

Aus dem Rudolf-Virchow-Zentrum, DFG-Forschungszentrum für experimentelle

Biomedizin,

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Martin Lohse

Sensibilisierung von Melanomzellen gegenüber Zytostatika durch zwei
verschiedene Mechanismen der NF- κ B-Inhibition

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Amschler

aus

Schweinfurt

Würzburg, September 2010

Referent: Prof. Dr. Michael P. Schön

Koreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2011

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	1
1.1 Pathophysiologie des malignen Melanoms	1
1.2 Therapeutische Möglichkeiten nach heutigem Stand	3
1.3 Kennzeichen der Malignität	5
1.3.1 Apoptoseresistenz.....	5
1.3.2 Proliferation.....	6
1.3.3 Invasion.....	7
1.3.4 Chemokine als Initiatoren von Wachstum und Angiogenese	8
1.4 Chemoresistenz als Hindernis einer wirksamen Therapie	9
1.5 Der Transkriptionsfaktor NF-κB	10
1.5.1 Konstitutive Aktivierung von NF- κ B.....	11
1.5.2 Der Signalweg von NF- κ B.....	11
1.5.3 Inhibition von NF- κ B.....	14
1.5.4 Induktion von NF- κ B	15
1.5.5 Kombination von NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika	17
2. Materialien und Methoden	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Laborgeräte.....	19
2.1.3 Standardlösungen und Puffer	19
2.2 Methoden in der Zellkultur	23
2.2.1 Zellkultur und Zellkulturbedingungen	23
2.2.2 Behandlungen der Melanomzellen in vitro	24
2.3 Proteinchemische Methoden	24
2.3.1 Herstellung von Zellextrakten.....	24
2.3.2 Westernblots	26
2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
2.3.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	27
2.4 Molekularbiologische Methoden	28
2.4.1 RNA-Isolierung.....	28
2.4.2 cDNA-Synthese	29
2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	29

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.4.5 Real-time PCR	30
2.5 Funktionelle Experimente	32
2.5.1 Zellzyklus-Analyse	32
2.5.2 Detektion Histon-gebundener DNA-Fragmente (Apoptosedetektion)	33
2.5.3 Experimente zur Tumorzell-Invasion <i>in vitro</i>	34
2.6 Experimentelle Tumormetastasierung <i>in vivo</i>	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Konstitutive und stimulierte NF-κB Aktivität in Melanomzellen	36
3.2 Expression NF-κB-regulierter Proteine.....	39
3.3 KINK-1 und Bortezomib – zwei NF-κB-Inhibitoren im Vergleich.....	40
3.3.1 Inhibition von NF- κ B durch KINK-1 und Bortezomib	40
3.3.2 Protein-Expression unter NF- κ B -Inhibition.....	41
3.3.3 Zellzyklusanalyse unter KINK-1 und Bortezomib	45
3.4 Kombination von NF-κB-Inhibition und Zytostatika	48
3.4.1 Auswirkung der Kombination auf NF- κ B-regulierte Proteine.....	48
3.4.2 Verstärkung der durch Zytostatika induzierten Apoptose.....	51
3.4.3 Verstärkung der Zytostatika-induzierten Invasionshemmung.....	55
3.5 Verstärkung der antitumoralen Wirkung von Camptothecin <i>in vivo</i>.....	57
4. Diskussion.....	61
4.1 Aktivität von NF-κB und deren Auswirkung auf NF-κB-regulierte Proteine	63
4.2 Auswirkung von KINK-1 und Bortezomib auf NF-κB-Aktivität, NF-κB-regulierte Proteine und Zellzyklus	64
4.3 KINK-1 und Bortezomib in Kombination mit Zytostatika	68
4.4 Vergleich von KINK-1 und Bortezomib	74
4.5 Einfluss auf zukünftige Therapien	77
5. Zusammenfassung	79
6. Abkürzungen	81
7. Literaturverzeichnis	84

1. Einleitung

1.1 Pathophysiologie des malignen Melanoms

Das maligne Melanom, auch der „schwarze Krebs“ genannt, ist einer der bösartigsten Tumoren des Menschen. Im Stadium der Fernmetastasierung beträgt die langfristige Überlebensrate gerade einmal 5 % - nur die Frühform hat Aussicht auf Heilung durch chirurgische Exzision (Cummins et al., 2006). In der weißen Bevölkerung ist weltweit ein drastischer Anstieg dieses Tumors zu verzeichnen: Beispielsweise stieg die Inzidenz in den letzten 40 Jahren in den Vereinigten Staaten um das 15-fache (Chudnovsky et al., 2005). Der verbesserten Früherkennung ist zu verdanken, dass dies nicht für die Mortalität gilt (Essner et al., 2004; Lens, 2008).

Das Melanom geht aus den Melanozyten hervor, die für die Pigmentsynthese in Haut, Augen und Haaren verantwortlich sind. Im stratum basale der Epidermis gelegen, werden diese pigmentierten Zellen von den sie umgebenden Keratinozyten auf UV-Einstrahlung hin angeregt, Melanin zu produzieren, um die Haut zu schützen (Gray-Schopfer et al., 2007).

Wie bei vielen Malignomen tragen Umweltfaktoren und genetische Faktoren als Risikofaktoren zur Entstehung des malignen Melanoms bei: Zu den äußeren Faktoren zählt vor allem eine übermäßige UVA- und UVB- Strahlung (Wang et al., 2001; Situm et al., 2007). Beispielsweise ist die Inzidenz in Klimazonen mit stärkerer UV-Exposition, wie etwa in Australien, höher als die in gemäßigten Zonen (MacKie et al., 2009). Weitere UV-bedingte Risikofaktoren sind frühkindliche Sonnenbrände und die Verwendung von Sonnenbänken (MacKie et al., 2009). Eher genetisch bedingte Risikofaktoren sind ein heller Hauttyp (Hauttyp 1 oder 2), das Vorhandensein multipler Nävuszellnävi (>100) oder klinisch dysplastisch erscheinende Nävi (Darlington et al., 2002; MacKie et al., 2009; Haenssle et al., 2010). Etwa 10% der Melanompatienten haben einen ebenfalls vom Melanom betroffenen Verwandten. In diesen Familien sind Mutationen in bestimmten Genen, die beispielsweise an der Zellyklus-

Regulation beteiligt sind, identifiziert worden (Chudnovsky et al., 2005; MacKie et al., 2009).

Der erste Schritt ist die Bildung melanozytärer Nävi, gutartiger Zellpopulationen von Melanozyten, die bei Erwachsenen meist multipel vorkommen. Etwa ein Drittel maligner Melanome geht aus diesen Nävi hervor, die meisten allerdings entstehen *de novo* (Hauschild et al., 2006; Weatherhead et al., 2007).

Nach *Hanahan* und *Weinberg* haben Tumorzellen sechs wichtige Eigenschaften erworben, die ihr aggressives Verhalten bedingen: Die Fähigkeit zur autokrinen Wachstumsstimulation, die Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren, die Apoptoseresistenz, ein endloses Potential zur Replikation, die Neoangiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Nach diesem Modell kann eine genetische Veränderung gleichzeitig mehrere dieser Fähigkeiten bewirken und umgekehrt können mehrere solcher Mutationen für eines der Charakteristika notwendig sein (Hanahan und Weinberg, 2000). Dabei lässt sich im malignen Melanom die histologische Progression, etwa vom linearen Wachstum der Melanomzellen in der Epidermis zum vertikalen Wachstum mit Durchbruch der Basalmembran mit der Akkumulation von charakteristischen Mutationen in diesen tumorrelevanten Genen korrelieren (Satyamoorthy und Herlyn, 2002; Melnikova und Bar-Eli, 2008). So kommt es etwa im Stadium des dysplastischen Nävus zum Verlust von E-Cadherin, welches für die Interaktion mit Keratinozyten von Bedeutung ist und dafür zur Aktivierung von N-Cadherin, welches die Interaktion mit Fibroblasten ermöglicht (Satyamoorthy und Herlyn, 2002; Haass et al., 2004). Die Melanomzellen haben sich so der Kontrolle der sie umgebenden Keratinozyten entzogen und erste Schritte für die Migration in die Dermis vollzogen. Für den Übergang in die vertikale Wachstumsphase wird die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie CREB/ATF1, ATF-2, SNAIL, aber auch NF- κ B verantwortlich gemacht (Nyormoi und Bar-Eli, 2003; Melnikova und Bar-Eli, 2008). Die Aktivierung dieser Faktoren bringt nun eine Reihe von Fähigkeiten mit sich, die weitere Schritte, wie Invasion, Metastasierung und Neoangiogenese bewirken: Hierfür sind beispielsweise die Expression von Proteinasen, wie MMP-2 und MMP-9, sowie die Expression autokrin wirksamer Wachstumsfaktoren, wie IL-8, verantwortlich (Nyormoi und Bar-Eli, 2003;

Melnikova und Bar-Eli, 2008). Schließlich erreichen die Melanomzellen, angelockt von Chemokinen, die vor allem in Organen wie Lunge, Gehirn, Knochenmark und Leber exprimiert werden, durch die Expression der zugehörigen Chemokinrezeptoren ferne Metastasierungsorte (Hofmann et al., 2000; Dhawan und Richmond, 2002).

Natürlich dient dies nur als Modell für die Entstehung des Malignen Melanoms und es sind nur Beispiele von Mutationen aufgeführt, die sich auch in anderer Reihenfolge ereignen können. Allerdings wird hierbei deutlich, dass die Blockade eines zentralen Transkriptionsfaktors wie NF- κ B deshalb sinnvoll ist, weil er relevante Schritte wie den Eintritt in das vertikale Wachstum kontrolliert. Zudem wird im Verlauf der Arbeit deutlich, dass er auch bei den folgenden Schritten, wie der Metastasierung mitwirkt, weswegen durch NF- κ B -Inhibition gleichzeitig mehrere der eingangs beschriebenen Fähigkeiten der Tumorzellen beeinflusst werden.

1.2 Therapeutische Möglichkeiten nach heutigem Stand

Die Prognose von Patienten mit malignem Melanom hängt insbesondere vom Stadium bei Diagnosestellung ab. Die Nähe zu des Primärtumors zu Lymph- und Blutgefäßen ist entscheidend für seine Metastasierungsfähigkeit. Ein wichtiger prognostischer Marker ist daher die Bestimmung der Tumordicke; diese wird in mm angegeben (Balch et al., 1978; Busam et al., 2001).

Klinisch teilt man das maligne Melanom in vier Stadien ein, wobei das Stadium 0 die Infiltration der Epidermis ohne Beteiligung der Dermis bedeutet (Melanoma in situ), die Stadien I und II einen lokal fortgeschrittenen Prozess mit/ ohne Ulzeration beschreiben, das Stadium III den Befall der Lymphknoten anzeigt und schließlich das Stadium IV Fernmetastasierung bedeutet (Chudnovsky et al., 2005). Im Stadium I beträgt die Heilungsrate über 95 %, wenn der Primärtumor komplett durch chirurgische Exzision entfernt wird (Balch et al., 2001). Dagegen bedeutet der Zustand der Fernmetastasierung (Stadium IV) trotz langjähriger Forschung und vielfältiger Therapieversuche eine mittlere Überlebenszeit von 6 bis 9 Monaten (Atkins, 2006). In diesem Stadium gilt immer noch Dacarbazin (DTIC) als Mittel der Wahl, dem einzigen von der US-

FDA (United States Food and Drug Administration) zugelassenen Chemotherapeutikum seit über 25 Jahren (Tarhini und Agarwala, 2006). Bei 10% - 20% der Patienten führt DTIC zur Tumorreduktion, allerdings nur für durchschnittlich vier bis sechs Monate (Serrone et al., 2000; Tarhini und Agarwala, 2006). Vergleichbare Effekte erzielt Temozolomid, ebenfalls ein alkylierendes Zytostatikum, welches therapeutisch den Vorteil hat, dass es oral verfügbar ist, die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann und im Vergleich zu DTIC nicht über Leberenzyme aktiviert werden muss (Tarhini und Agarwala, 2006; Quirt et al., 2007). Neben der genannten Monotherapie werden noch weitere Zytostatika wie Cisplatin, Vinblastin und Tamoxifen angewendet, die in unterschiedlicher Weise mit DTIC kombiniert werden (Atallah und Flaherty, 2005; Chudnovsky et al., 2005).

Klinisch etabliert ist auch die Immuntherapie mit IL-2 oder IFN- α -2b: Auch hier lassen sich Ansprechraten von 10% - 15% erreichen, weswegen auch diese von der US-FDA zugelassen sind (Atallah und Flaherty, 2005; Atkins, 2006; Petrella et al., 2007). Allerdings sind beide Therapien mit einer hohen Rate an gefährlichen Nebenwirkungen vergesellschaftet (Atallah und Flaherty, 2005; Chudnovsky et al., 2005). Ein neuerer Therapieansatz besteht darin, mittels Vakzinierung gegen zelluläre Bestandteile, Peptide, DNA-Fragmente und andere Antigene eine spezifische T-Zell-Immunantwort gegen die Melanomzellen zu generieren (Tanaka et al., 2002; Parmiani et al., 2003; Di Pucchio et al., 2006).

Zudem werden die genannten Therapien in unterschiedlicher Weise kombiniert, beispielsweise IL-2 mit Zytostatika als Immuno-Chemotherapie (Di Pucchio et al., 2006; Hess et al., 2007). Allerdings konnte keiner dieser Therapieversuche Dacarbazin als Monotherapie wesentlich übertreffen (Schadendorf, 2002; Lens und Eisen, 2003).

1.3 Kennzeichen der Malignität

1.3.1 Apoptoseresistenz

Die Apoptose ist ein evolutionär konservierter programmierter Zelltod, der physiologisch vorkommt. Bei Dysregulation führt sie zu pathologischen Zuständen wie Autoimmunerkrankungen oder Krebs. Die Apoptose ist durch charakteristische morphologische Veränderungen wie das Schrumpfen der Zelle, Abschnüren von Vesikeln und Fragmentierung der nukleären DNA gekennzeichnet (Fulda und Debatin, 2006). Die Effektormoleküle, die zu diesem Endzustand führen, sind die Caspasen, eine Familie von Proteasen, die verschiedene Substrate im Zytoplasma und Kern abbaut (Ivanov et al., 2003; Fulda und Debatin, 2006). Die Induktion der Caspasen kann einerseits über die Plasmamembran durch Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (extrinsische Aktivierung) erfolgen, bei der die Effektorcaspasen 3,6 und 7 über Caspase 8 aktiviert werden (Soengas und Lowe, 2003). Andererseits werden bei der intrinsischen Aktivierung pro-apoptische Proteine wie Cytochrom C, die sich zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran befinden, ins Zytosol freigesetzt; dort führt dieses durch Komplexbildung mit Apaf-1 zur Aktivierung der Caspase 9 (Kroemer und Reed, 2000; Ivanov et al., 2003; Fulda und Debatin, 2006). Die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran wird durch die Bcl2-Proteinfamilie kontrolliert, welche in drei Gruppen aufgeteilt werden kann: Die erste Gruppe besteht aus antiapoptischen Molekülen wie Bcl-2 und Mcl-1, die eine Bcl-2 Sequenzhomologie in den Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4 aufweisen. Die zweite Gruppe enthält proapoptische Moleküle wie Bax und Bak, welche in den Domänen BH1, BH2 und BH3 homolog sind. Die dritte Gruppe schließlich besteht aus proapoptischen Proteinen, die nur eine BH3 Domäne gemein haben, wie Bid, Bik, NOXA und Bim (Bellosillo et al., 2002). Die regulatorische Wirkung der Bcl-2 Moleküle besteht darin, dass sie zur Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran beitragen, wobei das Verhältnis von proapoptischen zu antiapoptischen Mitgliedern in der äußeren Membran, welche sich gegenseitig durch Komplexbildung neutralisieren können,

entscheidend ist: So bedeutet ein großer Quotient von Bax/Bcl-2 eine höhere Apoptosebereitschaft, wohingegen ein niedriger Quotient von Bax zu Bcl-2 antiapoptotisch wirkt (Raisova et al., 2001). Manche dieser proapoptotischen Proteine, beispielsweise Bax, liegen bereits im Zytosol vor und müssen nur noch ihre Lokalisation ändern um zu wirken; andere, wie das proapoptotische NOXA, werden nach Stimulation durch den Tumorsuppressor p 53 neu transkribiert (Gross et al., 1999; Shibue et al., 2003; Villunger et al., 2003). Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges sind die genannten Effektorcaspasen, doch auch diese können noch reguliert werden: Komplexbildung mit so genannten IAPs (inhibitors of apoptosis), zu denen auch XIAP und Survivin gehören, kann die Protease-Aktivität der Caspasen hemmen (Chawla-Sarkar et al., 2004; Obiol-Pardo et al., 2008). In zahlreichen Tumorzellen, wie auch im malignen Melanom ist das Gleichgewicht, das sich durch die verschiedenen beschriebenen Proteine ergibt, auf die Seite der Antiapoptose verschoben.

1.3.2 Proliferation

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Tumorzellen ist ihre im Vergleich zum Ursprungsgewebe verstärkte Proliferation. Der eukaryotische Zellzyklus ist in vier Phasen aufgeteilt, die G1, S, G2 und M-Phase (Johnson und Walker, 1999). Ruhende Zellen befinden sich in der G0-Phase und entsprechende Stimuli bewirken den Eintritt in die G1-Phase, die der Verdopplung des Genoms vorangeht (Schmitt et al., 2007). Der Zellzyklus unterliegt komplexen Regulationsmechanismen und vor entscheidenden Schritten, wie der DNA-Synthese (S-Phase) und der Mitose (M-Phase), müssen „checkpoints“ durchschritten werden. Beim Übergang von G1 zu S, dem Restriktionspunkt, kann der Zellzyklus beispielsweise bei DNA-Schäden zur DNA-Reparatur arretiert werden oder die Zelle kann das Signal zur Apoptose erhalten (Afshari und Barrett, 1993). Das Passieren dieser Kontrollpunkte wird durch eine große Familie von Kinasen reguliert, den cdks (cyclin-dependent kinases), deren Aktivität von der Interaktion mit Zyklinen abhängt. Diese Interaktionen wiederum können durch eine Reihe von cdkls (cyclin-dependent kinase inhibitors), zu

denen auch das in dieser Arbeit untersuchte p21 gehört, inhibiert werden (Schmitt et al., 2007). Diese cdkls werden beispielsweise beim Übergang von G1 in S bei DNA-Schäden durch den Tumorsuppressor p53 hochreguliert (Johnson und Walker, 1999).

In Tumorzellen sind aufgrund von Mutationen in wichtigen Regulatorproteinen, wie etwa dem Tumorsuppressor p53 diese Sicherheitsmechanismen verloren gegangen und die Tumorzelle vermehrt sich ungehindert. An dieser Regulation sind sehr viele verschiedene Proteine beteiligt und es können daher beispielhaft nur einige Proteine untersucht werden.

In dieser Arbeit werden Cyclin-D1 und c-myc untersucht. Cycline bilden Komplexe mit Cyclin-abhängigen Kinasen, die auf diese Weise aktiviert werden und weitere Substrate phosphorylieren (Johnson und Walker, 1999). Im Falle des Cyclins D1 wird das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein (Rb) phosphoryliert, was zu einer Aktivierung von Cyclin E führt und so die Progression von G1 zu S bewirkt (Johnson und Walker, 1999). Eine Hochregulation von Cyclin D1 würde folglich die Proliferation fördern.

Das Onkogen C-myc hingegen ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem auch Cycline wie Cyclin D1 reguliert und somit ebenfalls zur Zellproliferation beiträgt (Ekholm und Reed, 2000).

1.3.3 Invasion

Die Metastasierung eines Tumors hängt auch von seiner Fähigkeit zur Invasion und Angiogenese ab. Invasion bedeutet, dass Tumorzellen die extrazelluläre Matrix, die aus Kollagen, Glycoproteinen, Proteoglycanen und Elastin besteht, mit Hilfe von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) durchdringen können; dazu gehört auch die Fähigkeit, die Basalmembran zu überqueren, ein erster wichtiger Schritt des invasiven Wachstums (Hofmann et al., 2005). Erreicht der Tumor eine kritische Größe ($>1\text{mm}^3$) müssen Gefäße in der Umgebung verstärkt proliferieren und in den Tumor eindringen, so dass seine Versorgung gewährleistet ist: Dieser Prozess, die Angiogenese, wird vor allem durch die Regulation von Endothelzellen durch den Wachstumsfaktor VEGF erreicht (Streit und Detmar, 2003). Aber auch andere Faktoren wie zum Beispiel Cox-2,

ein inflammatorisches Protein fördern direkt oder indirekt über die Bildung von Prostaglandinen diese für den Tumor wichtige Gefäßausprossung (Spinella et al., 2007).

1.3.4 Chemokine als Initiatoren von Wachstum und Angiogenese

Chemokine gehören einer großen Familie von Polypeptiden an, die als Signalmoleküle zwischen den Zellen dienen und so eine wichtige Rolle in der Steuerung von Chemotaxis und Migration, beispielsweise von Leukozyten, spielen. Die Signalübermittlung erfolgt durch Bindung des Chemokins an den zugehörigen G-Protein gekoppelten transmembranären Chemokinrezeptor (Payne und Cornelius, 2002). Die Regulation von Chemokinen sowie der zugehörigen Rezeptoren in Melanomzellen steuert das autonome Wachstum, die Metastasierung sowie die Angiogenese (Payne und Cornelius, 2002). Bei diesen Prozessen übernehmen Tumorzellen auch die Kontrolle über immunologische Zellen des Betroffenen, und schaffen sich ein für sie günstiges Mikromileu für Angiogenese. Im Folgenden können nur die in dieser Arbeit untersuchten Chemokine näher beschrieben werden.

Chemokine werden - abhängig von der Position der konservierten Cystin-Aminosäuren am N-terminalen Ende - in die CXC, CC, C, und CX₃C Familien unterteilt. Die CXC Chemokinfamilie ist durch vier konservierte Lokalisationen für Cystin Aminosäuren charakterisiert. Die ersten beiden dieser konservierten Cystin-Aminosäuren werden von einer beliebigen anderen getrennt (CXC) (Belperio et al., 2000). Eine zweite strukturelle Einheit, die der CXC-Sequenz vorangeht, bestimmt das angiogenetische Potenzial dieser Chemokine: Haben sie am NH₂-Terminus die Aminosäuren Glu-Leu-Arg, das ELR-Motiv, werden sie als Förderer der Angiogenese angesehen (Belperio et al., 2000). Zu diesen gehören auch die beiden Chemokine IL-8 (CXCL8) und Gro α (CXCL1) (Belperio et al., 2000; Payne und Cornelius, 2002). Neben dieser Rolle in der Progression des malignen Melanoms fungieren sie durch parallele Hochregulation der zugehörigen Chemokinrezeptoren auch als autokrine Wachstumsfaktoren (Green et al., 1996; Dhawan und Richmond, 2002). Für diese Arbeit ist die Untersuchung dieser Chemokine deswegen so interessant,

weil ihre konstitutive Expression in Tumorzellen der Regulation durch NF- κ B zugeschrieben wird (Patel et al., 2002; Ryu et al., 2007).

Ein weiteres von vielen Melanomzellen produziertes Chemokin ist MCP-1 (CCL2), welches als Chemokin für Monozyten wirkt und im Melanom für die Rekrutierung Tumor-assoziiierter Makrophagen verantwortlich ist (Koga et al., 2008). Durch die Attraktion von Makrophagen, die wiederum Angiogenesefördernde Faktoren absondern, kann auch dieses Chemokin zur Metastasierung beitragen (Gazzaniga et al., 2007). Eine hohe MCP-1-Expression wird als Indiz für einen ungünstigen Verlauf der Tumorerkrankung gewertet (Koga et al., 2008).

1.4 Chemoresistenz als Hindernis einer wirksamen Therapie

Chemotherapeutika wirken, auch wenn sie zunächst verschiedene biochemische Veränderungen bewirken, letztendlich durch Induktion von Apoptose; erst bei Verwendung sehr hoher Konzentrationen sterben die Zellen durch Nekrose (Wang et al., 1999; Kaufmann und Earnshaw, 2000). Zum Einen geschieht die Apoptose-Induktion über die Stimulation von Todesrezeptorliganden und zum anderen über den Cytochrom C-vermittelten intrinsischen Weg; dieser Mechanismus wird sogar als der wichtigere angesehen (Kaufmann und Earnshaw, 2000). Dies macht verständlich, warum Chemotherapie bei vielen Tumoren erfolglos ist: Durch Hochregulation antiapoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bcl-xL oder ein Übermaß an IAPs, können die Cytochrom C-Freisetzung sowie die extrinsische Apoptoseinduktion unterbunden werden (Cory und Adams, 2002; Soengas und Lowe, 2003). Diese Resistenz kann bei schon vorhandener intrinsischer Resistenz von Therapiebeginn an bestehen oder während der Therapie durch erworbene Resistenzbildung einsetzen (Nakanishi und Toi, 2005; Fadeel et al., 2008). Das metastasierende Melanom ist besonders durch Dysregulation der Apoptose, verstärkte DNA-Reparatur und durch Transport zytotoxischer Substanzen aus der Zelle gekennzeichnet. Dadurch ist eine therapeutische Wirksamkeit vieler Pharmazien schwer erreichbar (Grossman und Altieri, 2001; Helmbach et al., 2001; Helmbach et al., 2002). Um die Wirksamkeit einer

Zytostatikatherapie zu gewährleisten müssen also die verantwortlichen molekularen Veränderungen erkannt und gezielt beeinflusst werden.

