

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

**In-vitro-Analyse des *apoptosis-related protein-2*:
Stellenwert des Potentials und die Grenzen
beim Zelltod von Melanomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Mutmid Ahmad

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referent: Dr. rer. nat. Simeon Santourlidis

Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Selimovic D, **Ahmad M**, El-Khattouti A, Hannig M, Haikel Y, Hassan M. Apoptosis-related protein-2 triggers melanoma cell death by a mechanism including both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysregulation; **Carcinogenesis**. 2011 Aug;32(8):1268-78. (**equally contributed**)

Zusammenfassung

Metastasierende Tumore wie das maligne Melanom sind häufig mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose verbunden, hervorgerufen durch verschiedene Ursachen. Daher ist der Erfolg einer systemischen Therapie des metastasierten Melanoms sehr gering.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, das *apoptosis-related protein (APR)-2 in vitro* funktionell zu charakterisieren, welches als ein Mediator in der Apoptose dazu beiträgt, dass die Resistenz von Melanomzellen gegen konventionelle Chemotherapie überwunden wird. Jene molekularen Mechanismen werden identifiziert, in denen das genannte Protein Apoptose in Melanomzellen auslöst. Um dies zu erreichen, wurden die Melanomzelllinien A375 und BLM eingesetzt und das lentiviral vermittelte Tet-On-Expressiossystem angewandt, um die Expression des APR-2 Proteins zu regulieren. Die Generierung und Etablierung stabiler Klone (A375/TetOn-APR-2 und BLM/TetOn-APR-2) diente der funktionellen Analyse des apoptotischen Potentials des *apoptosis-related protein (APR)-2*. Dabei wurden verschiedene zellbiologische und molekularbiologische Techniken und Verfahren angewandt.

Eine regulierte Expression des APR-2-Proteins wurde als Auslöser des Zelltods von Melanomzellen durch einen apoptotischen Mechanismus entdeckt. Dieser apoptotische Mechanismus ist durch die Freisetzung von Cytochrom c, die Aktivierung von Caspase-3, Caspase-9 und die Spaltung von PARP charakterisiert. Außerdem zeigte die detaillierte funktionelle Analyse des APR-2-Proteins, dass die subzelluläre Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum der Hauptakteur in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen ist. Es wurde festgestellt, dass die APR-2-induzierte Apoptose von Melanomzellen sowohl durch einen Stress des endoplasmatischen Retikulums als auch durch eine mitochondriale Dysregulation vermittelt wird. Der Stress des endoplasmatischen Retikulums ist charakterisiert durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung, die Aktivierung des *inositol requiring enzyme 1 α* (IRE1 α) und *calpain* sowie die Spaltung von Caspase-4. Die mitochondriale Dysregulation ist durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, die Spaltung von Caspase-9 und -3 und *poly adenosine diphosphate ribose polymerase* (PARP) gekennzeichnet. Ferner wurde die Aktivierung des *apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*, *c-jun-N-terminal kinase (JNK)* und der Transkriptionsfaktoren AP-1 und p53 sowie die Induktion der Bax-Expression in APR-2-exprimierenden Zellen festgestellt. Die Analyse der subzellulären Lokalisation des APR-2-Proteins und des proapoptotischen Proteins Bax mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot ergab den Nachweis einer Lokalisation an den Mitochondrien und am ER. Indessen zeigten die Experimente mit spezifischen Inhibitoren und der siRNA drei Signalwege für die APR-2-induzierte Apoptose. Der erste Weg ist *IRE1 α / tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 / ASK1 / JNK / Cyt.c / caspase-9 / caspase-3 / PARP*, der zweite umfasst *calpain / caspase-4 / caspase-9 / caspase-3 / PARP*. Der dritte Weg ist *protein kinase RNA-like ER kinase / ATF4 / C/EBP homologous protein (CHOP) / Bim*. Zusammenfassend zeigte die funktionelle Analyse von APR-2 seine Zuverlässigkeit als apoptotischer Mediator zur Überwindung der Melanomresistenz gegenüber Standardbehandlungen. Somit wird die Verwendung des APR-2-Gentransfers als ein alternativer Ansatz für die Melanombehandlung betrachtet.

Summary

Metastatic cancers such as melanoma are often associated with a growing resistance to apoptosis caused by different therapeutic modalities. However, the current systemic therapies of metastatic melanoma lead to minimal success.

The purpose of this work is to functionally characterize, *in vitro*, the ability of apoptosis-related protein (APR)-2 as an apoptotic mediator to overcome melanoma resistance to conventional therapy and to address the underlying molecular mechanisms which lead to apoptosis of melanoma cells triggered by APR-2. Therefore, melanoma cell lines namely A375 and BLM were designed for a tightly regulated expression of APR-2 using lentiviral Tet-On expression system. The generation and establishment of stable clones (A375/TetOn-APR-2 and BLM/TetOn-APR-2) were performed in order to functionally analyze the apoptotic potential of APR-2 using different cell biological and molecular biological techniques and procedures.

The tightly regulated expression of APR-2 protein was found to trigger melanoma cell death by an apoptotic mechanism. This apoptotic mechanism consists of release of cytochrome c, followed by activation of caspase-9, caspase-3 followed by cleavage of PARP. In addition, the functional analysis of APR-2 protein, in detail, demonstrated that the subcellular localization of APR-2 to endoplasmic reticulum is the main actor in modulation of APR-2-induced apoptosis of melanoma cells. APR-2-induced apoptosis of melanoma cells was found to be mediated not only by mitochondrial dysregulation but also by endoplasmic reticulum (ER) stress. ER stress is marked by the intracellular increase of Ca^{2+} release leading to activation of both, inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) and calpain, which is followed by cleavage of caspase-4. While the mitochondrial dysregulation is characterized by the loss of mitochondrial membrane potential leading to release of cytochrome c, followed by activation of caspase-9, caspase-3 and poly adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP). Further analysis of APR-2-induced apoptosis revealed its association with the activation of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1, c-jun-N-terminal kinase (JNK), the transcription factors p53 and AP-1 leading to induction of Bax expression. The analysis of the subcellular localization of APR-2 and the pro-apoptotic protein Bax by the use of western blotting and immune fluorescence staining revealed the localization of APR-2 at ER whereas Bax protein was localized at both ER and mitochondria. However, due to the experiments with specific inhibitors and siRNAs three parallel pathways for the induction of apoptosis by APR-2 could be addressed: the first pathway includes IRE1 α / TNF receptor-associated factor 2 / ASK1 / JNK / Cyt. c / caspase-9 / caspase-3 / PARP; the second pathway includes calpain / caspase-4 / caspase-9 / caspase-3 / PARP; and the third pathway includes protein kinase RNA-like ER kinase / ATF4 / C/EBP homologous protein (CHOP) / Bim. In conclusion, the functional analysis of APR-2 revealed its reliability as an apoptotic mediator to overcome melanoma resistance to standard treatments. Thus, the utilization of APR-2 gene transfer as an alternative approach for the melanoma treatment is considered.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius		Carboxamid (Darcabazin)
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotential	DTT	Dithiothreitol
A	Ampere	ECL	Elektrochemilumineszenz
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AP-1	<i>activator protein-1</i>	EGTA	Ethylenglycol-bis-tetraessigsäure
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
APR-2	<i>apoptosis-related protein-2</i>	ELK-1	<i>ets-like transcription factor 1</i>
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>	EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ATCC	American Type Culture Collection	ER	endoplasmatisches Retikulum
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>	ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>	FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FBS	fetales Rinderserum
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist / killer</i>	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	FLUO-3/AM	<i>1-[2-amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-'N,N,N',N'-tetraacetic acid pentaacetoxymethyl ester</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>	g	Gramm
BH3	<i>Bcl-2 homology domain 3</i>	g	Gravitationsfeldstärke
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
BSA	bovines Serumalbumin	GTP	Guanosintriphosphat
Ca²⁺	Calciumionen	h	Stunde
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>	IRE1α	<i>inositol-requiring protein 1α</i>
cDNA	komplementäre DNA	JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>	JNK	c-Jun N-terminale Kinase
cm²	Quadratcentimeter	Konz.	Konzentration
CO₂	Kohlenstoffdioxid	MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Cyt. c	Cytochrom c	MBP	Myelin-basisches Protein
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>	MEK	MAPK/ERK kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	min	Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	Mito. Fraction	mitochondriale Fraktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ml	Milliliter
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate	mM	Millimol
DOC	Desoxycholat		
Dox	Doxycyclin		
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline		
DTIC	Dimethyltriazenylimidazol-		

MPT pore	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>	RNA	Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	rtTA	Tetracyclin-regulierter Transaktivator
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
NaCl	Natriumchlorid	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
NaF	Natriumfluorid	s	Sekunde
ng	Nanogramm	siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
NHF	<i>normal human fibroblasts</i>	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
NHM	<i>normal human melanocytes</i>	TBE	TRIS-Borat-EDTA
nm	Nanometer	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
nM	Nanomol	TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
NP-40	Polyethylenglycol(40)-nonylphenoether	Tc	Tetracyclin
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase	TCA	Trichloressigsäure
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase	TNF	Tumornekrosefaktor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	TRE	<i>tetracycline response element</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
PERK	<i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>	U	Umdrehungen
PI	Propidiumjodid	UV	ultraviolett
p-IRE	phosphoryliertes <i>inositol-requiring protein 1a</i>	V	Volt
pM	Picomol	µCi	Mikrocurie
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>	µg	Mikrogramm
		µl	Mikroliter
		µM	Mikromol

Inhalt

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung des Melanoms	2
1.2 Chemotherapeutika und die Behandlung des Melanoms	3
1.3 Apoptose	4
1.4 Die Rolle von mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Signalwegen bei der Modulation antineoplastischer Effekte	6
1.5 APR-2	7
2 Das Ziel der Arbeit	9
3 Material und Methoden	10
3.1 Material	10
3.1.1 Zelllinien	10
3.1.2 Medium für die Zellkulturen	10
3.1.3 Chemikalien, Enzyme und Antikörper	10
3.1.4 Molekularbiologie-Kits	12
3.1.5 Detektionsfilm	12
3.1.6 Puffer und Lösungen für die DNA-Elektrophorese	13
3.1.7 Puffer für die Aufbereitung der Kernextrakte und Gesamtzellextrakte	13
3.1.8 Puffer und Lösungen für die Proteinelektrophorese und den Western Blot	15
3.1.9 Equipment	17
3.2 Methoden	18
3.2.1 Generierung von Melanomzelllinien mit regulierter APR-2-Expression	18
3.2.2 Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	18
3.2.3 Standard-PCR	19
3.2.4 Isolierung der RNA aus den Zelllinien	20
3.2.5 Aufbereitung der Zelllysate	20
3.2.6 Herstellung der Kernextrakte	21
3.2.7 Nachweis der Apoptose mit der Annexin V-/Propidiumjodid-Methode	21
3.2.8 Ermittlung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) mittels JC-1-Färbung	22
3.2.9 Western Blot	22
3.2.10 In-vitro-Kinase-Assay	23
3.2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	24
3.2.12 Ermittlung des Zellüberlebens durch das MTT-Assay	24
3.2.13 Immunfluoreszenzfärbung	25
3.2.14 Färbung des intrazellulären Calciums	25
3.2.15 Aufbereitung subzellulärer Fraktionen	25
3.2.16 Verwendung der siRNA	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Generierung der Melanomzelllinien mit regulierter APR-2-Expression	27
4.2 Der APR-2-induzierte Tod von Melanomzellen ist durch einen apoptotischen Mechanismus vermittelt	28
4.3 APR-2 triggert die Apoptose von normalen, humanen Melanozyten	31
4.4 Der APR-2-induzierte Effekt in Melanomzellen resultiert aus seiner Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum	33

4.5	APR-2 triggert in Melanomzellen Signalwege, die mit einem Stress des endoplasmatischen Retikulums assoziiert sind	35
4.6	Die APR-2-Expression aktiviert den ASK1/JNK-Signalweg	38
4.7	Die APR-2-induzierte Apoptose von Melanomzellen wird durch einen Stress des endoplasmatischen Retikulums über mitochondriale und nicht-mitochondriale Mechanismen vermittelt	43
4.8	Die Rolle von ATM in der Regulation der APR-2-induzierten Aktivierung von p53	48
4.9	Ein Knockdown der APR-2-Expression in Melanomzellen blockiert teilweise den Zytostatika-induzierten Zelltod	52
5	Diskussion	56
6	Fazit	61
7	Referenzen	63

1 Einleitung

Das maligne Melanom stellt einen der aggressivsten bösartigen Hauttumoren insbesondere der westlichen Bevölkerung dar (Messegueur et al., 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten im fortgeschrittenen Stadium mit einem Nachweis von Lymphknotenbeteiligung oder Fernmetastasen beträgt ca. 50% bzw. 10-20% (Elder et al., 2005). Gründe für diese schlechte Prognose sind u.a. einerseits die Tendenz, im Vergleich zu anderen Tumoren früh Metastasen zu bilden, sowie die Resistenz gegen eine konventionelle Chemotherapie (Monzon und Dancey, 2012).

Das maligne Melanom neigt dazu, früh in entfernte Organe wie das Gehirn, die Lunge, die Leber oder in die Knochen zu metastasieren (Werdin et al., 1988). Chirurgische Interventionen bei einem Nachweis von Metastasen sind von begrenztem Erfolg und führen nicht zu einer erhöhten Überlebensrate (Balch et al., 2001). Daher ist die Identifizierung von wirksamen Therapien zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms von großem Interesse (Li und McClay, 2002). Theoretisch sind Chemotherapeutika in der Lage, alle Metastasen zu erreichen. Jedoch sind die meisten zugelassenen Medikamente nicht ausreichend effizient (Soengas und Lowe, 2003). Neben der intrinsischen Resistenz zeichnet sich das metastasierte Melanom durch seine Fähigkeit aus, Resistenzen gegenüber den verfügbaren, therapeutischen Modalitäten zu entwickeln (Glinsky et al., 1997, Röckmann und Schadendorf, 2005). Diese intrinsischen und erworbenen Resistenzmechanismen führen zur Entgiftung und Methylierung, einem mangelhaften Wirkstofftransport (Pavel und Smit, 1996) sowie zur Zerstörung der apoptotischen Maschinerie und zur Aktivierung von DNA-Mechanismen (Morpurgo et al., 2012). Die Hauptursache für die Melanomresistenz bildet jedoch eine signifikante Dysregulation der Zelltodmaschinerie (Hou et al., 2011). Obwohl verschiedene Zytostatika für die Behandlung zur Verfügung stehen, sind die meisten dieser Therapeutika daher nicht ausreichend effektiv (Dillman et al., 2012). Infolgedessen ist die Wirksamkeit der systemischen Therapie im metastasierten Melanom minimal (Serrone et al., 2000, Bhatia et al., 2009). Dementsprechend wurde eine Dysregulation apoptotischer Mechanismen im Melanom beschrieben (Soengas und Lowe, 2003, Grossman und Altieri, 2001).

1.1 Die Entwicklung des Melanoms

Melanozyten stammen aus motilen Zellen der Neuralleiste und wandern in die Basalschicht der Epidermis (Thingnes et al., 2012). Neben weiteren Organellen enthalten diese Melanosomen, die das für die Pigmentierung der Haut verantwortliche Melanin produzieren, das Schutz vor Ultraviolettstrahlung bietet (Kanavy und Gerstenblith, 2011). Bei DNA-Schäden, die hauptsächlich durch UV-Licht verursacht werden, gerät das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und -tod von Melanozyten außer Kontrolle, was letztlich zur Tumorentwicklung führt (Zaidi et al., 2012).

Die histologische Einteilung des malignen Melanoms hängt von seinem Standort und der Progression ab (Lefevre et al., 2003). Unter Berücksichtigung der histologischen Kriterien werden folgende Stadien unterschieden: erworbene und angeborene Nävi ohne dysplastische Veränderungen; dysplastische Nävi mit struktureller und morphologischer Atypie; Melanome in der Radial-Wachstumsphase (RGP); Melanome in der Vertikal-Wachstumsphase (VGP) und das metastasierte Melanom (Weyers et al., 1999).

Die Entwicklung des kutanen Melanoms wird hauptsächlich durch eine signifikante Änderung der regulatorischen Moleküle des Signalwegs der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) bedingt (Romeo et al., 2012). In den meisten kutanen Melanomen wurden Defekte auf verschiedenen Ebenen am RAS / RAF / MEK / ERK-Signalweg nachgewiesen, die schließlich zu einer Deregulierung der Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt (Hatzivassiliou et al., 2010). Der RAS / RAF / MEK / ERK-Signalweg wird durch eine Aktivierung der GTPasen der RAS-Familie oder durch eine RAS-Mutation begonnen. Diese Kaskade führt zur Phosphorylierung des nuklearen Transkriptionsfaktors Ets, der Expression von Zellzyklusregulatoren einschließlich des Cyclin D (Bhatt et al., 2005), was schließlich zur Zellzyklusprogression, -differenzierung und -reifung und zur Regulation verschiedener Zellfunktionen wie Überleben und Apoptose führt (Yu et al., 2003). Eine regulierte Aktivierung solcher Wege ist für eine normale Zellfunktion essentiell, während eine abnorme Aktivierung des MAPK-Weges durch Mutationen mit einer Tumorentwicklung einschließlich des malignen Melanoms einhergeht (Dienstmann und Taberner, 2011). Dementsprechend wurden im primären und metastasierten Melanom Mutationen im MAPK-Weg sowie weitere genetische Veränderungen beschrieben (Zhang und Rosdahl, 2004).

1.2 Chemotherapeutika und die Behandlung des Melanoms

Die Resistenz des Melanoms gegenüber den gegenwärtigen medikamentösen Therapien ist auf intrinsische oder erworbene Faktoren zurückzuführen. Obwohl die verfügbaren Medikamente strukturell unabhängig sind und sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden, führt die klinische Anwendung bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung nicht zu einer relevanten Besserung (Gottesman et al., 2002). Die Chemoresistenz des Melanoms hängt von mehreren Faktoren ab. Einerseits kann die Konzentration des Chemotherapeutikums zu niedrig sein, andererseits kann die Erreichbarkeit des Wirkungsorts des Arzneimittels so eingeschränkt sein, dass der gewünschte Effekt nicht erreicht werden kann (Gottesman et al., 2002, Zhang et al., 1998). Grundsätzlich sind Chemotherapeutika dazu in der Lage, in jedem Stadium des metastatisierten Melanoms zu wirken. Die gegenwärtigen Behandlungen sind jedoch nicht zufriedenstellend (Soengas und Lowe, 2003).

Als Chemotherapeutikum wurde bisher hauptsächlich Dacarbazin eingesetzt, das zur Behandlung verschiedener Tumoren verwendet wird. Jedoch reagieren nur etwa 15% der Melanompatienten auf eine Behandlung mit Dacarbazin (Nardin et al., 2011). Zwar wird das progressionsfreie Intervall unter einer Anwendung von Dacarbazin erhöht, das Gesamtüberleben bleibt jedoch unverändert. Auch Behandlungen mit anderen Chemotherapeutika-Familien wie Nitrosoharnstoffen (Carmustin), Taxanen (Taxol), Vincaalkaloiden (Vinblastin, Vincristin) oder Platin-Komplex-Bildnern wie Cisplatin waren nicht vielversprechend (Li und McClay, 2002). Neben der konventionellen Chemotherapie ist eine Anwendung von Interferon alpha-2a als postoperative adjuvante Therapie üblich. Diese Zytokine aktivieren Immunzellen wie natürliche Killerzellen und Makrophagen und führen zu einer Hochregulation der Antigenpräsentation. Sie besitzen ferner die Fähigkeit, Apoptose direkt zu induzieren. Ihre Wirksamkeit wird jedoch kontrovers diskutiert (Sabel und Sondak, 2003). Eine weitere, verfügbare, postoperative adjuvante Therapie ist die Verwendung von hochdosiertem Interleukin-2 (IL-2). Leider hat sich herausgestellt, dass es hochtoxisch ist und die Antwortraten niedrig sind (Dillman et al., 2012).

Da es bisher keine Therapien gibt, die das Überleben signifikant verbessern, ist es notwendig, Signalwege zu identifizieren, um die Melanomresistenz zu überwinden (Tawbi

und Kirkwood, 2007).

1.3 Apoptose

Apoptose ist ein Synonym für einen programmierten Zelltod. Es handelt sich um einen natürlichen Zelltod als Folge von Zellschäden (Wyllie, 1997). Sie ist notwendig, um den Körper vor dem Einfluss genetisch geschädigter Zellen zu schützen, die in der Lage sind, Tumorgewebe zu bilden (Thompson et al., 1992). Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle nicht nur bei der Embryo- und Organogenese, sondern auch bei der Erhaltung der Zellhomöostase (Dang, 2012). Ferner ist die Apoptose für die Funktion des Immunsystems notwendig (Cummings et al., 1997). Somit ist die Apoptose ein fester Bestandteil für die Entwicklung und Erhaltung mehrzelliger Organismen.

Morphologisch ist die Apoptose durch die Kondensation von Chromatin charakterisiert (Wyllie et al., 1981). Wird ein programmierter Zelltod eingeleitet, so separiert sich die Zelle von den benachbarten Zellen und durchläuft Prozesse, die letztlich zur Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Bildung eines Apoptosekörperchens führen (Radović et al., 2008). Während dieser Prozesse beginnt das nukleäre Chromatin, Massen entlang der Kernhülle zu bilden, bevor sich der Kern selbst in Fragmente aufteilt (Wyllie, 1997). Als Nächstes spaltet sich die ganze Zelle in membrangebundene apoptotische Körper, die die Zellorganellen enthalten (Catchpoole und Stewart, 1995). Diese werden schließlich durch die Makrophagen vernichtet, sodass eine entzündliche Reaktion vermieden wird (Wyllie et al., 1997).

Die Mechanismen, die zur Apoptose führen, sind komplex und beinhalten ein Muster von organisierten molekularen Ereignissen in Form einer Kaskade. Es wurde festgestellt, dass die Apoptose durch zwei Hauptkaskaden vermittelt wird: durch den extrinsischen / Todesrezeptor-abhängigen Weg und durch den intrinsischen / mitochondrial bedingten Weg (Zeng et al., 2012).

Der extrinsische Weg wird durch eine Aktivierung der Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Genfamilie durch einen Liganden eingeleitet (Locksley et al., 2001). Bei ihrer Aktivierung werden Todessignale von der Zelloberfläche auf intrazelluläre Signalwege übertragen (Cetindere et al., 2010). Die am besten charakterisierten Todesrezeptoren sind die Fas-Rezeptoren und der TNF-Rezeptor Typ1. Nach ihrer Aktivierung durch den entsprechenden Liganden, Agonisten oder Antagonisten werden zytoplasmatische Adaptorproteine rekrutiert, sodass sich ein todesinduzierender

Signalisierungskomplex (*death-inducing signaling complex*) (Disc) entwickelt. Dieser hat die Fähigkeit, die autokatalytische Aktivierung von Procaspase-8 zu initiieren (Kischkel et al., 1995).

Im Gegensatz zum extrinsischen Weg wird der intrinsische Signalweg durch nicht-rezeptorvermittelte Stimuli initiiert. Diese Stimuli induzieren Veränderungen im Bereich der inneren mitochondrialen Membran (Serrano et al., 2011), was eine Zunahme des *mitochondrial permeability transition (MPT) pore* zur Folge hat (Grubb et al., 2001). Folglich tritt ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ein, was zur Freisetzung von Cytochrom c führt, das für die Bildung des Apoptosoms notwendig ist (Saelens et al., 2004). Das Apoptosom resultiert aus der Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 und Procaspase-9 (Chinnaiyan, 1999, Hill et al., 2004). Neben Cytochrom c existiert eine zweite Gruppe proapoptotischer Proteine, die den intrinsischen apoptotischen Weg vermitteln können. Hierzu gehören u.a. der *apoptosis inducing factor* (AIF), die Endonuklease G und CAD (Widlak und Garrard, 2005, Chhabra et al., 2006). Schließlich führt der intrinsische apoptotische Weg ebenfalls zur Kondensation des nukleären Chromatins (Susin et al., 2000).