1.5 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B wurde vor mehr als zwanzig Jahren als Transkriptionsfaktor der leichten Kette der Immunglobuline von Plasmazellen identifiziert, was für seine Namensgebung maßgeblich war (nuclear factor kappa B) (Sen und Baltimore, 1986). Schließlich wurde offensichtlich, dass er eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der adaptiven und angeborenen Immunantwort einnimmt: Beispielsweise reguliert dieser Transkriptionsfaktor die Migration phagozytischer Zellen durch Expression von Zytokinen (IL-1, IL-2, TNF α , IL-12) (Caamano und Hunter, 2002). In der adaptiven Immunantwort ist er neben der Reifung der B-Lymphozyten auch für die Proliferation und Expansion Antigen-spezifischer T-Lymphozyten nach Stimulation verantwortlich (Caamano und Hunter, 2002; Kumar et al., 2004).

Die bedeutende Rolle von NF- κ B wurde durch verschiedene Knock-out-Mausmodelle der einzelnen Untereinheiten des Transkriptionsfaktors herausgefunden. NF- κ B-Knock-out Mäuse der Untereinheit p50 und Mäuse, in deren B-Zellen ein Abbau-resistentes I κ B exprimiert wird, haben beispielsweise eine reduzierte humorale Abwehr (Gugasyan et al., 2000; Caamano und Hunter, 2002; Li und Verma, 2002). Fehlt die Untereinheit RelA (p65), sterben die Mäuse noch während der Embryonalphase und erleiden eine Degeneration der Leber, da die fötalen Hepatozyten apoptotisch werden (Beg et al., 1995).

Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass eine Dysregulation von NF- κ B mit vielen Erkrankungen, wie inflammatorischen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Virusinfektionen, aber auch Krebs in Zusammenhang gebracht wird (Kumar et al., 2004).

Mehr als 150 physiologisch relevante Stimuli wurden identifiziert, die diesen Transkriptionsfaktor aktivieren (Pahl, 1999). Die Integration all dieser Stimuli zu einer sinnvollen Reaktion mit Aktivierung der richtigen Gene ist sehr vielfältig. Es kann daher im Folgenden nur ein Ausschnitt dieses komplexen Themas

untersucht werden. Schwerpunkt ist die klassische Aktivierung von NF- κ B, die physiologischerweise durch TNF α erfolgen würde.

1.5.1 Konstitutive Aktivierung von NF- κ B

Zu den bekanntesten Zielgenen von NF- κ B gehören Wachstumsfaktoren, Chemokine, Regulatoren der Apoptose, weitere Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren (Tergaonkar, 2006). Somit reguliert dieser Transkriptionsfaktor tumorrelevante Eigenschaften, wie gesteigerte Proliferation, Invasion und Apoptoseresistenz. Viele hämatologische und solide Tumoren zeigen, im Gegensatz zu normalen Körperzellen, konstitutive NF- κ B-Aktivität (Aggarwal, 2004; Keutgens et al., 2006; Sethi et al., 2008). Der Grund für diese übermäßige Aktivität in Tumorzellen ist nicht in allen Einzelheiten bekannt, aber es werden Mutationen in dem inhibitorischen Protein I κ B α , eine übermäßige IKK-Aktivität, verstärkte Aktivität des Proteasoms oder verstärkte inflammatorische Zytokinexpression als Gründe vermutet (Miyamoto et al., 1994; O'Connell et al., 1995; Wood et al., 1998). Auch kanzerogene Viren, wie das Epstein-Barr Virus, welches in Zusammenhang mit Lymphomen gebracht wird, führen zur konstitutiven Aktivierung von NF- κ B (Sethi et al., 2008). Das maligne Melanom zeigt ebenfalls konstitutive Aktivität von NF- κ B (Yang und Richmond, 2001; Nyormoi und Bar-Eli, 2003; Ueda und Richmond, 2006). Die übermäßige Expression NF- κ B-regulierter Proteine könnte somit eine Ursache der Chemoresistenz sein.

1.5.2 Der Signalweg von NF- κ B

NF- κ B stellt eine Gruppe von fünf strukturell verwandten Proteinen dar, die der Rel Familie angehören und in inaktiver Form als Dimere im Zytosol vorliegen. Bei Säugetieren unterscheidet man zwei Klassen: Die erste Klasse beinhaltet die fertigen Proteine Rel A (p65), c-Rel und Rel-B. Zur zweiten Klassen gehören p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2), welche als längere Proteine synthetisiert werden und dann zu kleineren Proteinen (p50 und p52) gespalten werden (Baldwin, 2001; Aggarwal, 2004; Karin et al., 2004). Durch

Dimerisierung verschiedener Untereinheiten können unterschiedliche Bindungsspezifitäten erreicht werden, weswegen NF- κ B für die Regulation von über 150 Genen verantwortlich ist (Kumar et al., 2004). Dabei sind die Heterodimere aus p50/RelA und p52/RelA die transkriptionell aktivste Form (Kumar et al., 2004). All diesen Untereinheiten ist gemein, dass sie über eine homologe Domäne verfügen, die für die DNA - Bindung, Dimer - Bildung und Interaktionen mit inhibitorischen Proteinen verantwortlich ist (Karin et al., 2004). Letztere sind die I κ B Proteine, von denen bislang sieben bekannt sind: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3 und die langen RelProteine p100 und p105 (Aggarwal, 2004).

Die Komplexbildung dieser Inhibitoren mit den Rel Homo- oder Heterodimeren hält diese im Zytosol und unterbindet so die Transkription (Aggarwal, 2004; Tergaonkar, 2006) (Abb.1). Durch verschiedene Stimuli, wie bakterielles LPS oder proinflammatorische Zytokine, wie TNF und IL-1, werden diese inhibitorischen I κ B Proteine phosphoryliert (Baldwin, 2001; Karin et al., 2004) (Abb.1). Letzteres übernimmt der IKK-Komplex, der aus drei Untereinheiten, nämlich IKK α (IKK1), IKK β (IKK2) und IKK γ (auch als NEMO bekannt) besteht, wobei IKK α und IKK β die katalytischen Einheiten darstellen (Aggarwal, 2004; Karin et al., 2004). Dies resultiert in einem sofortigen Abbau der Inhibitoren durch das 26S Proteasom, woraufhin der Transkriptionsfaktor im Kern akkumuliert und die Transkription seiner spezifischen Zielgene bewirkt (Abb.1). Zu diesen Zielgenen gehören Gene von Proteinen, die die Proliferation regulieren (c-myc, Ku70, Ku80 und Cyclin D1), die die Invasion und Metastasierung regulieren (MMP2, MMP2, VEGF, ICAM-1, E-Selectin) sowie Proteine, die für die Suppression der Apoptose (Bcl-2, Bcl-xL, Xiap, cIAPs, c-Flip) und die Inflammation (TNF, IL1, IL8, MCP-1, COX2, ICAM-1, E-Selektin, iNOS) verantwortlich sind (Baldwin, 2001; Aggarwal, 2004; Kim et al., 2006).

Während Proliferation, Apoptosesuppression und Invasion sehr einfach mit der Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht werden können, sind Erkenntnisse, dass NF- κ B regulierte Entzündung ebenfalls zur Malignität beitragen kann, eher neu: So konnte gezeigt werden, dass das Wachstum muriner Darmtumoren bei entzündlicher Darmerkrankung gemindert werden kann, wenn IKK β in Makrophagen der Mäuse deletiert wurde. Offensichtlich

fungierten NF- κ B-regulierte inflammatorische Zytokine der Makrophagen als Wachstumsfaktoren (Greten et al., 2004).

Bei der Vielzahl der verschiedenen Gene, die NF- κ B kontrolliert, ist es nicht verwunderlich, dass dieser Transkriptionsfaktor in verschiedenen Zelltypen jeweils andere Funktionen haben kann. Dies geht so weit, dass beispielsweise in der Epidermis NF- κ B-Aktivierung für Wachstumsinhibition und Differenzierung notwendig zu sein scheint: So führte die Inhibition von NF- κ B in der Epidermis von Mäusen zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen (Baldwin, 2001; Aggarwal, 2004). In diesem Gewebe scheint folglich unter gewissen Bedingungen NF- κ B-Inhibition die Tumorentstehung zu fördern.

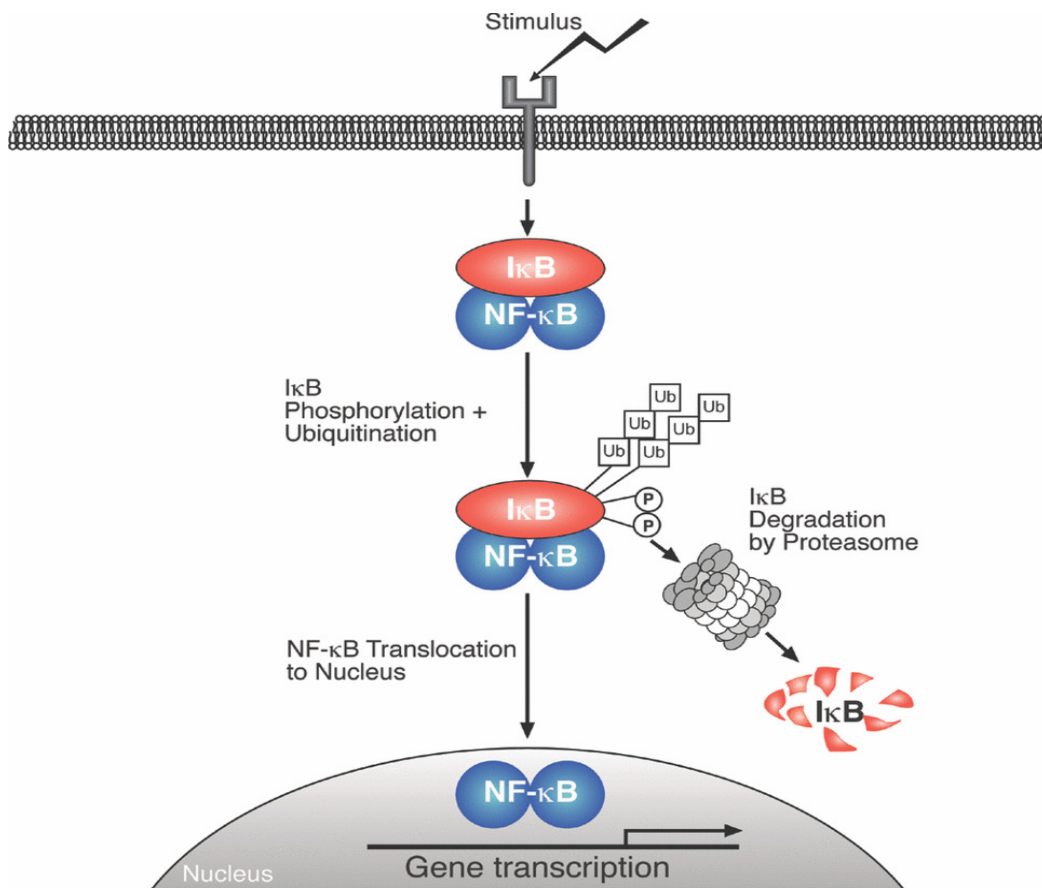


Abb.1: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

(<http://www.biochemj.org/bj/382/0393/bj3820393f02.htm?resolution=HIGH>)

1.5.3 Inhibition von NF- κ B

Aufgrund der beschriebenen Funktionen ist NF- κ B Zielstruktur vieler antitumoral wirkender Substanzen geworden. Eine wichtige molekulare Zielstruktur hierfür ist der Inhibitor-Komplex I κ B α , der entweder vermehrt synthetisiert, durch Hemmung der Phosphorylierung stabilisiert oder dessen Degradation verhindert wird. Die Folge ist, dass der Komplex aus Inhibitor und Transkriptionsfaktor im Zytosol verbleibt und keine Translokation in den Kern erfolgen kann. Viele Naturprodukte können derartige Effekte erreichen: Resveratrol, eine Substanz, die beispielsweise in der Schale roter Trauben vorkommt, bewirkt eine Hemmung der IKK-Aktivität (Nakanishi und Toi, 2005). Dies gilt auch für Curcumin, eine Substanz die Curry die gelbe Farbe verleiht (Nakanishi und Toi, 2005). Es gibt allerdings auch weniger spezifische Mechanismen zur NF- κ B-Inhibition, wie die TNF α -Blockade (Tergaonkar, 2006). Auch Glucokorticoide hemmen NF- κ B, ein Mechanismus ist hierbei die Interaktion von aktivierten Glucokorticoide-Rezeptoren mit NF- κ B im Kern (Nakanishi und Toi, 2005).

Im Folgenden werden einige Ansätze der synthetischen NF- κ B-Blockade exemplarisch umrissen:

Proteasominhibitoren wirken durch Hemmung des Abbaus des Inhibitor-Proteins I κ B α , wodurch NF- κ B im Zytosol verbleibt. Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, der aus einer zylindrischen 20S Haupteinheit besteht, die von zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten flankiert wird (Ciechanover und Schwartz, 1998). Es ist generell für den Abbau von Proteinen nötig und dadurch bei der Zellzyklus-Regulation und der Apoptosesteuerung beteiligt (Boccardo et al., 2005). Proteine, die abgebaut werden sollen, werden durch Ubiquitinierung gekennzeichnet; die Ubiquitin-Protein Ligasen müssen also spezifisch Motive der Degradation erkennen (Richardson et al., 2003). Obwohl natürlich alle Körperzellen Proteasomkomplexe haben, wirken Proteasominhibitoren oft bevorzugt auf Tumorzellen und induzieren Apoptose (Paramore und Frantz, 2003; Richardson et al., 2003). Dies wird vor allem mit der NF- κ B Inhibition erklärt (Paramore und Frantz, 2003).

Am besten untersucht ist der auch in dieser Arbeit verwendete Proteasominhibitor Bortezomib, der das 26S Proteasom selektiv und reversibel inhibiert (Boccardo et al., 2005). Die klinisch etablierte Anwendung ist die Therapie des multiplen Myeloms und neuerdings auch des Mantelzelllymphoms; für beide Indikationen ist Bortezomib von der FDA zugelassen (Chauhan et al., 2005; Ludwig et al., 2005; Guedat und Colland, 2007; Orłowski und Kuhn, 2008). Beim multiplen Myeloms konnte zudem gezeigt werden, dass Bortezomib die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapie erhöht (Ma et al., 2003). Aber auch bei der Therapie solider Tumoren hat sich Bortezomib experimentell bewährt, vor allem hinsichtlich der Verminderung von Chemoresistenzen durch Hemmung der NF- κ B-Aktivierung (Nakanishi und Toi, 2005; Tapia et al., 2007).

Andere NF- κ B-Inhibitoren, wie die beiden Substanzen BAY 11-7082 und BAY 11-7085, verhindern die Translokation von p65 in den Kern, indem sie die Phosphorylierung des Inhibitors I κ B α hemmen, wodurch letzteres nicht abgebaut wird (Nakanishi und Toi, 2005). Dies wird auch durch Inhibitoren der IKK β erreicht, wie beispielsweise BMS-345541: Diese Substanz konnte unter experimentellen Bedingungen die Funktion von NF- κ B im malignen Melanom inhibieren und so Apoptose verstärken (Yang et al., 2006). Auch der zweite in dieser Arbeit verwendete NF- κ B Inhibitor, KINK-1, ist ein spezifischer Inhibitor der IKK β -Kinase (Schön et al., 2008). In dieser Arbeit werden folglich zwei verschiedene Ansätze zur Inhibition von NF- κ B verglichen: die KINK-1-vermittelte Verhinderung der I κ B-Phosphorylierung, welches in diesem unphosphorylierten Zustand nicht ubiquitiniert und abgebaut wird, und die Inhibition durch Bortezomib, bei der zwar Phosphorylierung von I κ B, jedoch kein Abbau erfolgen kann.

1.5.4 Induktion von NF- κ B

Die Inhibition von NF- κ B zur Tumorbehandlung ist zunächst gegen die konstitutive NF- κ B-Aktivität gerichtet, welche eine Ursache der initial bestehenden Chemoresistenz sein kann (Yang und Richmond, 2001; Ueda und

Richmond, 2006). Ein anderer Aspekt ist, dass manche Zytostatika zusätzlich eine Induktion von NF- κ B bewirken, und zwar sowohl Genom-schädigende Chemotherapeutika als auch nicht Genom-schädigende wie Taxane oder Alkaloide (Das und White, 1997; Laurent und Jaffrezou, 2001; Yeh et al., 2002). Auch für das hier verwendete Camptothecin konnte gezeigt werden, dass es NF- κ B aktiviert (Huang et al., 2000; Cusack et al., 2001). Diese Induktion von NF- κ B während der Therapie durch das Zytostatikum selbst könnte zum Teil für den Verlust der Wirksamkeit der Chemotherapien verantwortlich sein, da durch sie selbst die genannten antiapoptotisch und proliferativ wirkenden Gene transkribiert werden. Dass Apoptose-induzierende Zytostatika NF- κ B aktivieren, passt zu der Beobachtung, dass TNF α , ein physiologischer Apoptoseinduktor, gleichzeitig auch ein NF- κ B-Aktivator ist (Rath und Aggarwal, 1999; Shishodia und Aggarwal, 2002). Dieser Mechanismus ist allerdings bei der Behandlung mit Zytostatika von Nachteil und könnte durch die simultane Gabe von NF- κ B-Inhibitoren unterbunden werden.

Neben der Möglichkeit, durch NF- κ B-Inhibition die Tumorbehandlung zu optimieren, scheint diese auch als Chemoprävention vor allem für inflammatorisch bedingte Tumoren sinnvoll zu sein: NF- κ B ist als wichtigstes Bindeglied zwischen Krebsentstehung auf dem Boden chronischer Inflammation, wie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und chronischen Virusinfektionen, wie Virushepatitiden identifiziert worden (Karin, 2006; Maeda und Omata, 2008). Inflammatorische Zytokine, wie TNF und IL-1, Virusbestandteile oder bakterielles LPS aktivieren NF- κ B und damit all die beschriebenen Proteine, die die Tumorentstehung begünstigen (Karin, 2006). Hierzu passt, dass die langjährige Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika wie Aspirin, welche die Aktivierung von NF- κ B hemmen, die Inzidenz vor allem inflammatorisch bedingter Tumoren reduzieren kann, was einer Chemoprävention entspricht (Karin et al., 2002; Gardiner und Gilmer, 2003; Takada et al., 2004).

1.5.5 Kombination von NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika

Betrachtet man den NF- κ B als ein Molekül, das durch sein antiapoptotisches Potenzial Chemoresistenz begünstigt, liegt es nahe, die Wirkung der Zytostatika durch gleichzeitige Blockade dieses Transkriptionsfaktors zu verstärken. Diese kombinatorische Behandlung aus NF- κ B-Inhibition und Zytostatika wurde schon bei Tumoren wie Pankreaskarzinom, Ovarialkarziom, Kolonkarzinom (Arlt et al., 2003; Mabuchi et al., 2004; Fukuyama et al., 2007) und auch beim malignen Melanom eingesetzt: Beispielsweise verstärkte diese Methode etwa beim Melanom die Wirksamkeit von Temozolomid oder machte zuvor resistente Pankreaskarzinomzellen angreifbar für Gemcitabin (Arlt et al., 2003; Amiri et al., 2004). Auch das hier verwendete Bortezomib konnte Tumorzellen für Bestrahlung und Chemotherapie sensibilisieren (Cusack et al., 2001; Russo et al., 2001; Ma et al., 2003).

Vor allem die Wirkung der Zytostatika, von denen bekannt ist, dass sie eine Induktion von NF- κ B bewirken, müsste durch die Blockade von diesem profitieren.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30%)	BioRad, München
Agarose	Biozym, Oldendorf
Albumin	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma, Taufkirchen
beta-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Bio-Rad-Lösung (proteinassay)	BioRad, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Carboxymethyl Cellulose	Sigma, Taufkirchen
Complete Mini (Tabletten)	Roche, Mannheim
Cremophor	Bayer, Wuppertal
Dry Milk	BioRad, München
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Goat serum	PAA, Cölbe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Nonidet-P40	USB, Ohio
p-Cumarsäure	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Propidiumjodid	Sigma, Taufkirchen
Temed	Sigma, Taufkirchen
Tris Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Tween 80	Roth, Karlsruhe

Wasserstoffperoxid

Roth, Karlsruhe

2.1.2 Laborgeräte

Agarosegelkammer	BioRad, München
ElisaReader	FluorStar Optima, BMG Labtechnology, Offenburg
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Gelshiftkammer	Laborunikat
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Axiovert 200, Zeiss, München
PCR Maschine	Eppendorf Mastercycler, Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Realtime PCR Maschine	ABI Prism 7900 HAT, Applied Biosystems, Darmstadt
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Standardlösungen und Puffer

Für Kernextrakte:Puffer A:

- 10 mM HEPES-KOH pH 7,9
- 1,5 mM MgCl₂
- 10 mM KCl
- 0,5 mM DTT
- 0,2 mM PMSF
- ad 20 ml H₂O

Puffer C:

- 20 mM HEPES-KOH pH 7,9
- 25 % Glycerol
- 420 mM NaCl
- 1,5 mM MgCl₂

0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT
0,2 mM PMSF
ad 10 ml H₂O

Für mitochondriale und cytosolische Lysate

Hypotoner Puffer:

20 mM Hepes pH 7,4
10 mM KCl
2 mM MgCl₂
Complete Mini 1 Tablette
Ad 10 ml H₂O

Triton X-100 Puffer:

50 mM Tris / Hcl pH 8,0
1% Triton X-100
10 % Glycerol
1 mM EDTA
250 mM NaCl
1mM DTT
Complete Mini 1 Tablette
Ad 10 ml H₂O

Für NP-40 Lysate:

NP-40-Lysispuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7,0
150 mM NaCl
0,5% NP-40
Complete Mini 1 Tablette
Ad 10 ml H₂O

Für Westernblots:10 x Laufpuffer:

288 g Glycin
60 g Tris
100 ml 10% SDS
ad 2 l H₂O

Transferpuffer:

5,82 g Tris
2,93 g Glycin
3,75 ml 10% SDS
200 ml Methanol
ad 1 l H₂O

TBS:

20 ml 1 M Tris pH 7
4 ml 0,5 M EDTA pH 8
100 ml 3 M NaCl
ad 2 l H₂O

TBS Tween:

Ad 500 µl Tween 20

5 x SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend)

200 mM Tris pH6,8
4 % SDS
40 % Glycerol
0,07 % Bromphenolblau

Chemilumineszenz-Reaktion:

70 µl Luminol
30 µl p-Cumarsäure

6,25 ml 100 mM Tris pH 8,3

4 µl konz. H₂O₂

Blotmilch

5% dry milk pulver

1% Albumin

1% Goat serum

Für EMSA:

5 x Gelshift binding buffer (im Kit, Promega):

20 % Glycerol

5 mM MgCl₂

2,5 mM EDTA

2,5 mM DTT

250 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,25 mg/ml poly(dI-dC)poly(dI-C)

10 x TBE

108 g Tris

55g Borsäure

7,44 g EDTA ad 1 l H₂O

10 x Ladepuffer:

250 mM Tris-HCl pH 7,5

40% Glycerol

0,2% Bromophenolblau

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl

1mM EDTA, pH 8,0

+ 100 µg/ ml RNase

4% natives (nicht-denaturierendes) Polyacrylamid Gel

- 56,7 ml H₂O
- 3,5 ml 10 x TBE
- 7 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
- 2,1 ml Glycerol
- 525 µl 10% APS
- 35 µl TEMED

Für Gelelektrophorese

6 x Ladepuffer:

- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25 % Xylene Cyanol FF
- 30 % Glycerin in H₂O

2.2 Methoden in der Zellkultur

2.2.1 Zellkultur und Zellkulturbedingungen

Für diese Arbeit wurden acht verschiedene Melanomzelllinien benutzt: A375, Mel-2A, Brown, MMNH, MV-3, MeWo, Lox und Sk-Mel 23. Diese Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) in DMEM Medium (angereichert mit 4500mg/ml Glucose, L-Glutamin und Pyruvat; Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), dem Penicillin/Streptomycin (5000 units/ml; 5000 µg/ml; Gibco), L-Glutamin (200 mM, 100x; Gibco) und 10% FCS (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) hinzugefügt worden sind, kultiviert. Unter Wachstumsbedingungen von 37°C und 5% CO₂ -Gehalt wurden die Zellen gehalten und alle drei bis vier Tage passagiert.