Die Regulation des mitochondrialen apoptotischen Wegs wird durch Proteine der Bcl-2-Familie vermittelt, wobei Bcl-2 selbst anti-apoptotisch ist (Kang und Reynolds, 2009). Die Hauptfunktion der an der mitochondrialen Membran lokalisierten Proteine der Bcl-2-Familie besteht in der mitochondrialen Dysregulation und somit Freisetzung des Cytochroms c, sodass die Bildung des Apoptosoms ermöglicht wird (Adrain et al., 2001). Eine weitere wichtige Rolle bei der Regulation des mitochondrialen apoptotischen Wegs spielt das Tumorsuppressor-Protein p53. Im Mitochondrium induziert es eine Oligomerisation von Bax und Bak und antagonisiert die antiapoptotischen Effekte von Bcl-2 (Amaral et al., 2010). Weitere wichtige Proteine der Bcl2-Familie sind Puma und Noxa, die ebenfalls an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt sind (Hussein et al., 2003). Der extrinsische und der intrinsische Weg konvergieren in der Ausführungsphase, dem finalen Schritt des apoptotischen Prozesses. Hier werden zytoplasmatische Endonukleasen und Proteasen durch Effektorcaspasen aktiviert (Guchelaar et al., 1997). Folglich werden nukleäre und zytoskelettale Proteine abgebaut. Caspase-3 gilt hierbei als eine der wichtigsten Effektorcaspasen. Sie aktiviert spezifisch die Endonuklease CAD, die somit eine Caspase-aktivierte DNase darstellt (Sakahira et al., 1998). Die aktivierte CAD löst schließlich den Abbau der chromosomalen DNA aus, sodass es zur Chromatinkondensation kommt (Widlak, 2000).

1.4 Die Rolle von mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Signalwegen bei der Modulation antineoplastischer Effekte

Zwar ist die Apoptose als ein aktiver, programmierter Zelltod identifiziert, der sowohl durch physiologische als auch pathologische Stimuli initiiert oder gehemmt werden kann (Kerr et al., 1972), dennoch sind die Regulationsmechanismen komplex und nicht vollständig verstanden. Es sind zwei Hauptwege für die Apoptose, nämlich der extrinsische, Todesrezeptor-vermittelte Weg und der intrinsische, mitochondrial-vermittelte Weg, bekannt (Zeng et al., 2012).

Die Rolle der Mitochondrien bei der Apoptose von Säugetierzellen wurde erstmals nach der Identifizierung mehrerer mitochondrialer Proteine erkannt, die unmittelbar an der Regulation des Zelltods beteiligt sind (Liu et al., 1996, Susin et al., 1999; Du et al., 2000, Verhagen et al., 2000, Li et al., 2001). Diese Proteine, einschließlich des Cytochroms c und des *apoptosis inducing factor* (AIF), sind im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. Somit wird durch eine Zerstörung der äußeren mitochondrialen Membran durch apoptotische Stimuli die Freisetzung von Cytochrom c und AIF in das Cytosol und / oder den Zellkern bedingt. Hier ermöglicht diese die Bildung des Apoptosoms (Saelens et al., 2004). Außerdem haben sie die Fähigkeit, den Zelltod voranzutreiben, indem sie Caspasen und Nukleasen aktivieren oder zytoplasmatische Inhibitoren der Apoptose neutralisieren (Ravagnan et al., 2002).

Cytochrom c ist ein Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette. Dementsprechend führt die Freisetzung von Cytochrom c in das Cytoplasma, als Reaktion auf den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, zur Aktivierung von Caspasekaskaden durch einen Mechanismus, der eine Bindung des *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) enthält. Dieses ist ein zytosolisches Protein, das eine *caspase recruitment domain* (CARD) enthält sowie eine Nukleotid-bindende Domäne und mehrere *WD-40 repeats* (Liu et al., 1996, Zou et al., 1997).

Das Apoptosom besteht aus einem Multimerkomplex aus Apaf-1- und Cytochrom c (Zou et al., 1999). Nach der Bindung an das Apoptosom wird Procaspase-9 effizient gespalten und beginnt, nachgelagerte Effektorcaspasen wie Caspase-3 zu aktivieren (Rodriguez und Lazebnik, 1999). Diese Effektorcaspasen spalten anschließend viele wichtige intrazelluläre Substrate. Dies führt zu den charakteristischen morphologischen Veränderungen in der

Apoptose einschließlich der Chromatinkondensation, der nukleosomalen DNA-Fragmentierung, dem Kernmembran-Abbau sowie der Externalisierung von Phosphatidylserin und Bildung von apoptotischen Körpern (Hengartner, 2000). Das endoplasmatische Retikulum (ER) dient der Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumhomöostase, ermöglicht ferner eine korrekte Proteinfaltung und posttranslationale Modifikation sowie deren Sortierung und Transport (Araki und Nagata, 2011). Dementsprechend führen große Veränderungen der Calciumhomöostase und eine Akkumulation von entfaltenen Proteinen zu einem Stress des ER (Yoneda et al., 2001). So verursachen sowohl oxidativer Stress als auch verschiedene Mittel wie Inhibitoren der Protein-Glycosylierung oder der Calcium-Homöostase und chemische Toxizide einen Stress des ER (Lee, 2001). Darüber hinaus können Proteine mit pro-apoptischer Funktion wie Noxa, die sich am ER befinden, die ER-Membranintegrität zerstören (Hassan et al., 2008).

Diese relative Rolle des ER-Stresses in der Modulation der Apoptose ist nicht ausführlich beschrieben. Aus mehreren Studien geht jedoch die Beteiligung von mehreren Wegen in der Modulation der Apoptose hervor, die mit dem Stress des ER assoziiert sind (Rahmani et al., 2010; Hiscutt et al., 2010). Allerdings konvergieren in den meisten Fällen die Wege am Mitochondrium (Corazzari et al., 2007).

Aus vorangehenden Studien geht hervor, dass eine anhaltende Calciumakkumulation in der mitochondrialen Matrix durch einen Stress des ER induziert wird. Der Stress des ER ruft einen Mechanismus hervor, der zu einer Erhöhung der Permeabilität, Störung des elektrochemischen Potentials und Verlagerung der *BH3-only proteins* an die Mitochondrien gekennzeichnet ist. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c in das Zytoplasma und anschließend zur Aktivierung von nachgeschalteten Caspasen, die letztlich zur Apoptose führen (Li und McClay, 2002, Deniaud et al., 2007).

1.5 APR-2

Das APR-2-Protein gehört zu einer Proteinfamilie, die für die Fas-induzierte Apoptose in verschiedenen Tumorzelltypen einschließlich des Melanoms entscheidend ist (Hassan et al., 2005). Außerdem ist diese Proteinfamilie essentiell für die Apoptose von Promyelozytenleukämie-Zellen, die durch All-trans-Retinsäure induziert wird (Zhu et al., 2000). Weitere Analysen des APR-2-Proteins in Melanomzellen konnten die pro-apoptische Funktion bestätigen. Diese wird durch ihre subzelluläre Lokalisierung am

endoplasmatischen Retikulum bedingt, dessen Stress der initiale Schritt in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose zu sein scheint.

2 Das Ziel der Arbeit

Obwohl die verfügbaren Chemotherapeutika grundsätzlich alle Metastasen erreichen können, ist die Gesamtwirksamkeit nicht ausreichend. Daher ist die Entwicklung alternativer therapeutischer Ansätze von großem Interesse.

Das *apoptosis-related protein* (APR)-2 ist ein proapoptotischer Mediator und spielt eine Rolle in der Modulation der Chemotherapeutika-induzierten Apoptose verschiedener Tumorzellen einschließlich der Melanomzellen. Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Zuverlässigkeit des APR-2 Proteins bei der Behandlung des metastasierten Melanoms *in vitro* zu charakterisieren, die molekularen Mechanismen zu identifizieren und zu spezifizieren, die für die Modulation der proapoptotischen Funktion in den Melanomzelllinien verantwortlich sind.

1. Generierung von Melanomzellen mit einer regulierten Expression von APR-2 durch Verwendung des Tetracyclin-Expressionssystems
2. In-vitro-Analyse der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen
3. Analyse der APR-2-Proteinexpression in Melanomzelllinien in Abhängigkeit von der Exposition gegenüber Zytostatika unter Verwendung der Western-Blot-Methode
4. Analyse der Wirkung von Zytostatika auf den APR-2-induzierten Zelltod in Melanomzellen unter Verwendung des MTT-Assays
5. Analyse des Knockdowns von APR-2 unter Zytostatika-induziertem Zelltod mittels MTT-Assay
6. Identifizierung und Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die zur APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die Melanomzelllinien A375 und BLM (ATCC: *American Type Culture Collection*) sowie normale menschliche Melanozyten (NHM: *normal human melanocytes*) und normale menschliche Fibroblasten (NHF: *normal human fibroblasts*) waren Geschenke von Dr. A. Mirmohammadsadgh (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bochum). Die Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12) ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum (FBS: *fetal bovine serum*), 2 mM Glutamin und 1% antibiotischer Lösung bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO₂ gehalten.

3.1.2 Medium für die Zellkulturen

DMEM/F12 (1:1)-medium: Serva (Heidelberg, Deutschland)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS): Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Doxycyclin: Clontech (Palo Alto, USA)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland)

Fetal Bovine Serum (FBS): Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland)

Genticin: Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland)

Tetracyclin: Clontech (Palo Alto, USA)

Trypsin/EDTA Solution: Seromed/Biochem (Berlin, Deutschland)

3.1.3 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien, Enzyme und Antikörper von höchster Reinheit verwendet und von folgenden Unternehmen erworben: Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), Biometra (Göttingen, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland), GE Healthcare / Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland), Perkin Elmer (New Jersey, USA), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Upstate Biotechnology (Eching, Deutschland), Genecraft (Münster, Deutschland), Boehringer-Ingelheim (Heidelberg, Deutschland), Clontech (Palo Alto, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland), Chemicon (Hofheim, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,

USA), Calbiochem (Bad Soden, Deutschland), Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland), Invitrogen (Lauch, Niederlande) und Biolabs (Schwalbach, Deutschland).

Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP): Sigma (St. Louis, USA)

Agar: Difco Laboratories (Detroit, USA)

AMV Reverse Transkriptase: Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Biotherm-Taq DNA-Polymerase: Genecraft (Münster, Deutschland)

Cell Proliferation Kit (MTT): Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP): Sigma (St. Louis, USA)

Glutathion-Sepharose: Pharmacia (Freiburg, Deutschland)

NaCl: Difco Laboratories (Detroit, USA)

Poly-T-oligonukleotid: Birsner / Grob (Denzlingen, Deutschland), Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Protease-Inhibitor (Tabletten): Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Proteinase K: Sigma (St. Louis, USA)

Restriktionsenzyme: Genecraft (Münster, Deutschland)

RNAse A: Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

RNAse-Inhibitor: Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Lachssperma DNA: Stratagene (Heidelberg, Deutschland)

T4-Ligase: Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Trypton: Difco Laboratories (Detroit, USA)

Enzyme für die RT-PCR

RT-Enzyme: Genecraft (Münster, Deutschland)

Taq-Polymerase: Genecraft (Münster, Deutschland)

dNTP-Nukleotide: Genecraft (Münster, Deutschland)

Primers: Genecraft (Münster, Deutschland)

Antikörper

Primärantikörper

Anti-p38: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Anti-JNK: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Anti-ERK: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Anti-PARP: Cell Signaling Technology (Santa Cruz, USA)

Anti-Actin SC-1615: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Sekundärantikörper

Alkaline phosphatase anti-rabbit: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Alkaline phosphatase anti-mouse: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Alkaline phosphatase anti-goat: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

3.1.4 Molekularbiologie-Kits

Qiagen Plasmid Isolation Kit: Qiagen (Hilden, Deutschland)

QIAquick PCR Purification/Gel Extraktion/Nucl. Removal Kit: Qiagen (Hilden, Deutschland)

Rneasy für RNA-Extraktion: Qiagen (Hilden, Deutschland)

Bio-Rad Protein Assay Kit: Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)

Substrate für das in-vitro-Kinase Assay

MBP: Biomol (Hamburg, Deutschland)

MAP Kinase-Inhibitor: Biomol (Hamburg, Deutschland)

GST-c-jun: Biomol (Hamburg, Deutschland)

Protein A agarose conjugate: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

Oligonukleotide für das Band Shift Assay

AP-1-Oligonukleotide: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

ATF-2-Oligonukleotide: Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

ELK-1-Oligonukleotide Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

3.1.5 Detektionsfilm

Hyperfilm ECL: GE Healthcare / Amersham Biosciences (Amersham, Vereinigtes Königreich)

3.1.6 Puffer und Lösungen für die DNA-Elektrophorese

0.5-facher TBE Puffer (TRIS-Borat-EDTA)

0.045 M TRIS-Borat

0.001 M EDTA

1-facher TAE Puffer (TRIS-Acetat-EDTA)

0.04 M TRIS-Acetat

0.001 M EDTA

6-facher Ladepuffer

0.25% Bromophenolblau

0.25% Xylencyanol FF

30% Glycerin in Wasser, gut vermischt und bei 4 °C gelagert

3.1.7 Puffer für die Aufbereitung der Kernextrakte und Gesamtzelleextrakte

RIPA Lysepuffer

50 mM Tris (pH 8.0)

150 mM NaCl

1.0% NP-40

0.5% DOC

0.1% SDS

Modifizierter RIPA Lysepuffer

50 mM Tris (pH 7.4)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM Na₃VO₄

1 mM NaF

1.0% NP-40

0.25% DOC

NP-40 Lysepuffer

50 mM Tris (pH 8.0)

150 mM NaCl

1.0% NP-40

High salt Lysepuffer

50 mM Tris (pH 8.0)

500 mM NaCl

1.0% NP-40

Low salt Lysepuffer

50 mM Tris (pH 8.0)

1.0% NP-40

Buffer A

20 mM HEPES; pH 7.9

10 mM NaCl

0.2 mM EDTA

2 mM DTT

Der Puffer wird bis zur Anwendung bei 4 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Anwendung wird der Protease-Inhibitor dem Buffer A hinzugefügt (1 Volumeneinheit Protease-Stammlösung in 24 Volumeneinheiten Buffer A).

RL-Buffer

20 mM HEPES, pH 7.5

10 mM EGTA

40 mM beta-Glycerophosphat

25 mM MgCl₂

2 mM Natriumorthovanadat

1 mM DTT

1% NP-40

Die Proteaseinhibitoren wurden unmittelbar vor der Verwendung hinzugefügt.

Buffer C

20 mM HEPES; pH 7.9

0.75 mM Spermidin

0.15 mM Spermin

420 mM NaCl

0.2 mM EDTA

2 mM DTT

25% Glycerol

Der Puffer wird bis zur Anwendung bei 4 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Anwendung wird der Protease-Inhibitor dem Buffer C hinzugefügt (1 Volumeneinheit Protease-Stammlösung in 24 Volumeneinheiten Buffer A).

Protease-Inhibitor

Die Stammlösung des Protease-Inhibitors wird in 25-facher Konzentration hergestellt, bei -20 °C aufbewahrt und dem herzustellenden Puffer hinzugefügt.

3.1.8 Puffer und Lösungen für die Proteinelektrophorese und den Western Blot

30%ige Acrylamid-Stammlösung

30 g Bisacrylamid (19:1)

Die Lösung wird mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 100 ml angehoben. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C.

4-facher Resolving buffer

181.7 g TRIS

40 ml 10% SDS

Der pH-Wert wird auf 8,8 eingestellt und die Lösung mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1Liter angehoben. Die Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur.

4-facher Stacking buffer

60.6 g TRIS

40 ml 10% SDS

Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt und die Lösung mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1 Liter angehoben. Die Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur.

5-facher Running buffer

15 g TRIS

72 g Glycin

Die Lösung wird mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1 Liter angehoben und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

1-facher Running buffer

200 ml 5x Running buffer stock

0.1% SDS

Die Lösung wird mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1Liter angehoben.

Färbelösung

25% Isopropanol

10% Essigsäure

0.25% Coomassie-Brilliant-Blau (R250)

Das Gesamtvolumen wird mit Wasser auf 800 ml angehoben.

Entfärbelösung

7% Essigsäure

2-facher Ladepuffer

15 g TRIS

72 g Glycin

0.25 mg Bromphenolblau

2.0 ml Glycerin

0.5 ml β -Mercaptoethanol

2.0 ml 10% SDS

2.5 ml 4x Stacking buffer

Das Gesamtvolumen wird mit entionisiertem Wasser auf 10 ml angehoben. Die Aufbewahrung erfolgt bei Raumtemperatur.

Transferpuffer

14.4 g Glycin

3.025 g TRIS

200 ml Methanol

Der pH-Wert wird auf 8,3 eingestellt und die Lösung mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1 Liter angehoben.

10-facher TBS Puffer

100 mM TRIS

1.5 M NaCl

Der pH-Wert wird auf 8,3 eingestellt und die Lösung mit entionisiertem Wasser auf eine Gesamtmenge von 1 Liter angehoben.

Blot solution A

5% BSA

100 ml 10x TBS

Das Gesamtvolumen wird mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter angehoben.

Blot solution B

5% BSA

100 ml 10x TBS

0.10% Triton X-100

0.05% Tween 20

Das Gesamtvolumen wird mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter angehoben.

Waschlösung

0.10% Triton X-100

0.05% Tween 20

100 ml 10x TBS

Das Gesamtvolumen wird mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter angehoben.

3.1.9 Equipment

Zentrifugen:

Zentrifuge 5415 D und Zentrifuge 5414 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Biofuge 28 RS (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland)

DNA-Gelelektrophorese-Apparat, breite Mini- und Mini-Zellen für die DNA-Agarose-Elektrophorese mit Stromversorgung (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)

PCR T3-Thermocycler (Biomtra, Göttingen, Deutschland)

Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Braunschweig, Deutschland)

Polymax 1040 Shaker (Heidolph, Kelheim, Deutschland)

MS1 Minishaker (Ika, Staufen, Deutschland)

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Zelle (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)

UV-Transilluminatoren, Wellenlänge 302 nm und UVT-20M (Herolab, Wiesloch, Deutschland)

UV-Kammer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Generierung von Melanomzelllinien mit regulierter APR-2-Expression

Die Melanomzellen (A375-TetOn und BLM-TetOn) wurden unter Verwendung des TetOn-Expressionssystems (Clontech, Mountain View, USA) nach bekanntem Protokoll generiert (Hassan et al., 2009, Hassan et al., 2004, Erhardt et al., 2002). Die Generierung und Selektion von A375-TetOn-APR-2 und BLM-TetOn-APR-2 wurde von Dr. Selimovic am Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale in Straßburg durchgeführt. Hierfür wurden die Melanomzelllinien (A375 und BLM) mit dem pTetOn-Plasmid transfiziert. 48 Stunden später wurden die transfizierten Zellen unter Anwendung von G418 (600 µg/ml) selektiert. Nach sechs Wochen wurden einzelne Klone ausgewählt, bevor eine Vermehrung ermöglicht wurde. Die Klone (A375-TetOn und BLM-TetOn) wurden schließlich mit dem pTRE2hyg-Luciferase-Vektor transfiziert und im Anschluss auf ihre Induktionseffizienz durch Zugabe von Doxycylin (10 ng/ml) für 24 Stunden getestet. Der Induktionsgrad jedes Klons wurde unter Verwendung des Luciferase-Assays nach bekanntem Protokoll bestimmt (Hassan et al., 2007, Hassan et al., 2005). Für die Transfektion mit pTRE2hyg-APR-2 wurden schließlich Klone mit hohem Induktionsniveau und niedrigem Hintergrund ausgewählt. Diese selektierten Zellen wurden in Gegenwart von G418 (600 µg/ml) und Hygromycin (300 µg/ml) kultiviert. Aus dieser Zellgruppe wurden Klone ausgewählt, isoliert und expandiert. Mittels quantitativer reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wurden die selektierten Zellen auf die APR-2-Expression untersucht. Für die funktionelle Analyse des APR-2-Proteins wurden Klone mit hohen Induktionsniveaus ausgewählt.

3.2.2 Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Synthese der Erststrang-cDNA

Um die cDNA zu amplifizieren, die das APR-2-Protein kodiert, wurden folgende Primer verwendet:

APR-2-Sense : 5'- GCG AGA GCC GCA GAA GAG AA -3'

APR-2- Antisense : 5'- AGG GGC GGA ATA ACC CCT AG -3'

GAPDH-Sense : 5'- TGC CAT CAA CGA CCC CTT CA -3'

GAPDH-Antisense : 5'- TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG -3'

Die Synthese des ersten Strangs wurde unter Verwendung von reverser Transkriptase gemäß der Anleitung des Herstellers (Roche) durchgeführt.

Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert:

Reverse Transkription: 30 min 50 °C

Initiale PCR-Aktivierung: 5 min 94 °C

Denaturierung: 1 min 94 °C 35 Zyklen

Primerhybridisierung: 1 min 60 °C 35 Zyklen

Elongation: 1 min 72 °C 35 Zyklen

Finale Elongation: 10 min 72 °C

Die Analyse der PCR-Produkte wurde auf einem 2%igen Agarosegel durchgeführt.

Synthese der Zweitstrang-cDNA

Die Zweitstrang-cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des ersten cDNA-Strangs als Schablone durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte durch Mischen von 1x PCR-Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl; pH 8,4; 500 mM KCl, 10 mM Dithiothreitol und 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM Desoxynukleotidmischung, 20 pM Upstream Primer, 20 pM Downstream Primer; 2,5 U/100µl Taq-DNA-Polymerase (Sigma, St.Louis, USA); 5 µl Erststrang-cDNA. Das Amplifikationsverfahren wurde im PCR-Cycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Reaktionsmischung wurde in 5 Minuten bei 94 °C denaturiert und dann 35 Zyklen einer Denaturierung für 1 Minute bei 94 °C unterzogen. Schließlich folgte das einminütige Abkühlen (Temperatur variabel) und die Polymerisation für 1 Minute bei 72 °C. Für die Analyse der PCR-Produkte wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet.

3.2.3 Standard-PCR

Die Standard-PCR-Reaktionen wurden in Volumina von je 100 µl unter Verwendung des GeneAmp PCR Systems 9700 von Applied Biosystems durchgeführt. Hierbei wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Expand High Fidelity PCR System Polymerase mit dem mitgelieferten Puffer 2, 100 ng Template DNA, 30 pM des jeweiligen Primers, jeweils 10 mM dNTPs. Der Zyklus wurde protokollgemäß mit der Denaturierung für 3 Minuten bei

94 °C begonnen. Im Anschluss folgte das Abkühlen der Primer für 30 Sekunden bei 50 °C und die Polymerisation für 3 Minuten bei 72 °C. Es folgte eine abschließende Polymerisation für 7 Minuten bei 72 °C. Für die Analyse wurden die PCR-Proben nach Anweisung mit SYBR Green markiert. Die fluoreszierenden PCR-Fragmente wurden auf 0,8-1,5%igem Agarosegel, die mit 1x TBE hergestellt wurden, getrennt und mit dem GeneGenius Bio Imaging System von Syngene sichtbar gemacht. Alternativ kann die lineare DNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyser nach Herstelleranweisung unter Verwendung der DNA 1000-, DNA 7500- oder DNA12000-Chips analysiert werden. Zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Fragmente mit dem Qiaquick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Deutschland) gereinigt. Für die Isolierung aus dem Agarosegel wurde die Gelextraktionsmethode verwendet.

3.2.4 Isolierung der RNA aus den Zelllinien

Die Gesamt-RNA wurde aus den Zelllinien A375 und BLM unter Verwendung des Rneasy Mini Kits (Qiagen, Deutschland) nach Herstelleranweisung isoliert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 500µl RLT-Buffer lysiert. Das Zelllysate wurde schließlich in eine QIA-shredder-Säule gegeben und bei 10.000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Nach der Gabe desselben Volumens Ethanol (70%ig) wurde das Lysat durch Pipettieren gut vermischt, bis es in eine Spin-Säule für das Rneasy Mini Spin gegeben und für 1 Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert wurde. Das Lysat wurde im Anschluss mit 500 µl RW1-Puffer durch Zentrifugation bei 10.000 U/min für 1 Minute gewaschen. Nach einer erneuten Waschung mit RPF-Puffer wurde der Inhalt in ein neues Sammelröhrchen gegeben und erneut bei 10.000 U/min für weitere 2 Minuten zentrifugiert. Es folgte eine Elution der Gesamt-RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurde die Gesamt-RNA durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 10.000 U/min gesammelt. Nach einer Bestimmung der Konzentration der Gesamt-RNA wurde sie bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Aufbereitung der Zelllysate

Nach zwei Waschungen mit eiskaltem PBS wurden die A375- und BLM-Zellen in 500 µl RL-Puffer lysiert und bei 4 °C für 10 Minuten inkubiert. Das Zelllysate wurde mit einem Gummischaber abgetragen, gesammelt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Herstellung der Kernextrakte

Die Herstellung der Kernextrakte wurde bei 4 °C nach bekanntem Protokoll durchgeführt (Selimovic et al., 2011). Nach einer Waschung der Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer wurden die Zellen unter Zugabe von 500 µl Puffer A (20 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM NaCl, 0,2 mM EDTA und 2 mM DTT), der einen Protease-Inhibitor in einer Konzentration von 1:25 enthält, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend geerntet. Nach der Zentrifugation bei 14.000 U/min für 3 Minuten wurde der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 50 µg Puffer C (20 mM HEPES, pH 7,9, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM Natrium-Vanadat 25% Glycerin), der ebenfalls einen Protease-Inhibitor in einer Konzentration von 1:25 enthält, resuspendiert, für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und schließlich bei 14.000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, ohne das Pellet zu stören, und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.2.7 Nachweis der Apoptose mit der Annexin

V-/Propidiumjodid-Methode

Der Nachweis der Apoptose erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung der Annexin V- und Propidiumjodid (PI) -Färbung nach bekanntem Protokoll (Selimovic et al., 2011). Nach der Induktion der Expression von APR-2 durch Zugabe von Doxycyclin zum Kulturmedium für die angegebenen Zeitperioden wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und dann trypsiniert. Nach erneuter, zweimaliger Waschung in eiskaltem PBS wurden die Zellen in 1x Bindungspuffer (Invitrogen) resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 5 µl Annexin V-FITC (Vybrant, Invitrogen) und 5 µl PI (100 µg/ml) in 100µl der Zellsuspension gegeben und eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Prozedur wurde die Zellsuspension vor Lichteinfluss geschützt. Schließlich wurden 400 µl Bindungspuffer zu den Proben gegeben, die bis zur Analyse eiskalt gehalten wurden. Die Fluoreszenzsignale des FITC und des PI wurden unter Anwendung der Fluorochrome FL1 bei 518 nm und FL2 bei 620 nm auf einem FACS-Calibur (Becton Dickinson Biosciences) nachgewiesen. Schließlich wurden apoptotische Melanomzellen (Annexin V-positiv/PI-negativ) quantifiziert.

3.2.8 Ermittlung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) mittels JC-1-Färbung

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurde durch die Durchflusszytometrieanalyse unter Verwendung der JC-1-Färbung nach bekanntem Protokoll bestimmt (Selimovic et al., 2011). Nach einer Wachstumsphase der Melanomzelllinien A375 und BLM für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen wurde die APR-2-Expression durch Zugabe von Doxycyclin für die jeweiligen Zeitperioden induziert. Nach der Ernte wurden die Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biotrend, Köln, Deutschland) mit JC-1 (10 μ M) für 30 Minuten unter Standard-Zellkulturbedingungen gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension (500 μ l) einer Durchflusszytometrieanalyse unterzogen, um den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) zu bestimmen. Die Farbumwandlung der Substrate von der grünen (520-530 nm) in die rote Fluoreszenz (550 nm) von 50.000 Einzelzellen wurde auf dem FACS-Calibur (Becton Dickinson Biosciences) analysiert.

3.2.9 Western Blot

SDS-PAGE

Gemäß Standardverfahren wurden für die Analyse der Zellproteine 10- bis 15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Als Standardprotein wurde der *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare / Amersham Biosciences) verwendet. Die Aufbereitung der Proteinproben erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 μ l mit 5 μ l von 5 \times SDS-Probenpuffer, das für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf die SDS-PAGE-Gele geladen. Die Minigels wurden in einer Mini-Protean II-Elektrophoresezelle (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) bei 100 bis 200 V betrieben.

Proteintransfer und Detektion des spezifischen Signals (Western Blot)

Die Übertragung der Proteine aus der SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) erfolgte in einer Biometra-Einheit auf eine 0,45 μ m dicke Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Protonentransfermembran (Amersham Pharmacia Biotech,

Braunschweig, Deutschland) unter Verwendung eines Transferpuffers für eine Stunde bei 120 V. Hierfür wurden die PVDF-Protonentransfermembranen mit Methanol vorinkubiert. Unter konstantem Rühren folgte eine Blockierung der Western Blots in 5% Trockenmilch über Nacht bei 4 °C. Schließlich wurden die Blots dreimal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer (PBS + 0,1% Tween 100) gewaschen. Die gewaschenen Blots wurden mit dem in 1% Trockenmilch verdünnten, primären Antikörper (monoklonaler Antikörper 1: 1000 und polyklonaler Antikörper 1: 500) unter konstantem Rühren über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine dreimalige, jeweils 15-minütige Waschung der Blots bei Raumtemperatur. Mit dem sekundären Antikörper, der in 1% Trockenmilch (im Verhältnis 1:2000) verdünnt wurde, wurden die Blots erneut für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer abschließenden, dreimaligen Waschung der Western Blots für je 15 Minuten wurde das spezifische Signal unter Verwendung von ECL-Western-Blotting-Nachweisreagenzien (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig, Deutschland) erfasst.

3.2.10 In-vitro-Kinase-Assay

Die In-vitro-Kinase-Assays wurden gemäß bekanntem Protokoll durchgeführt (Selimovic et al., 2011). Nach einer Wachstumsphase der Melanomzelllinien A375 und BLM für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen wurde die APR-2-Expression durch Zugabe von Doxycyclin für die jeweiligen Zeitperioden induziert. Nach einer zweimaligen Waschung mit eiskaltem PBS wurden die Zelllysate unter Verwendung von Puffer L (20 mM HEPES [pH 7,9], 10 mM EGTA, 40 mM β -Glycerophosphat, 25 mM $MgCl_2$, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, 1% NP-40, 5 μ g Apoprotein, 1 mM Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin und 1 mM Benzamidin) aufbereitet. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt. Das Zelllysate wurde mit dem gewünschten spezifischen Antikörper inkubiert, um die interessierende Kinase für eine Stunde bei 4 °C immunpräzipitieren zu lassen. Die Bindung der Immunkomplexe an A-Sepharose (5 mg/ml in Lysepuffer) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach der Zentrifugation wurden die entstandenen Sepharosekügelchen dreimal mit Kinase-Reaktionspuffer (80 mM HEPES [pH 7,9], 80 mM $MgCl_2$, 0,1 mM ATP, 2 mM Na_3VO_4 und 20 mM NaF) gewaschen. Schließlich wurde die Kinaseaktivität durch Inkubation mit der empfohlenen Menge des entsprechenden Kinasensubstrats und 5 μ Ci [γ - ^{32}P] ATP in 15 μ l Kinase-Reaktionspuffer bestimmt und eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Nach Gabe von 15 μ l Probenpuffer wurde die Kinaseaktivität mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Das getrocknete Gel wurde durch Belichtung

auf einem Hochleistungs-Autoradiographie-Film visualisiert.

3.2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* wurde gemäß bekanntem Protokoll durchgeführt (Selimovic et al., 2011). Aus Sicherheitsgründen wurden die Versuche mit radioaktiven Stoffen einschließlich der Auftragung der Proben auf das Gel und deren Visualisierung ausschließlich durch den Laborleiter Dr. Mohamed Hassan (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Die synthetischen doppelsträngigen Oligonukleotide, die die Bindungsstelle für den interessierenden Transkriptionsfaktor tragen, wurden mit [γ - ^{32}P] ATP in Gegenwart der T4-Polynukleotidkinase markiert. Als Nächstes erfolgte die Bindung von 4 μg Kernextrakt an die markierte Probe in einem Gesamtvolumen von 30 μl für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Bindungspuffer (10 mM Tris, pH 7,5; 50 mM NaCl, 1 mM EDTA; 1 mM MgCl_2 ; 0,5 mM DTT und 4% Glycerol). Für den Kontroll-Assay wurden unmarkierte Proben verwendet, die ebenfalls die Sequenz der interessierenden Bindungsstelle enthielten. Die Inkubation mit den Kernextrakten erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die markierten Proben zugegeben wurden. Schließlich wurde die Elektrophorese für 3 Stunden bei 100 V in $0,5 \times$ Tris-Borat-EDTA *Running buffer* bei Raumtemperatur durchgeführt. Das getrocknete Gel wurde auf einem Hochleistungs-Autoradiographie-Film visualisiert.

3.2.12 Ermittlung des Zellüberlebens durch das MTT-Assay

Der Anteil lebensfähiger Zellen wurde unter Verwendung des kolorimetrischen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays nach beschriebenem Protokoll bestimmt (Selimovic et al., 2011). Die Zellen wurden in der empfohlenen Dichte in Mikrotiterplatten gegeben. 24 Stunden später wurden die Zellen mit dem interessierenden Zytostatikum behandelt bzw. wurde zunächst die Expression von APR-2 für die angegebenen Zeitperioden induziert. Am Ende der Inkubation wurde jeweils 20 μl MTT-Lösung (5 mg/ml) in jede Vertiefung gegeben. Nach der Inkubation der Platte in einem CO_2 -Inkubator bei 37 °C für weitere 5 Stunden wurde das Medium entfernt und je 200 μl DMSO in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde 10 Minuten lang sanft bei Raumtemperatur geschüttelt, um entstandene Kristalle aufzulösen. Nach weiterer Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C wurde die Platte in den ELISA-Leser gegeben und die

Extinktion bei 550 nm gemessen.

3.2.13 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde nach beschriebenem Protokoll durchgeführt (Selimovic et al., 2011). Nach einer Wachstumsphase der Melanomzelllinien A375 und BLM für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen wurde die APR-2-Expression durch Zugabe von Doxycyclin für die jeweiligen Zeitperioden induziert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung nach bekanntem Protokoll unterzogen (Hassan et al., 2009). In erster Linie wurden Anti-APR-2- (Biogenes, Berlin, Deutschland), Anti-Tom20-, Anti-Bap31- (Santa Cruz Biotechnology, USA) oder Anti-Bax-Antikörper (Cell Signaling Technology, USA) verwendet. Die Antikörperbindung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen dreimal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und mit Sekundärantikörpern inkubiert, die mit Alexa Flour markiert sind. Nach weiteren drei Waschungen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurden die Zellen mit Dako Fluorescence Mounting Medium behandelt, bis die Bilder mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen wurden.

3.2.14 Färbung des intrazellulären Calciums

Die intrazelluläre Calciumfärbung wurde nach beschriebenem Protokoll durchgeführt (Selimovic et al., 2011). Nach der Induktion der APR-2-Expression für die angegebenen Zeiträume wurde das Medium durch ein neues Medium ohne Phenolrot ersetzt. Nach einer Inkubation für zwei Stunden wurde der calciumempfindliche Farbstoff Fluo-3 AM (1,5 µM) und MitoTracker Red (200 nM, Invitrogen) für weitere zwei Stunden inkubiert. Nach dreißig Minuten wurden Bilder unter Standardzellkulturbedingungen auf einem Leica TCS SP2 AOBS mit einem 40-fachen Ölimmersionsobjektiv unter Verwendung der Leica Confocal Software aufgenommen.

3.2.15 Aufbereitung subzellulärer Fraktionen

Die Aufbereitung der mitochondrialen und der ER-Fractionen wurde nach beschriebenem Protokoll durchgeführt (Selimovic et al., 2011). Nach einer Wachstumsphase der Melanomzelllinien A375 und BLM für 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen wurde die APR-2-Expression durch Zugabe von Doxycyclin für die jeweiligen Zeitperioden induziert. Die A375-APR-2- und BLM-APR-2-Zellen wurden unter Verwendung von 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung abgeschabt. Die so

gesammelten Zellen wurden mittels Zentrifugation bei 600 g für 5 Minuten präzipitiert, gewaschen, resuspendiert und homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 600 g für 5 Minuten wurde der post-nukleare Überstand durch einen diskontinuierlichen Gradienten von 40 und 60% Saccharose in HE-Puffer (3 bzw. 1 ml) geschichtet. Nach 3-stündiger Zentrifugation bei 100.000 g wurden die Reste mit 10% Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Schließlich wurden diese einer *SDS-PAGE* bzw. einem Immunblotting unter Verwendung von Antikörpern für Mitochondrien bzw. für das ER unterzogen.

3.2.16 Verwendung der siRNA

Der Knockdown der interessierenden Genprodukte erfolgte durch Transfektion der entsprechenden spezifischen siRNA nach Herstelleranweisung (Cell Signaling Technology). Der Knockdown von Bim durch seine spezifische siRNA (# 6461; Cell Signaling Technology), von *Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase* (PERK) durch seine spezifische siRNA (SC-36213; Santa Cruz Biotechnology) sowie der Knockdown von ATM durch seine spezifische siRNA (# SR300330; OriGene Technologies, Rockville, USA) wurden gemäß Herstelleranweisung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung der Melanomzelllinien mit regulierter APR-2-Expression

Um die zugrundeliegenden Mechanismen bei der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen funktionell zu untersuchen, wurde zunächst eine regulierte Expression von APR-2 durch Zugabe von Tetracyclin / Doxycyclin zu den Zelllinien A375 und BLM ermöglicht. Die Generierung und Etablierung der A375-TetOn- und BLM-TetOn-Zelllinien, die den Tetracyclin-regulierten Transaktivator rtTA konstitutiv exprimieren, wurde von Dr. Denis Selimovic durchgeführt. Dazu wurde in die Zelllinien ein Plasmid für eine Tetracyclin-regulierte Expression von Luciferase (pTRE / Luciferase) transfiziert. Die Induktion der Luciferase wurde schließlich luminometrisch untersucht. Die entstandenen A375-TetOn- und BLM-Tet-On-Klone mit hoher Luciferaseaktivität wurden selektiert und als Nächstes mit pTRE-APR-2-Plasmiden transfiziert, bevor sie einer weiteren Selektion unterzogen wurden. Die so generierten Klone von A375-APR-2 und BLM-APR-2 wurden für die funktionelle Analyse des APR-2 unter Anwendung verschiedener diagnostischer Verfahren verwendet. Es wurde festgestellt, dass die APR-2-Expression von der Dosis und der Inkubationszeit des zur Induktion verwendeten Doxycyclins abhängt (Abb. 1A und 1B).

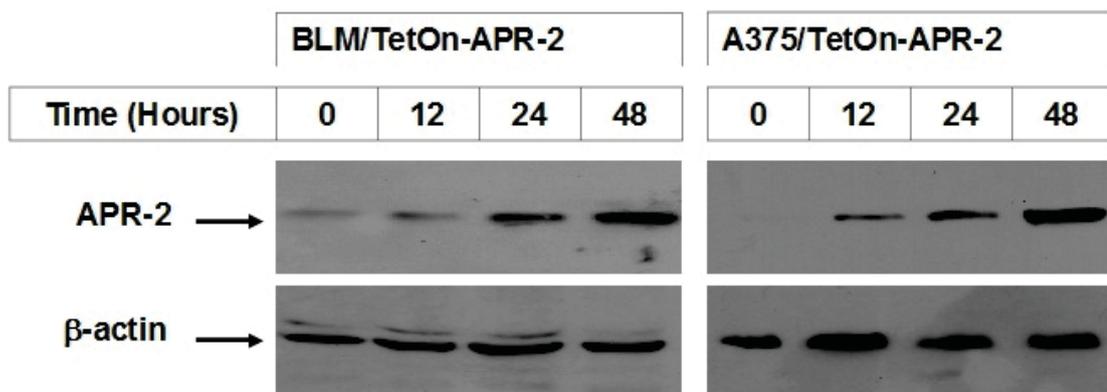


Abb. 1A Der Western Blot zeigt die Induktion des APR-2-Proteins in den Melanom-Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Doxycyclins. Die A375-APR-2- und BLM-APR-2-Klone wurden in Abwesenheit (0 ng/ml) oder in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) für verschiedene Zeitintervalle kultiviert. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet.

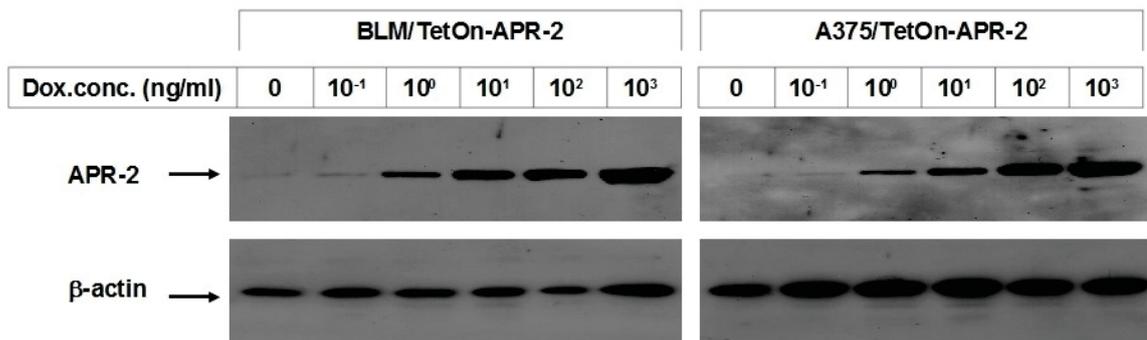


Abb. 1B Der Western Blot zeigt die Induktion des APR-2-Proteins in den Melanom-Zelllinien in Abhängigkeit der Doxycyclin-Dosierung. Die A375-APR-2- und BLM-APR-2-Klone wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin (0, 1, 1, 10, 50, 100, 1000 ng/ml) kultiviert. β-Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet.

4.2 Der APR-2-induzierte Tod von Melanomzellen ist durch einen apoptotischen Mechanismus vermittelt

Um zu zeigen, ob eine regulierte Expression des APR-2 die Zellviabilität von Melanomzellen beeinflusst, wurden die A375-APR-2- und BLM-APR-2-Zellen unter Standardbedingungen für 24 Stunden kultiviert. Die weitere Entwicklung erfolgte in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) für festgelegte Zeitintervalle von bis zu 48 Stunden. Da sich in mehreren probatorischen Experimenten das Expressionsniveau des APR-2-Proteins unter einer Doxycyclin-Konzentration von 10 ng/ml als voll ausreichend erwies, wurde auch für die folgenden Experimente diese Konzentration beibehalten. Schließlich wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie unter der Annexin V/PI-Färbung analysiert. Die hieraus gewonnenen Daten (Abb. 2A) zeigten eine dosis- und zeitabhängige Tötungseffizienz des APR-2 sowohl in A375-APR-2- als auch in BLM-APR-2-Zellen. Die Durchflusszytometrieanalyse zeigte ferner, dass der APR-2-induzierte Melanomzelltod durch einen apoptotischen Mechanismus vermittelt wird.

Als Nächstes wurden die durchflusszytometrisch erhobenen Erkenntnisse auf molekularer Ebene analysiert. Nach einer 24-stündigen Induktion der APR-2-Expression in den Melanomzelllinien wurden die Gesamtzelllysate hergestellt und eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Apoptose-Markern durchgeführt. Wie vermutet, war die Expression des APR-2 mit einer Zunahme der Freisetzung von Cytochrom c, der Spaltung von

Caspase-3, Caspase-9 sowie PARP assoziiert (Abb. 2B). Zur näheren Spezifikation des zugrundeliegenden Mechanismus wurde überprüft, ob eine mitochondriale Beteiligung bei der APR-2-induzierten Apoptose vorliegt. Nach der 24-stündigen Induktion der APR-2-Expression wurde das mitochondriale Membranpotential mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung der JC-1-Färbung ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine APR-2-Expression mit einem verstärkten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials in beiden Melanomzelllinien assoziiert ist (Abb. 2C). Aus den gewonnenen Daten geht hervor, dass die mitochondriale Dysregulation eine zentrale Rolle in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen spielt.

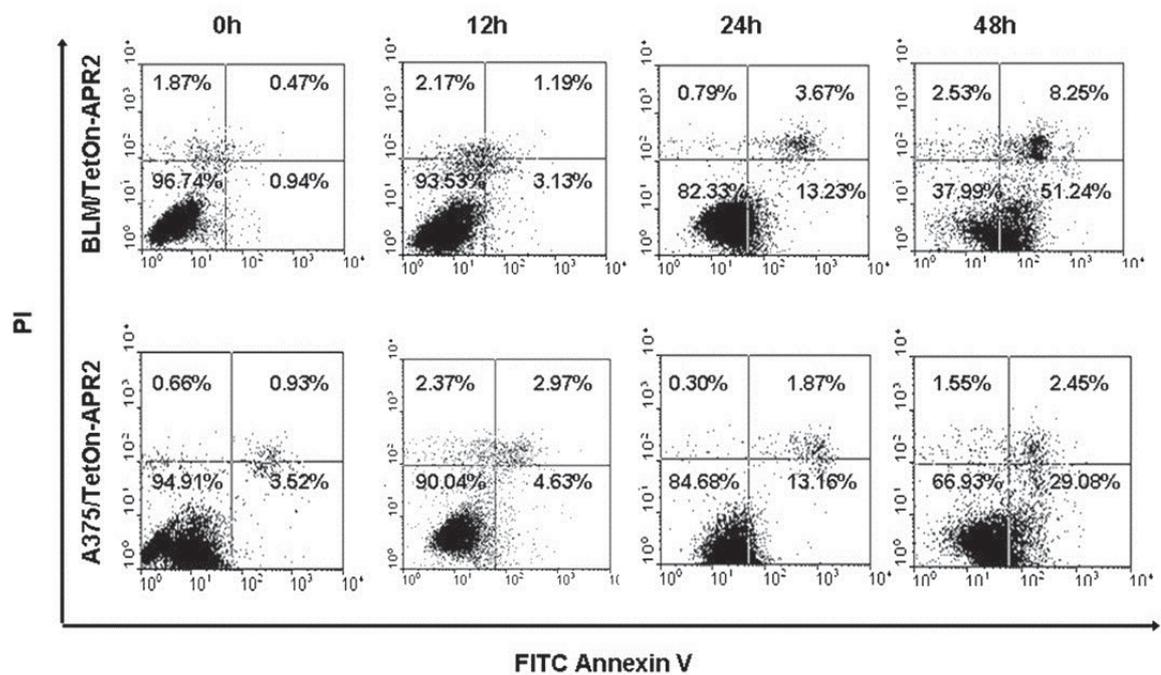


Abb. 2A Die Durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung der Annexin-V/PI-Färbung zeigt die Induktion der Apoptose durch die APR-2-Induktion in Abhängigkeit von der Zeit.

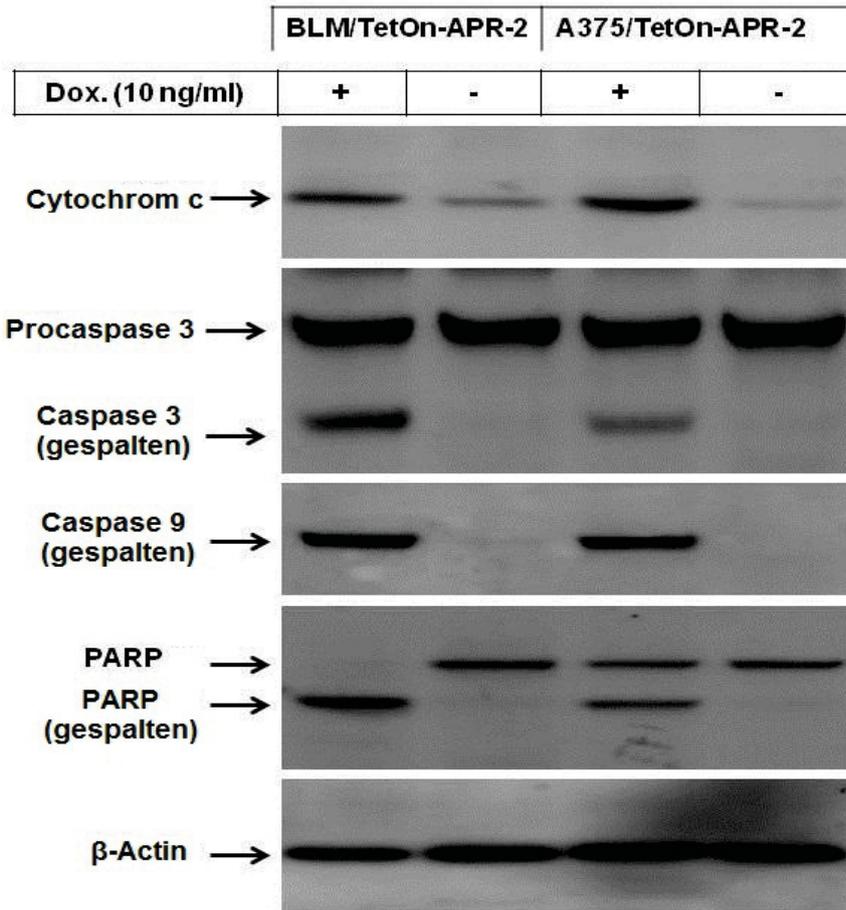


Abb. 2B Die Western-Blot-Analyse zeigt die Freisetzung von Cytochrom c, die Spaltung von Caspase-3, Caspase-9 sowie PARP unter einer Induktion der APR-2-Expression. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche.