2.2.2 Behandlungen der Melanomzellen *in vitro*

Ausgewählte Melanomzellen wurden mit zwei verschiedenen NF- κ B Inhibitoren, KINK-1 und Bortezomib, sowie mit vier verschiedenen Zytostatika, nämlich Camptothecin, Doxorubicin, Temozolomid und Dacarbazin behandelt: KINK-1, Molekulargewicht 394, für *in vitro*-Behandlung gelöst in DMSO, Stammlösung 50 mM; Bortezomib, Molekulargewicht 384,2, gelöst in H₂O, Stammlösung 1mg/ ml; Camptothecin (von MBL, Woburn, USA), Molekulargewicht 384,4, gelöst in DMSO, Stammlösung 30 mM; Doxorubicin (von MBL), Molekulargewicht 579,98, gelöst in H₂O, Stammlösung 2mM; Temozolomid (von Chempacific Corporation, Baltimore, USA), Molekulargewicht 194, gelöst in DMEM und Dacarbazin (von Sigma), Molekulargewicht 182, gelöst in DMEM. Temozolomid und Dacarbazin sind pH-sensibel und wurden vor jedem Versuch neu gelöst. Dacarbazin war schwer löslich und wurde für 20 – 30 Minuten im Ultraschallbad bei 40 °C gelöst. Die Endkonzentrationen und Dauer der Behandlungen sind bei dem jeweiligen Versuch angegeben.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Herstellung von Kernextrakten und cytoplasmatischen Extrakten

Am Vortag der Behandlung wurden A375 Melanomzellen in Petrischalen (Greiner bio-one) mit einem Durchmesser von 10 cm so ausgesät, dass etwa eine 60%ige Zelldichte erreicht wurde. Nach der Inkubationszeit (jeweils beim Versuch angegeben) wurden die Zellen geerntet, indem sie abgeschabt und zusammen mit dem Medium in beschriftete Zentrifugen-Röhrchen überführt wurden. Um keine Zellen zu verlieren wurde einmal mit PBS (Gibco) nachgewaschen. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1500 rpm für 3 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1ml Puffer A suspendiert und in Eppendorf Gefäße überführt. Nun erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 1400 rpm für 3 Minuten; der Überstand wurde wieder abgesaugt und die Zellen mit 50 μ l Puffer A suspendiert um sie so 30 Minuten auf Eis stehen zu lassen.

Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit 1,6 µl Nonidet P-40 lysiert und für 10 Sekunden mittels Vortex gut gemischt. Die Proben wurden dann bei 16400 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand, der die cytoplasmatische Fraktion enthielt, in frische Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde mit 25 µl Puffer C suspendiert, 20 Minuten auf Eis stehen gelassen, für 2 Minuten bei 4°C bei 16400 rpm zentrifugiert und der Überstand, der die Kernproteine enthielt, in neue Eppendorf Gefäße überführt. Die Kernextrakte wurden direkt eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

Herstellung von cytoplasmatischen und mitochondrialen Extrakten

Die Zellen wurden wie für die Herstellung der Kernextrakte geerntet. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1 ml hypotonem Puffer suspendiert (Waschschrift) und in Eppendorf Gefäße überführt. Es erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 Minuten. Nach Abheben des Überstandes wurde das Pellet mit 50 µl hypotonem Puffer suspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Spritzen (20G-Spitze) homogenisiert und für 10 Minuten bei 10 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand stellte die cytosolische Fraktion dar und wurde in neue Eppendorf Gefäße überführt. Sowohl Pellet als auch Überstand wurden (nun getrennt) ein zweites Mal genauso zentrifugiert. Die gesammelten Überstände stellten die cytoplasmatische Fraktion dar. Das Pellet wurde mit 50 µl Triton X 100 Puffer suspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Abschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 16400 rpm für 10 Minuten; der Überstand stellte die mitochondriale Fraktion dar.

Herstellung von Ganzzelllysaten

Die Zellen wurden wie für die Herstellung der Kernextrakte geerntet und zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 100 µl NP-40 Puffer suspendiert und bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen der Proben wurden diese mit Spritzen (20G-Spitze) homogenisiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Abschließend wurden die Zellen bei 4°C und 10.000

rpm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand (NP-40 –Lysat) bei -20° C eingefroren.

2.3.2 Westernblots

Für Westernblots wurde eine Proteinmenge zwischen 100 und 160 µg eingesetzt und diese Menge ad 15 µl H₂O pipettiert. Nach Zugabe von 5 µl 5 x Probenpuffer wurden die Proben für 5 Minuten gekocht. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und auf 10 - 12% SDS-Gele aufgetragen und (in 1 x Laufpuffer) bei 100 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der Proteine wurden diese bei 200 mA auf Nitrozellulosemembranen (TransBlot Transfer Medium, pure nitrocellulose membrane, 0,45 µm; BioRad) transferiert. Die Membranen wurden über Nacht in 5% fettreduzierter Milch inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen für 3 Stunden in TBS Tween mit dem ersten Antikörper inkubiert und dann drei Mal mit TBS Tween für jeweils 15 Minuten gewaschen. Danach wurden die Membranen für 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert, wiederum drei Mal mit TBS Tween gewaschen und die Proteine mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion (Inkubation ungefähr 5 Minuten) sichtbar gemacht. In der Dunkelkammer wurde ein Film (Hyperfilm, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) für 3 bis 10 Minuten in einer Röntgenkassette auf die Membran aufgelegt und entwickelt (Röntgenfixierer-, und Röntgenentwicklerkonzentrat; beide jeweils 1:5 verdünnt mit Wasser, von Kodak).

2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Lysate zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford folgendermaßen durchgeführt: Für die Standardkurve wurden 800 µl Wasser ohne Protein (blank), mit 1 µg/ ml, 2,5 µg/ ml, 5 µg/ ml, 10 µg/ ml, 15 µg/ ml oder 25 µg/ ml Standardprotein (BSA, Bio-Rad) und mit 1 µl NP-40 Puffer versetzt sowie 200 µl Proteinassay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) hinzugefügt. Für die Messung der Proben

wurde 1 µl anstatt des Proteinstandards mit Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte dann photometrisch mit einem BioPhotometer 6131 (Eppendorf AG).

2.3.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Am Vortag wurden die Gele gegossen und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Es wurde das Gelshift assay System von Promega benutzt, bei dem NF-κB Oligonukleotide mit radioaktivem ATP (γ - 32 P) markiert wurden. Radioaktiv markierten Oligonukleotide (Sonde) wurden wie folgt präpariert: Zunächst wurde die Radioaktivität im Wasserbad bei 37°C im Isotopenlabor aufgetaut. Dann wurden 2 µl der konsensuellen Oligonukleotide (1,75 pmol/µl; 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'), 1 µl T4 Polynukleotid-Kinase, 1 µl 10 x Kinase Puffer, und 3,8 µl Nuklease-freies Wasser zusammen pipettiert und im Kontrollbereich/Isotopenlabor 2,2 µl 32 P γ ATP hinzugefügt. Dieser Ansatz (insgesamt 10 µl) wurde nun für 10 Minuten ins Wasserbad (37°) gestellt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt und 89 µl TE-Puffer hinzugefügt. Nun wurden überschüssige (also nicht radioaktiv markierte) Oligonukleotide durch Zentrifugation entfernt. Dazu wurden für 100 µl Sonde 2 Mini Quick DNA Säulen (Mini Quick columns; Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. Durch zweimaliges Zentrifugieren der Säulen für 1 Minute bei 1000 g wurden die Säulen vorbereitet und dann in frische Eppendorf-Zentrifugenröhrchen gestellt. Nun wurden pro Säule 50 µl Sonde pipettiert und diese bei 1000 g für 4 Minuten zentrifugiert und das Zentrifugat gepoolt.

Probenvorbereitung: Es wurden 10 µg Protein aus Kernlysaten eingesetzt und das Volumen auf 8 µl mit H₂O ergänzt. Bei der Kontrolle wurde nur auf 5 µl mit H₂O aufgefüllt und noch 3 µl unmarkierte NF-κB-Oligonukleotide (Kit, 1,75 pmol/ml) zugegeben. Alle Proben enthielten danach 2 µl Bindepuffer (Endvolumen 10 µl) und wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Isotopenlabor wurden dann jeder Probe 2 µl der radioaktiven Sonde hinzugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die beiden vorbereiteten gekühlten Gele in die Gelkammer mit 0,5 x TBE-Puffer gesetzt und eine Spannung von 200 – 250 V angelegt. Nach 20 Minuten wurden den

Proben je 1 μl 10 x Ladepuffer hinzugefügt und die Elektrophorese bei 200-250 V für ca. 40 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten entfernt, auf Filterpapier aufgebracht und ca. eine Stunde auf einem Gelrockner bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde nun über Nacht in einer Kassette auf eine Imager-Folie (Imaging Plate for Bio Imaging Analyzer von Fuji Film, BAS-MS 2025, 20x25 cm) gelegt und am folgenden Tag am PhosphorImager eingelesen. Auswertung und Quantifizierung erfolgten mit ImageQuant software (BioRad, München, Deutschland).

Für den Supershift assay wurden zu den 10 μg Kernprotein 4 μl Antikörper (p65, monoklonaler IgG Maus-Ak von Santa Cruz; p50, monoklonaler IgG Maus-Ak von Santa Cruz; beide 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wie bei den Gelshifts ad 8 μl Wasser hinzugefügt und wie beschrieben fortgefahren.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Der Lysispuffer (bestehend aus 1 ml RLT-Puffer aus dem Kit und 10 μl β -Mercaptoethanol) wurde vor jeder Isolation frisch angesetzt; Dazu wurden 600 μl Lysispuffer für $> 5 \times 10^6$ Zellen benötigt. Die Zellen wurden nach der jeweiligen Behandlung geerntet und das Pellet mit dem entsprechenden Volumen Lysispuffer suspendiert. Anschließend wurden die Proben mit Spritze und Nadel (20G) homogenisiert und mit dem gleichen Volumen (also 600 μl) Ethanol gemischt. Davon kamen 700 μl auf Mini-Säulen (Kit) und wurden für 20 Sekunden zentrifugiert. Die nicht gebundene Fraktion wurde verworfen und der Rest des Lysates auf die Säule geladen und die Zentrifugation wiederholt. Nun erfolgte ein DNase Verdau (RNase free DNase Set, Quiagen): Hierfür wurden 350 μl RW1 Puffer auf die Säule geladen, für 20 Sekunden zentrifugiert und DNase (10 μl DNase + 70 μl RDD-Puffer pro Probe) auf die Säulen pipettiert und für 16 Minuten inkubiert. Anschließend wurden noch einmal 350 μl RW1

Puffer auf die Säulen geladen und zentrifugiert. Nun folgte der RPE Waschschrift: 500 µl des RPE Puffers wurden auf die Säule geladen und für 20 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde genauso wiederholt und die Mini-Säule danach in ein 1,5 ml Sammelröhrchen (Kit) gestellt. Die RNA wurde mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser (50°C) eluiert. Die Proben wurden für 1 Minute bei 16400 rpm zentrifugiert und diese Elution und anschließende Zentrifugation ein weiteres Mal wiederholt. Die RNA-Konzentration im Eluat (ca. 60 µl) wurde nun (verdünnt mit 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1+199) photometrisch gemessen (BioPhotometer 6131; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

2.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit einem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Zur RNA (2 µg) wurde ad 10 µl Nuklease-freies Wasser hinzugefügt, sowie 1 µl dT₁₈ Primer. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und derweil der Mastermix zusammenpipettiert: 4 µl 5 x Puffer, 2 µl dNTP mix und 1µl Ribonuclease-Inhibitor. In jede Probe wurden nun 7 µl des Mastermix pipettiert und dann in den Heizblock gestellt (37°C); nach ca. 5 Minuten wurde 1 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde bei 70°C für 10 Minuten gestoppt und die Proben dann sofort auf Eis gestellt. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Der Mastermix der PCR, der zu 1 µl template cDNA pipettiert wurde, bestand aus 0,5 µl Forward Primer, 0,5 µl Reverse Primer, 0,5 µl dNTPmix (10 mM, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), 2,5 µl Puffer S (15 mM MgCl₂; Peqlab), 19,8 µl H₂O und 0,2 µl Taq Polymerase (5 Units/ µl; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland); das Volumen betrug insgesamt also 24 µl pro Probe. Die folgenden Primer wurden für die Amplifikation verwendet: MCP-1 FW 5' – GCT CAT AGC AGC CAC CTT CAT TC – 3', REV

5' – TGC AGA TTC TTG GGT TGT GGA – 3'; B-Catenin FW 5' - CTG ATT TGA TGG AGT TGG AC – 3', REV 5' – CTG CTA CTT GTT CTT GAG TG – 3'; COX-2 FW 5' – GAG AAA ACT GCT CAA CAC CG – 3', REV 5' – GCA TAC TCT GTT GTG TTC CC – 3'; p21 FW 5' - AGG CGC CAT GTC AGA ACC GGC TGG – 3', REV 5' CAG GAT CCT GTG GGC GGA TTA GGG CT – 3'; IL-8 FW 5' ACG AAT TCC TAG GAC AAG AGC CAG GAA G – 3', REV 5' – GTG AAT TCA GTG TGG TCC ACT CTC AAT C – 3'; hGAPDH FW 5' – CT TTG GTA TCG TGG AAG GAC TC – 3', REV 5' – TT CGT TGT CAT ACC AGG AAA TG – 3'. Die Programme dieser PCRs waren folgende: 94°C für 3 Minuten; 94°C für 30 Sekunden – (MCP-1) 62°C, (B-Catenin) 55°C, (COX-2) 60°C, (p21) 62°C, (IL-8) 61°C und (hGapdh) 58°C für 30 Sekunden - 72°C für 60 Sekunden (25 – 30 cycles); 72°C für 5 Minuten.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf 1,5 % Agarosegelen (1,5 g SeaKem® LE Agarose, Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA, in 100 ml TBE-Puffer) aufgetrennt. Die Agarosegele enthielten zusätzlich 2,5 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotrend Chemikalien; Köln, Deutschland), das wie Ethidiumbromid in Nukleinsäuren interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Je nach Primer wurden 2-5 µl PCR-Produkt, das mit 1 µl 6 x Ladepuffer (und evtl. ad 5 µl H₂O) gemischt wurde, auf das Gel geladen. Als Größenstandard wurde eine 100 bp DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) benutzt. Die Elektrophorese erfolgte ca. 115 Minuten bei 100 V. Die durch das GelRed angefärbten Banden wurden im UV-Licht eines Transilluminators (E.A.S.Y. 440K, Herolab, GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) sichtbar gemacht.

2.4.5 Real-time PCR

Die cDNA-Synthese für diese PCR erfolgte mit Hilfe der Superscript II Reversen Transkriptase (= 200 Units; von Invitrogen), wobei die anderen Substanzen aus dem Fermentas Kit (oben beschrieben) entnommen wurden: Zunächst wurden

2 µg RNA ad 10 µl H₂O pipettiert und 1 µl Oligo dT18 Primer und 1 µl dNTP (10 mM, beides aus Fermentas Kit) hinzugegeben. Die Proben wurden bei 65°C für 5 Minuten erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Mastermix (7 µl pro Probe), der wie folgt zusammengesetzt ist, hinzugefügt: 4 µl 5 x First Strand Puffer (Superscript II), 2 µl 0,1 M DTT (Superscript II) und 1 µl Rnase Inhibitor (Fermentas Kit). Die Proben wurden nach Mischen in den Heizblock (42°C) gestellt und nach 2 Minuten wurde 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Nach 50 Minuten bei 42 °C wurde die Reaktion durch Inkubation bei 70 °C für 15 Minuten gestoppt.

Für die Real-time PCR wurde für jede Probe 1 µl dieser cDNA eingesetzt, wobei diese 1:2,5 mit Nuklease-freiem H₂O verdünnt wurde. Da pro Probe eine Dreifachbestimmung erfolgte, verdünnte man (bei Benutzen von drei verschiedenen Primern) also 10 µl cDNA mit 15 µl Nuklease freiem H₂O. Die so entstandenen 25 µl wurden auf 9 wells (pro Probe) einer 384 well Platte aufgetragen. Pro well wurden nun 10 µl Mastermix hinzugefügt. Für die Primer IL-8 und CXCL-1 (QuantiTect®Primer Assay von Quiagen; vor der ersten Benutzung mit 1,1 ml TE pH 8,0 verdünnt) galt: 5 µl SYBR Green (QuantiFast SYBR Green PCR Kit von Quiagen), 1 µl Primer (FW und REV schon zusammen) und 4 µl Nuklease freies H₂O. Der Mastermix der GAPDH setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl SYBR Green, 1 µl GAPDH FW 5' – AAT GGA AAT CCC ATC ACC ATC T – 3', 1 µl REV 5' – C GCC CCA CTT GAT TTT GG – 3' (von Operon) und 3 µl Nuklease freies H₂O. Nach Zugabe des Mastermixes wurde die Platte, die mit einer Folie abgedeckt wurde, zentrifugiert und in die PCR-Maschine gestellt. Das Programm wurde wie folgt eingestellt: 5 Minuten 95°C (Aktivierung der Hot Star Taq in SYBR Green); 10 Sekunden 95°C (Denaturierung) und 30 Sekunden 60°C (Annealing und Extension kombiniert) mit 40 Zyklen; Anstieg von 60°C auf 95°C über 20 Minuten (Schmelzkurve). Nach der Messung wurden die C_T Werte bestimmt (Zyklus, bei dem der erste signifikante Anstieg der Fluoreszenz zu messen ist; markiert den Anfang der exponentiellen Phase), von den 3 wells pro Probe Mittelwerte errechnet und außerdem die beiden Zielgene IL-8 und CXCL-1 in Verhältnis zum Referenzgen GAPDH gesetzt. Dabei wurde das Verhältnis aus mRNA Zielgen / mRNA GAPDH der völlig unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt.

2.5 Funktionelle Experimente

2.5.1 Zellzyklus-Analyse

A375 Melanomzellen (ca. 2×10^5) wurden am Vortag in T 25 Zellkulturflaschen (Greiner bio-one) ausgesät. Die Synchronisierung der Zellen hinsichtlich ihres Teilungszyklus erfolgte durch doppelte Thymidin-Behandlung wie folgt: Die Zellen erhielten je T 25 Zellkulturflasche 5 ml Medium und 50 μ l 200 mM Thymidin (Sigma, Mol.Gew. 242,23 Stammlsg: 200 mM; Endkonzentration 2 mM). Nach 10 Stunden wurde die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und neues Medium, welches nur 0,5% FCS enthielt, hinzugegeben. Nach 10 Stunden wurden 2 mM Thymidin hinzugefügt und für 12 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und frisches Medium mit 10% FCS, welches den Zellzyklus initiiert und so „synchronisiert“, hinzugegeben. Diesem Medium wurde auch die Behandlung, nämlich Bortezomib in den Konzentrationen 5 ng/ml sowie 10 ng/ml und KINK-1 in den Konzentrationen 5 μ M und 15 μ M für je 4 und 12 Stunden hinzugefügt. Nach diesen Zeiten wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Kulturmedium suspendiert und auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 8 – 10 Minuten bei 4°C und der Überstand wurde anschließend abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 500 μ l PBS (Gibco) gewaschen, gut suspendiert und die Proben auf Eis gestellt. Nun wurden, unter ständigem Mischen, tropfenweise 5 ml 70 % Ethanol (-20°C) hinzugegeben, um die Zellen zu fixieren. Die Zellen blieben so über Nacht stehen. Danach wurden sie drei Mal bei 2000 rpm bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und dazwischen jeweils mit 1ml kaltem PBS (4 °C) suspendiert. Nach der dritten Zentrifugation wurde mit PBS, das Propidiumiodid (Sigma) und Rnase (RnaseZAP™, Sigma) enthielt, suspendiert. (Herstellung: 20 ml PBS + 100 μ l Propidiumiodid + 200 μ l RNAse). In die FACS-Röhrchen wurde ca. 1 ml FACS-Puffer (FacsFlow™ von BD) vorgelegt und 5 – 20 μ l der Propidiumiodid-markierten Zellsuspension gegeben. Beim Messen (Low Flow) sollten ungefähr 300 Zellen pro Sekunde gezählt und im Kanal FL3

gemessen werden / (FacsCalibur von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland).

2.5.2 Detektion Histon-gebundener DNA-Fragmente (Apoptosedetektion)

Zur Apoptosedetektion wurde das Cell Death Detection ELISA Kit von Roche benutzt und nach den Instruktionen des Herstellers vorgegangen. Einen Tag vor der Behandlung wurden A375 Melanomzellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6-well Zellkulturplatten (Greiner bio-one) ausgesät. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium, das abgeschwommene Zellen enthielt, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das well mit 1 ml PBS nachgewaschen. Die Zellen wurden mit 0,5 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) abgelöst und letzteres mit 1,5 ml DMEM, das 10% FCS enthält, neutralisiert. Die Suspension wurde ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt und diese bei 1500 rpm für 3 Minuten zentrifugiert / (Hettich Zentrifugen, 16R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Nachdem der Überstand abgenommen war, wurde das Pellet in 1 ml DMEM suspendiert und die Zellen wurden gezählt. Anschließend wurden 2×10^5 Zellen entnommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden für 4 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5417R), der Überstand abgehoben, das Pellet in 500 µl Inkubationspuffer (im Kit) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 16400 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde mit Inkubationspuffer im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Einen Tag zuvor war eine 96-well Platte vorbereitet worden, indem die wells mit Anti-Histon Antikörper bedeckt wurden und die Platte gekühlt wurde / (monoklonaler Maus-Ak, Klon H11-4; 1:15 verdünnt mit Wasser und 10 x coating buffer nach Anleitung). Überschüssiger Antikörper wurde nun von der Platte durch Herausschleudern entfernt und 200 µl Inkubationspuffer in jedes well gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte drei Mal mit Waschlösung (im Kit) gewaschen und je 100 µl der 1:5 verdünnten Probe wurden in Triplets aufgetragen. Zudem wurde in jeweils zwei wells eine Positiv-, und eine Negativkontrolle hinzugefügt / (Positivkontrolle: im

Kit; Negativkontrolle: Inkubationspuffer). Die Platte wurde dicht abgeklebt und für eine Stunde auf einem Taumler bewegt. Nach dreifachem Waschen mit der Waschlösung wurde der Anti-DNA-POD-Antikörper auf die Proben gegeben und wiederum eine Stunde auf dem Taumler inkubiert / (monoklonaler Maus-Ak, Klon MCA-33, mit Peroxidase konjugiert, 1:15 verdünnt mit Inkubationspuffer). Danach wurde die Platte wieder drei Mal gewaschen und 100 µl der Substratlösung (ABTS, im Kit) zu jedem well hinzugefügt. Nach 10 Minuten wurde diese Reaktion (Umsetzung des Substrats durch Peroxidase) mittels eines ELISA readers bei 405 nm (FluoStar optima, BMG Labtech., Offenburg, Deutschland) quantifiziert.

2.5.3 Experimente zur Tumorzell-Invasion *in vitro*

Für diese Versuche wurde das BD BioCoat™ Tumor Invasion System von BD (BD Biosciences) verwendet. Dieses System besteht aus einer 24 well-Platte, in welche Einsätze eingehängt werden. Beide Kompartimente – Einsätze und äußere wells – sind durch eine Membran mit 8 µm großen Poren, welche zusätzlich durch eine künstliche Basalmembran bedeckt sind, voneinander getrennt. So können nur Zellen, die zur Invasion befähigt sind, die untere Seite der Membran erreichen. Zudem ist die Membran undurchlässig für Fluoreszenzlicht: Fluoreszenz-markierte Zellen, die durch die Poren getreten sind, werden so von denen auf der Oberseite unterschieden. Pro Einsatz wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen in FCS-freiem Medium ausgesät und sofort mit Bortezomib (5 ng/ml), KINK-1 (5 µM), Camptothecin (0,03 µM), Doxorubicin (0,1 µM) oder den Kombinationen aus Camptothecin oder Doxorubicin und KINK-1 beziehungsweise Camptothecin oder Doxorubicin und Bortezomib behandelt. Jeweils zwei Einsätze erhielten identische Behandlungen. Danach wurden die äußeren wells mit 750 µl DMEM inklusive 10% FCS (um die Zellen anzulocken) gefüllt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Einsätze in eine neue 24 well Platte gesetzt, die 0,5 ml PBS mit 4 µg/ml Calcein AM (Sigma) enthielt, und für eine Stunde bei 37° inkubiert. So wurden die Zellen, die sich an der Unterseite der Membran befanden, angefärbt. Die Zellen wurden unter einem inversen Mikroskop (Zeiss) beurteilt und fotografisch dokumentiert.

2.6 Experimentelle Tumormetastasierung *in vivo*

Für die *in vivo* Versuche wurden C57BL6 Mäusen jeweils $2,5 \times 10^5$ B16F10 Melanomzellen (in 150 μ l PBS suspendiert) in die Schwanzvenen injiziert, die mir der Blutzirkulation die Lunge erreichten. Im pulmonalen Kapillarnetz siedelten sich die Melanomzellen ab und bildeten Metastasen, die nach 17 Tagen quantifiziert wurden. Die antitumorale Behandlung erfolgte intraperitoneal mit 1ml Einmalspritzen (Dispomed®, von Hartenstein) und 27G Spritzen (Sterican®, vorne weiß, von Braun) und begann am ersten Tag nach folgendem Behandlungsschema (6 Mäuse/ Gruppe): Gruppe 1: Kontrolle - keine Behandlung, Gruppe 2 - KINK-1: 3 mg/kg jeden zweiten Tag; Gruppe 3 - Bortezomib: 0,5mg/kg an Tag 1 und 6, 0,25mg/kg an Tag 11; Gruppe 4 - Camptothecin: 1,8mg/kg an den Tagen 2,5,7,10, 13 und 15; Gruppe 5 - Camptothecin und KINK-1: Kombination beider mit jeweiliger Dosierung der Einzelbehandlung; Gruppe 6 - Kombination beider mit jeweiliger Dosierung der Einzelbehandlung. Das schwer lösliche Camptothecin wurde in PBS pH 7,4 gelöst, das 0,3% Natriumcarboxymethylzellulose und 0,2% Tween 20 enthielt (Dora et al., 2006). KINK-1 wurde basierend auf Erfahrungen des Labors in Wasser mit 10% Cremophor gelöst; Bortezomib nur mit Wasser verdünnt. Am Tag 17 wurden die Lungen entnommen, die Anzahl der Metastasen gezählt, das Gewicht der Lungen sowie der Mäuse festgehalten und von jeder Lunge ein Foto gemacht.