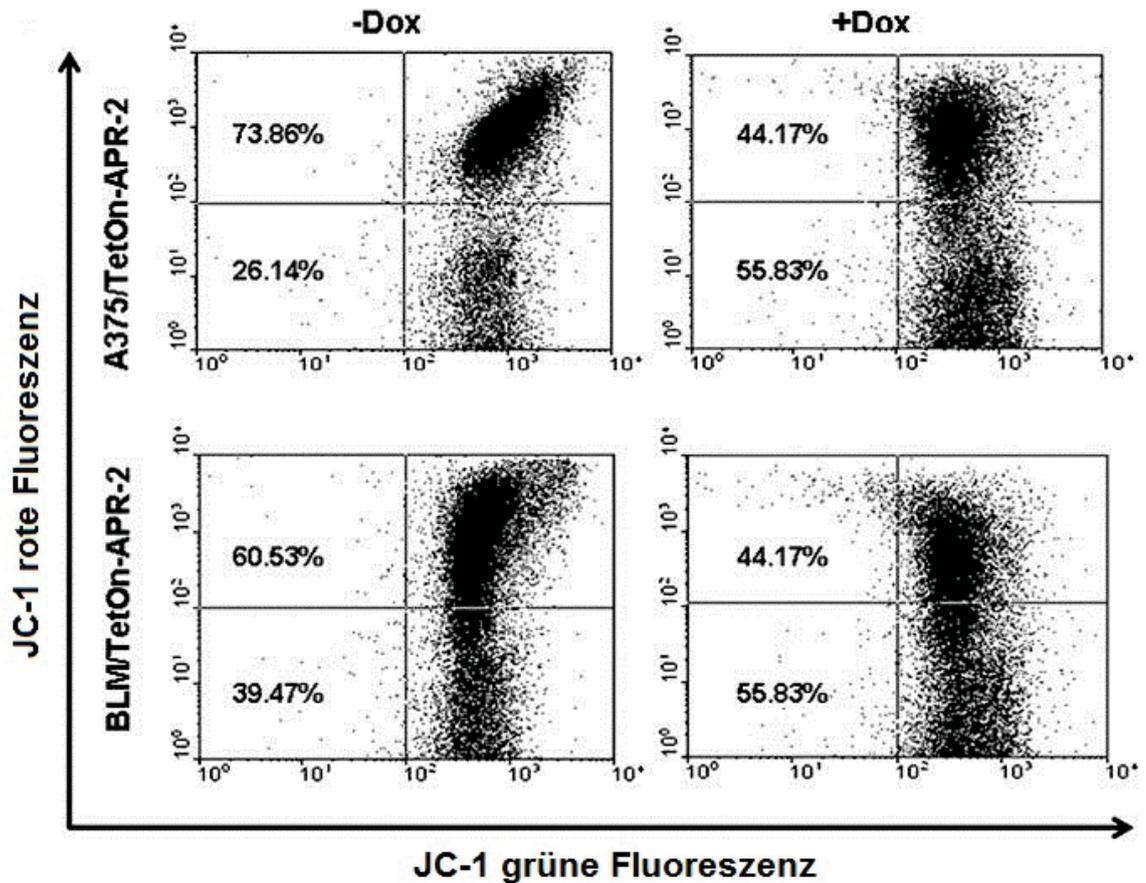


Abb. 2C Durchflusszytometrische Analyse von A375-APR-2- und BLM-APR-2-Zellen unter Verwendung der JC-1-Färbung. Die Zellen wurden in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) kultiviert. 48 Stunden später wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zellen mit intakten Mitochondrien zeigen eine hohe rote und niedrige grüne Fluoreszenz und erscheinen im oberen, rechten Quadranten der Streudiagramme. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen, die das mitochondriale Membranpotential verloren haben, eine hohe grüne und niedrige rote Fluoreszenz und erscheinen im unteren, rechten Quadranten.

4.3 APR-2 triggert die Apoptose von normalen, humanen Melanozyten

Um herauszufinden, ob die Induktion der APR-2-Expression auch die Apoptose von humanen Melanozyten (NHM) und Fibroblasten (NHF) induzieren kann, wurden die Zelllinien NHM und NHF mit einem leeren Vektor bzw. einem APR-2-Plasmid transfiziert. Nach einem Inkubationsintervall von 48 Stunden wurden die Zellen einer Durchflusszytometrieanalyse unter Verwendung von Annexin-V/PI-Färbung sowie einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Die aus der Durchflusszytometrie-Analyse gewonnenen Ergebnisse (Abb. 3A) zeigten, dass das APR-2 die Fähigkeit besitzt, sowohl in den NHM

als auch in den NHF Apoptose auszulösen. Die ergänzende Western-Blot-Analyse zeigte eine Spaltung von PARP, was ebenfalls bestätigt, dass ein apoptotischer Mechanismus bei der Modulation des APR-2-induzierten Todes beider Zellarten beteiligt ist.

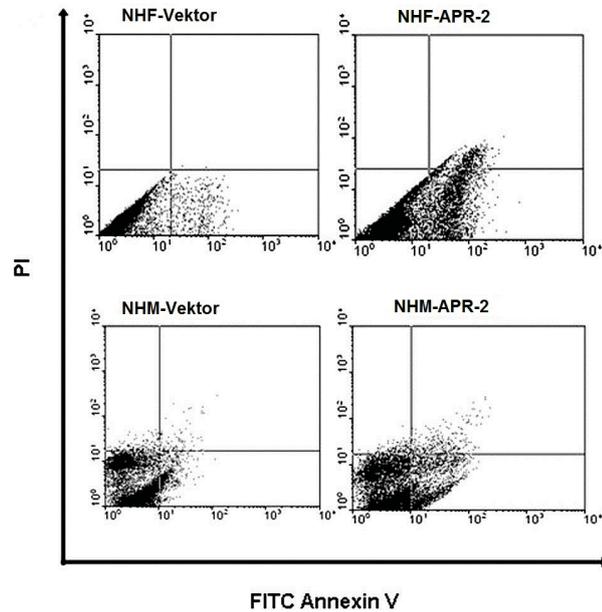


Abb. 3A Durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung der Annexin-V / PI-Färbung von NHF und NHM nach einer 48-stündigen Inkubationszeit nach Transfektion mit einem leeren Vektor bzw. APR-2-Plasmid für eine konstitutive APR-2-Expression. Zellen mit intakten Mitochondrien zeigen eine hohe rote und niedrige grüne Fluoreszenz und erscheinen im oberen, rechten Quadranten der Streudiagramme. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen, die das mitochondriale Membranpotential verloren haben, eine hohe grüne und niedrige rote Fluoreszenz und erscheinen im unteren, rechten Quadranten.

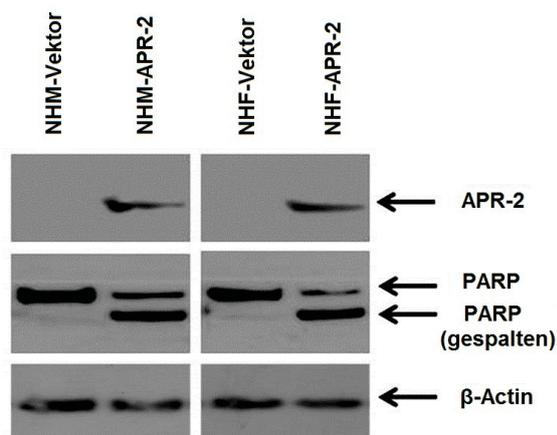


Abb. 3B Die Western-Blot-Analyse zeigt die Spaltung von PARP sowohl in NHF- als auch NHM-Zellen, die APR-2 exprimieren. β-Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet.

4.4 Der APR-2-induzierte Effekt in Melanomzellen resultiert aus seiner Lokalisation am endoplasmatischen Retikulum

Um die subzelluläre Lokalisation von APR-2 in Melanomzellen näher zu untersuchen, wurden die BLM-Melanomzellen für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert, bis die APR-2-Expression durch Doxycyclin induziert wurde. Nach einem Intervall von zwölf Stunden wurden die APR-2-exprimierenden Zellen fixiert und eine Inkubation mit Antikörpern gegen Bap31 und Tom20 als spezifische Marker für das ER bzw. für die Mitochondrien durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen mit Anti-APR-2-Antikörpern inkubiert. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte eine Lokalisierung des APR-2 am ER, nicht jedoch an den Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 4A). Die ergänzende Western-Blot-Analyse der subzellulären Fraktionen der Mitochondrien und des ER belegten ebenfalls eine Lokalisation des APR-2 am ER in beiden Zelllinien (Abb. 4B).

Nach erfolgtem Nachweis der unmittelbaren Lokalisation des APR-2 am ER wurde untersucht, ob die APR-2-induzierte Apoptose der Melanomzellen mit einem Stress des ER assoziiert ist, indem die intrazelluläre zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration bestimmt wurde. Hierfür wurde die Expression von APR-2 in verschiedenen Zeitintervallen, maximal bis zu 48 Stunden, vor der Inkubation der Melanomzellen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo3-AM (Abb. 4C) in BLM-APR-2-Zellen induziert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass eine Induktion der APR-2-Expression in den Melanom-Zelllinien zu einem zeitabhängigen Anstieg von interzellulärem Ca^{2+} führt. Dies liefert einen Nachweis für einen APR-2-induzierten ER-Stress in Melanomzellen und suggeriert somit, dass das ER eine wichtige Rolle in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose spielt.

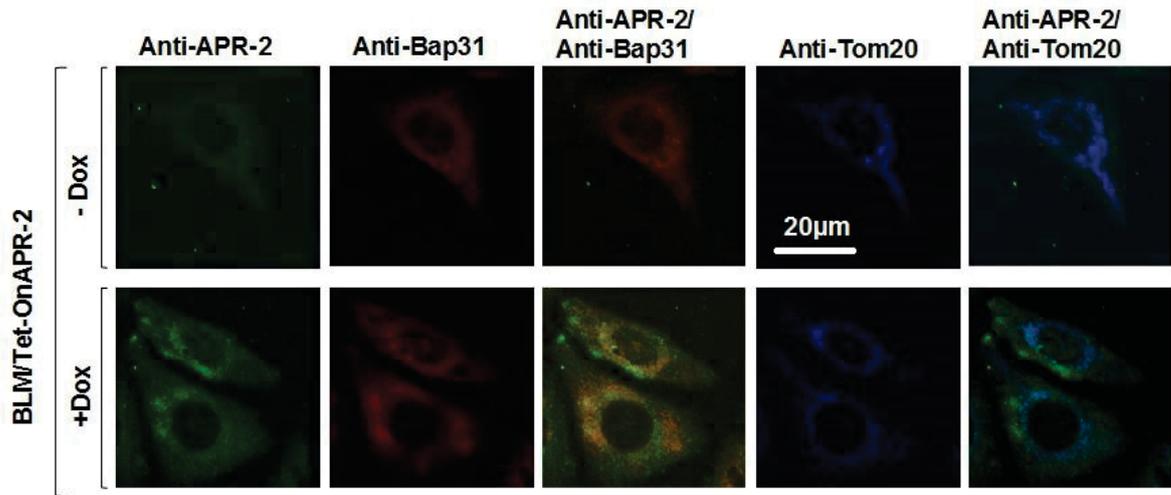


Abb. 4A Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von BLM-Zellen. Die Melanomzellen wurden für 24 Stunden in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) kultiviert, bis eine Inkubation mit Anti-APR-2-Antikörpern (grün) durchgeführt wurde. Die Mitochondrien wurden durch eine Färbung mit dem Markerprotein Tom20 (blau) und das ER wurde mit Bap31 (rot) nachgewiesen. Der weiße Balken entspricht einer Länge von 20 µm (= 500-fache Vergrößerung).

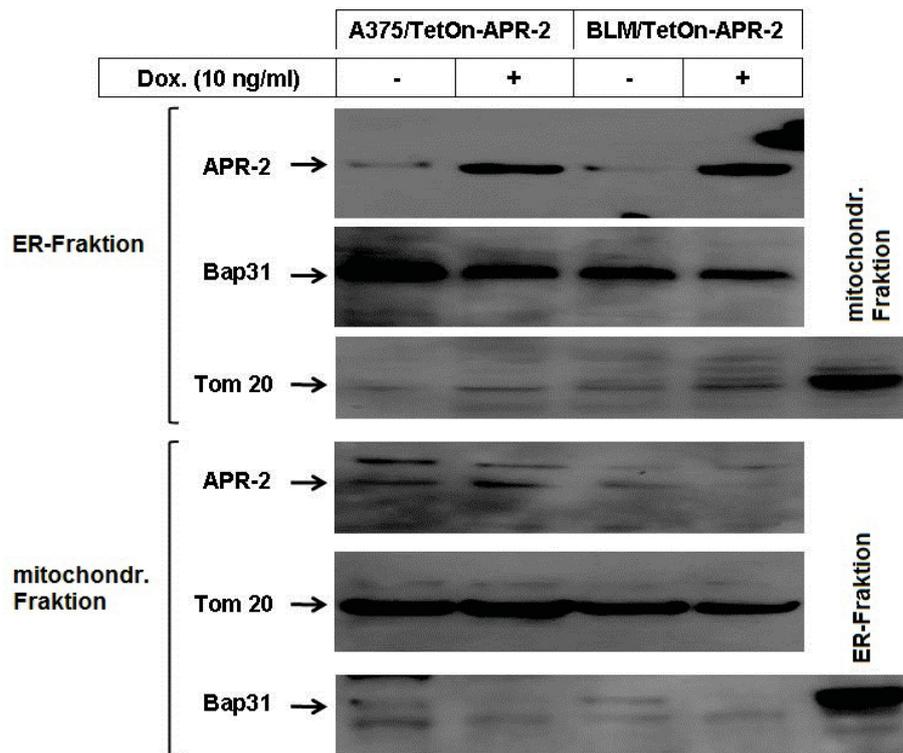


Abb. 4B Western-Blot-Analyse der APR-2-Expression in verschiedenen, subzellulären Fraktionen. Die APR-2-Expression wurde in mitochondrialen und ER-Fractionen der A375-APR-2 und BLM-APR-2 Klone untersucht, die in Abwesenheit oder in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert wurden. Die Reinheit der Fraktionen wurde mittels Western Blot des mitochondrialen Markers Tom20 und des ER-spezifischen Markers Bap31 verifiziert.

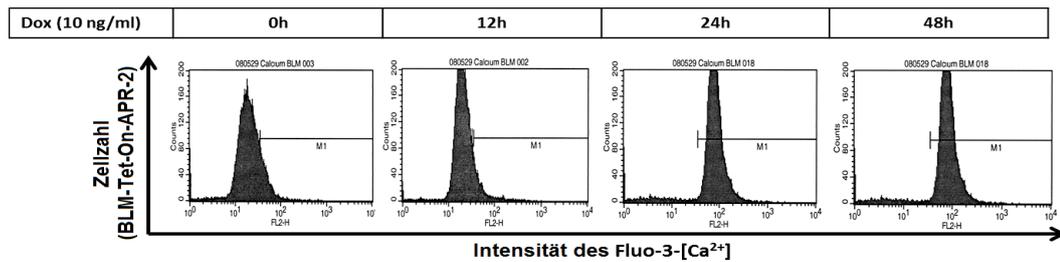


Abb. 4C Durchflusszytometrische Analyse des intrazellulären Ca^{2+} in den BLM-APR-2-Klonen. Die Zellen wurden in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) bis zu einem Zeitraum von 48 Stunden für ein kontrolliertes Zeitintervall kultiviert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung wurde durch Anfärben mit dem Ca^{2+} -empfindlichen Farbstoff Fluo-3 AM bewertet.

4.5 APR-2 triggert in Melanomzellen Signalwege, die mit einem Stress des endoplasmatischen Retikulums assoziiert sind

Um zu untersuchen, ob die APR-2-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung mit der Modulation von ER-abhängigen Signalwegen wie $\text{IRE1}\alpha$ / ASK1 / JNK, PERK / ATF4 / CHOP und/oder Calpain / Caspase-4 assoziiert ist, wurden die Proteine $\text{IRE1}\alpha$, ASK1, JNK, PERK, ATF4, CHOP, Calpain, Caspase-4 und Bim in den Melanomzelllinien nach Induktion der APR-2-Expression mittels Western Blot analysiert. Im Expressionsniveau von $\text{IRE1}\alpha$ wurde keine Änderung festgestellt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass unter der APR-2-Expression die Phosphorylierung von $\text{IRE1}\alpha$ im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkt ist (Abb. 5A). Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um den Einfluss der APR-2-Expression auf Calpain und/oder Caspase-4 zu bewerten. Dazu wurden die Gesamtzelllysate aus den APR-2-exprimierenden Zellen mittels Western Blot analysiert. Die Analyse zeigte einen Abbau von Calpain sowie eine Spaltung von Caspase-4, was einen vorliegenden ER-Stress impliziert (Abb. 5B). Darüber hinaus wurde die Rolle des PERK-Signalwegs in der Modulation des APR-2-induzierten ER-Stresses ebenfalls durch Western Blot analysiert. Hier wurde eine Phosphorylierung von PERK und Induktion von CHOP, ATF4 und Bim-Proteinen verifiziert (Abb. 5C). Die ergänzende Analyse der Kernextrakte der APR-2-exprimierenden Zellen mittels EMSA (Abb. 5D) ergab den Nachweis einer Verstärkung der DNA-Bindungsaktivität von CHOP. In Zusammenschau der gewonnenen Ergebnisse konnte dem Stress des endoplasmatischen Retikulums eine zentrale Rolle in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen zuerkannt werden.

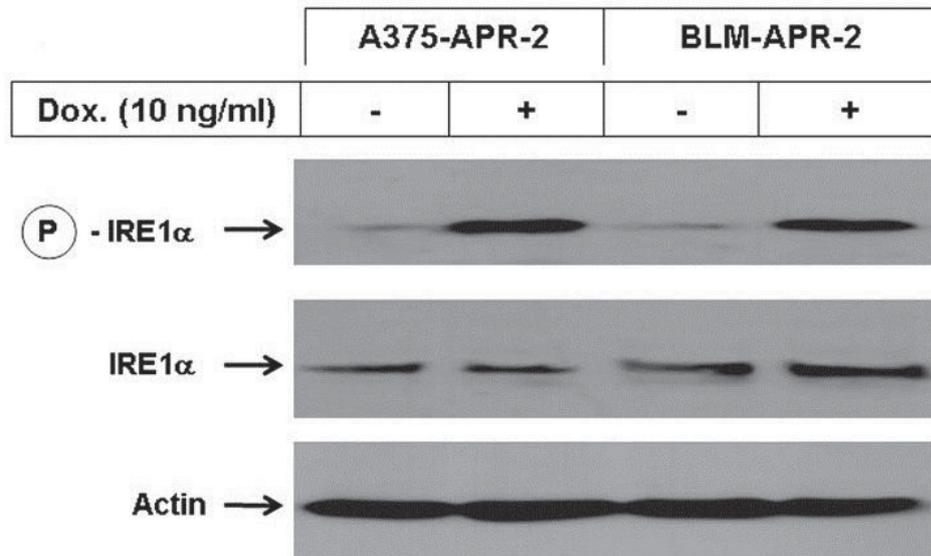


Abb. 5A Western-Blot-Analyse von IRE1 α in APR-2-exprimierenden Zellen. Die Zellen wurden in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für p-IRE1 α bzw. IRE1 α unterzogen.

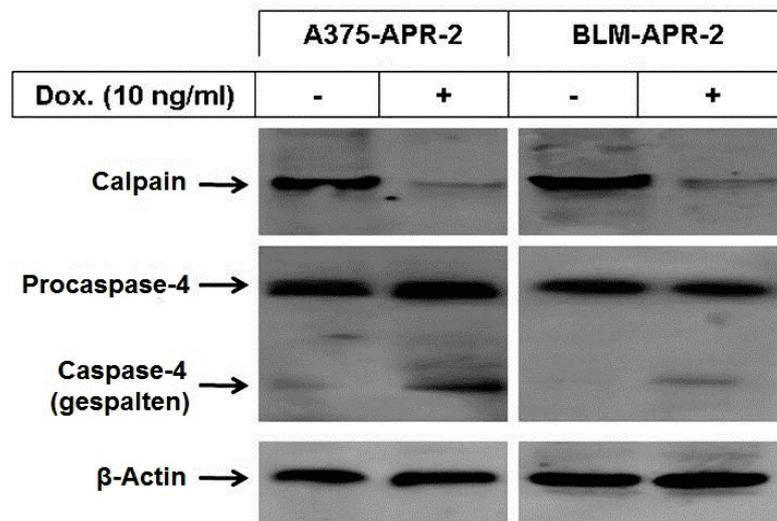


Abb. 5B Western-Blot-Analyse von Calpain, Procaspase-4, gespaltenen Caspase-4 in APR-2-exprimierenden Zellen. Die Zellen wurden in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für die genannten Proteine unterzogen.

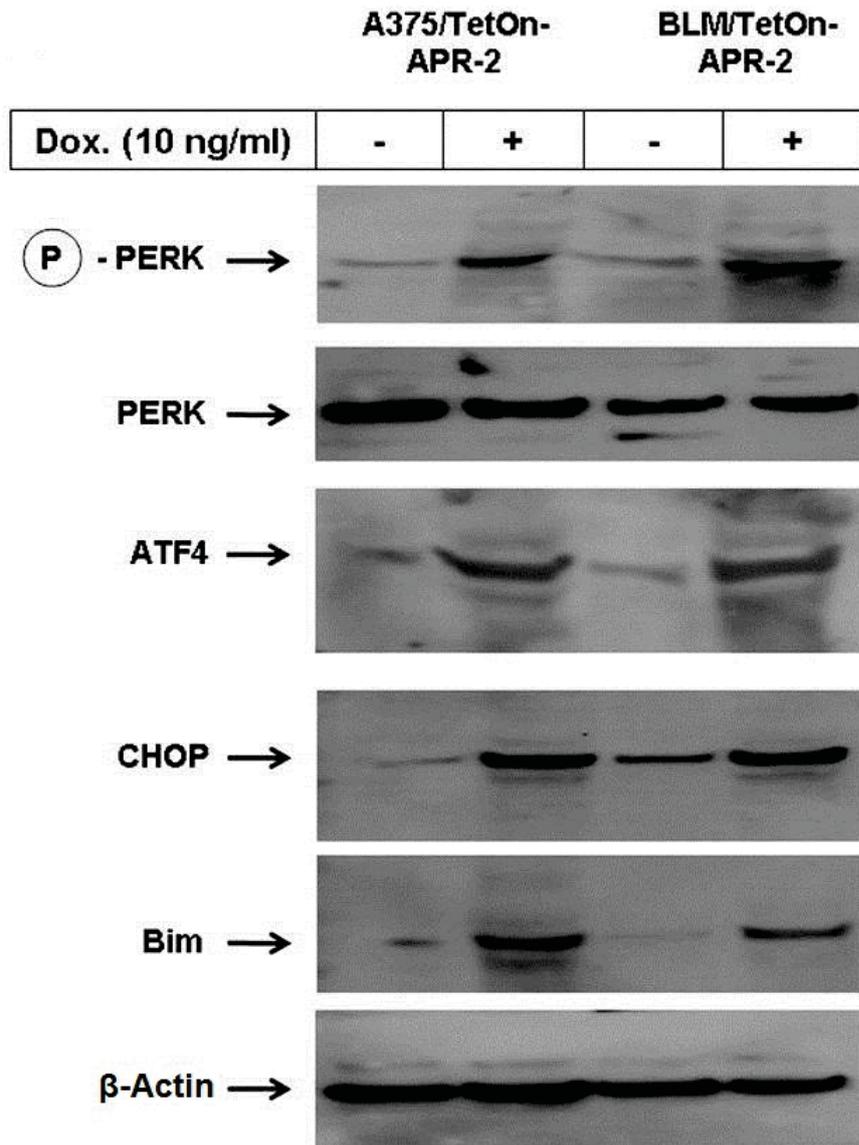


Abb. 5C Western-Blot-Analyse von PERK, phosphoryliertem PERK, ATF-4, CHOP und Bim in APR-2-exprimierenden Zellen. Die Zellen wurden in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern für die genannten Proteine unterzogen. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet.