3. Ergebnisse

3.1 Konstitutive und stimulierte NF- κ B Aktivität in Melanomzellen

Viele Tumorzellen verfügen über konstitutive, das heißt intrinsisch vorhandene NF- κ B-Aktivität. Mit Hilfe von EMSAs sollte eine mögliche konstitutive Aktivität in den untersuchten Melanomzelllinien nachgewiesen werden. Hierfür wurden acht verschiedene Melanomzelllinien kultiviert, Kernlysate hergestellt und jeweils 10 μ g dieser Kernlysate für die Detektion von in den Kern transloziertem p65 mittels EMSA verwendet: Hierbei wird die Kernfraktion mit radioaktiv markierter DNA, welche die Sequenz einer Promotorregion von NF- κ B aufweist, inkubiert. Kernlysate, welche p65, eine wichtige NF- κ B Untereinheit, enthalten, binden diese und dieser Komplex wird im Gel durch die radioaktiv markierte Sonde sichtbar gemacht. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass 7 der 8 untersuchten Melanomzelllinien konstitutive NF- κ B-Signale aufweisen. Die stärksten Signale waren bei Brown, MeWo, MMNH, MV3 und Lox zu sehen. Dahingegen hatte Mel-2a ein schwaches Signal und A 375 zeigte eine eher mittlere Aktivität (Abb.2). Bei Sk-Mel 23 war keine klare konstitutive NF- κ B-Aktivität zu erkennen. In einem weiteren Versuch wurden die Melanomzellen mit TNF α inkubiert und so eine Aktivierung von NF- κ B induziert. Diese induzierte NF- κ B Aktivierung ist ein wesentlicher Bestandteil der erworbenen Chemoresistenz nach oder während der Zytostatika-Therapie. Hier konnte beobachtet werden, dass vor allem die Zelllinien MeWO, MMNH und MV3 auf die TNF α -Behandlung mit einer starken NF- κ B Aktivität antworteten. Dagegen ließen sich andere Melanomlinien, wie Mel-2a oder Sk-Mel 23 kaum stimulieren (Abb.2).

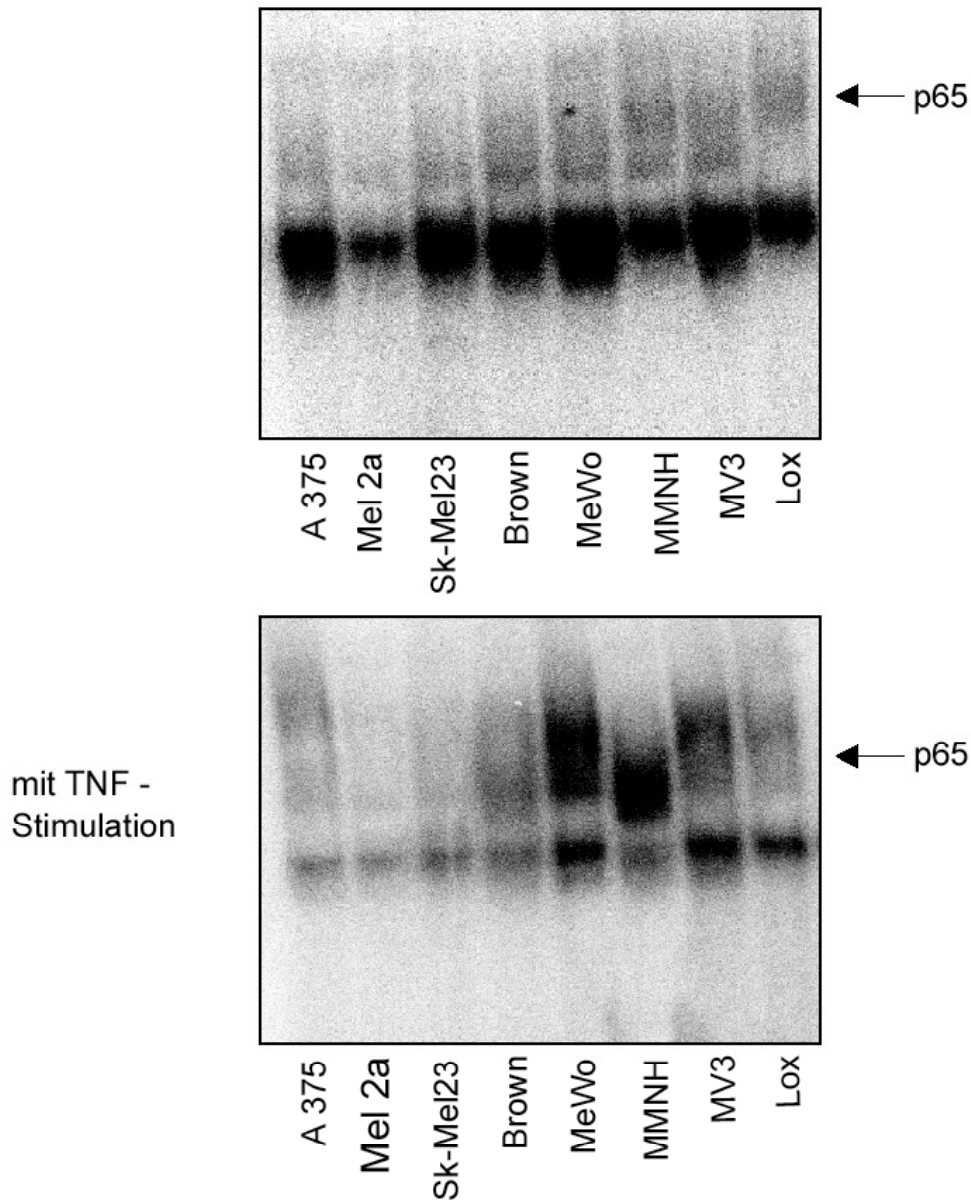


Abb.2: Konstitutive und stimulierte NF- κ B-Aktivität in acht verschiedenen Melanomzellen

Acht Melanomzelllinien wurden geerntet, lysiert und Kernlysate hergestellt. Für die Detektion der NF- κ B-Aktivität mittels EMSA wurden 10 μ g Kernlysate pro Probe eingesetzt. Brown, MeWo, MMNH und MV3 zeigten die stärkste Aktivität. Im zweiten Versuch wurde die NF- κ B Aktivität der Zellen vor dem Ernten für eine Stunde mit 1nM TNF stimuliert. Vor allem MeWo, MMNH und MV3 zeigten eine starke Induktion des NF- κ B-Signals.

In diesen Gelshift-Experimenten wurden für NF- κ B zwei Banden nachgewiesen. Mit Hilfe eines Supershift-Experimentes sollte daher untersucht werden, in welcher Bande sich die für die Translokation wichtige p65-Untereinheit befindet.

Dazu wurden die Kernlysate vor der Inkubation mit der radioaktiv markierten DNA zunächst mit Antikörpern gegen die beiden häufigsten Untereinheiten von NF- κ B, nämlich p50 und p65 präinkubiert. Durch die Bindung der Antikörper an den Komplex wird dieser größer und aufgrund des höheren Molekulargewichtes läuft er im Gel langsamer, wird also weiter oben festgehalten. So konnte bestätigt werden, dass die obere Bande die Untereinheit p65 enthalten muss, da dieser Komplex nach Antikörperinkubation ein erhöhtes Molekulargewicht aufwies (Abb.3). Deshalb wurde im weiteren Verlauf vor allem die obere Bande ausgewertet.

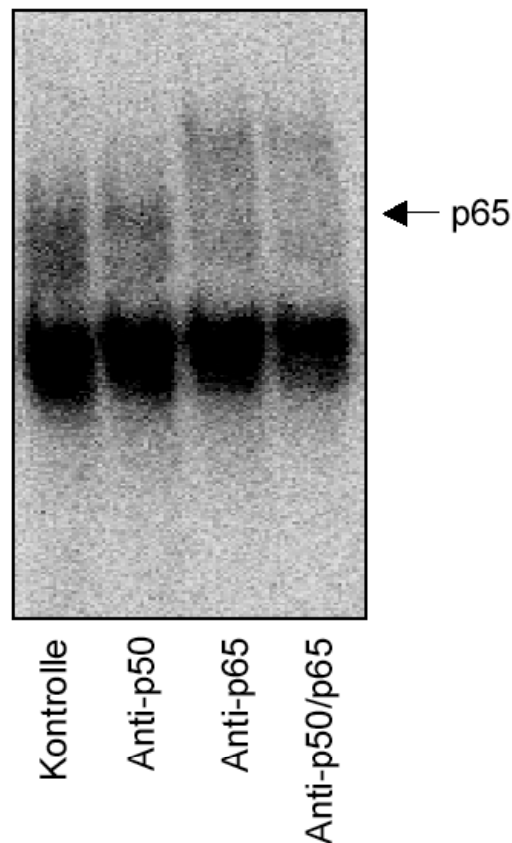


Abb.3: „Supershift“ zur Identifikation der oberen Bande

10 μ g Kernlysat von A375 Melanomzellen wurden entweder mit Antikörper gegen p50 oder gegen p65 oder mit beiden Antikörpern für eine halbe Stunde inkubiert. Mittels EMSA wurde NF- κ B detektiert und ein „Shift“ der oberen Bande bei Inkubation mit p65 festgestellt.

3.2 Expression NF- κ B-regulierter Proteine

Nachdem gezeigt worden war, welche der untersuchten Melanomlinien eine konstitutive NF- κ B-Aktivität aufweisen, wurden diese Linien im Folgenden hinsichtlich der Expression bestimmter NF- κ B-regulierter Proteine, nämlich XIAP, Survivin, c-myc und Cyclin D1 untersucht. Hier zeigte sich, dass zwischen der konstitutiven Aktivität und der Expression dieser Proteine kein unmittelbarer Zusammenhang bestand: Nur das antiapoptotisch wirksame XIAP verhielt sich gleichsinnig wie das im Kern vorhandene p65: Während MeWo, MMNH, MV 3 und Lox XIAP stark exprimierten, war die Expression bei Mel-2a Melanomzellen sehr schwach. Auch Survivin, ebenfalls ein Protein aus der Gruppe der IAP's (Inhibitors of Apoptosis) zeigte bei MV3, Lox und Brown ein starkes Expressionssignal, also in Zellen mit hoher konstitutiver NF- κ B-Aktivität. Eine schwächere Survivin-Expression war aber auch in Mel-2a und Sk-Mel 23 zu beobachten. Insgesamt ließ sich feststellen, dass in jeder Melanomlinie mindestens eines dieser mit Malignität assoziierten Proteine stark exprimiert war, wobei manche Melanomlinien wie Brown, MV 3 und Lox auch mehrere der untersuchten Proteine stark exprimierten (Abb.4).

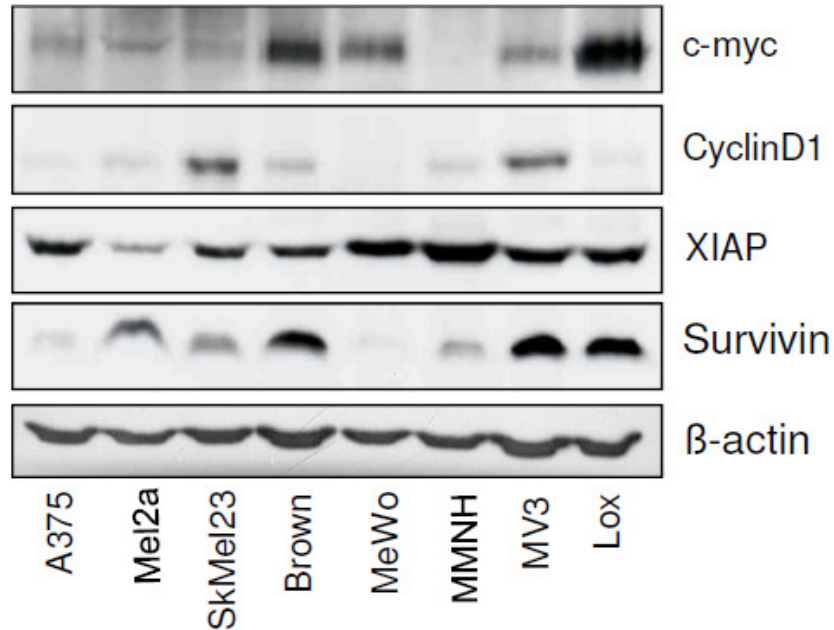


Abb.4: Expression NF-κB-abhängiger Proteine in acht verschiedenen Melanomzellen

Acht Melanomzelllinien wurden geerntet, und Kernlysate sowie zytosolische Lysate hergestellt. Mittels Westernblots wurden NF-κB-abhängige Proteine untersucht: Für XIAP und Survivin wurden zytosolische, für Cyclin D1 und c-myc Kernlysate verwendet; je nach Protein wurden 100 – 160 µg Protein eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde β-actin verwendet.

3.3 KINK-1 und Bortezomib – zwei NF-κB-Inhibitoren im Vergleich

3.3.1 Inhibition von NF-κB durch KINK-1 und Bortezomib

Für die folgenden Versuche wurde die Melanomlinie A375 aufgrund ihrer mittleren NF-κB-Aktivität ausgewählt. Zunächst sollte bewiesen werden, dass die beiden beschriebenen NF-κB-Inhibitoren, der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib und der IKKβ-Inhibitor KINK-1, auch wirklich die Translokation von p65 vom Zytoplasma in den Kern verhindern. Hierfür wurden A375 Melanomzellen für 18 Stunden mit Bortezomib (2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 30 ng/ml) oder KINK-1 (2 µM, 5 µM, 15 µM und 25 µM) behandelt und danach erfolgte eine Stimulierung von NF-κB durch TNFα für eine Stunde. Die NF-κB-Aktivität wurde wiederum mittels EMSA detektiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass KINK-1 das NF-κB Signal konzentrationsabhängig reduzierte und

bei 15 μM und 25 μM kaum noch NF- κB -Aktivität vorhanden war. Hingegen konnten niedrige Konzentrationen von Bortezomib die Translokation noch nicht verhindern; allerdings zeigten hohe Konzentrationen ab 10 ng/ml auch eine komplette Inhibition (Abb.5).

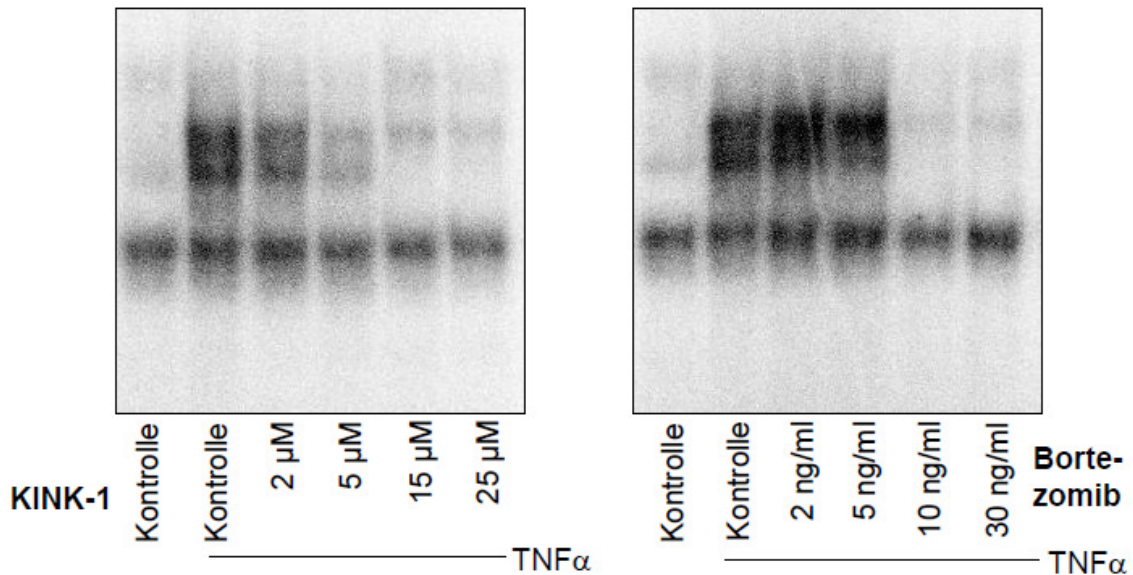


Abb.5: KINK-1 und Bortezomib verhindern die Translokation von p65 in den Kern

A375 Melanomzellen wurden mit KINK-1 in den Konzentrationen 2, 5, 15 und 25 μM sowie mit Bortezomib in den Konzentrationen 2, 5, 10 und 30 ng/ml für 18 Stunden behandelt. Eine Stunde vor dem Ernten wurde das Medium entfernt und durch Medium, welches 1 nM TNF enthielt, ersetzt. 10 μg der daraus hergestellten Kernlysate wurden für die Detektion der NF- κB -Aktivität verwendet. Beide Substanzen verhinderten die Translokation von p65 in den Kern.

3.3.2 Protein-Expression unter NF- κB -Inhibition

Um die Auswirkung der NF- κB -Inhibition auf Proteine, die die Proliferation und Apoptose regulieren, zu untersuchen, wurden Kernlysate, zytosolische Lysate und Ganzzelllysate von A375 Melanomzellen, welche mit Konzentrationsreihen von Bortezomib und KINK-1 behandelt worden waren, angefertigt. Mittels Westernblots wurde nach Veränderungen der Expression relevanter Proteine gesucht. Dabei zeigte sich, dass weder KINK-1 noch Bortezomib die Expression antiapoptotischer Proteine wie Survivin oder Xiap veränderte. Auch die Expression von Bcl-xL und das Verhältnis von bax zu bcl-2, welches die

Integrität der Mitochondrien anzeigt, blieben unter dieser Behandlung unverändert. Proteine, deren Expression sich veränderte, sind vor allem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt: So zeigte Cyclin D1 unter Bortezomib-Behandlung eine deutliche und unter KINK-1 eine leichte Abnahme. Zudem konnte unter Bortezomib eine starke Zunahme des Tumorsuppressors p53 festgestellt werden und auch NOXA, ein proapoptisches Protein, wurde unter Bortezomib verstärkt exprimiert (Abb.6).

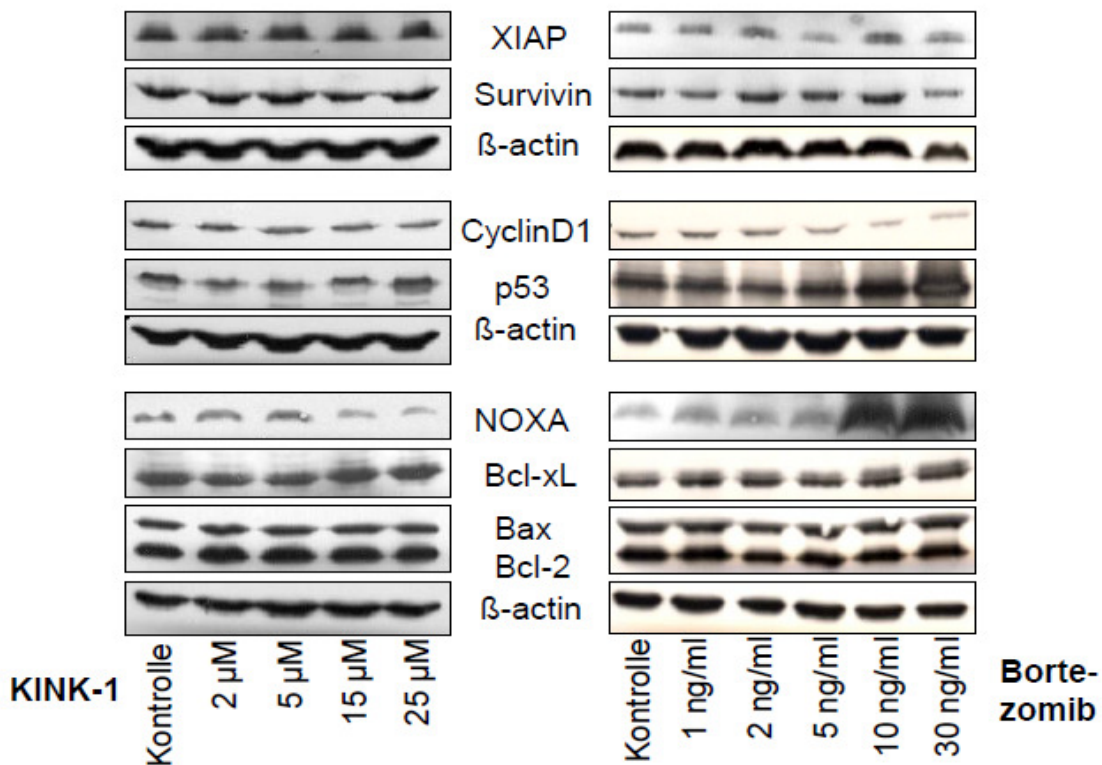


Abb.6: Expression tumorrelevanter Proteine unter der Behandlung von KINK-1 und Bortezomib

A375-Melanomzellen wurden mit KINK-1 in den Konzentrationen 2, 5, 15 und 25 μM sowie mit Bortezomib in den Konzentrationen 1, 2, 5, 10 und 30 ng/ml für 18 Stunden behandelt. Mittels Westernblots wurde die Expression tumorrelevanter Proteine in der Kernfraktion (Cyclin D1, p53), in der zytosolischen Fraktion (Survivin, XIAP) und in Ganzzelllysaten (NOXA, Bax, Bcl-2, Bcl-xL) untersucht. Relevante Veränderungen zeigten sich bei NOXA, p53 und Cyclin D1.

Neben den genannten Proteinen wurde auch die Expression von Zytokinen, die maßgeblich zur Tumorenstehung und –progression beitragen können, unter der Behandlung von KINK-1 und Bortezomib untersucht. Mittels Realtime-PCR aus RNA von Zellen, die mit ansteigenden Konzentrationen von KINK-1 und

Bortezomib behandelt und anschließend für eine Stunde mit TNF α stimuliert worden waren, konnte gezeigt werden, dass beide Inhibitoren die RNA-Synthese dieser Chemokine nahezu bis zum konstitutiven, also unstimulierten Ausmaß hemmen konnten (Abb.7).

Auch die Ausweitung dieser Untersuchung durch RT-PCR, durch welche IL-8 und zusätzlich MCP-1 untersucht wurden, zeigte vergleichbare Ergebnisse (Abb.8). MCP-1 und IL-8 verhielten sich hier gleichsinnig wie die im EMSA gezeigte NF- κ B-Hemmung (Abb.5): Während KINK-1 im Bereich von 2 μ M bis 5 μ M eine kontinuierliche Abnahme von MCP-1 und IL-8 bewirkte, war bei Bortezomib zwischen 5 und 10 ng/ml ein deutlicher Sprung erkennbar (Abb.8). Schließlich wurde noch Cox-2 untersucht. Dieses Enzym reguliert nach Studien von *Denkert et al.* die Invasion; ein spezifischer Cox-2-Inhibitor konnte die Matrigel-Invasion, nicht aber die Proliferation von Melanomzellen verhindern (Denkert et al., 2001). Hier konnte Bortezomib konzentrationsabhängig eine leichte Reduktion bewirken; auch KINK-1 führte zunächst zu einer Reduktion, bei hohen Konzentrationen allerdings stieg die Cox-2-Expression wieder an (Abb.8).

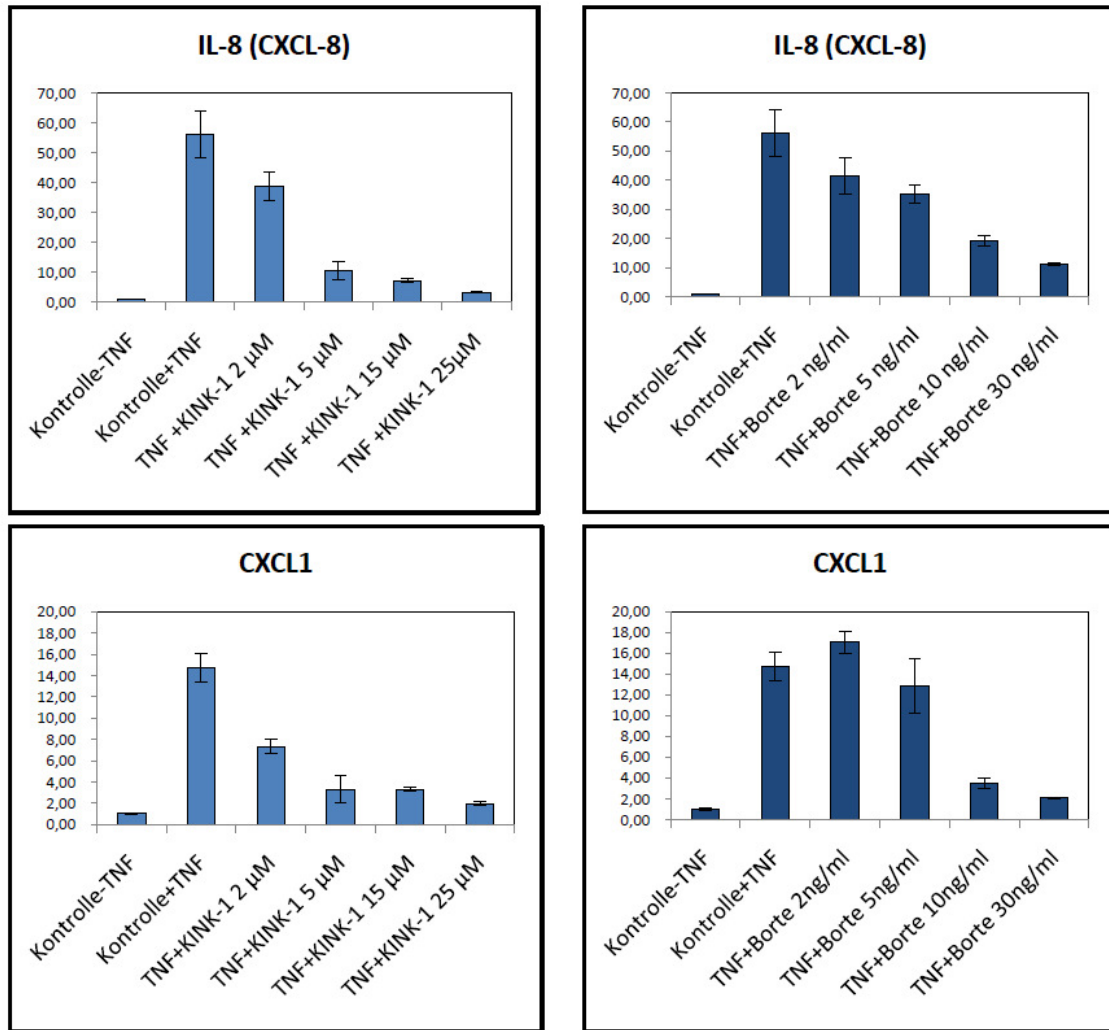


Abb.7: Quantitative „Realtime“ PCR der mRNA-Expression der Chemokine Gro α (CXCL1) und IL-8 (CXCL8) unter der Behandlung mit KINK-1 und Bortezomib

A375-Melanomzellen wurden mit KINK-1 in den Konzentrationen 2, 5, 15 und 25 μ M sowie mit Bortezomib in den Konzentrationen 2, 5, 10 und 30 ng/ml für 18 Stunden behandelt. Eine Stunde vor dem Ernten wurde das Medium entfernt und durch Medium, welches 1 nM TNF enthielt, ersetzt. RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und die cDNA mit Superscript II Reverser Transkriptase (Invitrogen) synthetisiert. Die gezeigten Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Einzelmessungen (Tripletts); die Standardabweichung ist angegeben.

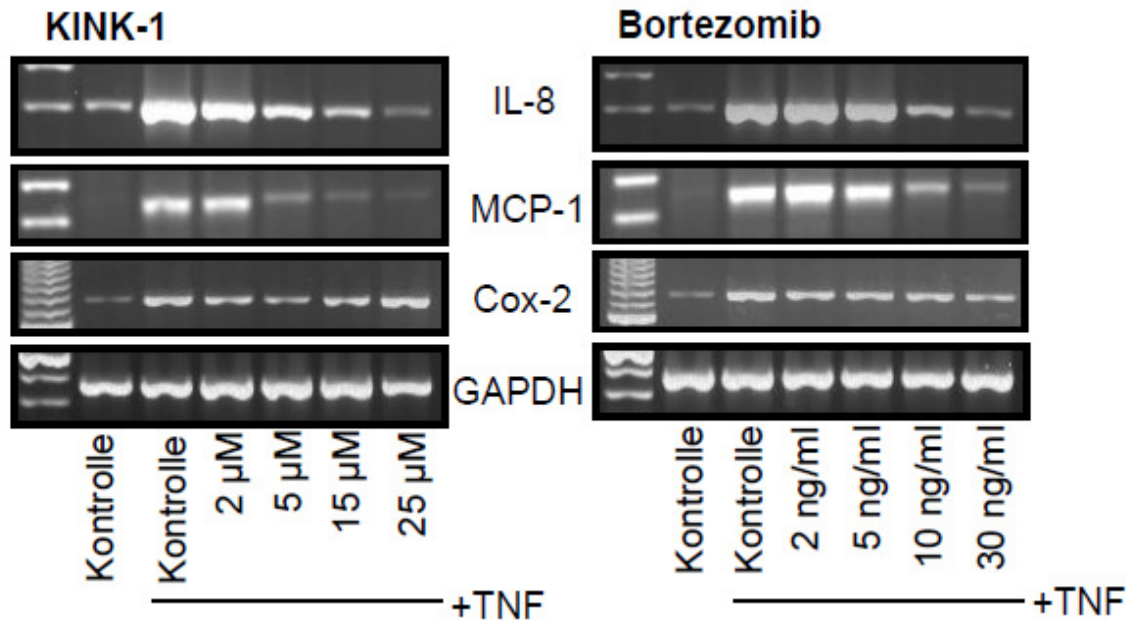


Abb.8: RT-PCR der mRNA Expression verschiedener Chemokine unter der Behandlung von KINK-1 und Bortezomib

Die RNA für diese Proben wurde wie beschrieben isoliert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem cDNA Synthesis Kit und die Gene IL-8 (CXCL8), MCP-1, Cox-2 und GAPDH als („housekeeping“-Gen), dessen Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen weitgehend konstant blieb, wurden amplifiziert.

3.3.3 Zellzyklusanalyse unter KINK-1 und Bortezomib

Die Veränderung der Expression der Proteine Cyclin D1 und p53 nach Inkubation mit den beiden NF- κ B-Inhibitoren führte zur Idee, den Zellzyklus zu analysieren, da beide Proteine an dessen Regulation beteiligt sind: Nach einer zweimaligen Behandlung mit Thymidin, welches die Zellen hinsichtlich ihrer Zyklusphasen synchronisiert und initial einen G1/S-Arrest bewirkt, wurden A 375-Melanomzellen mit Bortezomib in den Konzentrationen 5 ng/ml oder 10 ng/ml und KINK-1 in den Konzentrationen 5 μ M oder 15 μ M jeweils für 4 oder 12 Stunden behandelt. Die Analyse nach 4 Stunden zeigte, dass die Zellen, unabhängig von der Behandlung, noch überwiegend in der G1/S-Phase waren; es hatte noch kein deutlicher Anteil der Zellen die nächste Zellzyklus-Phase erreichen können. Nach 12 Stunden hingegen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen KINK-1 und Bortezomib festgestellt werden: Während unter KINK-1-Behandlung bei einer Konzentration von 5 μ M 33 % der Zellen in

der G2/M Phase waren, wurden in der höheren Konzentration von 15 μ M 56 % der Zellen in G2/M arretiert. Es fand also ein konzentrationsabhängiger G2/M-Zellarrest statt. Dagegen war die Behandlung mit 5 ng/ml Bortezomib bereits so effektiv, dass 85 % der Zellen in G2/M arretierten; dies konnte dann auch durch die höhere Bortezomib-Konzentration von 10 ng/ml nur noch auf 89 % verstärkt werden (Abb.9).

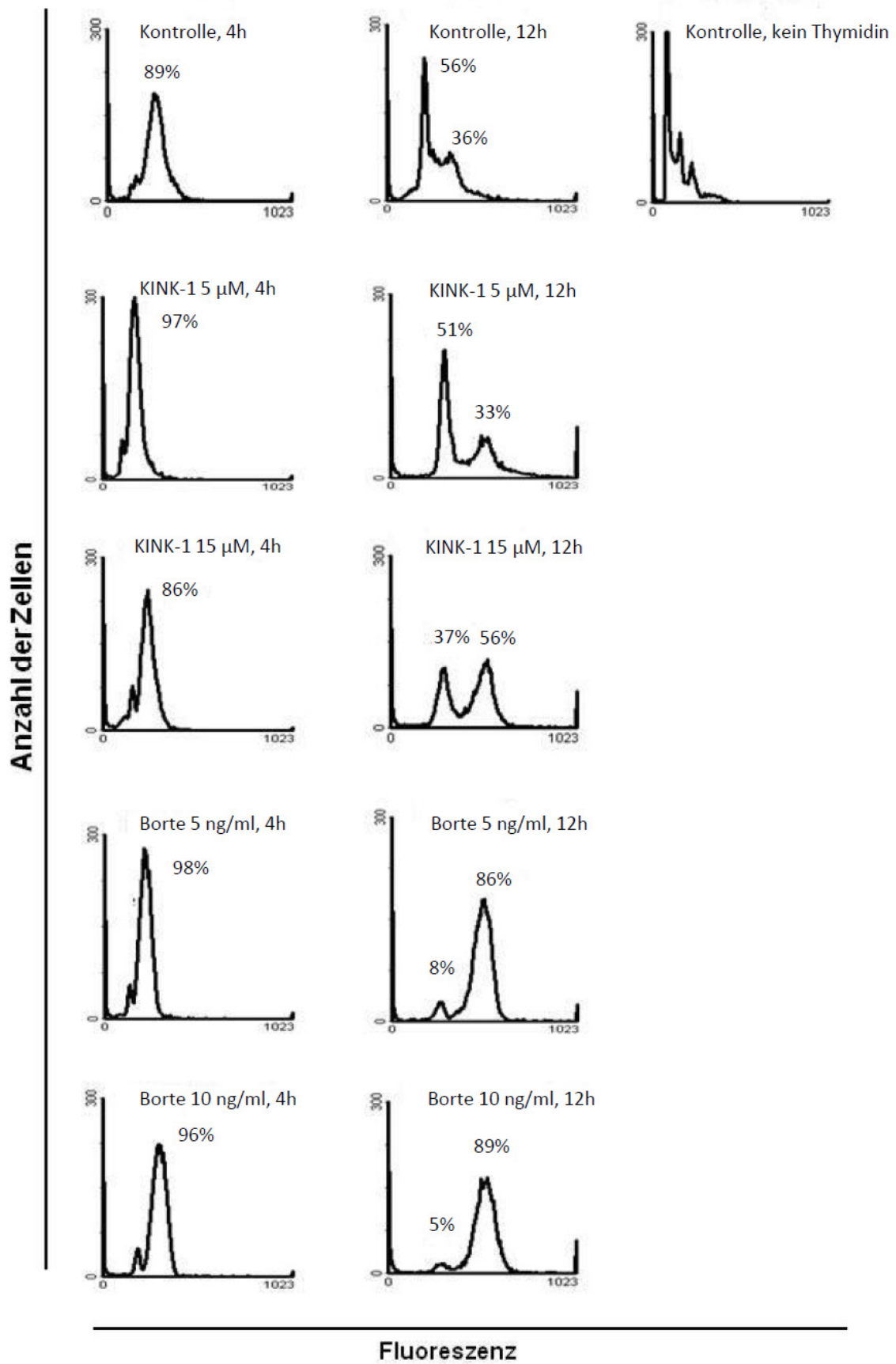


Abb.9: Einfluss von KINK-1 und Bortezomib auf den Zellzyklus

Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zeigt den Anteil von A375-Melanomzellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (linker Gipfel stellt G1 dar; rechter Gipfel stellt G2 dar); die Analyse erfolgte mittels CellQuest Software. Zunächst wurden die Zellen durch zweimalige Behandlung mit Thymidin (2 mM) im Abstand von 12 Stunden synchronisiert und dann erfolgte die Behandlung mit KINK-1 (5 μ M oder 15 μ M) sowie mit Bortezomib (5 ng/ml oder 10 ng/ml) für jeweils 4 oder 12 Stunden. Um den regulären Zellzyklus zu sehen, wurde eine Probe nicht synchronisiert. Die jeweiligen Prozentsätze der verschiedenen Phasen sind angegeben.

3.4 Kombination von NF- κ B-Inhibition und Zytostatika

3.4.1 Auswirkung der Kombination auf NF- κ B-regulierte Proteine

In einem nächsten Schritt wurden die beiden NF- κ B-Inhibitoren KINK-1 und Bortezomib zum Einen mit Camptothecin als experimentellem Zytostatikum und zum Andern mit Doxorubicin kombiniert, um synergistische Effekte durch diese Kombinationen offen zu legen. Hierfür wurden A375-Melanomzellen mit 5 ng/ml Bortezomib, 5 μ M KINK-1, 0,1 μ M Doxorubicin oder 0,03 μ M Camptothecin und den Kombinationen aus Inhibitor und den beiden Zytostatika in den genannten Konzentrationen behandelt. Die aus diesen Proben isolierte RNA wurde für Realtime-PCR-Analysen der Chemokine CXCL-1 und CXCL8 verwendet. Hierbei konnte ein deutlicher Unterschied in der Wirkung der beiden NF- κ B-Inhibitoren KINK-1 und Bortezomib festgestellt werden: Während KINK-1 die Expression der durch Camptothecin induzierten Chemokine CXCL1 und CXCL8 wieder inhibieren konnte, zeigte Bortezomib diese Zytokin-Hemmung nicht: Vor allem bei CXCL8 war dieser Unterschied zwischen KINK-1 und Bortezomib deutlich; bei CXCL1, welches insgesamt ein schwächeres Signal aufwies, war der Unterschied nicht ganz so ausgeprägt. Die Kombination mit Doxorubicin zeigte ein ähnliches Bild: Zwar wurde durch Doxorubicin weder IL-8 noch CXCL1 induziert, dagegen senkte die Kombination aus KINK-1 und Doxorubicin das Signal sogar unter den Wert der Kontrolle. Bei den Kombinationen aus Doxorubicin und Bortezomib wurde deutlich, dass Bortezomib eine stärkere Induktion sowohl von CXCL1 als auch von CXCL8 bewirkte als Doxorubicin: Die Expression beider Chemokine war unter Bortezomib-Behandlung höher als unter Doxorubicin-Behandlung (Abb.10).

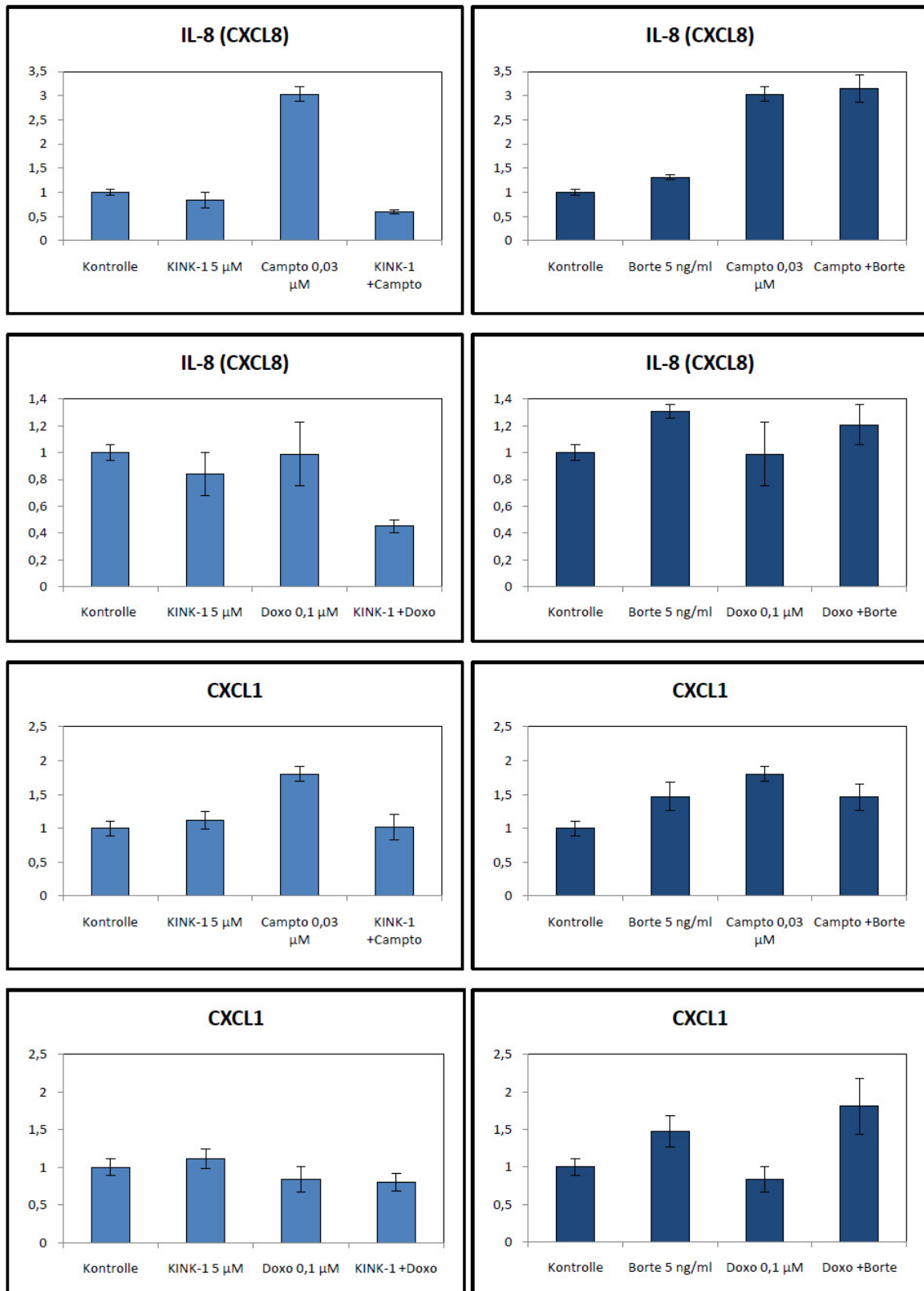


Abb.10: Quantitative „Realtime“ PCR zeigt die Regulation NF- κ B-abhangiger Proteine unter der Behandlung von KINK-1 und Bortezomib in Kombination mit den Zytostatika Doxorubicin und Camptothecin

A375-Melanomzellen wurden kultiviert in normalem Medium oder in Medium, das 5 ng/ml Bortezomib, 5 μ M KINK-1, 0,03 μ M Camptothecin, 0,1 μ M

Doxorubicin oder die jeweiligen Kombinationen aus Zytostatika und NF- κ B-Inhibitoren erhielt, für 18 Stunden inkubiert. Mit aus diesen Proben gewonnener RNA wurden mittels Quantitativer „Realtime“ PCR die Gene Gro α (CXCL1) und IL-8 (CXCL8) amplifiziert. Die angegebenen Werte ergeben sich aus dem Durchschnitt von drei verschiedenen Einzelmessungen (Triplets); die Standardabweichungen sind angegeben. Es zeigen sich unterschiedliche synergistische Effekte zwischen KINK-1 und Bortezomib mit den Zytostatika.

Auch die Analyse mittels RT-PCR konnte einerseits diese unterschiedliche Wirkungsweise von KINK-1 und Bortezomib für CXCL8 bestätigen und andererseits auch auf das Chemokin MCP-1 ausweiten: Die Expression von MCP-1 wurde durch die Kombination von Camptothecin und KINK-1 ebenso deutlich gesenkt, während die Kombination von Camptothecin mit Bortezomib zu keiner verringerten MCP-1-Expression führte (Abb.11).

Ergänzend wurden mit dieser Methode noch die Expression der cdk-Inhibitor p21 und Cox-2 untersucht. Camptothecin und Doxorubicin bewirkten, wie für Zytostatika zu erwarten war, erhöhte Expression von p21; doch weder die Zugabe von KINK-1 noch von Bortezomib verstärkte diese Wirkung. Auch das die Invasion fördernde Cox-2 wurde durch Camptothecin und Doxorubicin induziert; in Kombination mit Camptothecin verringerte weder KINK-1 noch Bortezomib diese Induktion, dagegen schien die Kombination aus Doxorubicin und Bortezomib eine Reduktion zu bewirken. Beta-Catenin, ein Protein, welches am Wnt/beta-Catenin Signalweg beteiligt ist und dabei durch Translokation in den Kern die Transkription tumorprogressionsfördernder Proteine mitreguliert (Shah et al., 2008), zeigte kaum Veränderungen (Abb.11).

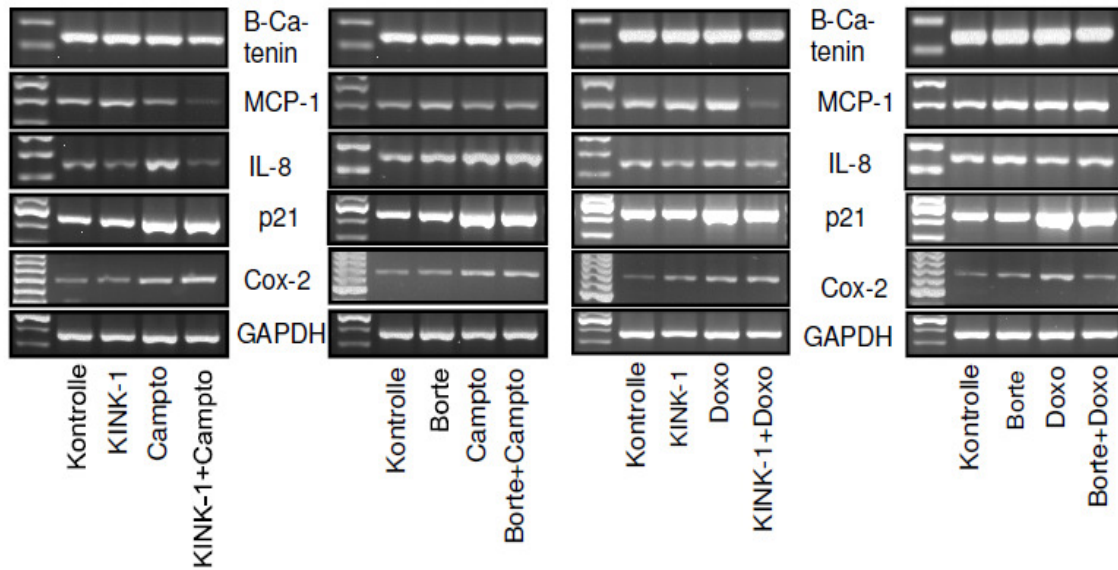


Abb.11: RT-PCR zeigt die Regulation NF- κ B abhängiger Proteine unter der Behandlung von KINK-1 und Bortezomib in Kombination mit den Zytostatika Doxorubicin und Camptothecin

Die Proben wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben gewonnen und die Gene Beta-Catenin, MCP-1, IL-8, p21, Cox-2 sowie GAPDH (als „housekeeping“-Gen) mittels RT-PCR amplifiziert. Es zeigen sich unterschiedliche synergistische Effekte zwischen KINK-1 und Bortezomib mit den Zytostatika.

3.4.2 Verstärkung der durch Zytostatika induzierten Apoptose

Wie bereits beschrieben, besteht die Wirkung von Zytostatika gegen Tumorzellen vor allem in der Induktion der Apoptose. Durch Kombination mit einem NF- κ B-Inhibitor soll diese Induktion verstärkt werden, da die durch NF- κ B bewirkte Hochregulation antiapoptotischer Proteine auf diese Weise verhindert werden kann. In einer Serie von Apoptose-Experimenten sind vier verschiedene Zytostatika, nämlich Camptothecin, Doxorubicin, Temozolomid und Dacarbazin (DTIC) in Kombination mit KINK-1 und Bortezomib untersucht worden. Dazu wurde die DNA-Fragmentierung mit Hilfe eines ELISA gemessen – hier allerdings kann nur ein Teil dieser Experimente gezeigt werden.

Zwar bewirkten weder KINK-1 noch Bortezomib deutliche Veränderungen ausgewählter Apoptose-relevanter Proteine, (vgl. Abb.6), die Kombination von 5 μ M KINK-1 und 5 ng/ml Bortezomib mit 0,03 μ M Camptothecin führte jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu Camptothecin

allein (Abb.12, Bild 1,2). Im Gegensatz dazu konnte die Apoptoserate von Camptothecin in einer Konzentration von 0,1 μM nicht verstärkt werden, da diese selbst schon im maximal Erreichbaren lag (Abb.12, Bild1, 2).

Die Apoptoseinduktion durch Doxorubicin, ein Zytostatikum, welches wie auch Camptothecin NF- κB induziert (Das und White, 1997), konnte ebenso durch Zugabe von KINK-1 oder Bortezomib in den genannten Konzentrationen verstärkt werden. Vor allem bei Verwendung der geringen Dosis von 0,1 μM Doxorubicin und KINK-1 zeigte sich ein hochsignifikanter, synergistischer Effekt (Abb.12, Bild 3).