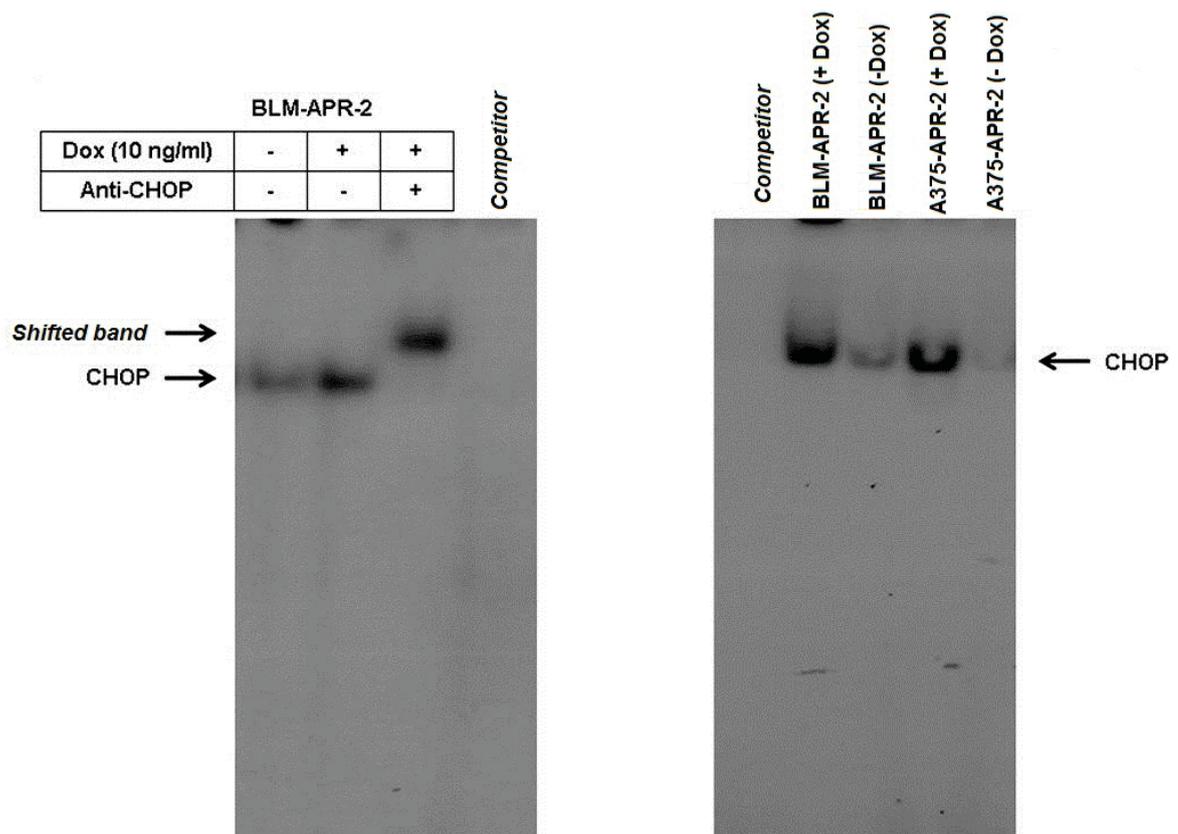


Abb. 5D Der EMSA zeigt die DNA-Bindungsaktivität von CHOP in APR-2-exprimierenden Melanomzellen. Die Spezifität der DNA-Bindungsaktivität von CHOP wurde durch ein Supershift-Assay bestimmt.

4.6 Die APR-2-Expression aktiviert den ASK1/JNK-Signalweg

Als Nächstes wurde die Rolle der mitogenaktivierten Proteinkinase im Zusammenhang mit der APR-2-induzierten Apoptose untersucht. Nach der APR-2-Expression durch die Zugabe von Doxycyclin (10 ng/ml) zum Kulturmedium wurden nach einem Intervall von 24 Stunden die Gesamtzelllysate und Kernextrakte hergestellt und für Western-Blot-Analysen, für das In-vitro-Kinase-Assay sowie EMSA-Analysen verwendet. In der Western-Blot-Analyse gelang der Nachweis einer leichten Verstärkung des Expressionsniveaus der c-Jun-N terminale Kinase (JNK). Im Expressionsniveau der *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), p38 oder der *extracellular regulated kinase* (ERK) wurde keine Änderung registriert. Indes wurde im zur Korrelation durchgeführten In-vitro-Kinase-Assay unter einer APR2-Expression eine Induktion der Aktivierung der JNK aber auch ASK1 nachgewiesen. Das Expressionsniveau von ERK und p38 blieb im

In-vitro-Kinase-Assay unverändert (Abb. 6A). Mittels EMSA konnte eine Verstärkung der DNA-Bindungsaktivitäten der Transkriptionsfaktoren AP-1 und p53 unter einer Induktion der APR-2-Expression nachgewiesen werden (Abb. 6B und 6C).

Die weiteren Western-Blot-Analysen zeigten eine Induktion der Expression von Bax in den APR-2-exprimierenden Zellen (Abb. 6D), was auf eine zentrale Rolle dieses Proteins hindeutet. Eine Verstärkung der Expression von Bak konnte nicht nachgewiesen werden.

Schließlich wurde die subzelluläre Lokalisation von Bax in den APR-2-exprimierenden Zellen untersucht. Dafür wurde das Bax-Protein mit den spezifischen

Immunfluoreszenzmarkern für die Mitochondrien (Tom20) sowie für das endoplasmatische Retikulum (Bap31) gefärbt (Abb. 6E). Die Färbung verriet, dass Bax sowohl am ER als auch am Mitochondrium lokalisiert ist. Diese Erkenntnisse wurden durch die ergänzenden Western-Blot-Analysen der subzellulären mitochondrialen und ER-Fractionen bestätigt (Abb. 6F).

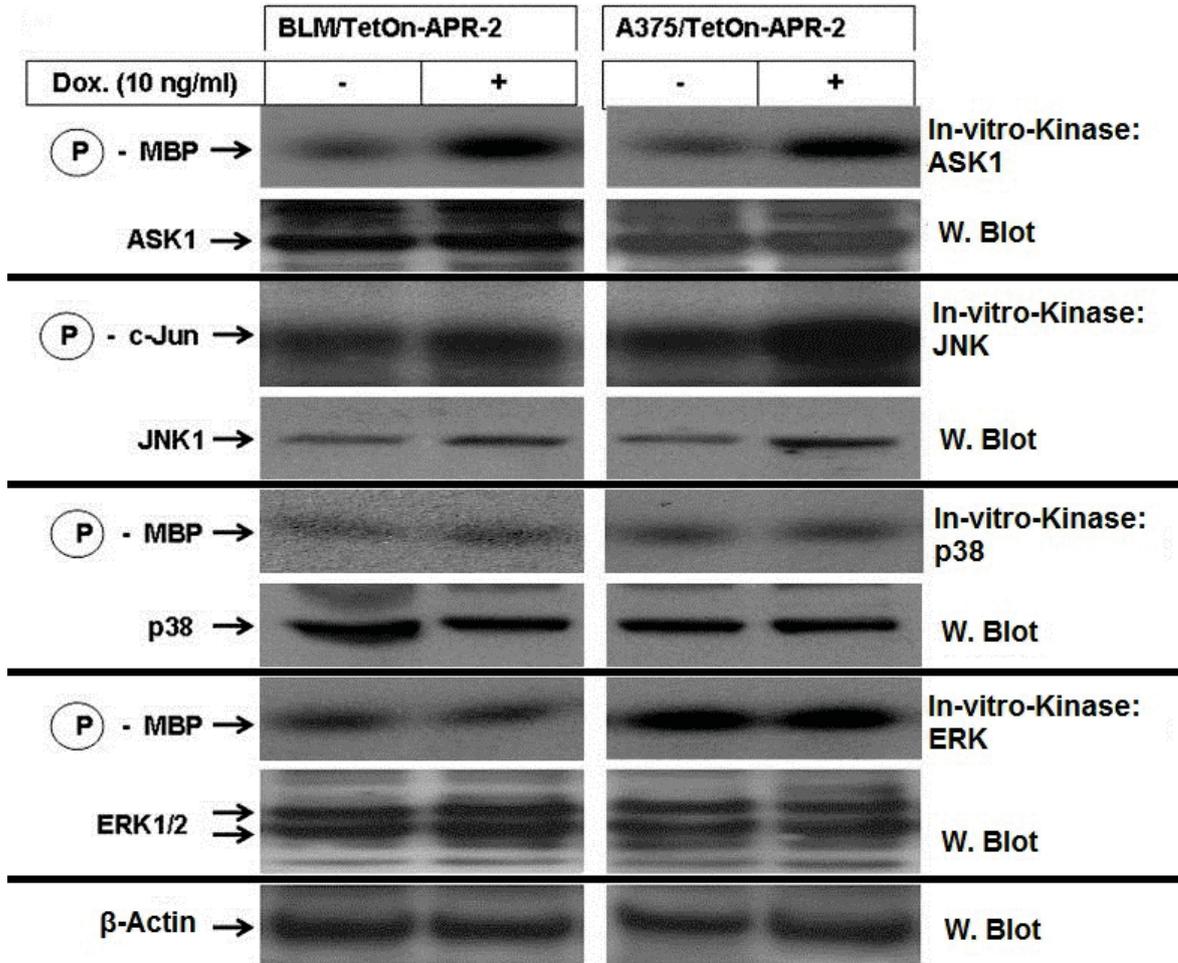


Abb. 6A In-vitro-Kinase-Assay unter Verwendung des Myelin-basischen Proteins (MBP) als Substrat für ASK1, p38 und ERK bzw. GST-c-Jun als Substrat für JNK. Ergänzend wurde zur Korrelation eine Western-Blot-Analyse der genannten Proteine durchgeführt.

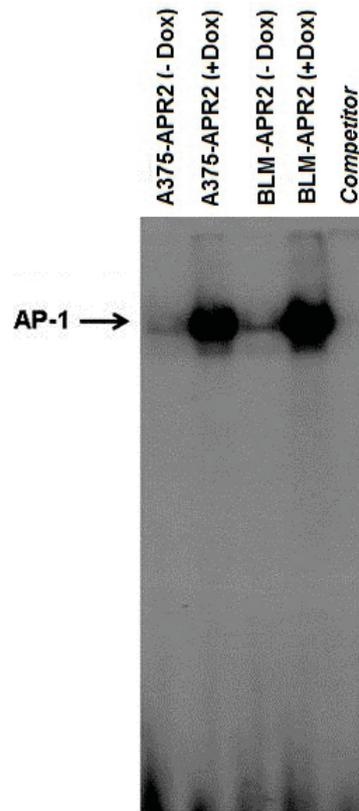


Abb. 6B Der EMSA demonstriert die Verstärkung der DNA-Bindungsaktivität von AP-1 unter einer Induktion der APR-2-Expression.

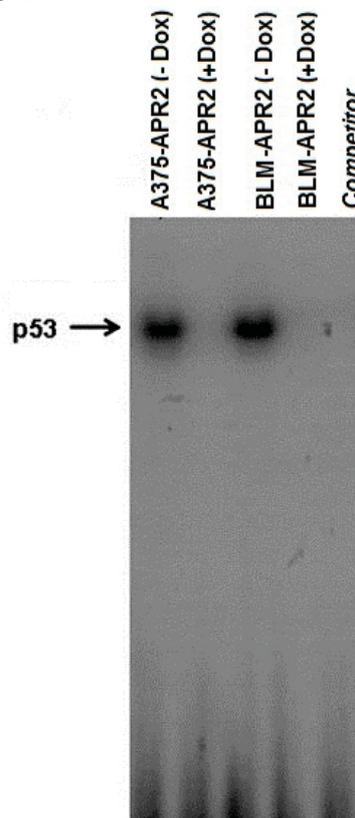


Abb. 6C Der EMSA demonstriert die Verstärkung der DNA-Bindungsaktivitäten von p53 unter einer Induktion der APR-2-Expression.

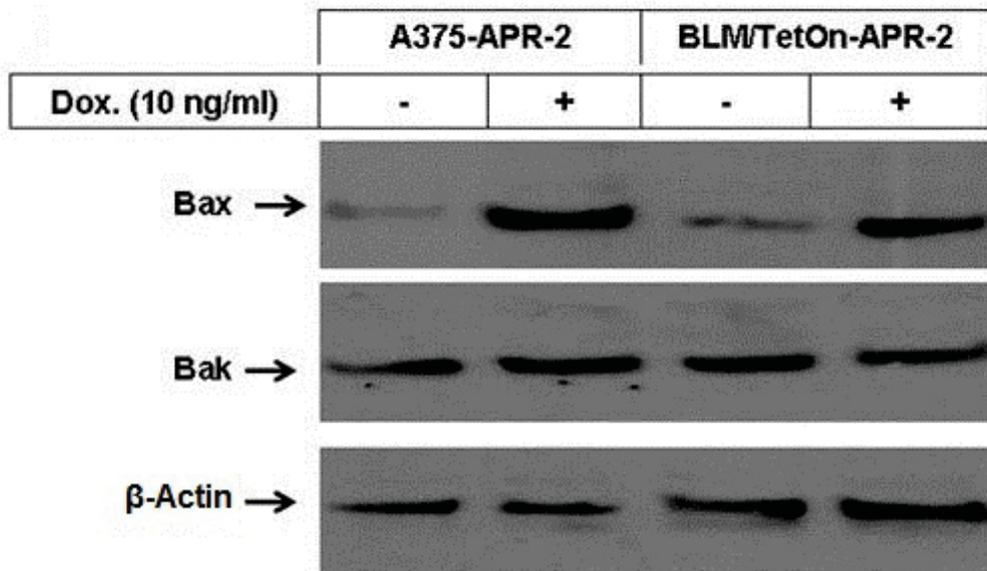


Abb. 6D Die Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von Bax und Bak ohne bzw. unter einer Induktion der APR-2-Expression in den Melanomzellen. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

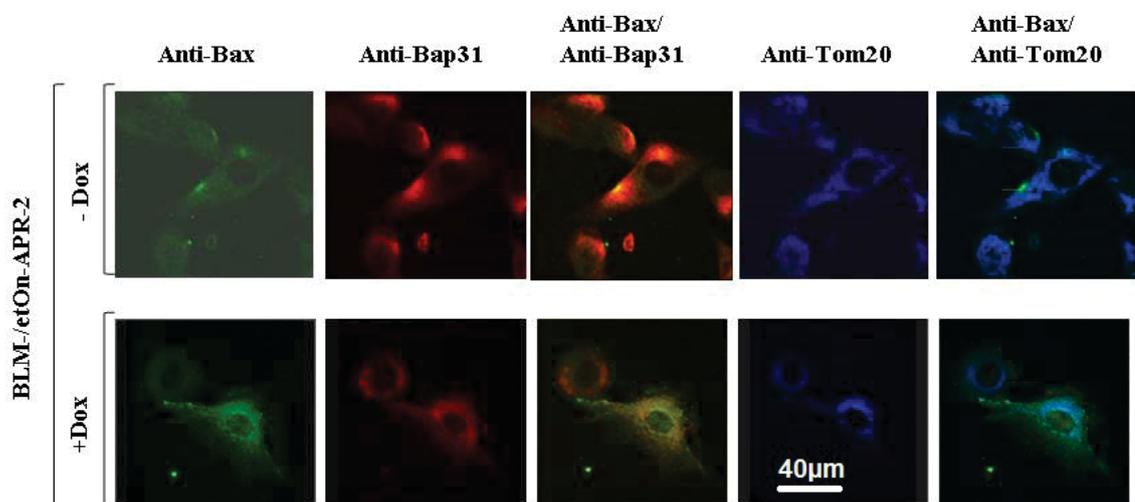


Abb. 6E Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zeigt die Lokalisierung von Bax sowohl am ER als auch am Mitochondrium. Vor der Anfärbung mit dem Anti-Bax-Antikörpern (grün), dem Mitochondrien-spezifischen Antikörper Tom20 (blau) und dem spezifischen Antikörper für das endoplasmatische Retikulum Bap31 (rot) wurden BLM-APR-2 Zellen für 24 Stunden in Abwesenheit oder in Gegenwart von Doxycyclin (10 ng/ml) kultiviert. Die Farbüberlagerung mit Tom20 und Bap31 zeigt eine Lokalisierung von Bax sowohl am ER (gelb) als auch an den Mitochondrien (türkis). Der weiße Balken entspricht einer Länge von 40 μ m (= 200-fache Vergrößerung).

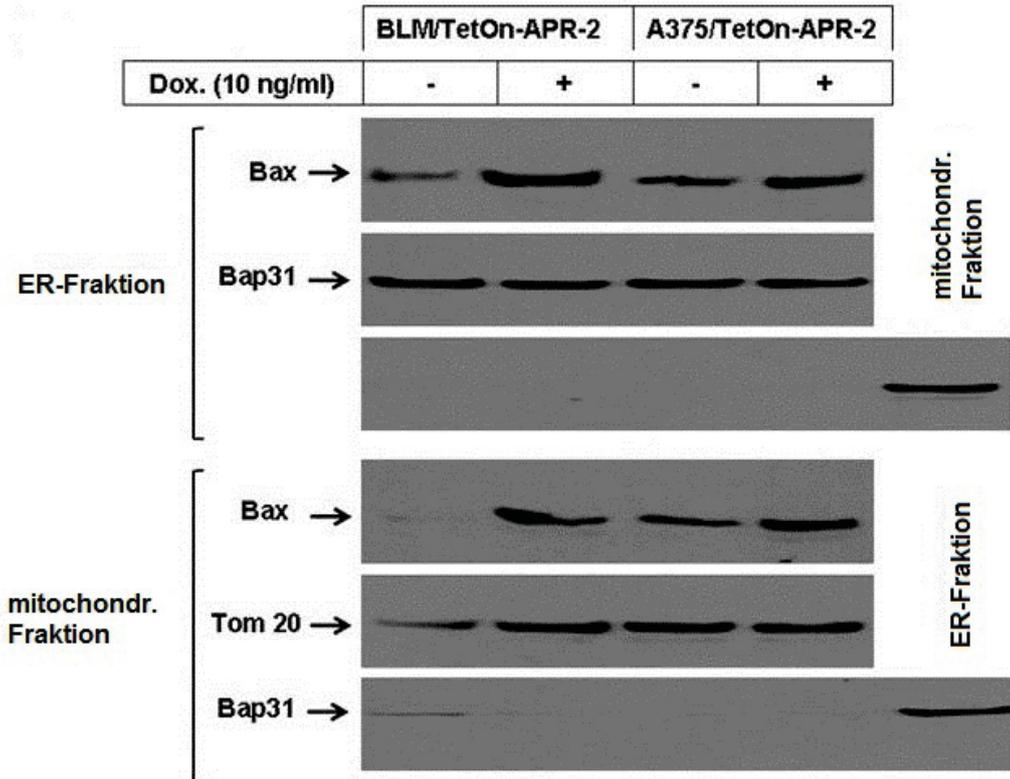


Abb. 6F Western-Blot-Analyse der Bax-Expression in verschiedenen subzellulären Fraktionen. Die Bax Expression wurde in den Mitochondrien (Mito) und im ER von A375-APR-2 und BLM-APR-2 Zellen vor und nach der Induktion von APR-2 Protein für 24 Stunden analysiert. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch das Immunoblotting für das mitochondriale Protein Tom20 und das ER-Protein Bap31 bestätigt.

4.7 Die APR-2-induzierte Apoptose von Melanomzellen wird durch einen Stress des endoplasmatischen Retikulums über mitochondriale und nicht-mitochondriale Mechanismen vermittelt

Für die detaillierte Erforschung der molekularen Mechanismen der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen wurden weitere Experimente unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren für IRE1 α (Irestatin), Calpain (ALLM), JNK (SP600125), Caspase-4 (Z-LEVD-FMK) und ASK1 (Thioredoxin) durchgeführt. Durch eine Vorbehandlung der A375-APR-2- und BLM-APR-2-Zellen mit Irestatin vor der Induktion des APR-2-Proteins wurde die APR-2 induzierte Aktivierung von ASK1 und JNK (Abb. 7A) sowie die hierauf folgende Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1

(Abb. 7B) und p53 (Abb. 7C) unterdrückt. Da unter der Irestatin-Vorbehandlung darüber hinaus die APR-2-induzierte Freisetzung des Bax-Proteins sowie von Cytochrom c ebenfalls gehemmt wird (Abb. 7D), ist von einer Mitbeteiligung von IRE1 α an der Regulation des ASK1 / JNK-AP-1 / p53-Signalwegs auszugehen. Dieser bedingt eine APR-2-vermittelte Induktion von Bax, die sowohl zum Stress des ER führt als auch zu einer mitochondrialen Dysregulation.

Als Nächstes wurde die Wirkung des Calpain-Inhibitors (ALLM) auf die APR-2-induzierte Spaltung von Caspase-4 analysiert. Sowohl die A375-APR-2- als auch die BLM-APR-2-Zellen wurden vor der Induktion der APR-2-Expression für 24 Stunden mit ALLM vorbehandelt, bis die Gesamtzelllysate unter Verwendung spezifischer Antikörper für Caspase-4 mittels Western Blot analysiert wurden. Wie vermutet, führte die Inhibierung von Calpain zu einer Blockierung der APR-2-induzierten Spaltung von Caspase-4 (Abb. 7E).

Im Rahmen der genaueren Analyse wurden weitere Versuche unter Anwendung der Inhibitoren von Calpain (ALLM), PERK (siRNA), IRE1 α (Irestatin), JNK (SP600125) und ASK1 (Thioredoxin) durchgeführt und der Effekt auf den Umfang des APR-2-induzierten Melanomzelltods mittels MTT-Assay untersucht (Abb. 8A und 8B). Die Versuche zeigten eine partielle Hemmung der APR-2-induzierten Apoptose unter der Anwendung der Inhibitoren von Calpain, PERK, IRE1 α , ASK1 oder JNK. Im Gegensatz zur partiellen Hemmung unter einem einzigen Inhibitor führte eine Kombination von ALLM mit Irestatin, Thioredoxin oder SP600125 zu einer stärkeren Blockade des APR-2-induzierten Melanomzelltods. Auch eine Kombination von Irestatin mit Thioredoxin oder SP600125 ergab eine stärkere Blockade des APR-2-induzierten Melanomzelltods (Abb. 8A). Ein Knockdown von PERK durch seine spezifische siRNA in Kombination mit ALLM oder Irestatin blockierte die APR-2-induzierte Apoptose teilweise. Eine kombinierte Hemmung von PERK, Calpain und IRE1 α führte zur stärksten Blockade des APR-2-induzierten Zelltods beider Melanomzelllinien (Abb. 8B).

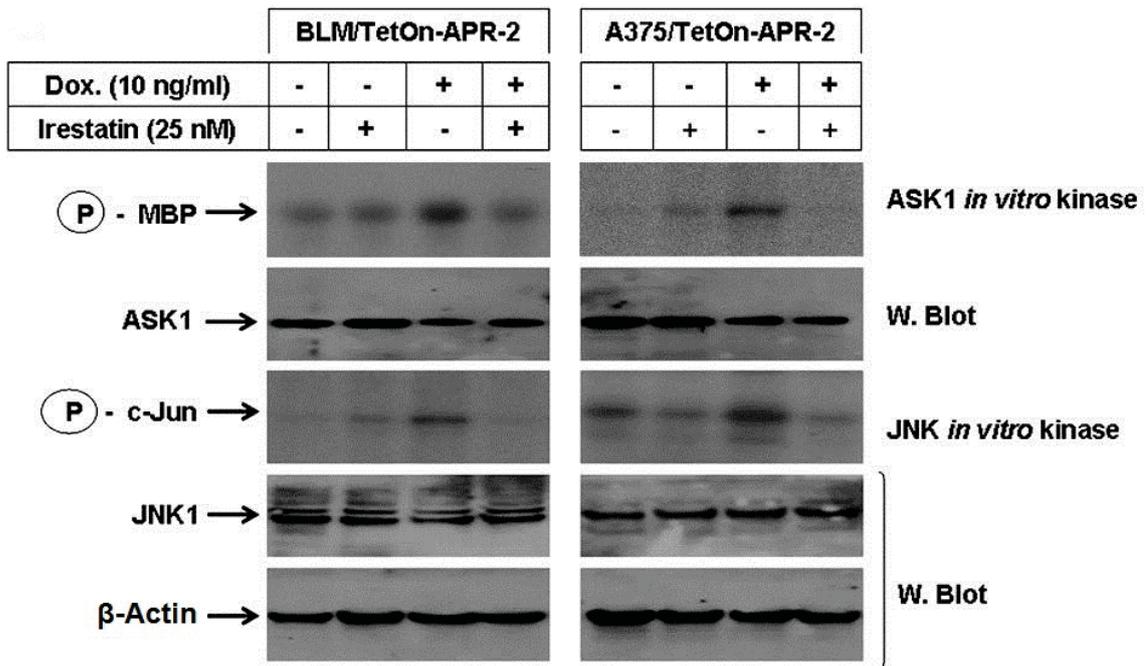


Abb. 7A Das In-vitro-Kinase-Assay zeigt die Expression des Myelin-basischen Proteins (MBP) als Substrat für ASK1 bzw. GST-c-Jun als Substrat für JNK1 in Abhängigkeit einer Anwendung des Inhibitors von IRE1 α (Irestatin) und/oder Induktion der APR-2-Expression. Zur Korrelation wurde die Western-Blot-Analyse der Proteine ASK1 und JNK1 durchgeführt.

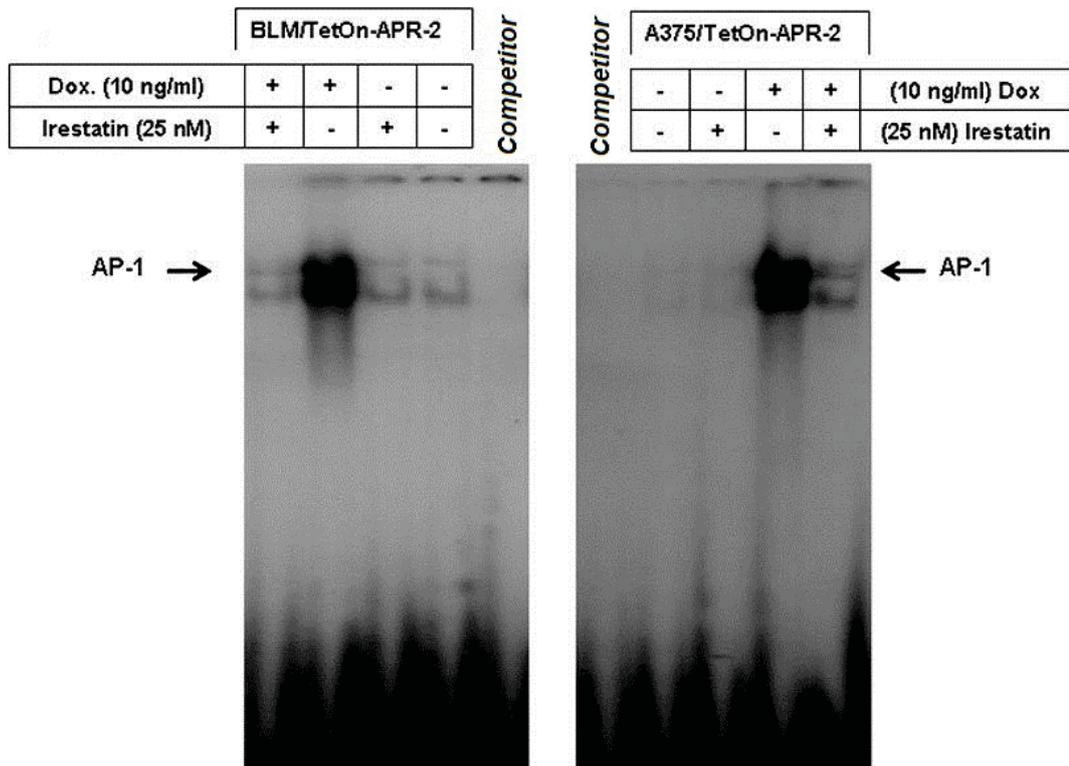


Abb. 7B EMSA zeigt den Verlust der APR-2-verstärkten DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 unter einer Anwendung des Inhibitors von IRE1 α (Irestatin).

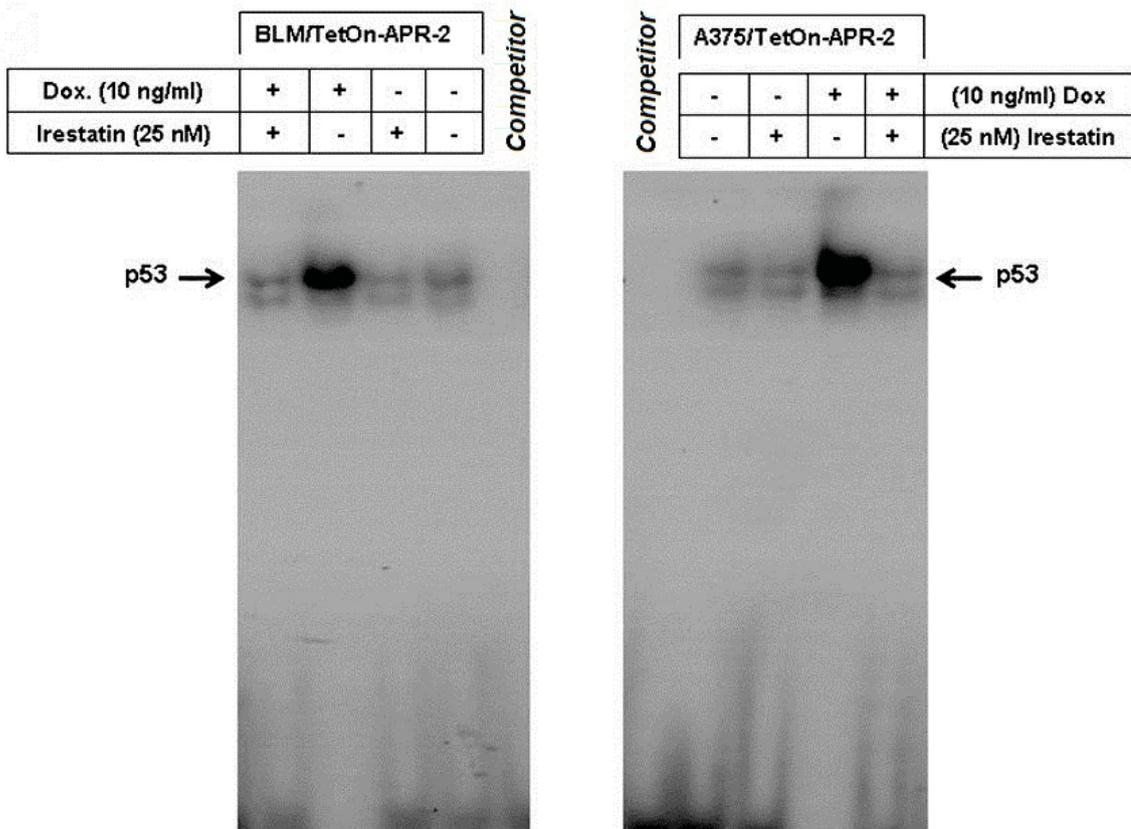


Abb. 7C Der EMSA zeigt einen Verlust der APR-2-vermittelten DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors p53 unter einer Anwendung des Inhibitors von IRE1 α .

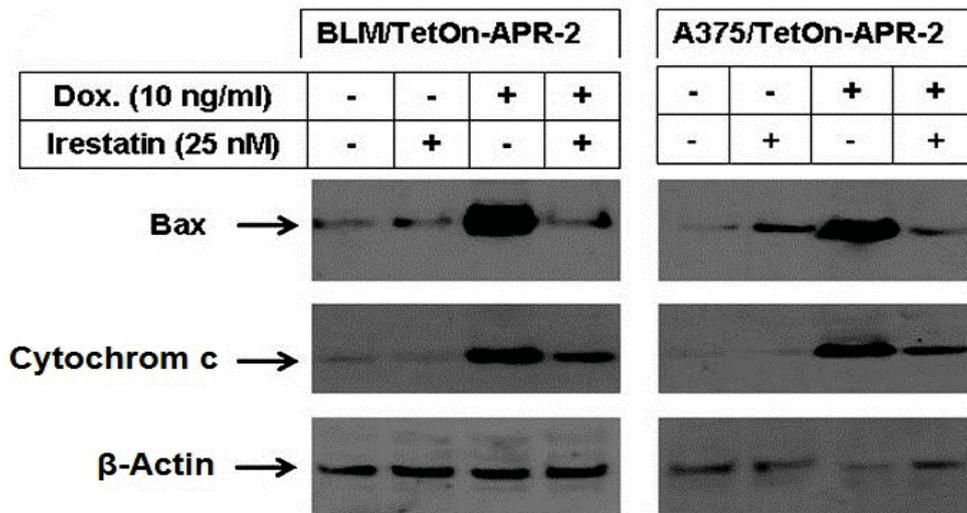


Abb. 7D Die Western-Blot-Analyse zeigt das Expressionsniveau von Bax und die Cytochrom c-Freisetzung in Abhängigkeit einer Anwendung des Inhibitors von IRE1 α (Irestatin) und/oder Induktion der APR-2-Expression.

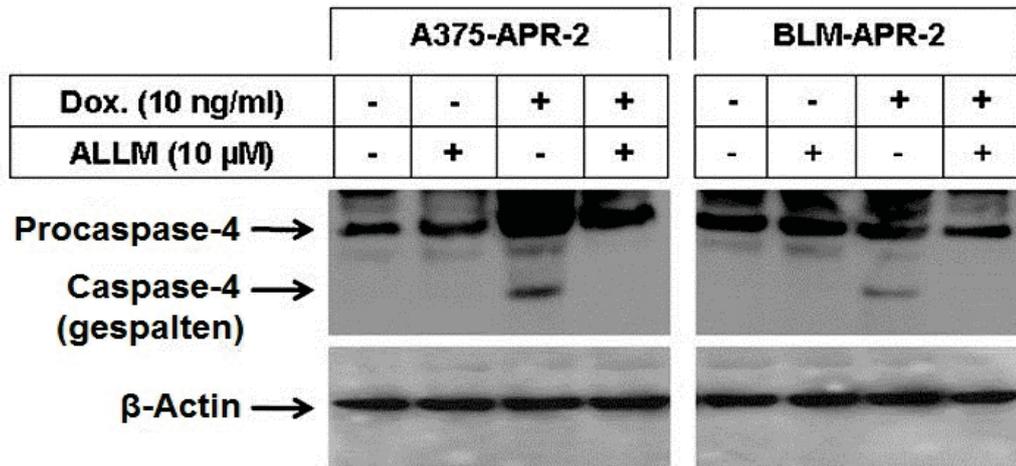
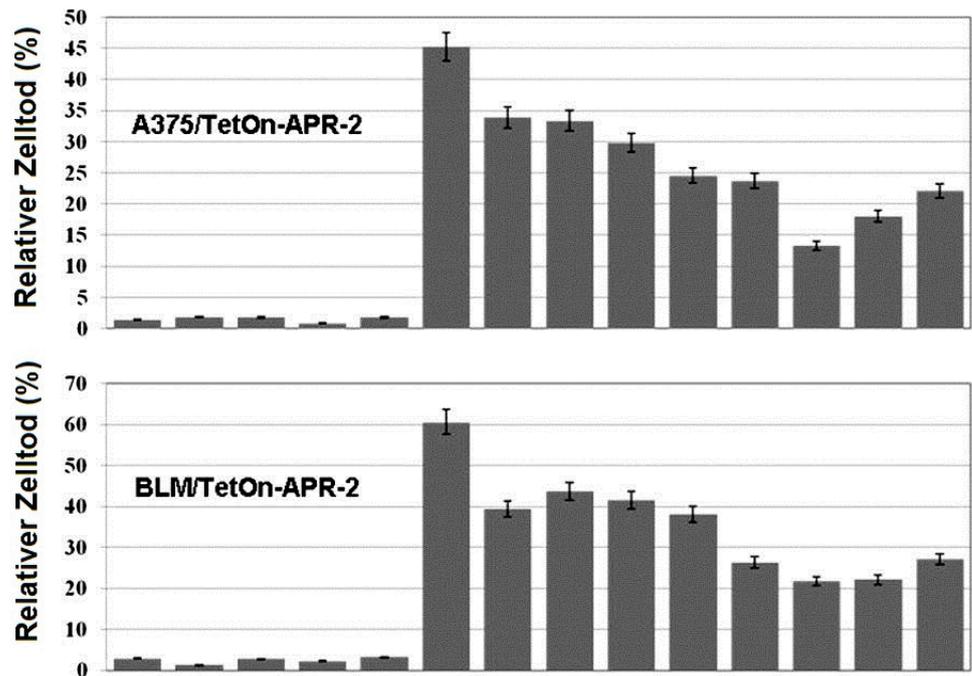
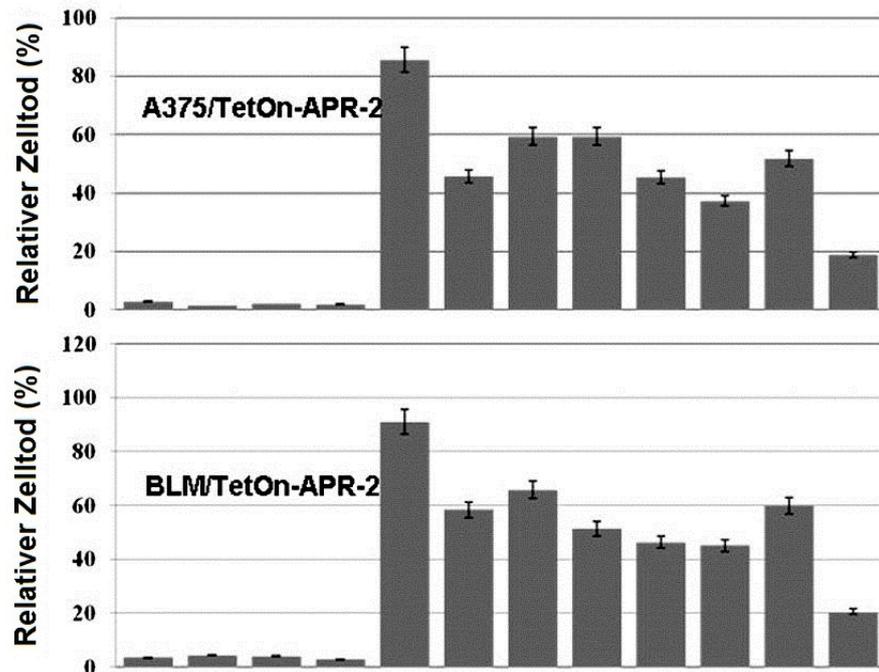


Abb. 7E Die Western-Blot-Analyse zeigt das Expressionsniveau von Procaspase-4 und der gespaltenen Caspase-4 in Abhängigkeit einer Anwendung des Inhibitors von Calpain (ALLM) und/oder Induktion der APR-2-Expression. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei getrennt durchgeführte Experimente.



ALLM (20 μ M)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Irestatin (25 nM)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Thioredoxin (1 μ M)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
SP600125 (20 μ M)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
	-Dox					+Dox								

Abb. 8A Das *cell viability assay* zeigt die Wichtigkeit der Ca^{2+} / Calpain / Caspase-4- und IRE1 α / ASK1 / JNK-Signalkaskaden bei der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose. Das MTT-Assay zeigt die Wirkung der Inhibitoren Calpain (ALLM), IRE1 α (Irestatin), ASK1 (Thioredoxin) und JNK (SP600125) auf den APR-2-induzierten Zelltod der Melanomzellen.



ALLM (20 μM)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Irestatin (25 nM)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
Scramble	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PERK siRNA	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
	-Dox						+Dox					

Abb. 8B Das *cell viability assay* zeigt die Wichtigkeit der Ca^{2+} / Calpain / Caspase-4- und IRE1 α / ASK1 / JNK-Signalkaskaden bei der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose. Das MTT-Assay zeigt die Wirkung der Inhibitoren von Calpain (ALLM), IRE1 α (Irestatin) und PERK (siRNA) auf den APR-2-induzierten Melanomzelltod.

4.8 Die Rolle von ATM in der Regulation der APR-2-induzierten Aktivierung von p53

Um die Rolle von ATM in der Regulation der APR-2-induzierten Aktivierung von p53 und anschließenden Apoptose näher einzuschätzen, wurde die Expression sowie die Phosphorylierung von ATM in den APR-2-exprimierenden Zellen mittels Western Blot untersucht. Neben den A375-APR-2- und BLM-APR-2-Zellen wurden ferner NHF-APR-2- und NHM-APR-2-Zellen verwendet. Weder in den Melanomzellen A375 und BLM noch in humanen Melanozyten oder Fibroblasten (NHM, NHF) schien eine APR-2-Überexpression einen Einfluss auf die Expression oder die Phosphorylierung von ATM zu haben (Abb. 9A).

Zur weiteren Beurteilung der Rolle von ATM wurde der Effekt einer Supprimierung von ATM auf die APR-2-induzierte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 untersucht. Daher wurde ATM durch seine spezifische siRNA supprimiert, indem die Melanomzellen A375-APR2, BLM-APR-2 und die NHF- und NHM-Zellen mit der ATM-spezifischen siRNA transfiziert wurden. Nach einem Intervall von 24 Stunden wurde die APR-2-Expression in den Melanomzelllinien durch die Zugabe von Doxycyclin (10 ng/ml) induziert bzw. die NHM- und NHF-Zellen für 24 Stunden mit den pcDNA-APR-2-Plasmiden transfiziert. Nach der Ernte wurden die Gesamtzelllysate und Kernextrakte erzeugt bzw. die Zellviabilität mittels MTT-Assay ermittelt.

Zunächst wurde das Expressionsniveau von ATM in den siRNA-transfizierten Zellen mittels Western Blot analysiert. Wie erwartet, führte die Transfektion mit der spezifischen siRNA im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer Reduktion der ATM-Expression in sämtlichen untersuchten Zellen (Abb. 9B und 9C). Als Nächstes wurde der Effekt der ATM-Suppression auf die APR-2-induzierte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors p53 untersucht. Die Analyse der Kernextrakte der APR-2 exprimierenden und Kontrollzellen mittels EMSA zeigte, dass die Unterdrückung von ATM durch seine spezifische siRNA die APR-2-induzierte p53-Aktivierung in allen untersuchten Zellarten nicht beeinflusst (Abb. 9D bis 9G).

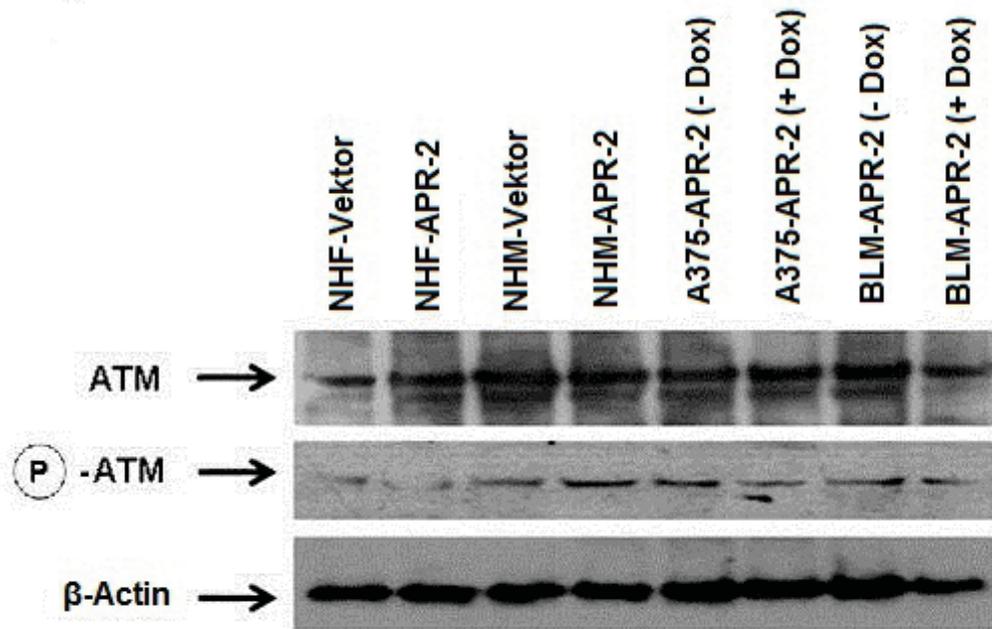


Abb. 9A Die Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von ATM und des phosphorylierten ATM sowohl in normalen, humanen Zellen (NHF, NHM) als auch in den Melanomzellen (A375 und BLM) in Abhängigkeit von der Transfektion mit einem APR-2-Plasmid bzw. Induktion der APR-2-Expression. β-Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

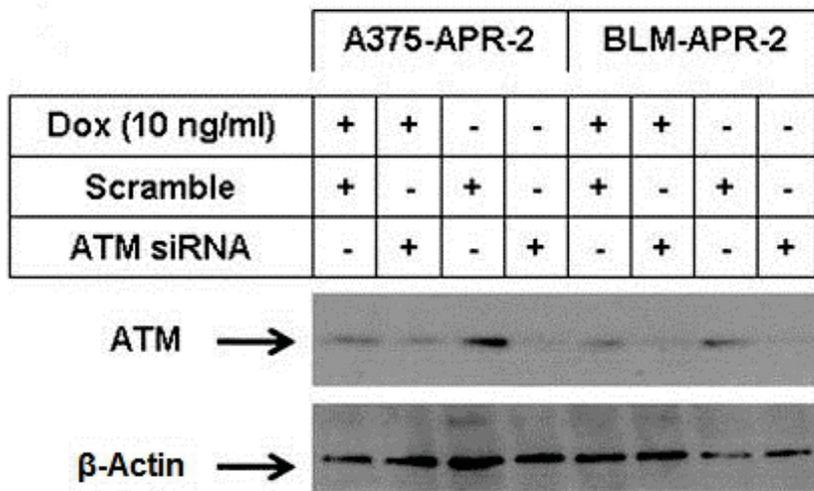


Abb. 9B Die Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von ATM in Abhängigkeit von der Anwendung seiner siRNA sowie in Abhängigkeit der Induktion der APR-2-Expression. β-Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

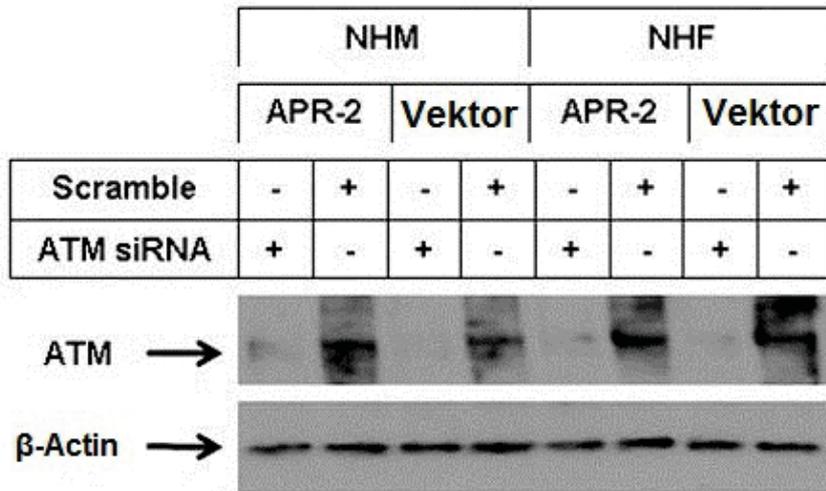


Abb. 9C Die Western-Blot-Analyse zeigt die Expression von ATM unter Anwendung seiner spezifischen siRNA sowohl in NHF- als auch NHM-Zellen, die mit APR-2-Plasmiden bzw. einem leeren Vektor transfiziert wurden. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die Beladung und den Transfer verwendet. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

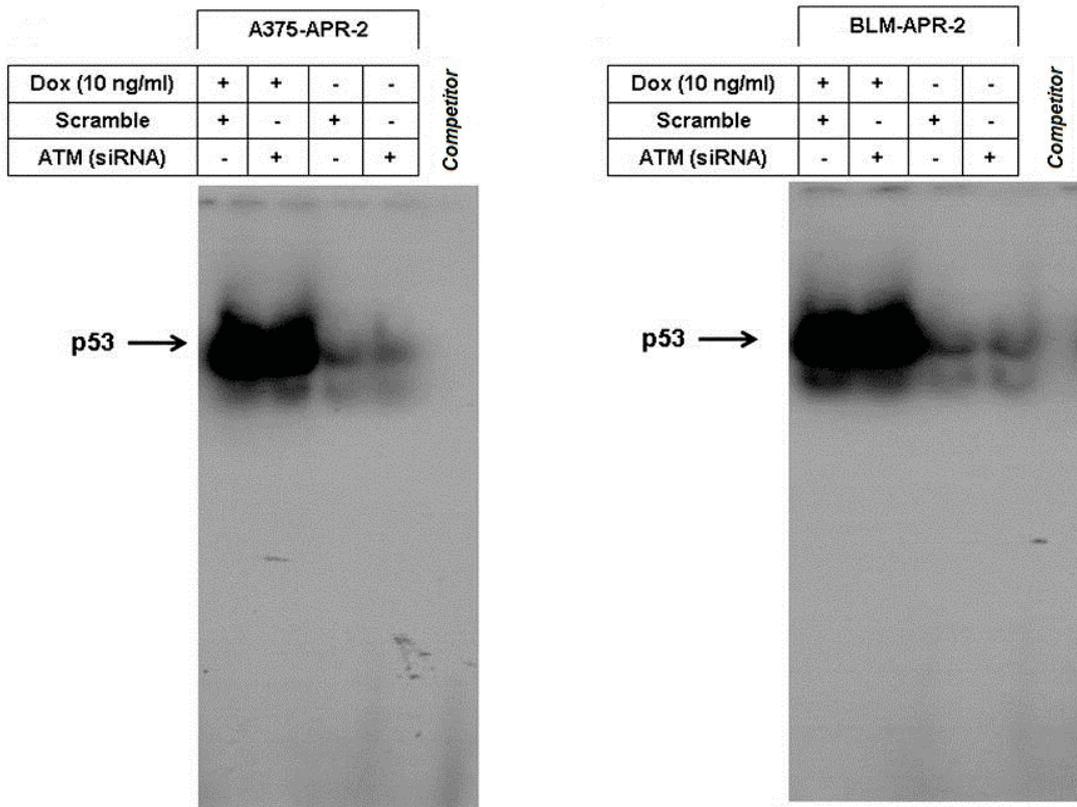


Abb. 9D und E Das EMSA zeigt die p53-Aktivierung in Abhängigkeit von der Inhibition des ATM-Proteins durch seine spezifische siRNA sowie in Abhängigkeit von der Induktion der APR-2-Expression in den Melanomzelllinien A375 und BLM. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit identischen Ergebnissen.