Schließlich sind diese Versuche auch mit den alkylierenden Zytostatika Dacarbazin und Temozolomid durchgeführt worden, von denen aufgrund ihres Wirkungsmechanismus bekannt ist, dass sie mehr Zeit brauchen, um zu wirken. Deswegen wurden hierfür die Proben zusammen mit den NF- κB Inhibitoren für 48 Stunden inkubiert, wobei für diese längere Zeit die Konzentration des toxischeren Bortezomib auf 2 ng/ml angepasst wurde. Gezeigt ist hier zum Einen die Kombination aus DTIC und KINK-1, bei der die Zugabe von 5 μM KINK-1 zu 50 μM und 100 μM DTIC die Apoptoserate signifikant erhöhte (Abb.12, Bild 5). Zum Anderen zeigte die Kombination aus Bortezomib und Temozolomid ebenso eine sehr starke Verstärkung der Apoptose – allerdings erst bei der höheren Temozolomid-Dosis von 200 μM (Abb.12, Bild 6).

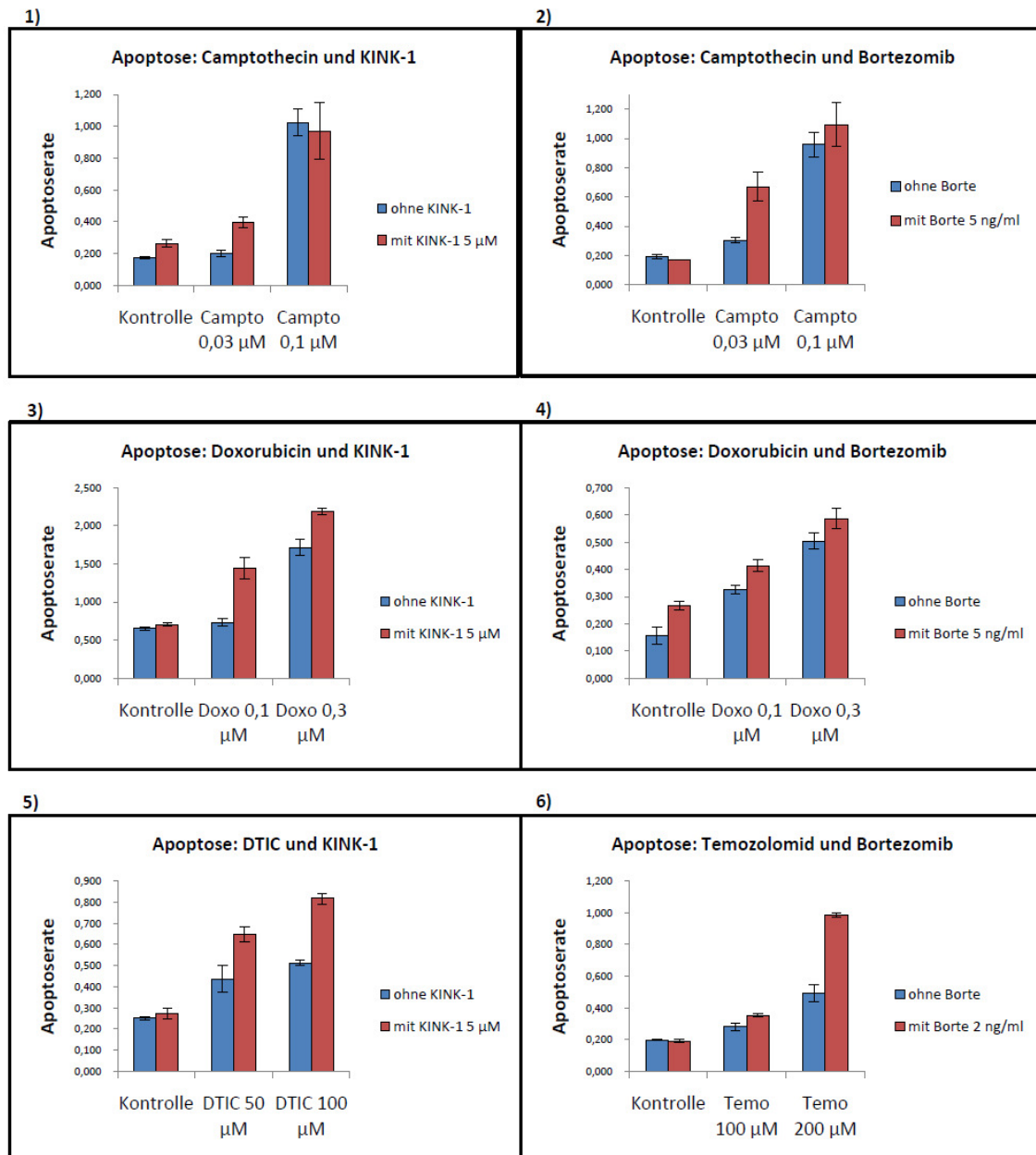


Abb.12: Verstärkung der durch die Zytostatika Camptothecin, Doxorubicin, Dacarbazin und Temozolomid induzierten Apoptose durch KINK-1 und Bortezomib

Bilder 1-4: A375-Melanomzellen wurden mit 5 ng/ml Bortezomib, 5 µM KINK-1, 0,03 µM oder 0,1 µM Camptothecin sowie 0,1 µM oder 0,3 µM Doxorubicin beziehungsweise den Kombinationen aus Zytostatika und NF-κB Inhibitor für 18 Stunden in 6-well Zellkulturplatten behandelt. Bilder 5-6: A-375 Melanomzellen wurden mit 2 ng/ml Bortezomib, 5 µM KINK-1, 50 µM sowie 100 µM Dacarbazin und 100 µM sowie 200 µM Temozolomid für 48 Stunden in 6-well Zellkulturplatten behandelt. Die Apoptoserate jeder Behandlungsform wurde mit dem CellDeath Detection ELISA Kit von Roche detektiert. Die Kombinationen zeigten eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate.

Um den molekularen Mechanismus dieser verstärkten Apoptoseinduktion aufzudecken, wurden von A375-Melanomzellen, die mit den genannten Konzentrationen und Substanzen für 18 Stunden behandelt worden waren, mitochondriale, zytosolische und Ganzzelllysate angefertigt. Untersucht wurden das Bax/Bcl-2 Verhältnis und NOXA als Indikatoren für die mitochondriale Integrität sowie Cytochrom C, das nach Porenbildung im Mitochondrium ins Zytosol gelangt und dort die Aktivierung von Caspase 9 bewirkt. Zusätzlich ist für jede Fraktion β -Actin als Ladekontrolle detektiert worden. Wie schon unter Monobehandlung mit den beiden NF- κ B-Inhibitoren zeigte sich auch nach Kombination mit Camptothecin keine Veränderung im Bax/Bcl-2 Verhältnis. Cytochrom C wurde vor allem nach Camptothecin-Behandlung freigesetzt. Es konnte jedoch klar festgestellt werden, dass die Expression des proapoptotisch wirkenden Proteins NOXA durch gleichzeitige Behandlung mit Camptothecin und Bortezomib synergistisch induziert wurde (Abb.13).

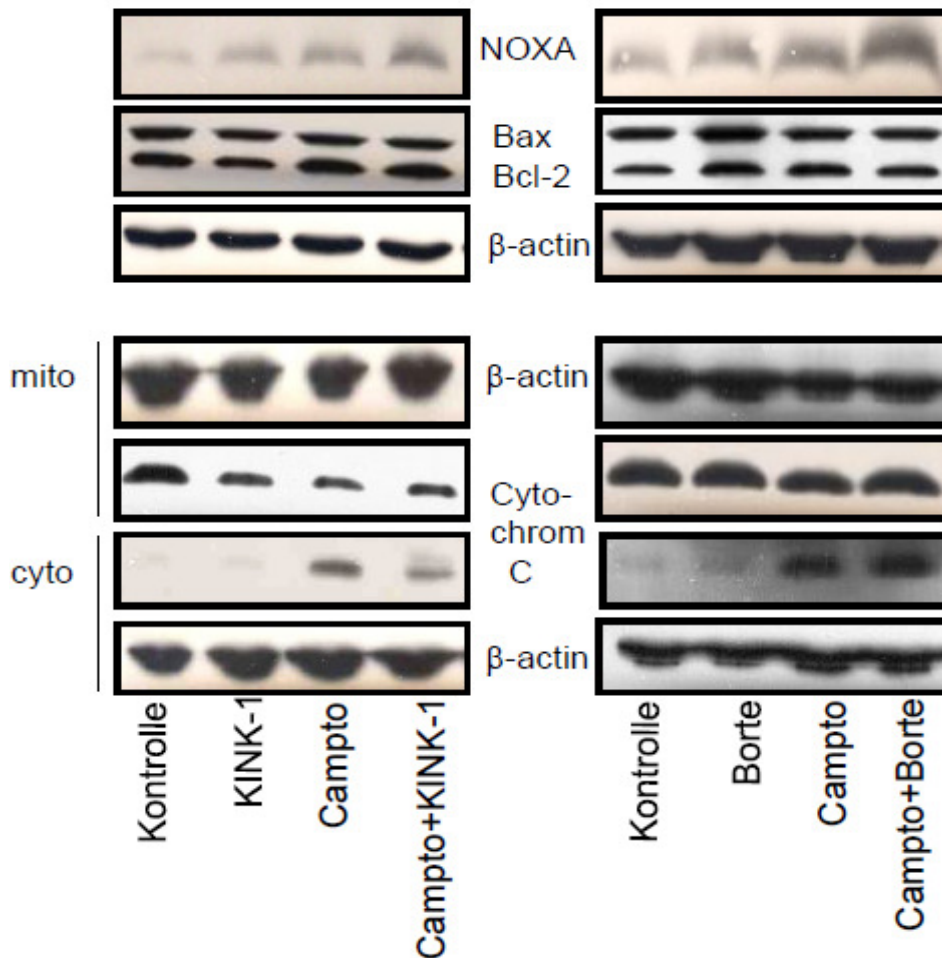


Abb.13: Apoptose-regulierende Proteine unter Behandlung von Camptothecin und NF- κ B-Inhibitoren

A375-Melanomzellen wurden mit 5 ng/ml Bortezomib, 5 μ M KINK-1 sowie 0,03 μ M Camptothecin und den angegebenen Kombinationen für 18 Stunden behandelt. Es wurden mitochondriale und zytosolische Lysate für die Detektion der Cytochrom C-Freisetzung hergestellt sowie Ganzzelllyse für die Detektion von Proteinen der mitochondrialen Integrität (Bax, Bcl-2, NOXA).

3.4.3 Verstärkung der Zytostatika-induzierten Invasionshemmung

Ein wichtiger Schritt der Tumorzellen zum Erreichen der Metastasierungsfähigkeit ist die Fähigkeit zur Durchbrechung einer Basalmembran. Hierzu benötigen Tumorzellen verschiedene Proteinase, wie Matrixmetalloproteinase und andere Enzyme wie Cox-2. Diese Proteine werden teilweise durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert. Um den Einfluss der NF- κ B-Inhibition auf die Invasion zu untersuchen, wurde auf ein experimentelles Invasionssystem zurückgegriffen: Dieses besteht aus einer 24 well-Platte, deren innere Einsätze durch eine Membran mit Poren der Größe 8

μm von den äußeren Gefäßen, in welche erstere hineingesetzt werden, getrennt sind. Zusätzlich ist diese Membran mit einer artifiziellen Basalmembran überzogen – Zellen die also von den Einsätzen in die äußeren Gefäße wandern können, sind zur Invasion befähigte Zellen. Die Behandlung der Zellen mit Camptothecin, Doxorubicin, KINK-1, Bortezomib und den jeweiligen Kombinationen im Vergleich erfolgte über einen Zeitraum von 22 Stunden, jeweils in doppelten experimentellen Ansätzen. Nach der Inkubationszeit wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen mit dem inversen Mikroskop beurteilt und Fotos von der Unterseite der Membranen gemacht, an welcher die invadierten, angefärbten Melanomzellen nachweisbar waren. Dabei zeigte sich, dass die unbehandelten Kontrollzellen und Zellen, die mit 5 ng/ml Bortezomib behandelt worden waren, in hohem Maße zur Invasion befähigt waren. Unter der Behandlung von KINK-1 invadierten etwas weniger Zellen und die beiden Zytostatika Camptothecin und Doxorubicin bewirkten eine deutliche Hemmung der Invasion (Abb.14). Bei der Zugabe der NF- κ B-Inhibitoren zu den Zytostatika wurde die Invasionsfähigkeit allerdings noch deutlich stärker unterdrückt (Abb.14).

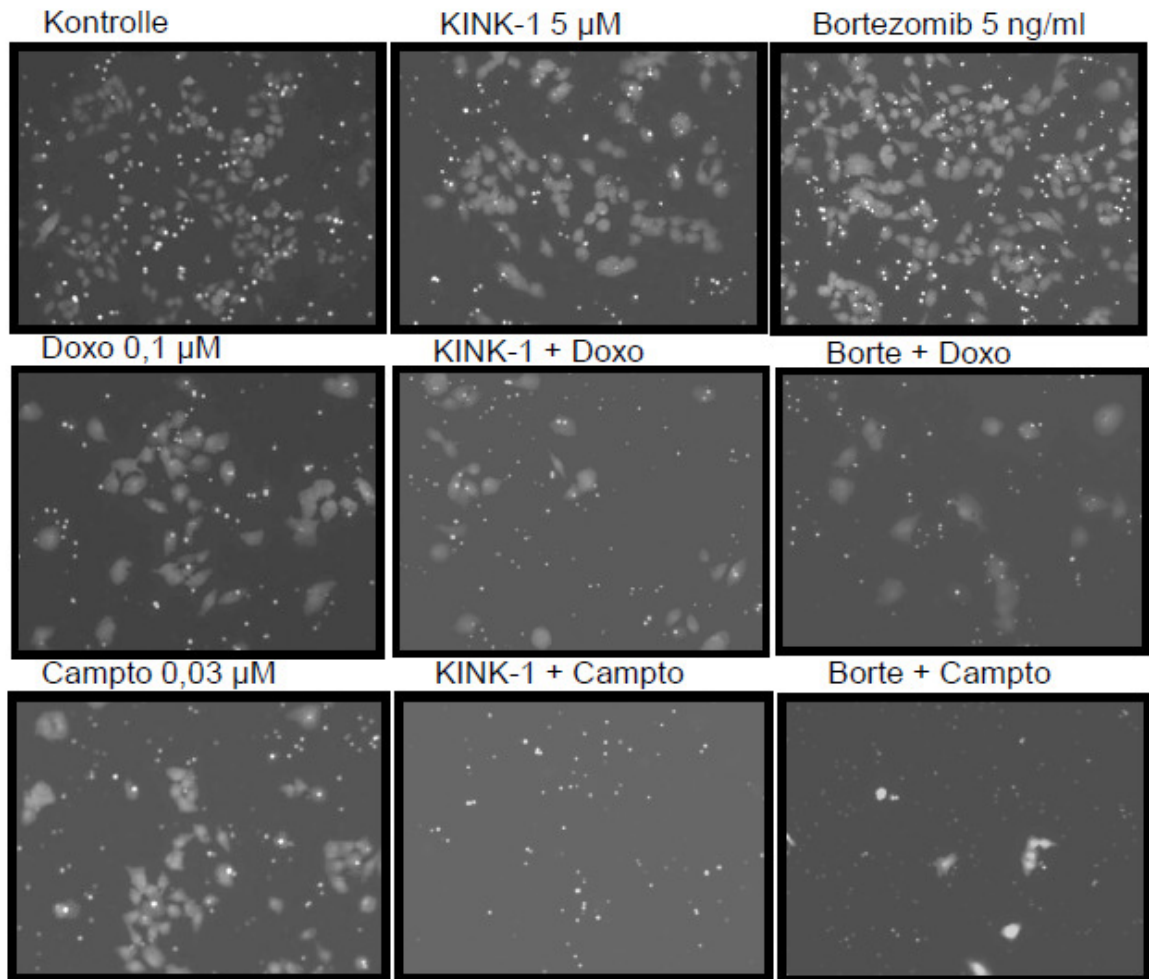


Abb.14: Verstärkung der Invasionshemmung von Camptothecin und Doxorubicin durch KINK-1 und Bortezomib

A375-Melanomzellen wurden in Gefäße mit einer künstlichen Basalmembran gegeben (BD BioCoat Tumor Invasion System) und hatten 22 Stunden Zeit, diese zu passieren. Währenddessen wurden sie mit 5 ng/ml Bortezomib, 5 µM KINK-1, 0,03 µM Camptothecin, 0,1 µM Doxorubicin oder den angegebenen Kombinationen inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten, invadierten Zellen mit einem inversen Mikroskop beurteilt.

3.5 Verstärkung der antitumoralen Wirkung von Camptothecin *in vivo*

Um die beobachteten synergistischen antitumoralen Effekte von Zytostatika und NF-κB-Inhibitoren auch *in vivo* untersuchen zu können, wurde ein Maus-Modell zur experimentellen pulmonalen Metastasierung angewandt. Hierfür wurden B16F10-Melanomzellen in die Schwanzvenen von C57BL6-Mäusen injiziert und am nächsten Tag mit der intraperitonealen Verabreichung der jeweiligen Substanzen begonnen. Folglich hatten die Zellen vor Beginn der Therapie

genügend Zeit, über die Blutzirkulation die Lunge zu erreichen und sich dort abzusiedeln. Am 17.Tag erfolgte die Auswertung, wobei die Mäuse getötet und gewogen wurden, anschließend die Lungen entnommen und ebenfalls gewogen wurden sowie die Anzahl der Metastasen auf der Lungenoberfläche mit einer Lupe bestimmt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Lungen der Kontrollmäuse sowie der Mäuse, die Bortezomib und KINK-1 allein erhalten hatten, zahlreiche und große Metastasen aufwiesen (Abb.15). Die Lungen von Mäusen, die mit Camptothecin allein behandelt worden waren, enthielten die gleiche Anzahl an Metastasen; diese Metastasen waren jedoch deutlich kleiner als die der Kontrollmäuse. Nach kombinatorischer Behandlung mit Camptothecin und KINK-1 beziehungsweise Bortezomib jedoch waren wesentlich weniger Metastasen makroskopisch nachweisbar (Abb.15). Die genauere Untersuchung der Lungen mit der Lupe zeigte jedoch, dass auch nach der kombinierten Behandlung mit Zytostatikum und NF- κ B-Inhibitor eine mit der Kontrolle vergleichbare Anzahl an Metastasen zu finden war. Diese waren jedoch um ein Vielfaches kleiner als in den Kontrollen; ihr Wachstum wurde also durch diese Behandlung deutlich reduziert. Die gleiche Anzahl der Metastasen kommt also durch die primäre Absiedlung der Tumorzellen zu Beginn der Experimente zustande, woraufhin sich die unterschiedlichen Behandlungen vor allem auf das Wachstum und die Endgröße der Metastasen auswirkten. Vor allem die Auswertung des Lungengewichts - ein hilfreicher Parameter für den Befall der Lungen durch das Gewicht der Metastasen - zeigte eine signifikante Inhibition des Metastasenwachstums bei kombinatorischer Behandlung im Vergleich zu Lungen von Mäusen, die mit Camptothecin allein behandelt worden waren (Abb.16). Schließlich wurde mit Hilfe der Fotos, die von allen Lungen gemacht worden waren, der prozentuale Anteil der Fläche, die von Metastasen bedeckt war, zur Gesamtfläche der Lunge mit Hilfe einer Auswerte-Software (PhotoShop) morphometrisch objektiv bestimmt. Auch durch diese alternative, quantitative Auswertung ließen sich die genannten Ergebnisse bestätigen (Abb.17).

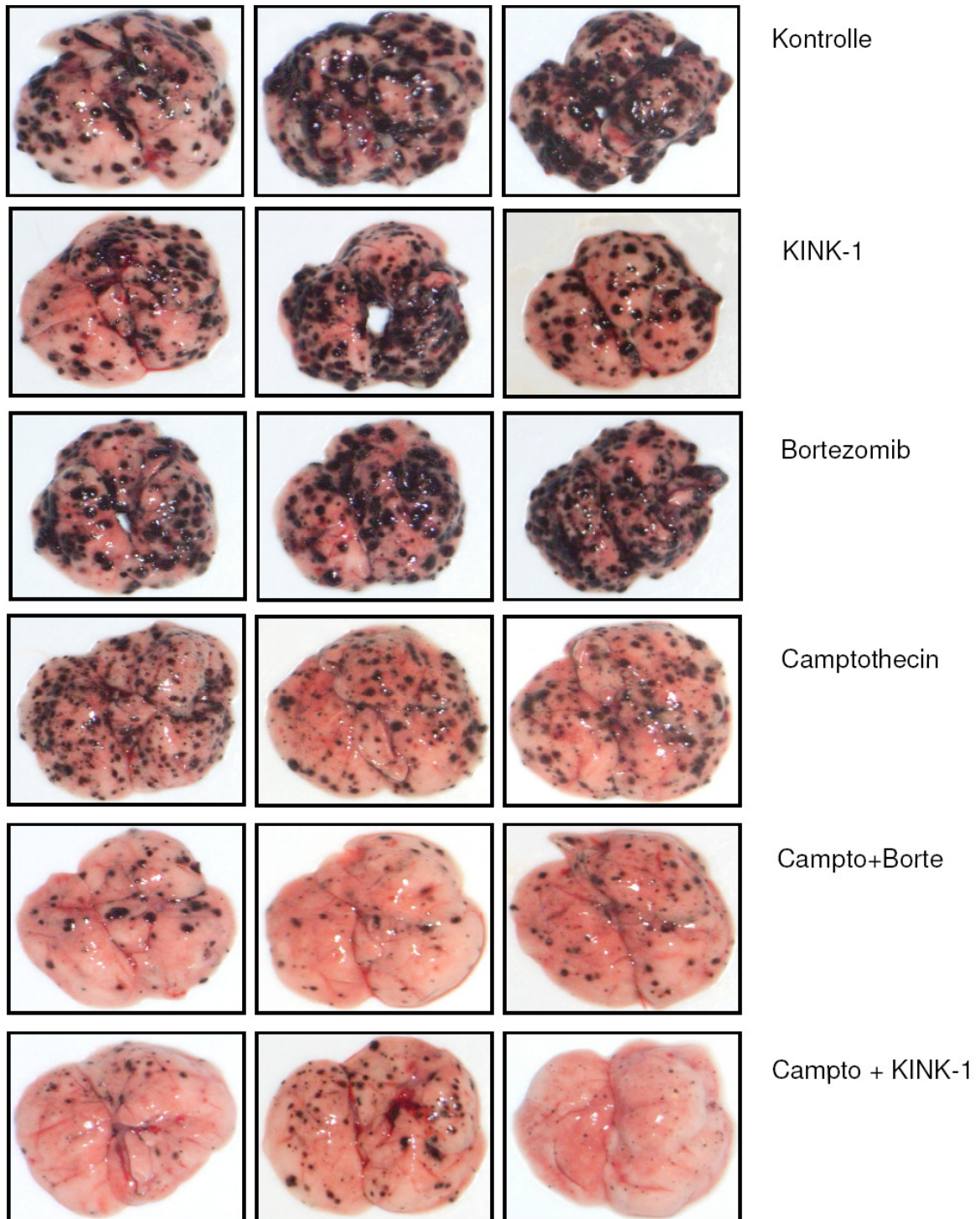


Abb.15: Camptothecin in Kombination mit KINK-1 oder Bortezomib hemmt das Metastasenwachstum *in vivo*

Dargestellt sind die Lungen mit Metastasen von C57BL6-Mäusen, welchen intravenös 2×10^5 B16F10-Melanomzellen injiziert worden waren und die mit KINK-1, Bortezomib, Camptothecin oder den Kombinationen aus Zytostatikum und NF- κ B-Inhibitor intraperitoneal behandelt wurden. Die Kombinationen konnten den Effekt des Zytostatikums deutlich verstärken.

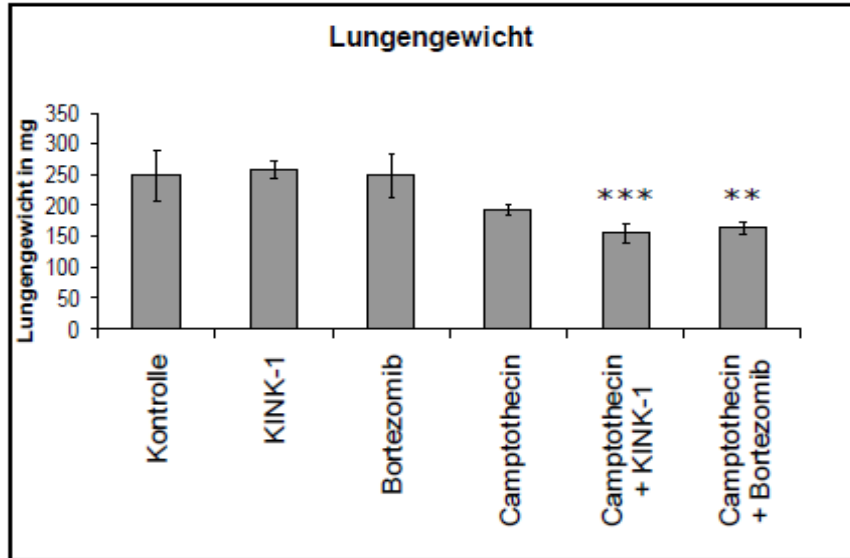


Abb.16: Vergleich des Lungengewichts als Maß für die pulmonale Tumormasse

Der Vergleich des durchschnittlichen Lungengewichts jeder Gruppe (6 Mäuse) ergab eine signifikante Reduktion des Lungengewichts und damit der Tumormasse bei der kombinatorischen Behandlung im Vergleich zu Camptothecin allein. *** bedeutet $P < 0,001$ und ** bedeutet $P < 0,01$.

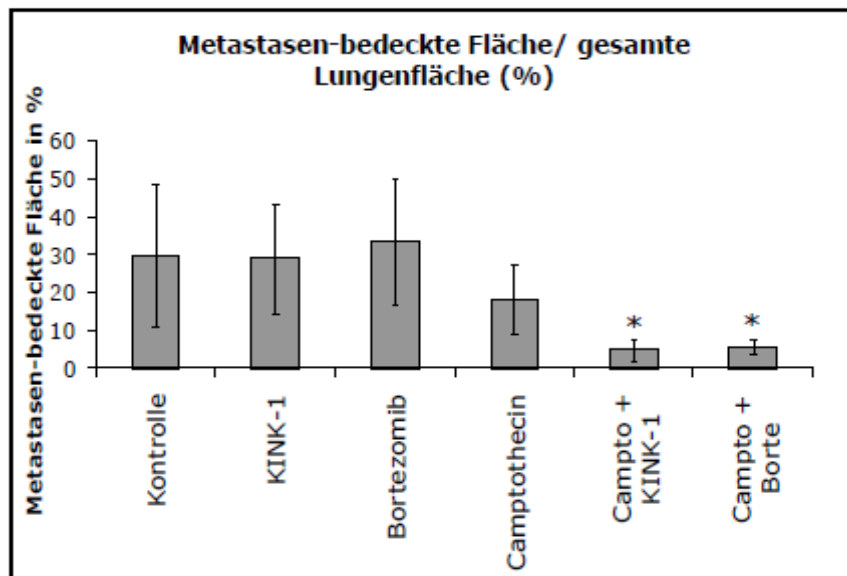


Abb.17: Vergleich des prozentualen Anteils an Lungenmetastasen (schwarze Fläche) in Relation zur gesamten Lungenfläche

Jede fotografierte Lunge wurde mittels Photoshop ausgewertet und der prozentuale Anteil der mit Metastasen bedeckten Fläche zur Gesamtfläche der Lunge ermittelt. Anschließend wurden Durchschnittswerte und Standardabweichungen ermittelt (* bedeutet $P < 0,05$). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion bei den kombinatorischen Behandlungen im Vergleich zu Camptothecin allein.

4. Diskussion

Das maligne Melanom zeichnet sich im Besonderen durch Chemoresistenz aus, was die schlechte Prognose im Stadium der Fernmetastasierung begründet. Vor allem die Aktivierung von Signalkaskaden, die die Inhibition der extrinsischen und intrinsischen Apoptose bewirken, wird hierfür verantwortlich gemacht (Grossman und Altieri, 2001; Soengas und Lowe, 2003). Dagegen wird die Bedeutung anderer Strategien der Chemoresistenz, wie DNA-Reparaturmechanismen und membranständige Pumpen zum Transport von Zytostatika aus den Zellen, kontrovers diskutiert (Soengas und Lowe, 2003).

Zu den zentralen zellulären Signalwegen, denen Bedeutung für die Chemoresistenz von Tumorzellen beigemessen wird, gehört die Aktivierung von NF- κ B, die ein Grund für die konstitutive und auch durch Zytostatika induzierte Chemoresistenz sein kann: Dieser Transkriptionsfaktor reguliert Proteine, darunter Zytokine und Chemokine, welche verstärkte Proliferation, Invasionsfähigkeit und Apoptoseresistenz und somit auch Malignität des Tumors fördern können (Baldwin, 2001; Karin et al., 2002; Kim et al., 2006).

In dieser Arbeit kann die genannte Theorie in verschiedenen Experimenten *in vitro* und in einem *in vivo*-Experiment mit den hier verwendeten Substanzen bestätigt werden: Sowohl KINK-1 als auch Bortezomib bewirkten eine effektive Hemmung von NF- κ B, sowie verschiedene weitere molekulare Veränderungen in Melanomzellen. Mit diesen neuen Eigenschaften waren die Tumorzellen für die Zytostatika angreifbar und die Apoptose konnte verstärkt, die Invasion gehemmt und die Metastasierung reduziert werden.

Die für die Endaussage wichtigen Experimente sind mit dem experimentellen Zytostatikum Camptothecin durchgeführt worden. Camptothecin induziert selbst die Aktivierung von NF- κ B, was mehrfach beschrieben wurde (Piret und Piette, 1996; Wang et al., 1999; Huang et al., 2000) und hier durch die starke Induktion von IL-8, welches durch NF- κ B reguliert wird (Mukaida et al., 1994), bestätigt wurde. Zudem ist die Wirksamkeit von Camptothecin in Mausmodellen bereits demonstriert worden (Liu, 1989; Dora et al., 2006).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt im Vergleich zweier NF- κ B Inhibitoren mit verschiedenen Wirkmechanismen. Dabei ist der Proteasominhibitor Bortezomib

eine klinisch etablierte Substanz, die bereits zur Therapie des Malignen Lymphoms und des Mantelzelllymphoms zugelassen ist (Amiri et al., 2004; Ludwig et al., 2005; Orłowski und Kuhn, 2008). Der IKK β -Kinase Inhibitor KINK-1 dagegen ist erst kürzlich durch seinen Effekt in Kombination mit Doxorubicin in präklinischen Studien bekannt geworden (Schön et al., 2008) und wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal mit Camptothecin kombiniert.

Nach einem Modell von *Nakanashi* und *Toi* kann man drei verschiedene Ursachen finden, die zu einer konstitutiven NF- κ B-Aktivität in Krebszellen führen: Erstens Mutationen in den Genen für NF- κ B und den Inhibitor I κ B, zweitens eine konstitutive Aktivierung des IKK-Komplexes und drittens eine ständige Inaktivierung von I κ B, beispielsweise durch eine verstärkte Proteasomaktivität (Nakanishi und Toi, 2005). Daraus folgt, dass je nach Tumorzelle der eine oder andere Ansatz der NF- κ B-Inhibition effektiver sein kann, wie folgende Beispiele zeigen: Nach *Shumway* und *Miyamoto* kann die konstitutive NF- κ B-Aktivität in einer bestimmten B-Zelllinie nicht durch Proteasominhibitoren gemindert werden. Eine Sequenz im Inhibitorprotein I κ B führt hier wohl zu dessen Degradation unabhängig vom Proteasom (Shumway und Miyamoto, 2004). Während in letzterem Beispiel Bortezomib vermutlich keine starke Wirksamkeit als NF- κ B-Inhibitor gezeigt hätte, sprechen Studien von *Wu et al* eher für den Einsatz eines Proteasominhibitors: Diese zeigen, dass in Magenkarzinomzellen eine verstärkte Proteasomaktivität und ein erhöhter Ubiquitin-Level mit der NF- κ B-Aktivität korrelieren (Wu et al., 2008). Andererseits soll in Prostatakarzinomzellen eine verstärkte IKK-Aktivität für die konstitutive Aktivität von NF- κ B verantwortlich sein; hier wäre eventuell wiederum KINK-1 ein spezifischerer Therapieansatz (Gasparian et al., 2002). Diese Beispiele zeigen, dass sich in Abhängigkeit von den zugrunde liegenden Fehlregulationen in der Tumorzelle unterschiedliche Effekte unter Bortezomib oder KINK-1 ergeben könnten.

Folglich lässt der Vergleich zweier verschiedener NF- κ B -Inhibitoren im Umkehrschluss Rückschlüsse auf die jeweils aktivierten Proteine in dieser Signalkaskade der NF- κ B -Aktivierung im malignen Melanom zu. Somit liefert diese Arbeit auch einen Beitrag zur Entschlüsselung der Fehlregulationen im

malignen Melanom oder zumindest in manchen Melanomlinien, was wiederum als Basis für neue Therapieoptionen dienen kann.

4.1 Aktivität von NF- κ B und deren Auswirkung auf NF- κ B-regulierte Proteine

Die Beobachtung, dass viele Tumorzellen über konstitutiv aktiviertes NF- κ B verfügen, konnte für die hier ausgewählten acht Melanomzellen bestätigt werden; auch sie zeigten teilweise ein sehr starkes konstitutives Signal (Abb.2). Jedoch ist auffallend, wie unterschiedlich stark diese Signale waren. Schließlich wird die Effektivität aus der Kombination NF- κ B-Inhibitor und Zytostatikum unter anderem durch eine konstitutive, die Resistenz begründende NF- κ B-Aktivität, erklärt. Es kommt also die Frage auf, ob die Wirksamkeit dieser kombinatorischen Therapie von der konstitutiven NF- κ B-Aktivität, die ja klinisch bei jedem Melanom anders wäre, beeinflusst wird und somit unterschiedliche Erfolgsraten erzielt würden. In dieser Arbeit konnte diese Frage nicht weiter verfolgt werden, doch muss sie eventuell für spätere Studien berücksichtigt werden.

Die Stimulation dieser acht Melanomzellen durch TNF α , einem bekannten Induktor von NF- κ B (Manna et al., 2000) zeigte, dass bei einem großen Teil der Tumorzellen neben der konstitutiven Aktivität unter stimulierenden Einflüssen eine zusätzliche Verstärkung von NF- κ B möglich ist (Abb.2). Dies ist deshalb von Bedeutung, weil es gerade unter Chemotherapie zu diesem Vorgang kommen kann, was für verschiedene Zytostatika gezeigt werden konnte (Bian et al., 2001; Chuang et al., 2002; Li et al., 2005). Hierbei wurde für verschiedene Substanzen, wie Paclitaxel, aber auch Anthracycline und Alkaloide gezeigt, dass diese NF- κ B-Aktivierung mit einer Degradation von I κ B und Translokation des Heterodimers p65/p50 in den Kern einhergeht, wie es auch unter TNF α -Stimulation stattfindet (Das und White, 1997; Tergaonkar, 2006). Diese Induktion von NF- κ B während der Chemotherapie kann klinisch ein Grund für die Resistenzentwicklung der Tumorzellen sein.

Die Untersuchung der acht Melanomzelllinien auf NF- κ B-regulierte Proteine, wie Cyclin D1, c-myc, XIAP sowie Survivin machte deutlich, dass die

Proteinexpression dieser Proteine häufig nicht mit im Kern vorhandenem p65 korrelierte; nur für XIAP stimmte bei den meisten Melanomzelllinien die NF- κ B-Aktivität mit dessen Proteinexpression überein (Abb.2, Abb.4). Diese Beobachtung ist mit der Tatsache, dass diese Proteine von NF- κ B reguliert werden auf den ersten Blick schwer in Einklang zu bringen. Andererseits unterstreicht sie den komplizierten Vorgang von der Induktion durch NF- κ B bis zur Expression des Proteins: Posttranskriptionelle und posttranslationelle Modifikationen scheinen diese direkte Abhängigkeit der Proteine von NF- κ B zu verändern. Dies deckt sich mit Studien von *Hassa* und *Hottiger*, die besagen, dass für die Expression mancher NF- κ B-regulierter Proteine auch Kofaktoren notwendig sind, wie beispielsweise die Poly (ADP-Ribose) Polymerase - PARP (Hassa und Hottiger, 1999). Zum andern gibt es auch Hinweise darauf, dass die posttranslationelle Modifikation von dem aktivierenden p65 selbst dessen Fähigkeit, an bestimmte Promotoren zu binden, beeinflusst (Campbell und Perkins, 2004). Die Regulation NF- κ B-abhängiger Proteine hängt also auch von anderen Faktoren ab, was unter anderem erklären mag, warum sich in Abhängigkeit vom Zelltyp gegensätzliche Effekte wie Apoptoseförderung oder aber eine Reduktion der Apoptose andererseits unter NF- κ B-Inhibition ergeben können. In der Literatur findet man auch Daten, die die möglichen anti-onkogenen und proapoptotischen Mechanismen von NF- κ B beschreiben (Baldwin, 2001; Aggarwal, 2004; Perkins, 2004). Manche Genprodukte unterliegen darüber hinaus der Regulation durch weitere Transkriptionsfaktoren (direkt oder indirekt), deren Funktion hier nicht überprüft werden konnte.

4.2 Auswirkung von KINK-1 und Bortezomib auf NF- κ B-Aktivität, NF- κ B-regulierte Proteine und Zellzyklus

Sowohl für KINK-1 als auch für Bortezomib konnte gezeigt werden, dass eine konzentrationsabhängige Inhibition von TNF α -induzierter NF- κ B-Aktivität stattfindet (Abb.5). Ein gegenteiliger Effekt musste ausgeschlossen werden, denn zumindest für Bortezomib ist kürzlich beschrieben worden, dass Bortezomib in Endometriumkarzinomzellen NF- κ B induziert habe (Dolcet et al., 2006). Für diesen und die folgenden Versuche ist die Melanomzelllinie A375

ausgewählt worden – mit der Wahl einer Melanomlinie mit mittlerer NF- κ B-Aktivität sollte demonstriert werden, dass nicht notwendigerweise eine starke NF- κ B-Aktivität die Bedingung für einen messbaren Effekt ist.

Die Untersuchung einiger NF- κ B regulierter, apoptoserelevanter Proteine unter ansteigenden Konzentrationen von KINK-1 und Bortezomib zeigte Veränderungen in deren Expression (Abb.6). Ansteigende Konzentrationen von KINK-1 bewirkten zwar keine Veränderung des Bax/Bcl-2 Verhältnisses, aber eine leichte Reduktion von Cyclin D1. Dies stimmt mit Daten unseres Labors überein, in denen die Expression tumorrelevanter Proteine unter KINK-1-Behandlung untersucht wurde und sich für diese Proteine ein ähnliches Bild zeigte (Schön et al., 2008). Auch unter Bortezomib-Behandlung sind diese Proteine in verschiedenen Zelllinien untersucht worden: In Pankreaskarzinomzellen etwa wurde in einer groß angelegten Analyse der Genexpression mittels GeneChip-Array zwar das antiapoptotische Bcl-2 reduziert, allerdings änderte sich die Expression anderer Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie Bcl-xL und Bax nicht (Tang et al., 2008). Für Melanomzellen wurde festgestellt, dass trotz der Fähigkeit von Bortezomib, NF- κ B zu hemmen, antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL nicht beeinflusst wurden und Letzteres wurde auch für den mangelnden Therapieerfolg gegen diese Tumorzellen verantwortlich gemacht (Wolter et al., 2007). Die genannten Ergebnisse decken sich mit denen meiner Arbeit insofern, als dass auch hier unter Bortezomib und KINK-1 diese wichtigen Indikatoren der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran weitgehend konstant blieben. Allerdings ließen sich dennoch deutlich Effekte, beispielweise in der Reduktion der Apoptose, erreichen.

Auffallend in Abbildung 6 ist jedoch die starke Induktion von NOXA durch Bortezomib. Dieses proapoptotische BH3-only-Protein wurde schon von *Qin et al.* sowie *Fernandez et al.* als wichtigste Variable unter Bortezomibbehandlung in Melanomzellen identifiziert (Fernandez et al., 2005; Qin et al., 2005). Nach Studien von *Fernandez et al.* bewirkte Bortezomib keine Reduktion der NF- κ B-regulierten Proteine XIAP, Survivin, Bcl-2 und Bcl-xL, wohl aber eine Freisetzung von Cytochrom C durch die Induktion von NOXA (Fernandez et al.,

2005). Die Veränderung dieses einen Proteins scheint also für einen starken Effekt, nämlich die Aktivierung des mitochondrialen Weges der Apoptose, auszureichen. Auch in meiner Arbeit zeigte sich eine synergistische Wirkung von Camptothecin und Bortezomib im Sinne einer Freisetzung von NOXA sowie einer parallel verstärkten Freisetzung von Cytochrom C (Abb.13).

Anlass zur Diskussion bot in vielen Studien die Frage, ob die Induktion von NOXA von p53 abhängig sei (Kroemer und Reed, 2000; Perez-Galan et al., 2006). Auch hier spricht die parallele Erhöhung von p53 für einen solchen Zusammenhang. Nach *Nikiforov et al.* ist als Regulator für die Bortezomib-induzierte Erhöhung von NOXA aber die transkriptionelle Wirkung des Onkoproteins c-myc identifiziert worden und p53 wurde eine Wirkung als Cofaktor zugeschrieben (Nikiforov et al., 2007). Betrachtet man die unterschiedliche Expression von c-myc in den acht Melanomzellen (Abb.2), kommt so die Frage auf, ob zum Beispiel die Melanomzelle Lox mit sehr hoher c-myc Expression besonders für eine Bortezomibbehandlung aufgrund starker Induktion von NOXA geeignet wäre.

Andere NF- κ B-Inhibitoren, wie zum Beispiel Resveratrol bewirkten im Gegensatz zu Bortezomib auch in Melanomzellen eine deutliche Inhibition von Survivin oder Bcl-xL; allerdings wurde nachgewiesen, dass dieser NF- κ B-Inhibitor auch andere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel STAT3, hemmt (Ivanov et al., 2008).

Vor allem für hohe Konzentrationen von KINK-1 und Bortezomib galt, dass die moderate Veränderung tumorassoziierter Proteine in deutlichem Kontrast zu den funktionellen Effekten stand. So konnte beispielsweise für Bortezomib ab 10 ng/ml eine relativ hohe Apoptoserate detektiert werden. Dies spricht dafür, dass sich außer der Aktivierung von p53 und NOXA und der Abnahme von Cyclin D1 auch die Expression anderer regulativer Proteine ändert. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Auf Chemokin-Ebene zeigten die Daten meiner Arbeit eine enge Korrelation zwischen funktionellem Effekt auf zelluläre Funktionen und den Ergebnissen der verringerten Translokation von NF- κ B in den Gelshifts (Abb.5). Die Chemokine IL-8, Gro α und MCP-1, welche durch TNF α induziert wurden,

wurden deutlich durch KINK-1 und Bortezomib inhibiert (Abb.7, Abb.8). Wie in der Einleitung beschrieben, befördern diese Chemokine wichtige mit Malignität assoziierte Eigenschaften, wie verstärktes Wachstum, Invasion und Angiogenese.

Die starke Abhängigkeit von IL-8, CXCL1 und MCP-1 von im Kern vorhandenem p65 zeigt, dass diese Chemokine eindeutig unter der Regulation dieses Transkriptionsfaktors stehen. Dies scheint aber teilweise zelltypabhängig zu sein: Nach Studien von *Papageorgiou et al.* bewirkte Bortezomib in Urothelkarzinomzellen zwar eine Reduktion des die Angiogenese fördernden VEGF, aber andererseits eine verstärkte Expression des Chemokins IL-8 (Papageorgiou et al., 2006). Studien von *Nencioni et al.* hingegen zeigten, dass MCP-1, welches unter anderem der Chemoattraktion von Leukozyten dient, in dendritischen Zellen dieser Arbeit vergleichbare Veränderungen unter Bortezomib hatte: Die Induktion von MCP-1 durch LPS konnte durch Bortezomib verhindert werden (Nencioni et al., 2006).

Bei der Untersuchung NF- κ B-regulierter Proteine stachen vor allem NOXA, p53 und Cyclin D1 heraus: Unter Bortezomib-Behandlung ergaben sich deutliche Veränderungen der Expression dieser Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Abb.6). Diese Ergebnisse sind gut mit dem Vergleich von KINK-1 und Bortezomib in der Analyse des Zellzyklus vereinbar: Hier zeigte sich ebenso unter Bortezomib der stärkere Effekt, nämlich ein G2/M Arrest bei 5 ng/ml (Abb.9).

Ganz im Gegensatz zur Hemmung der NF- κ B-Aktivität und der Chemokine IL-8, MCP-1 und CXCL-1 unter der Behandlung mit KINK-1 oder Bortezomib, für die galt, dass KINK-1 hier in den verglichenen Konzentrationen deutlichere Effekte zeigte als Bortezomib, war dieses Bild beim Zellzyklus genau umgekehrt: Hier konnten 5 ng/ml Bortezomib einen fast kompletten Zellzyklusarrest erreichen, welcher in diesem Maße auch nicht von der höheren KINK-1-Konzentration (15 μ M) erreicht werden konnte. Dies stimmt mit Studien von *Fernandez et al.* überein, die ebenfalls einen G2/M-Arrest in Melanomzellen bei einer 24-stündigen Behandlung mit 50 nM Bortezomib zeigten (Fernandez et al., 2005). Für A375-Melanomzellen reichte allerdings ein Viertel der publizierten höheren

Konzentration aus: 50 nM entsprechen in etwa 20 ng/ml Bortezomib und in meiner Arbeit wurden 5 ng/ml verwendet. Auch in Tumorzellen des Glioblastoms konnte eine Inkubation von 12 Stunden einen zwei-fachen Anstieg der Zellen in der G2/M-Phase bewirken (Yin et al., 2005). Dies scheint also ein eher zellunabhängiger, genereller Wirkungsmechanismus von Bortezomib zu sein, der für die hier verwendete Melanomlinie bestätigt werden konnte. Diese Induktion des Zellzyklusarrestes ist so erklärbar, dass die physiologischerweise durch das Proteasom bewirkte Degradation regulativer Proteine des Zellzyklus nicht mehr stattfinden konnte (Orlowski und Kuhn, 2008).

Beim Vergleich beider NF- κ B-Inhibitoren lässt sich aus diesen Ergebnissen ein stärkerer Einfluss von Bortezomib auf die Reduktion der Proliferation im Vergleich zu KINK-1 herleiten. Auch in der Literatur finden sich hierzu Hinweise: *Hideshima et al.* verglichen in Lymphomzellen den Einfluss eines IKK-Inhibitors (PS-1145) und eines Proteasominhibitors (Bortezomib) auf die Proliferation und stellten dabei fest, dass obwohl beide in gleichem Maße effektiv NF- κ B inhibierten, PS-1145 eine 20-50%-Reduktion der Proliferation erreichte, wohingegen Bortezomib diese komplett unterdrückte (Hideshima et al., 2002).

4.3 KINK-1 und Bortezomib in Kombination mit Zytostatika

Durch die Kombination der beiden NF- κ B-Inhibitoren mit Zytostatika sollten mögliche synergistische Effekte herausgefunden werden. Hintergrund dieser Kombination ist zum Einen, die Resistenzbildung gegen Zytostatika durch Induktion von NF- κ B zu verringern, und zum Andern, vorhandene Resistenzen aufgrund konstitutiver NF- κ B-Aktivität zu überwinden. Zusätzlich bietet eine solche Kombination die Möglichkeit, die Dosis der toxischen Zytostatika zu reduzieren, während gleiche oder gar bessere Therapieerfolge erreicht werden. Die Grundidee besteht also darin, durch den NF- κ B-Inhibitor, der in einer nicht zytotoxischen Dosis gewählt wird und überwiegend molekulare Veränderungen bewirkt, die Tumorzelle durch ihre veränderten Eigenschaften gegenüber der Wirkung von Zytostatika zu sensibilisieren. Die Zytostatika selbst wirken über ihren bekannten Wirkungsmechanismus, nämlich eine DNA-Schädigung und daraus resultierender Apoptose in den Tumorzellen.

Das Zytostatikum Camptothecin, mit dem die meisten Experimente in meiner Arbeit durchgeführt wurden, ist ein Inhibitor der Topoisomerase 1, der zu DNA Doppelstrangbrüchen während der DNA-Replikation führt (Liu, 1989; Wang, 1996). Die zytoplasmatischen Anteile der klassischen Aktivierung von NF- κ B, nämlich I κ B α und der IKK-Kinasekomplex, sind für die Induktion von NF- κ B durch Camptothecin essentiell (Huang et al., 2000). Um diese Induktion von NF- κ B durch Camptothecin zu verhindern, erscheint also die Kombination mit einem IKK-Inhibitor beziehungsweise einem Proteasominhibitor sinnvoll, da durch beide wichtige Module des Aktivierungswegs gehemmt werden.

Ein Teil der Experimente ist allerdings auch mit Zytostatika durchgeführt worden, die andere Wirkungsmechanismen aufweisen: Das Anthracyclin Doxorubicin, welches NF- κ B induzieren kann (Das und White, 1997), sowie die alkylierenden, phasenunabhängigen Zytostatika DTIC und Temozolomid konnten gute kombinatorische Effekte erzielen (Abb.12). Folglich ist diese Kombination unabhängig von der Wahl des Zytostatikums ein gutes Prinzip und eröffnet so die Möglichkeit der Behandlung verschiedener Tumoren, die mit jeweils anderen Zytostatika gehemmt werden können.

Zu diesem Themenkomplex sind die Regulation NF- κ B-relevanter Proteine durch Camptothecin und Doxorubicin (Abb.10, Abb.11), die funktionellen Versuche zur Apoptose mit Camptothecin, Doxorubicin, Dacarbazin und Temozolomid (Abb.12), der Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Camptothecin (Abb.13), die Invasionshemmung durch Camptothecin und Doxorubicin (Abb.14) und schließlich die *in vivo*-Wirkung von Camptothecin (Abb.15) untersucht worden. Im Folgenden werden die jeweiligen Ergebnisse diskutiert.

Für diese Experimente wurden die Tumorzellen nicht mit TNF α stimuliert – eine mögliche Aktivierung von NF- κ B erfolgte nun konstitutiv oder durch die Zytostatika selbst.