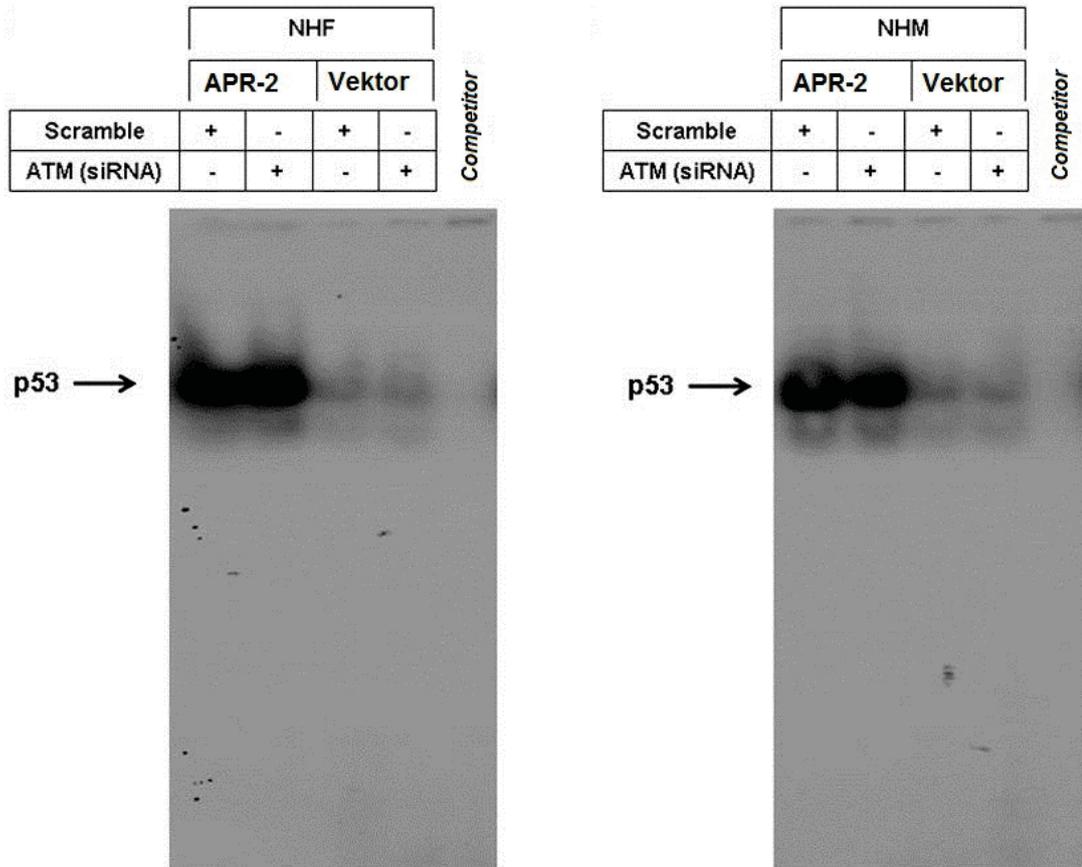


Abb. 9F und G. Der EMSA zeigt die p53-Aktivierung in Abhängigkeit von der Inhibition des ATM-Proteins durch seine spezifische siRNA in NHF- und NHM-Zellen, die mit einem APR-2-Plasmid bzw. einem leeren Vektor transfiziert wurden. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit identischen Ergebnissen.

4.9 Ein Knockdown der APR-2-Expression in Melanomzellen blockiert teilweise den Zytostatika-induzierten Zelltod

Für die Analyse des Einflusses eines Knockdowns von APR-2 auf den durch Zytostatika verursachten Zelltod von Melanomzellen wurden die Melanomzelllinien A375 und BLM mit der APR-2-spezifischen siRNA transfiziert. Nach einem Intervall von 24 Stunden wurden die Zellen mit einem Zytostatikum für weitere 24 Stunden inkubiert, bis die Zellviabilität mittels MTT-Assay ermittelt wurde.

Es wurde festgestellt, dass unter einem Knockdown von APR-2 durch die spezifische siRNA die Zytostatika-induzierte Apoptose von Melanomzellen durch Bortezomib (Abb. 10A), Cisplatin (Abb. 10B), CH11 (Abb. 10C), DTIC (Abb. 10D) und TNF- α (Abb. 10E) teilweise gehemmt wird.

Indes wurde unter einer Überexpression von APR-2 die Zytostatika-induzierte Apoptose von Melanomzellen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 10A bis 10E).

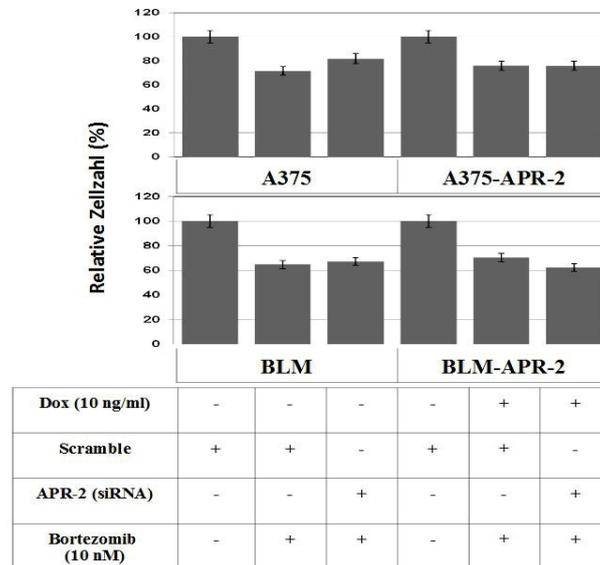


Abb. 10A Auswertung des MTT-Assays mit Darstellung des Zellüberlebens nach einer Bortezomib-induzierten Apoptose der Melanomzellen unter einer APR-2-Überexpression bzw. unter dessen Knockdown durch die spezifische siRNA des APR-2. Die Induktion der APR-2-Expression erfolgte durch Gabe von Doxycyclin (10 ng/ml) zum Kulturmedium beider Zelllinien (TetOn-Expressionssystem).

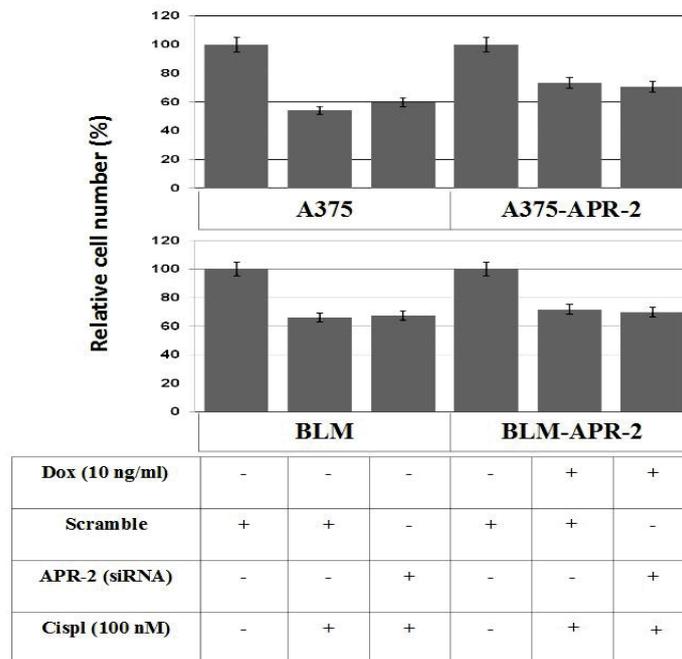


Abb. 10B Auswertung des MTT-Assays mit Darstellung des Zellüberlebens nach einer Cisplatin-induzierten Apoptose der Melanomzellen unter einer APR-2-Überexpression bzw. unter dessen Knockdown durch die spezifische siRNA des APR-2. Die Induktion der APR-2-Expression erfolgte durch Gabe von Doxycyclin (10 ng/ml) zum Kulturmedium beider Zelllinien (TetOn-Expressionssystem).

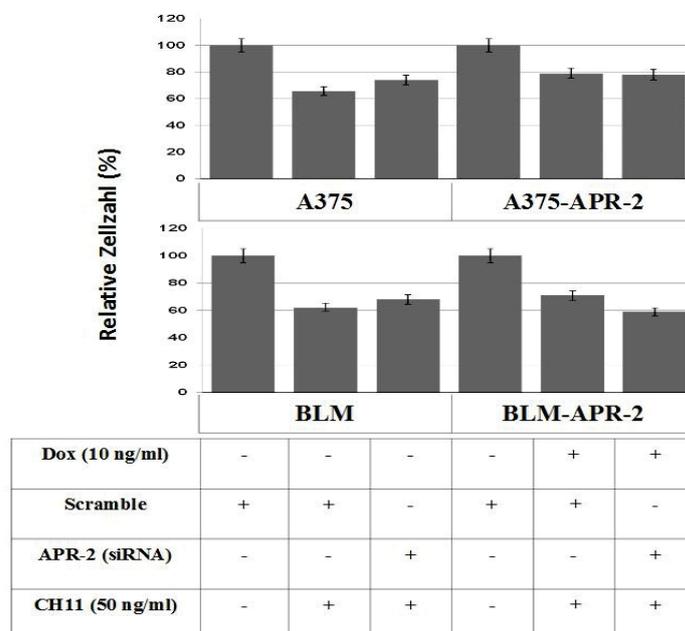


Abb. 10C Auswertung des MTT-Assays mit Darstellung des Zellüberlebens nach einer CH11-induzierten Apoptose der Melanomzellen unter einer APR-2-Überexpression bzw. unter dessen Knockdown durch die spezifische siRNA des APR-2. Die Induktion der APR-2-Expression erfolgte durch Gabe von Doxycyclin (10 ng/ml) zum Kulturmedium beider Zelllinien (TetOn-Expressionssystem).

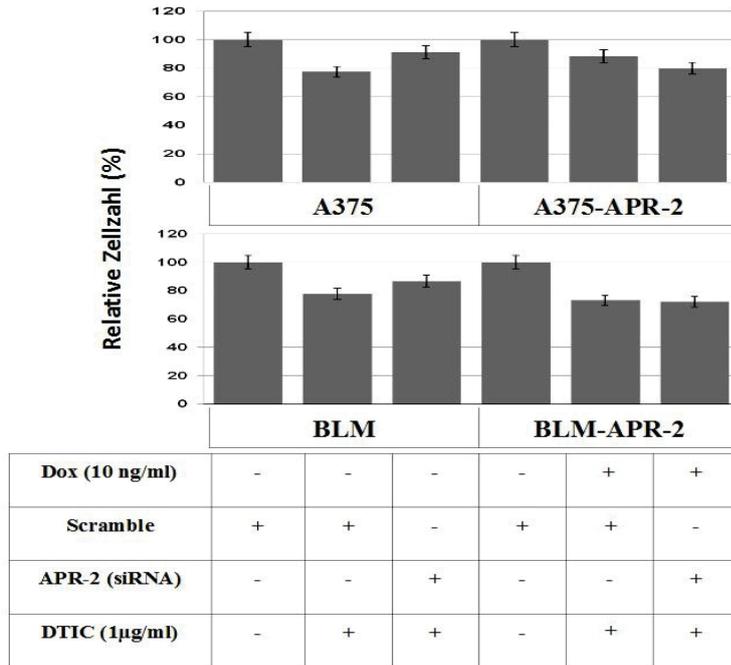


Abb. 10D Auswertung des MTT-Assays mit Darstellung des Zellüberlebens nach einer DTIC-induzierten Apoptose der Melanomzellen unter einer APR-2-Überexpression bzw. unter dessen Knockdown durch die spezifische siRNA des APR-2. Die Induktion der APR-2-Expression erfolgte durch Gabe von Doxycyclin (10 ng/ml) zum Kulturmedium beider Zelllinien (TetOn-Expressionssystem).

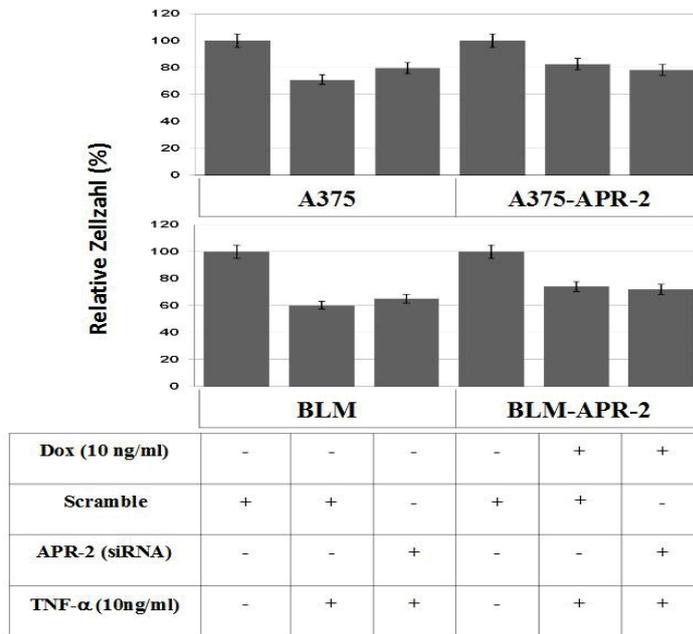


Abb. 10E Auswertung des MTT-Assays mit Darstellung des Zellüberlebens nach einer TNF-α-induzierten Apoptose der Melanomzellen unter einer APR-2-Überexpression bzw. unter dessen Knockdown durch die spezifische siRNA des APR-2. Die Induktion der APR-2-Expression erfolgte durch Gabe von Doxycyclin (10 ng/ml) zum Kulturmedium beider Zelllinien (TetOn-Expressionssystem).

5 Diskussion

Die erhöhte Inzidenz des malignen Melanoms mit seiner hohen Mortalität und Resistenz gegen die derzeit verfügbaren Therapien stellt eine enorme Herausforderung dar. Daher ist die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien dringend erforderlich.

Das APR-2 gehört zu einer Proteinfamilie, die für die Fas-induzierte Apoptose verschiedener Tumorzelltypen einschließlich des Melanoms essentiell ist (Hassan et al., 2005). Ferner spielt diese Proteingruppe eine wichtige Rolle in der Apoptose von promyelozytischen Leukämiezellen, die durch Trans-Retinoinsäure induziert wird (Zhu et al., 2000).

In der vorliegenden Studie konnte mittels Durchflusszytometrie in den Melanomzelllinien eine dosis- und zeitabhängige Tötungseffizienz des APR-2-Proteins gezeigt werden. Die Analyse der Gesamtzelllysate der APR-2-exprimierenden Zellen mittels Western-Blot ergab eine Steigerung der Expressierung der Apoptose-Marker Caspase 3, Caspase-9, PARP sowie Cytochrom c, sodass die durchflusszytometrisch erhobene Erkenntnis des Zugrundeliegens eines apoptotischen Mechanismus bestätigt wurde.

Die vorliegende Studie zeigt die Fähigkeit des APR-2, einen Stress des ER auszulösen, der wiederum die Apoptose von Melanomzellen über mitochondriale sowie nicht-mitochondriale Wege vermittelt. Eine Durchflusszytometrie der APR-2-exprimierenden Zellen unter Verwendung der JC-1-Färbung ergab, dass eine APR-2-Expression mit einem verstärkten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials assoziiert ist, sodass eine zentrale Rolle der mitochondrialen Dysregulation belegt wurde.

Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Verwendung von Antikörpern mit spezifischen Markern für das ER bzw. für die Mitochondrien wurde die subzelluläre Lokalisation des APR-2 am ER, jedoch nicht am Mitochondrium ausfindig gemacht. Auch die ergänzende Western-Blot-Analyse der subzellulären Fraktionen der Mitochondrien und des ER beider Zelllinien belegte die Lokalisation des APR-2 am ER. Diese unmittelbare Lokalisation am ER ermöglicht den Stress des ER und bedingt somit seine proapoptotische Funktion. In der durchflusszytometrischen Analyse der APR-2-exprimierenden Melanomzellen unter Anwendung eines Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffs wurde ein zeitabhängiger Ca^{2+} -Anstieg nachgewiesen, was einen APR-2-induzierten Stress des ER induziert, der eine zentrale Rolle in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose spielt.

Dieser Stress des ER scheint wiederum den ersten Schritt des mehrschrittigen Prozesses der APR-2-induzierten Apoptose zu bilden.

Das Potential eines Stresses des ER in der Melanomtherapie ist bereits bekannt (Croft et al., 2013). Der Stress des ER ist für die Regulierung des Gleichgewichts zwischen Tumorzelltod und Tumorzellwachstum sowie für die Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika von Bedeutung, worüber bereits in mehreren Studien berichtet wurde (Hassan et al., 2008, Zong et al., Scorrano et al. 2003, Serrone et al., 2000, Zhu et al., 2000). Das ER spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumhomöostase, für die Proteinbiosynthese, die posttranslationale Modifikation, die korrekte Proteinfaltung sowie die Proteinsortierung und den Proteintransport. Daher führt eine Veränderung der Calciumhomöostase und eine Akkumulation von ungefalteten Proteinen zur Induktion eines Stresses des ER, der durch Transmembranproteine wie PERK, IRE1 α und ATF6, detektiert wird, die am ER ansässig sind (Lai et al., 2007). Die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER in das Zytoplasma wurde als Schlüsselereignis in vielen Apoptose-Modellen beschrieben und ist mit der mitochondrial-vermittelten Apoptose assoziiert. Des Weiteren wurden viele ER-Proteine beschrieben, die die Apoptose beeinflussen, indem sie entweder mit Bcl-2-Familienmitgliedern interagieren oder die Ca²⁺-Freisetzung durch das ER verändern. Außerdem stellen mehrere ER-Proteine Caspase-Substrate dar, die die Ausführungsphase der Apoptose regulieren können (Breckenridge et al., 2003). In der vorliegenden Studie ergaben die Western-Blot-Analysen den Nachweis einer stärkeren Phosphorylierung von IRE1, einen stärkeren Abbau von Calpain, und Spaltung von Caspase-4 in APR-2-exprimierenden Zellen. Ferner wurde eine Phosphorylierung von PERK, Induktion von CHOP, ATF4 und BIM nachgewiesen. Die ergänzende Analyse der Kernextrakte mittels EMSA ergab ferner den Nachweis einer Verstärkung der DNA-Bindungsaktivität von CHOP. In Zusammenschau der ermittelten Erkenntnisse konnten folgende Kaskaden abgegrenzt werden, die unter einer ER-induzierten intrazellulärem Ca²⁺-Freisetzung ausgelöst werden und zur Apoptose führen: (1) Ein Caspase-4-abhängiger Weg über die Aktivierung von Calpain, (2) ein mitochondrialer apoptotischer Weg über die IRE1 α / ASK1 / JNK-Kaskade und (3) ein mitochondrial-unabhängiger apoptotischer Weg über PERK / ATF4 / CHOP / Bim. Die proapoptotischen Proteine Bax und Bak spielen eine Schlüsselrolle in der Änderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), was wiederum zur Freisetzung mitochondrialer apoptogener Faktoren führt. Die Proteine Bax und Bak reagieren auf den

Stress des ER mit einer Konformationsänderung, sodass sie eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER-Lumen in das Zytoplasma bewirken (Zong et al., 2003). Unter einer Exposition gegenüber Ca^{2+} kommt es zu einer Autospaltung von Calpain, was zu dessen Aktivierung und letztlich auch Abbau führt (Goll et al., 2003). Neben der Beteiligung an der Apoptose durch eine Spaltung pro- und anti-apoptotischer Proteine in Abhängigkeit des Stimulus und der Art der beteiligten Zellen (Benetti et al., 2001) wurde berichtet, dass Calpain die Caspase-4 bei der ER-Stress-vermittelten Apoptose spaltet (Hitomi et al., 2004). Daher wurde die Rolle der IRE1 α / ASK1 / JNK-Kaskade in der Regulation von Bax im Detail untersucht, um den zugrunde liegenden Mechanismus zu definieren, der letztlich zu einer APR-2-induzierten, mitochondrialen Dysregulation führt. Die Ergebnisse zeigen, dass das APR-2 die Expression von Bax verstärkt. Dieses wiederum transloziert zu den Mitochondrien, wo es zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c und Spaltung von Caspase-9, Caspase-3 und PARP führt. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Verwendung spezifischer Marker für das ER bzw. für die Mitochondrien wurde Bax sowohl am ER als auch am Mitochondrium lokalisiert. In den Western-Blot-Analysen konnte in den APR-2-exprimierenden Melanomzellen die Bax-Expression ebenfalls sowohl in der mitochondrialen als auch in der ER-Fraktion nachgewiesen werden.

Die Rolle des ER in der Modulation verschiedener Zellfunktionen, einschließlich der Apoptose, ist bekannt (Hassan et al., 2008). Unter einem Stress des ER wird IRE1 phosphoryliert, sodass der *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* rekrutiert wird, sodass sich ein Komplex bildet, der anschließend ASK1 aktiviert (Nishitoh et al., 1998). Das aktive ASK1 wiederum aktiviert JNK, was zu einer Verstärkung der Bindungsaktivität seiner physiologischen Substrate AP-1 und p53 führt (Hassan et al., 2008; Kim et al., 2009), die für die Regulierung der APR-2-induzierten Bax-Expression essentiell zu sein scheinen.

Dem Protein p53 konnte in der vorliegenden Studie eine wichtige Rolle in der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen zugeschrieben werden. Zwar sind im Falle eines DNA-Schadens verschiedene Proteine wie JNK (Kim et al., 2009) und die ATM-Kinase an der Regulation des p53 beteiligt (Banin et al., 1998; Chehab et al., 2000), dennoch konnte der Mechanismus der APR-2-induzierten Aktivierung von p53 untersucht werden. Sowohl JNK als auch ATM wurden daher in Melanom- und NHF-Zellen bezüglich der APR-2-induzierten p53-Aktivierung bei DNA-Schäden analysiert.

Aus mehreren Studien geht hervor, dass die ATM-Kinase sowohl direkt (z. B. Banin et al., 1998) als auch indirekt (z. B. Chehab et al., 2000) an der Aktivierung von p53 in verschiedenen Zelltypen beteiligt ist. Obwohl die Rolle von ATM bei der Regulation von p53 als Reaktion auf DNA-Schäden bereits vorbeschrieben ist, zeigten die Ergebnisse dieser Studie, dass JNK bei der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen sowie NHF und NHM an der Regulation von p53 beteiligt ist, nicht jedoch ATM.

Neben der Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} zeigen die gewonnenen Daten die Fähigkeit von APR-2, die Aktivierung von Calpain zu verstärken, das wiederum die Spaltung und somit Aktivierung von Caspase-4 vermittelt. Die APR-2-induzierte Caspase-4-Aktivierung scheint zumindest teilweise die Spaltung von Caspase-9 zu vermitteln. Es wurde berichtet, dass Caspase-4, ähnlich wie Caspase-12, über Cytochrom c-unabhängige Mechanismen an der Spaltung von Caspase-9 beteiligt ist (Yukioka et al., 2008; Morishima et al., 2002).

In Zusammenschau der gewonnenen Daten lassen sich drei parallele Signalwege abgrenzen, die für die Modulation der APR-2-induzierten Apoptose essentiell sind: Der erste Weg (IRE1 α / ASK1 / JNK / Cyt.c / Caspase-9 / Caspase-3 / PARP) ist mitochondrial gebunden. Die anderen zwei Wege (Calpain / Caspase-4 / Caspase-9 / Caspase-3 / PARP und PERK / ATF4 / CHOP / Bim) sind unabhängig vom Mitochondrium (Abb. 11). Unter Verwendung spezifischer Inhibitoren für IRE1 α (Irestatin), Calpain (ALLM), JNK (SP600125), Caspase-4 (Z-LEVD-FMK) und ASK1 (Thioredoxin) konnte gezeigt werden, dass eine simultane Inhibition dieser Signalwege zu einer effizienten Blockierung der APR-2-induzierten Apoptose führt, während eine Kombination von zwei Inhibitoren zu einer teilweisen Hemmung führt. Es konnte ferner gezeigt werden, dass unter einem Knockdown von APR-2 durch die spezifische siRNA die Zytostatika-induzierte Apoptose der Melanomzellen durch Bortezomib, Cisplatin, CH11, DTIC und TNF- α teilweise gehemmt wird

Zusammenfassend bieten die ermittelten Ergebnisse neben der Erkenntnis der Tötungseffizienz eines APR-2-Gentransfers einen Einblick in die molekularen Mechanismen der APR-2-induzierten Apoptose von Melanomzellen. Die Verwendung des APR-2-Gentransfers wird daher als komplementärer Ansatz für die Behandlung des chemotherapieresistenten, metastasierten malignen Melanoms in Betracht gezogen.

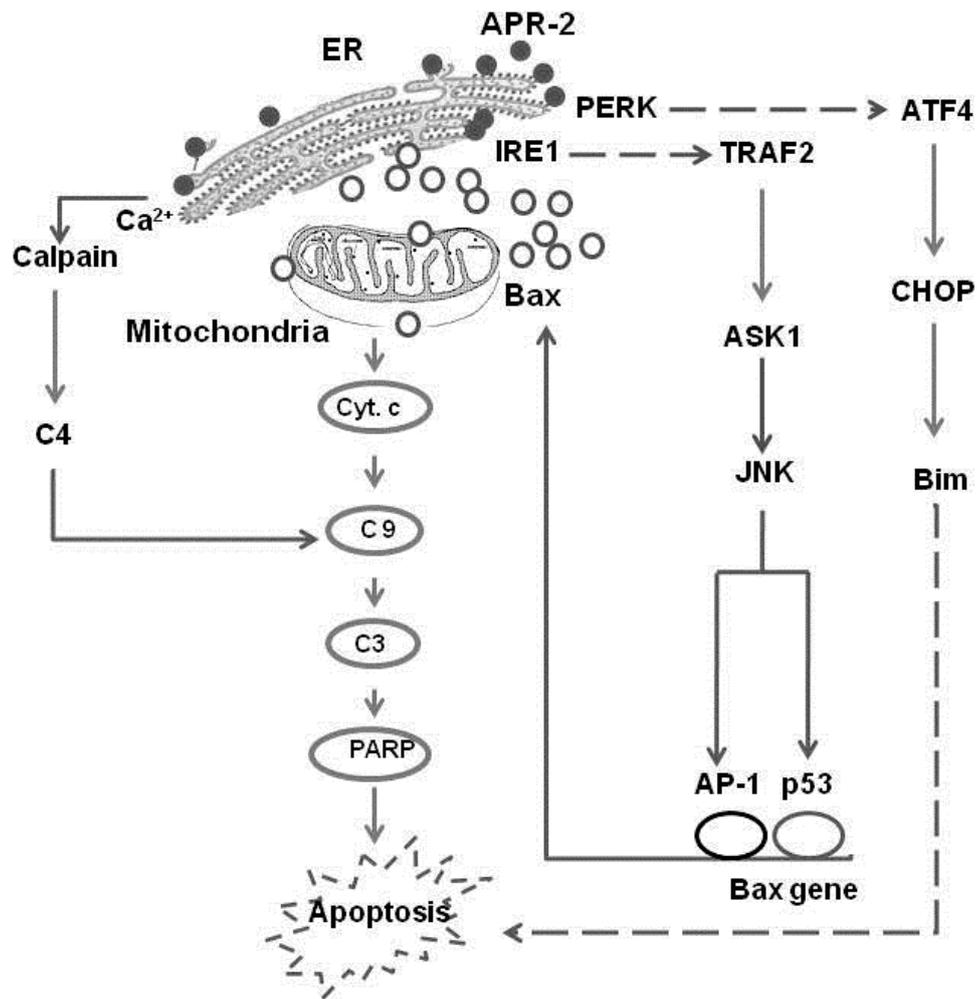


Abb. 11 Vorgeschlagenes Modell für APR-2-induzierte Apoptose in humanen Melanomzellen. Durch die unmittelbare Lokalisation des APR-2 am endoplasmatischen Retikulum (ER) wird dessen Stress verursacht, der zur intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} und durch die Aktivierung von IRE1 α und PERK nachgewiesen wird. Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} führt wiederum zur verstärkten Aktivierung von Calpain, das anschließend aufeinanderfolgend zur Spaltung von Caspase-4, Caspase-9, Caspase-3 und Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) führt. Parallel vermittelt IRE1 α die Aktivierung von ASK1 und seiner nachgeschalteten Kinase JNK, die an der Verstärkung der DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1 und p53 beteiligt ist. Diese wiederum induzieren die Bax-Expression. Zusätzlich führt die Aktivierung von PERK zur Induktion von ATF4 und anschließend zur Induktion und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CHOP zusammen mit der Induktion der Bim-Expression, die zur APR-2-induzierten Apoptose beiträgt. Durch die Lokalisation von Bax am ER wird der APR-2-induzierte Stress des ER erhöht, während seine Lokalisation an den Mitochondrien den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) zur Folge hat. Dies ist durch die anschließende Freisetzung von Cytochrom c, Spaltung von Caspase-9, Caspase-3, PARP und anderen Substraten gekennzeichnet, die die APR-2-induzierte Apoptose von Melanomzellen vermittelt. (Nach Selimovic D, Ahmad et. al., 2011.)

6 Fazit

Die aggressivste Form der kutanen Tumoren ist das maligne Melanom. In den westlichen Populationen zählt es zu den Tumoren mit der höchsten Mortalität. Patienten im fortgeschrittenen Stadium mit einem Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50% bzw. 10-20%. Der Grund für diese schlechte Prognose resultiert vor allem aus der Tendenz, im Vergleich zu anderen Tumoren früh zu metastasieren, und aus der wachsenden Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie. Metastasierende Neoplasien einschließlich des Melanoms sind häufig mit einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose verbunden, die durch verschiedene therapeutische Modalitäten induziert wird. Daher ist der Erfolg einer systemischen Therapie zur Behandlung des metastasierten Melanoms minimal.

Das Ziel dieser Studie war es, die Fähigkeit des *apoptosis-related protein* (APR)-2 als einen apoptotischen Mediator *in vitro* zu charakterisieren und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen darzulegen, um Möglichkeiten zur Überwindung der Melanomresistenz bei der Therapie aufzuzeigen. Für die Analyse der Tötungseffizienz des APR-2 bei Melanomzellen wurden als Modell die Melanomzelllinien A375 und BLM mit einer regulierten Expression von APR-2 verwendet.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene zellbiologische und molekularbiologische Techniken und Verfahren für die In-vitro-Analyse des APR-2 angewandt. Mittels regulierter Expression von APR-2 in den Melanomzellen wurde der Zelltod durch einen apoptotischen Mechanismus hervorgerufen.

Der apoptotische Mechanismus wurde durch die Freisetzung von Cytochrom c, die Aktivierung von Caspase-3, Caspase-9 und die Spaltung von PARP charakterisiert. Die weitere, detaillierte funktionelle Analyse des APR-2 ergab, dass die Anheftung von APR-2 am endoplasmatischen Retikulum die Hauptrolle bei der Modulation der APR-2-induzierten Apoptose in Melanomzellen darstellt. Die APR-2-induzierte Apoptose von Melanomzellen wurde sowohl durch einen Stress des endoplasmatischen Retikulums als auch durch eine mitochondriale Dysregulation vermittelt. Ferner wurde in den APR-2-exprimierenden Melanomzellen eine Aktivierung von *apoptosis signal-regulating kinase* (ASK) 1, *c-jun-N-terminal kinase* (JNK) und der Transkriptionsfaktoren AP-1 und p53 festgestellt sowie eine Induktion der Bax-Expression. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blotting konnten APR-2 am ER und Bax sowohl am ER als auch am

Mitochondrium lokalisiert werden. Die Analyse der inhibitorischen Experimente zeigte, dass die APR-2-induzierte Apoptose von Melanomzellen durch drei parallele Wege vermittelt wird:

Ein Weg (IRE1 / *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* / ASK1 / JNK / Cyt. c / caspase-9 / caspase-3 / PARP) scheint mitochondrial gebunden zu sein, während die weiteren zwei Wege (Calpain / Caspase-4 / Caspase-9 / Caspase-3 / PARP und *protein kinase RNA-like ER kinase* / ATF4 / CHOP / Bim) unabhängig von Mitochondrium zu sein scheinen.

In den letzten zwei Jahrzehnten gab es nur wenige neue Zytostatika, die beim metastasierten Melanom wirksam sind. Diese Therapeutika waren jedoch meist mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Daher kann die Entwicklung alternativer therapeutischer Ansätze wie eine Substitutionstherapie in Form eines Gentransfers, eine Kombinationstherapie oder die Anwendung von niedermolekularen Verbindungen dazu beitragen, die erheblichen Nebenwirkungen der konventionellen Therapien zu reduzieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass zukünftige Melanom-Therapien von Medikamenten, die auf der molekularen Wirkung proapoptotischer Mediatoren wie dem APR-2 allein oder in Kombination mit spezifischen Inhibitoren oder Chemotherapeutika beruhen, profitieren können. Somit kann der Therapieerfolg unter einer Minimierung der Nebenwirkungen optimiert werden. Dieses neuartige therapeutische Konzept könnte zu einer erhöhten APR-2-induzierten Apoptose in Melanomzellen führen und somit den Behandlungserfolg bei Patienten im Stadium des metastasierten malignen Melanoms verbessern. Klinische Studien sind jedoch dringend nötig, um zu bestätigen, ob die In-vitro-Ergebnisse dieser Studie auf klinische In-vivo-Therapieeinstellungen angewendet werden können.

7 Referenzen

Amaral JD1, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* 2010 Feb;9(45):145-52.

Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 2001 Dec 3; 20(23): 6627–6636.

Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Nov 1;3(11):a007526. doi: 10.1101/cshperspect.a007526. Review

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol.* 2001 Aug 15;19(16):3622-34

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1674-7

Benetti R, Del Sal G, Monte M, Paroni G, Brancolini C, Schneider C. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 2001 Jun 1;20(11):2702-14

Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park).* 2009 May;23(6):488-96. Review

Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene.* 2005 May 12;24(21):3459-71

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 2003 Mar 31;160(7):1115-27

Catchpoole DR, Stewart BW. Formation of apoptotic bodies is associated with internucleosomal DNA fragmentation during drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 1995 Jan;216(1):169-77

Cetindere T, Nambiar S, Santourlidis S, Essmann F, Hassan M. Induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase by death receptor activation contributes to apoptosis of melanoma cells via mitochondrial damage-dependent ROS accumulation. *Cell Signal* 2010 Feb;22(2):197-211. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.09.013. Epub 2009 Sep 30

Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 2000 Feb 1;14(3):278-88

Chhabra A, Mehrotra S, Chakraborty NG, Dorsky DI, Mukherji B. Activation-induced cell death of human melanoma specific cytotoxic T lymphocytes is mediated by apoptosis-inducing factor. *Eur J Immunol.* 2006 Dec;36(12):3167-74

Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia.* 1999 Apr;1(1):5-15. Review

Corazzari M, Lovat PE, Armstrong JL, Fimia GM, Hill DS, Birch-Machin M, Redfern CP, Piacentini M. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57. *Br J Cancer.* 2007 Apr 10;96(7):1062-71. Epub 2007 Mar 13

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002 Sep;2(9):647-56. Review

Croft A, Tay KH, Boyd SC, Guo ST, Jiang CC, Lai F, Tseng HY, Jin L, Rizos H, Hersey P, Zhang XD. Oncogenic activation of MEK/ERK primes melanoma cells for adaptation to

endoplasmic reticulum stress. *J Invest Dermatol.* 2014 Feb;134(2):488-497. doi: 10.1038/jid.2013.325. Epub 2013 Aug 6.

Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997 Jan;21(1):88-101. Review. No abstract available

Dang TP. Notch, apoptosis and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2012;727:199-209. Review

Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene.* 2008 Jan 10;27(3):285-99. Epub 2007 Aug 13

Dienstmann R, Tabernero J. BRAF as a target for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 Mar;11(3):285-95. Review

Dillman RO, Barth NM, Vandermolen LA, Mahdavi K, McClure SE. Should high-dose interleukin-2 still be the preferred treatment for patients with metastatic melanoma? *Cancer Biother Radiopharm.* 2012 Aug;27(6):337-43

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):33-42

Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatol Ther.* 2005 Sep-Oct;18(5):369-85. Review

Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Häussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology.* 2002 Jan 20;292(2):272-84

Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett.* 1997 May 19;115(2):185-93

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):48-58. Review

Grubb DR, Ly JD, Vaillant F, Johnson KL, Lawen A. Mitochondrial cytochrome c release is caspase-dependent and does not involve mitochondrial permeability transition in didemnin B-induced apoptosis. *Oncogene.* 2001 Jul 5;20(30):4085-94

Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci.* 1997 Jun;19(3):119-25. Review. Erratum in: *Pharm World Sci* 1997 Oct;19(5):253

Hassan M, Alaoui A, Feyen O, Mirmohammadsadegh A, Essmann F, Tannapfel A, Gulbins E, Schulze-Osthoff K, Hengge UR. The BH3-only member Noxa causes apoptosis in melanoma cells by multiple pathways. *Oncogene.* 2008 Jul 31;27(33):4557-68. Epub 2008 Apr 14. Erratum in: *Oncogene.* 2011 Apr 28;30(17):2086

Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. *Virology.* 2005 Mar 15;333(2):324-36

Hassan M, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Activation of RB/E2F signaling pathway is required for the modulation of hepatitis C virus core protein-induced cell growth in liver and non-liver cells. *Cell Signal.* 2004 Dec;16(12):1375-85

Hassan M, Mirmohammadsadegh A, Selimovic D, Nambiar S, Tannapfel A, Hengge UR. Identification of functional genes during Fas-mediated apoptosis using a randomly

fragmented cDNA library. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Sep;62(17):2015-26

Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-kader O. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology.* 2009 May;49(5):1469-82

Hassan M, Selimovic D, Ghozlan H, Abdel-Kader O. Induction of high-molecular-weight (HMW) tumor necrosis factor(TNF) alpha by hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3) in liver cells is AP-1 and NF-kappaB-dependent activation. *Cell Signal.* 2007 Feb;19(2):301-11. Epub 2006 Aug 17

Hassan M, Selimovic D, Hannig M, Haikel Y, Brodell RT, Megahed M. Endoplasmic reticulum stress-mediated pathways to both apoptosis and autophagy: Significance for melanoma treatment. *World J Exp Med.* 2015 Nov 20; 5(4): 206–217.

Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoefflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature.* 2010 Mar 18;464(7287):431-5. Epub 2010 Feb 3

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6. Review

Hirt UA, Leist M. Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. *Cell Death Differ.* 2003 Oct;10(10):1156-64

Hiscutt EL, Hill DS, Martin S, Kerr R, Harbottle A, Birch-Machin M, Redfern CP, Fulda S, Armstrong JL, Lovat PE. Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein to increase the efficacy of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis for melanoma therapy. *J Invest Dermatol.* 2010 Sep;130(9):2250-8. doi: 10.1038/jid.2010.146. Epub 2010 Jun 3.3

- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 2004 May 10;165(3):347-56. Epub 2004 May 3
- Hou LL, Jin L, Han CC, Cheng B, Wang L, Zhang XD, Zhang LJ. [Role of dysregulation of Bim in resistance of melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2011 Jul;33(7):494-8. Chinese
- Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol.* 2003 Mar;199(3):275-88. Review
- Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 2011 Dec;30(4):222-8. Review
- Kang MH and Reynolds CP. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 15; 15(4): 1126–1132.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57. Review
- Kim MS, Kwon JY, Kang NJ, Lee KW, Lee HJ. Phloretin induces apoptosis in H-Ras MCF10A human breast tumor cells through the activation of p53 via JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Aug;1171:479-83
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995 Nov 15;14(22):5579-88
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda).* 2007 Jun;22:193-201. Review

- Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci.* 2001 Aug;26(8):504-10. Review
- Lefevre M, Vergier B, Balme B, Thiebault R, Delaunay M, Thomas L, Beylot-Barry M, Machet L, De Muret A, Bioulac-Sage P, Bailly C. Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. *Am J Surg Pathol.* 2003 Jun;27(6):717-24
- Li Y, McClay EF. Systemic chemotherapy for the treatment of metastatic melanoma. *Semin Oncol.* 2002 Oct;29(5):413-26
- Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):95-9
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996 Jul 12;86(1):147-57
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501. Review. No abstract available
- Messeguer F, Agustí-Mejías A, Traves V, Requena C, Alegre V, Guillén C, Oliver V, Nagore E. Mitotic rate and subcutaneous involvement are prognostic factors for survival after recurrence in patients with only locoregional skin metastasis as the first site of recurrence from cutaneous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012 Feb 4. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04454.x
- Monzon JG, Dancey J. Targeted agents for the treatment of metastatic melanoma. *Onco Targets Ther.* 2012;5:31-46
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):34287-94. Epub

2002 Jul 3

Morpurgo G, Fioretti B, Catacuzzeno L. The increased incidence of malignant melanoma in obese individuals is due to impaired melanogenesis and melanocyte DNA repair. *Med Hypotheses*. 2012 Apr;78(4):533-5. Epub 2012 Feb 14

Nardin A, Wong WC, Tow C, Molina TJ, Tissier F, Audebourg A, Garcette M, Caignard A, Avril MF, Abastado JP, Prévost-Blondel A. Dacarbazine promotes stromal remodeling and lymphocyte infiltration in cutaneous melanoma lesions. *J Invest Dermatol*. 2011 Sep;131(9):1896-905. doi: 10.1038/jid.2011.128. Epub 2011 Jun 9

Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*. 1998 Sep;2(3):389-95

Pavel S, Smit NP. Metabolic interference of melanogenesis in pigment cells. *Sb Lek*. 1996;97(1):29-39

Radović N, Cucić S, Altarac S. [Molecular aspects of apoptosis]. *Acta Med Croatica*. 2008 Jul;62(3):249-56. Review. Croatian

Rahmani M, Mayo M, Dash R, Sokhi UK, Dmitriev IP, Sarkar D, Dent P, Curiel DT, Fisher PB, Grant S. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 potently induces apoptosis in human myeloid leukemia cells through a process regulated by endoplasmic reticulum stress. *Mol Pharmacol*. 2010 Dec;78(6):1096-104. doi: 10.1124/mol.110.068007. Epub 2010 Sep 21. 3

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol*. 2002 Aug;192(2):131-7. Review

Röckmann H, Schadendorf D Role of apaf-1 in melanoma drug resistance and apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2005 Aug;125(2):386-7

- Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3179-84
- Romeo Y, Moreau J, Zindy PJ, Saba-El-Leil M, Lavoie G, Dandachi F, Baptissart M, Borden KL, Meloche S, Roux PP. RSK regulates activated BRAF signalling to mTORC1 and promotes melanoma growth. *Oncogene.* 2012 Jul 16. doi: 10.1038/onc.2012.312
- Sabel MS, Sondak VK. Pros and cons of adjuvant interferon in the treatment of melanoma. *Oncologist.* 2003;8(5):451-8. Review.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2861-74. Review
- Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):96-9
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 2003 Apr 4;300(5616):135-9. Epub 2003 Mar 6
- Selimovic D, Ahmad M, El-Khattouti A, Hannig M, Haïkel Y, Hassan M. Apoptosis-related protein-2 triggers melanoma cell death by a mechanism including both endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysregulation; *Carcinogenesis.* 2011 Aug;32(8):1268-78
- Selimovic D, Porzig BB, El-Khattouti A, Badura HE, Ahmad M, Ghanjati F, Santourlidis S, Haikel Y, Hassan M. Bortezomib/proteasome inhibitor triggers both apoptosis and autophagy-dependent pathways in melanoma cells. *Cell Signal.* 2012 Oct 15;25(1):308-318. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.10.004
- Serrano FA, Matsuo AL, Monteforte PT, Bechara A, Smaili SS, Santana DP, Rodrigues T, Pereira FV, Silva LS, Machado J Jr, Santos EL, Pesquero JB, Martins RM, Travassos LR, Caires AC, Rodrigues EG. A cyclopalladated complex interacts with mitochondrial

membrane thiol-groups and induces the apoptotic intrinsic pathway in murine and cisplatin-resistant human tumor cells. *BMC Cancer*. 2011 Jul 14;11:296

Serrone L, Zeuli M, Sega FM, Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res*. 2000 Mar;19(1):21-34

Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3138-51. Review

Su F, Bradley WD, Wang Q, Yang H, Xu L, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Kim MJ, Trunzer K, Lee RJ, Schostack K, Carter J, Albert T, Germer S, Rosinski J, Martin M, Simcox ME, Lestini B, Heimbrook D, Bollag G. Resistance to selective BRAF inhibition can be mediated by modest upstream pathway activation. *Cancer Res*. 2012 Feb 15;72(4):969-78. Epub 2011 Dec 28

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 2000 Aug 21;192(4):571-80

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999 Feb 4;397(6718):441-6

Tawbi HA, Kirkwood JM. Management of metastatic melanoma. *Semin Oncol*. 2007 Dec;34(6):532-45

Thingnes J, Lavelle TJ, Hovig E, Omholt SW. Understanding the melanocyte distribution in human epidermis: an agent-based computational model approach. *PLoS One*. 2012;7(7):e40377. Epub 2012 Jul 9

Thompson HJ, Strange R, Schedin PJ. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992 Nov-Dec;1(7):597-602. Review

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000 Jul 7;102(1):43-53

Werdin C, Limas C, Knodell RG. Primary malignant melanoma of the rectum. Evidence for origination from rectal mucosal melanocytes. *Cancer.* 1988 Apr 1;61(7):1364-70

Weyers W, Euler M, Diaz-Cascajo C, Schill WB, Bonczkowitz M. Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. *Cancer.* 1999 Jul 15;86(2):288-99

Widlak P, Garrard WT. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem.* 2005 Apr 15;94(6):1078-87. Review

Widłak P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):1037-44. Review

Wright KM, Linhoff MW, Potts PR, Deshmukh M. Decreased apoptosome activity with neuronal differentiation sets the threshold for strict IAP regulation of apoptosis. *J Cell Biol.* 2004 Oct 25;167(2):303-13

Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 1981 Jul;13(4):681-92

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull.* 1997;53(3):451-65. Review

Yadav V, Zhang X, Liu J, Estrem S, Li S, Gong XQ, Buchanan S, Henry JR, Starling JJ, Peng SB. Reactivation of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway by FGF Receptor 3 (FGFR3)/Ras Mediates Resistance to Vemurafenib in Human B-RAF V600E Mutant Melanoma. *J Biol Chem.* 2012 Jun 22 [Epub ahead of print]

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):13935-40. Epub 2001 Jan 29

Yu BD, Becker-Hapak M, Snyder EL, Vooijs M, Denicourt C, Dowdy SF. Distinct and nonoverlapping roles for pRB and cyclin D:cyclin-dependent kinases 4/6 activity in melanocyte survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 9;100(25):14881-6. Epub 2003 Nov 20

Yukioka F, Matsuzaki S, Kawamoto K, Koyama Y, Hitomi J, Katayama T, Tohyama M. Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int*. 2008 Mar-Apr;52(4-5):683-7. Epub 2007 Sep 4

Zaidi MR, De Fabo EC, Noonan FP, Merlino G. Shedding light on melanocyte pathobiology in vivo. *Cancer Res*. 2012 Apr 1;72(7):1591-5. Epub 2012 Mar 15. Review

Zeng L, Li T, Xu DC, Liu J, Cui MZ, Fu X, Xu X. Death Receptor 6 Induces Apoptosis Not Through Type I or Type II Pathways, but Via a Unique Mitochondria-dependent Pathway by Interacting with Bax. *J Biol Chem*. 2012 Jul 3

Zhang H, Rosdahl I. Expression of p27 and MAPK proteins involved in all-trans retinoic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in matched primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol*. 2004 Nov;25(5):1241-8

Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol*. 1998 Apr;12(4):871-82. Review

Zhu F, Yan W, Zhao ZL, Chai YB, Lu F, Wang Q, Peng WD, Yang AG, Wang CJ. Improved PCR-based subtractive hybridization strategy for cloning differentially expressed genes. *Biotechniques*. 2000 Aug;29(2):310-3

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 2003 Jul 7;162(1):59-69

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 1997 Aug 8;90(3):405-13

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23;274(17):11549-56

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Simeon Santourlidis für die Übernahme der Betreuung der Arbeit und seine großzügige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Andreas Krieg für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Bereitschaft, diese Arbeit vor der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Mohamed Hassan für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Er hat mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und durch viele anregende Diskussionen und Denkanstöße wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke der Leitung und den Mitarbeitern der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf für die Bereitstellung der Laborräume, die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei allen Problemen im Laboralltag.

Meinem alten Deutschlehrer Manfred Weise danke ich für seine hartnäckige Ermutigung und seine strengen Mahnungen zur Sorgfalt und Genauigkeit bei der Abfassung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich auch meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Rücksicht diese Arbeit wohl kaum möglich gewesen wäre.