A375-Melanomzellen wurden mit Camptothecin, Doxorubicin oder den NF- κ B-Inhibitoren allein sowie im Vergleich dazu mit der Kombination aus je einem Zytostatikum und KINK-1 oder Bortezomib behandelt, um eine Veränderung der

Chemokin-Expression zu untersuchen (Abb.10, Abb.11). Dabei war festzustellen, dass 5 μ M KINK-1 das nicht durch TNF α induzierte, also konstitutive Signal von IL-8, MCP-1 oder Gro α nicht so deutlich hemmen konnten wie unter TNF α Stimulation (Abb.10, Abb.11 im Vgl. zu Abb.7, Abb.8). Hier ergaben sich also beim Vergleich zur Kontrolle ohne TNF α durch NF- κ B-Inhibition keine signifikanten Veränderungen. Auffallend ist, dass Bortezomib „paradoxaerweise“ das konstitutive Signal dieser Chemokine leicht verstärkte, während KINK-1 kaum eine Veränderung bewirkte. Inwieweit diese unterschiedliche Chemokin-Stimulation Einfluss auf das therapeutische Ansprechen maligner Tumoren haben könnte, ist derzeit noch spekulativ. Beide NF- κ B-Inhibitoren vermochten also die durch TNF α induzierte, nicht aber die konstitutive Expression der untersuchten Chemokine zu hemmen.

Somit ließ sich ein eindeutig synergistischer Effekt in der Kombination von Zytostatikum (Doxorubicin oder Camptothecin) mit KINK-1, nicht aber mit Bortezomib, feststellen: Während KINK-1 in einer Konzentration von 5 μ M allein die Expression der Chemokine IL-8, Gro α (CXCL1) und MCP-1 nicht stark veränderte und das Zytostatikum Camptothecin diese, zumindest die von IL-8 und Gro α (CXCL1) induzierte, konnte die Kombination aus beiden eine Reduktion auf das Niveau der Kontrolle bewirken (Abb.10, linke Spalte). In der Kombination aus Doxorubicin und KINK-1 ergab sich bei IL-8 und Gro α (CXCL1) sogar ein Signal unterhalb des Niveaus der Kontrolle, aber dieses Zytostatikum bewirkte auch keine Induktion der Chemokine (Abb.10, linke Spalte). Folglich wurde hier ein zweifacher Effekt von KINK-1 deutlich: Zum Einen verhinderte es die durch Camptothecin bewirkte Induktion der beiden Chemokine, zum Andern wurde in der Kombination mit Doxorubicin deutlich, dass es auch konstitutive Expressionsspiegel der Chemokine reduzieren kann. Letzteres zeigte sich auch bei der Untersuchung von MCP-1: Sowohl in Kombination mit Doxorubicin als auch mit Camptothecin bewirkte KINK-1 eine Reduktion von MCP-1 unter den Kontrollwert, weswegen man von einem synergistischen Effekt ausgehen muss, da die jeweiligen Substanzen allein dies nicht vermochten (Abb.11).

Bortezomib hingegen fiel vor allem in der Kombination mit Doxorubicin auf, da es hier ein stärkerer Induktor der Chemokine als das Zytostatikum selbst war

(Abb.10, rechte Spalte). Neben der Tatsache, dass der Effekt von Bortezomib auf diese Chemokine, wie nach bereits publizierten Arbeiten zu erwarten war (Nencioni et al., 2006; Papageorgiou et al., 2006), vom Zelltyp abhängig zu sein schien, zeigte sich, dass er auch vom Stimulationsweg abhing.; unter TNF-Stimulation bewirkte Bortezomib schließlich sehr wohl eine Reduktion der Chemokin-Expression.

Allerdings ist die bisherige Darstellung der Chemokine als das Tumorwachstum fördernde Faktoren etwas einseitig. Ihre Funktion erstreckt sich beispielsweise auch auf die Regulation verschiedener Funktionen des Immunsystems. So sind Patienten, die aufgrund einer Organtransplantation immunsuppressiv behandelt werden müssen, einem eindeutig höheren Malignitätsrisiko ausgesetzt sind (Jensen et al., 1999; Buell et al., 2005). Einigkeit besteht darin, dass den Chemokinen in der lokalen Umgebung des Tumors (Tumor-Mikromilieu), die aus stromalen Fibroblasten, Endothelzellen und infiltrierenden Leukozyten, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen besteht, eine Schlüsselrolle im Zusammenspiel all dieser Zellen zukommt (Shurin et al., 2006). Vermutlich können bestimmte Chemokine, je nach individueller Konstitution und relativen Mengen und Verteilungen im Gewebe dabei das Geschehen in beide Richtungen lenken, also zum einen die immunologische Abwehr gegen Tumorzellen anregen, aber auch durch proinflammatorische Stimulation, die Bildung neuer Gefäße oder funktionelle Aktivierung der Tumorzellen selbst die Metastasierung fördern. So ist MCP-1 durch seine Attraktion der Tumor-assoziierten Makrophagen einmal als ungünstiger Marker für die Prognose des malignen Melanoms beschrieben (Sica et al., 2008). Andererseits wurde die chemotaktische Wirkung von MCP-1 auf dendritische Zellen in den drainierenden Lymphknoten für den Rückgang des Tumorwachstums verantwortlich gemacht (Wang et al., 2003). Viele Daten sprechen allerdings auch dafür, dass vor allem IL-8 und CXCL1 von Vorteil für verschiedene Tumorzellen sind: Beispielsweise ließ sich beim Vergleich von normaler Mukosa mit Schleimhaut des kolorektalen Karzinoms feststellen, dass die genannten Chemokine im veränderten Gewebe eindeutig verstärkt exprimiert sind (Baier et al., 2005). Zudem sind sowohl CXCL1 und IL-8 in der infiltrativen

und bösartigeren Form des Magenkarzinoms, dem diffusen Typ, im Gegensatz dazu im intestinalen Typ entweder gar nicht (CXCL1) oder viel schwächer (IL-8) exprimiert (Eck et al., 2003). Auch für das maligne Melanom ist, wie eingangs beschrieben, die Chemokinexpression wachstums- und invasionsfördernd. Deswegen wird die Fähigkeit von KINK-1, die durch Zytostatika induzierte Chemokine zu inhibieren, eher als Vorteil angesehen, wenngleich auf die Ambivalenz der Rolle der Chemokine hingewiesen werden muss. Eine individuelle Bewertung sollte in jedem Einzelfall erfolgen.

Ein wichtiger Wirkungsmechanismus von Zytostatika besteht in der Induktion der Apoptose (Hickman, 1992). Die Kombination verschiedener Zytostatika mit KINK-1 oder mit Bortezomib ergab eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur Apoptoseinduktion durch das Zytostatikum allein (Abb.12).

In den funktionellen Versuchen zur Apoptose ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen KINK-1 und Bortezomib, zumindest in Kombination mit Doxorubicin und Camptothecin. Betrachtet man die Ergebnisse, wird deutlich, dass eine primär zu hoch gewählte Zytostatika-Dosis, wie zum Beispiel 0,1 μM Camptothecin Nachteile hat: Zum Einen lässt sich in diesem Bereich die Apoptoserate nicht weiter durch NF- κ B-Inhibition erhöhen und zum Andern ist sie sehr toxisch. Die Vorteile aus der Kombination von NF- κ B-Inhibition und Zytostatika wurden folglich vor allem in moderaten Zytostatika-Konzentrationen deutlich.

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel für die synergistische Wirkung von NF- κ B-Inhibitoren und Zytostatika waren die Versuche zur Inhibition der Invasion: Vor allem bei der Kombination aus KINK-1 und Camptothecin zeigte sich, dass keine Melanomzelle in dem vorgegebenen Zeitraum die artifizielle Basalmembran passieren konnte, wohingegen die Monotherapien weit weniger erfolgreich waren. Dieses Überqueren der Basalmembran stellt einen der ersten Schritte zur Fernmetastasierung dar und es ist daher therapeutisch von großer Bedeutung, diesen Schritt zu hemmen.

Um die Wirksamkeit der bisher viel versprechenden Substanzen in einer präklinischen Studie zu beweisen, wurden B16F10-Melanomzellen, eine aggressive Maus-Melanomlinie, intravenös gespritzt und die Lungenmetastasierung ermittelt. Damit wurde auf ein gängiges, allerdings auch artifizielles, experimentelles Tumorsystem zurückgegriffen, welches auch die Anwendung des schwer löslichen Camptothecins durch intraperitoneale Applikation möglich machte (Matsuzaki et al., 1988; Dora et al., 2006; Loch-Neckel et al., 2007).

Dieser Versuch zeigte deutliche synergistische Effekte sowohl von Bortezomib als auch von KINK-1 mit Camptothecin. Nicht untersucht wurde hierbei die Verhinderung des initialen kapillären Tumorzell-Arrests (Erpenbeck et al., 2010); schließlich wurde den Tumorzellen zunächst ein Tag Zeit gegeben, sich in der Lunge anzusiedeln und erst dann wurden die Substanzen gespritzt. Dieses experimentelle Konzept wurde gemäß den hauptsächlichen Wirkungen der eingesetzten Substanzen auf Zellproliferation und –apoptose, nicht hingegen auf Adhäsion, gewählt. Im Einklang damit war auch die mit der Lupe ermittelte Anzahl der Metastasen unverändert. Wohl aber änderte sich die Größe der Metastasen, was sowohl die Bilder der Lungen als auch das reduzierte Lungengewicht in den Kombinationsbehandlungen zeigten (Abb.15, Abb.16). Auch die morphometrische Auswertung der Lungen-Oberflächen mit einem Vergleich des prozentualen Anteils an Lungenmetastasen an der gesamten Lungenfläche zeigte eine signifikante Reduktion in der kombinatorischen Behandlung (Abb.17). Dies bedeutet, dass die verwendeten Substanzen sich hier als erfolgreiche Therapie auszeichneten.

In weiteren Versuchen nach Abschluss des experimentellen Teiles meiner Arbeit wurde untersucht, welche molekularen Ursachen dem starken Erfolg der kombinatorischen Therapie zugrunde liegen: Hier konnte in Apoptosemessungen in den Metastasen dieses *in-vivo* Versuchs festgestellt werden, dass die Apoptoserate bei der Monotherapie mit KINK-1 und Bortezomib, aber auch mit Camptothecin, nicht gegenüber der Kontrolle verstärkt war. Dagegen konnte bei der Kombination aus Camptothecin und jedem der beiden NF- κ B-Inhibitoren eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate detektiert werden. Zusätzlich konnte in den Kontrollen sowie in

den Metastasen, die nur mit Camptothecin behandelt wurden, vereinzelt NF- κ B immunhistochemisch im Kern nachgewiesen werden. Dagegen ließ sich in den mit NF- κ B-Inhibitoren behandelten Metastasen, mit oder ohne Camptothecin keine Translokation von p65 in den Kern nachweisen (Amschler et al., 2010).

4.4 Vergleich von KINK-1 und Bortezomib

Die NF- κ B-Inhibitoren KINK-1 und Bortezomib erzielten vergleichbare funktionelle Effekte auf zellulärer Ebene: Sowohl in der Induktion der Apoptose (Abb.12), als auch in der Invasionshemmung (Abb.14) und im *in-vivo* Versuch (Abb.15) verstärkten sie in gleichem Maß den Effekt der Zytostatika. Zwar führen sowohl die IKK-Inhibition durch KINK-1 als auch die Inhibition des Proteasoms durch Bortezomib zur NF- κ B-Hemmung, allerdings ließen sich in dieser Arbeit einige interessante Unterschiede zwischen beiden Substanzen auf molekularer Ebene feststellen: Während Bortezomib eine starke Induktion von NOXA und p53 sowie eine deutliche Hemmung des die Proliferation fördernden Cyclin D1 zeigte, erreichte KINK-1 hier nur sehr geringe Veränderungen, wie eine sehr schwache Reduktion von Cyclin D1 (Abb.6). Dafür aber verhinderte KINK-1 die durch Camptothecin bewirkte Induktion von Tumorwachstumsfördernden Chemokinen wie CXCL1, CXCL8 und MCP-1 (Abb.10). Auch bei der Zellzyklus-Untersuchung zeigten sich Unterschiede. Während Bortezomib schon in einer Konzentration von 5 ng/ml einen starken G2/M-Arrest bewirkte, konnte ein vergleichbarer Effekt von KINK-1 nicht einmal in sehr hohen Konzentrationen von 15 μ M erreicht werden. Die beschriebenen Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammenfassend dargestellt.

Es lassen sich einige Hypothesen aufstellen, die diese unterschiedlichen molekularen Effekte der beiden NF- κ B-Inhibitoren erklären können: Zunächst einmal haben Proteasominhibitoren wie Bortezomib neben der NF- κ B-Inhibition zusätzliche Effekte. Dies gilt zum Beispiel für die Induktion von NOXA und p53 durch Proteasominhibitoren, die zumindest teilweise unabhängig von der NF- κ B-Inhibition erreicht wird (Fernandez et al., 2005; Orłowski und Kuhn, 2008). Wie bereits beschrieben, ist die Induktion von NOXA durch Bortezomib erst kürzlich mit der transkriptionellen Aktivierung durch das Onkoprotein c-myc

erklärt worden (Nikiforov et al., 2007). Dieser Eingriff in die Maschinerie der Apoptose durch Bortezomib konnte auch in anderen Krebszellen, wie Brustkrebs, Lungenkrebs und hämatologischen Malignomen nachgewiesen werden (Nikiforov et al., 2007). Möglicherweise gibt es spezifische „Nebenwirkungen“ auch bei KINK-1; allerdings sind diese noch nicht gefunden worden.

Zudem kontrolliert das Proteasom die Degradation aller poly-ubiquitinierten Proteine; zu seinen Substraten zählen auch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen, welche den Zellzyklus regulieren (Nakanishi und Toi, 2005; Orłowski und Kuhn, 2008). Der unspezifische Ansatz der Proteasom-Inhibition führt deshalb zu zahlreichen Veränderungen in den Zellen und je nach Ausmaß der Aktivierung von Proteinen, die der Degradation des Proteasoms unterliegen, ist der Effekt durch Proteasominhibition unterschiedlich.

Dieser breite Wirkungsmechanismus könnte im Vergleich zu einem spezifischeren Ansatz wie KINK-1 auch Nachteile aufweisen. So wurde beschrieben, dass die Expression anti-apoptotischer Proteine, wie MCL-1, die auch nach Ubiquitinierung dem Proteasom-Abbau unterliegen, unter Bortezomib-Behandlung ansteigen kann (Nguyen et al., 2007). Ein anderes Beispiel allerdings zeigt, dass dieser unspezifische Ansatz auch von Vorteil sein kann. Ein Mechanismus der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Topoisomerase-Inhibitoren (wie Camptothecin) ist die Herunterregulierung der Topoisomerasen durch Ubiquitinierung und anschließendem Abbau durch das Proteasom. Diese Herunterregulierung kann man durch Proteasominhibitoren verhindern (Desai et al., 1997; Desai et al., 2001).

Diese Beispiele zeigen, dass sich theoretisch sowohl für KINK-1 als auch für Bortezomib Argumente finden, die die eine oder andere Substanz - beispielsweise in Abhängigkeit vom kombinierten Zytostatikum - vorteilhaft erscheinen lassen. Möglicherweise wirkte Bortezomib eher über die Beeinflussung des Zellzyklus und machte durch das Festhalten der Tumorzellen in G2/M die Zellen gegenüber niedrigen Dosierungen von Camptothecin angreifbar. Dagegen erreichte KINK-1 dies eventuell über das Verhindern der Induktion proliferationsfördernder Chemokine wie CXCL1 und CXCL8. Der Netto-Effekt jedenfalls, nämlich die Suszeptibilität der Tumorzellen

gegenüber Camptothecin zu erhöhen, wurde durch beide NF- κ B-Inhibitoren erreicht.

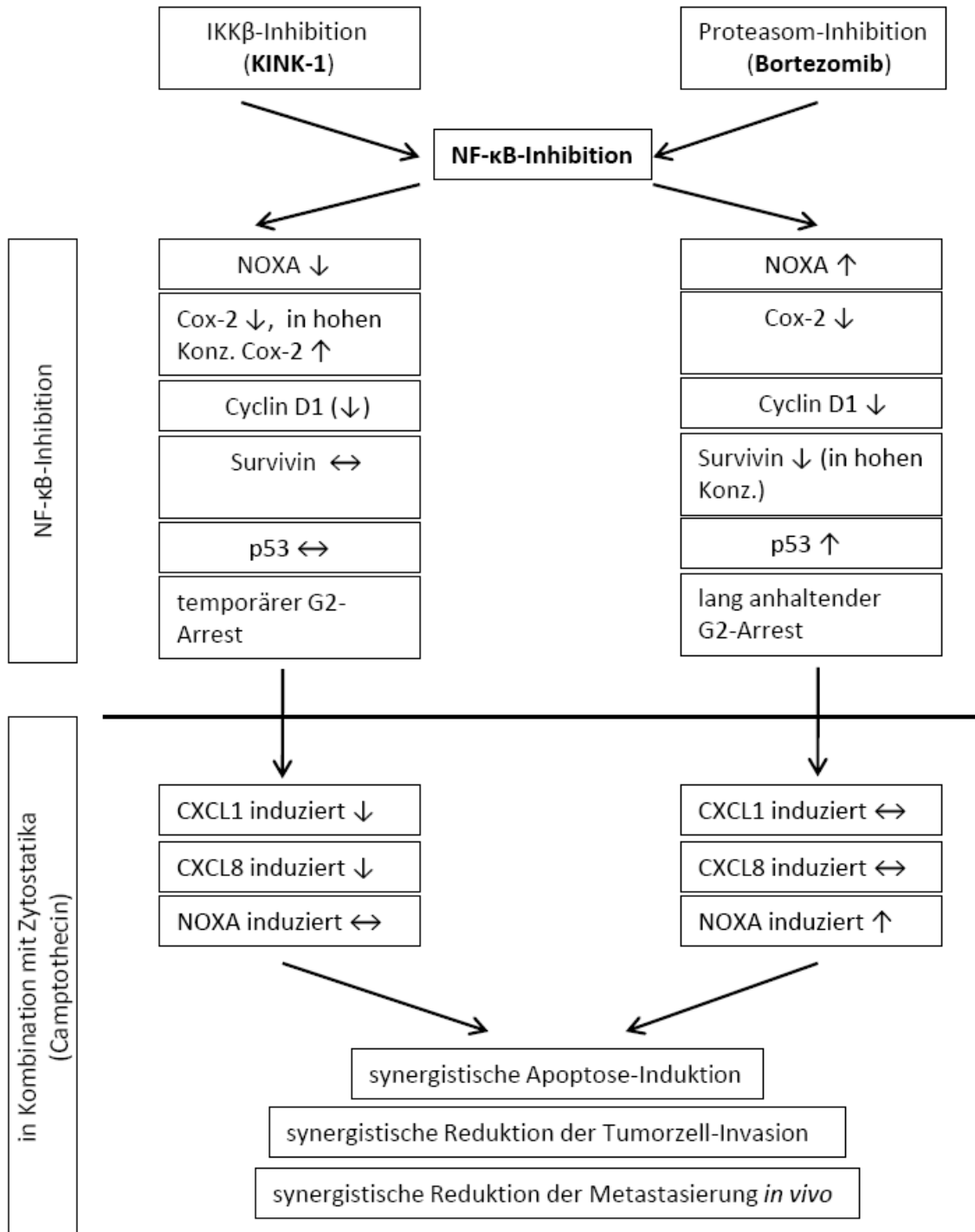


Abb.18) Veränderung der Expression tumorrelevanter Proteine und Zytokine unter NF- κ B-Monotherapie und unter der Kombination von NF- κ B-Inhibition mit Zytostatika (vgl. Amschler et al., 2010)

4.5 Einfluss auf zukünftige Therapien

Das maligne Melanom ist durch zahlreiche molekulare Veränderungen gekennzeichnet, welche einen erfolgreichen Angriff durch Chemotherapie erschweren. Diese Arbeit unterstreicht die Notwendigkeit, auf diese Veränderungen möglichst gezielt einzugehen und sie anzugreifen, um die daraus resultierende Resistenz zu verringern. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B eignet sich im Besonderen für einen solchen Angriff, da er sehr viele tumorrelevante Proteine reguliert. In der Klinik sollen dadurch zwei Ziele erreicht werden: Zum Einen soll das Ansprechen der Tumorzellen auf Zytostatika verbessert werden und somit eine verlängerte Überlebenszeit der Patienten erreicht werden. Zum Andern kann in einem nächsten Schritt die Dosis der sehr toxischen Zytostatika reduziert werden, da beispielsweise die Induktion der Apoptose in der NF- κ B-inhibierten Zelle in niedrigeren Dosen möglich ist. Dadurch kann das zweite Ziel, nämlich eine verbesserte Lebensqualität erreicht werden.

Auch die Tatsache, dass durch unterschiedliche Mechanismen der NF- κ B-Inhibition vergleichbar gute Effekte erzielt werden konnten, ist von Bedeutung: Gerade für Bortezomib ist die Induktion von *de novo* Chemoresistenzen beschrieben (Chauhan et al., 2004a; Chauhan et al., 2004b; Kuhn et al., 2007). Bei Resistenzentwicklung gegen einen NF- κ B-Inhibitor ist dieser vielleicht durch einen zweiten ersetzbar und die Therapie muss nicht abgebrochen werden. Eine simultane Resistenzentwicklung gegen KINK-1 und Bortezomib ist bei unterschiedlichem Wirkungsmechanismus nicht zu erwarten. Daher existieren Bemühungen, neue Proteasominhibitoren zu etablieren. Einer davon ist Carfilzomib, eine Substanz, welche eine irreversible Blockade der Chymotrypsin-artig wirkenden Untereinheit des Proteasoms bewirkt. Diese Substanz war auch gegen Zellen des Multiplen Myeloms wirksam, welche resistent gegen Bortezomib waren (Kuhn et al., 2007). Allerdings wäre denkbar, dass diese dem Bortezomib sehr ähnliche NF- κ B-Inhibition schnell ebenso zu Resistenzen führt und der Einsatz von KINK-1 hier womöglich langfristig effektiver wäre.

Eine andere Idee wäre, von Beginn an mit zwei derartig verschiedenen NF- κ B-Inhibitoren wie Bortezomib und KINK-1 zu therapieren, da dies vielleicht die Entstehung von *de novo* Resistenzen verhindern kann. Dies müsste allerdings in weiteren Studien herausgefunden werden.

Was molekulare Ansätze angeht, hat die NF- κ B-Inhibition im Gegensatz zu neueren Ansätzen, in denen beispielsweise mit antisense-Oligonukleotiden bestimmte mRNAs, etwa von bcl-2 angegriffen werden sollen (Moreira et al., 2006; Palmieri et al., 2007), den Vorteil, dass sie prinzipiell bei einem größeren Patientenkollektiv wirksam sein könnte, da NF- κ B sehr häufig im malignen Melanom verstärkt aktiv ist.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Möglichkeit auf, die bisher meist erfolglose Chemotherapie des malignen Melanoms zu verbessern: Durch Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Regulation vieler tumorrelevanter Gene verantwortlich ist, konnten die Tumorzellen gegenüber der Wirkung von Zytostatika sensibilisiert werden.

Zunächst wurden acht verschiedene Melanomzellen in Bezug auf ihre NF- κ B-Aktivität und der Expression NF- κ B-regulierter Proteine verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Melanomzellen über konstitutive Aktivität von NF- κ B verfügt. Dabei bestand kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Expression NF- κ B-regulierter Proteine und der Aktivität dieses Transkriptionsfaktors im Kern, was komplexe Regulationsmechanismen bei der Transkription und Translation vermuten lässt. Anhand einer ausgewählten Melanomzelllinie konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene NF- κ B-Inhibitoren, der Proteasom-Inhibitor Bortezomib und der neue IKK β -Inhibitor KINK-1 die Aktivität von NF- κ B deutlich hemmen. Beim Vergleich beider NF- κ B-Inhibitoren ließen sich unerwartet verschiedene molekulare Wirkungsmechanismen nachweisen: Während Bortezomib konzentrationsabhängig eine sehr starke Induktion von NOXA, eine Induktion von p53 sowie eine Abnahme von Cyclin D1 bewirkte, zeigte KINK-1 seine Effekte vor allem in der Reduktion von Chemokinen wie IL-8 und MCP-1. Passend zur Veränderung der Expression zellzyklus-relevanter Proteine hatte Bortezomib einen stärkeren Effekt auf den Zellzyklus als KINK-1.

Beide Inhibitoren wurden mit verschiedenen Zytostatika kombiniert und konnten einerseits die Apoptoseinduktion durch Zytostatika verstärken und andererseits die durch Zytostatika reduzierte Invasion weiter reduzieren. Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung tumorrelevanter Chemokine, dass KINK-1 im Gegensatz zu Bortezomib synergistische Effekte mit Camptothecin und Doxorubicin aufweist. Trotz molekularer Unterschiede bewirkten beide NF- κ B-Inhibitoren vergleichbare funktionelle Effekte auf zellulärer Ebene.

Dies galt auch für ein präklinisches *in-vivo*-Modell, in dem die experimentelle Lungenmetastasierung von B16F10-Melanomzellen in Mäusen ermittelt wurde:

Hier wurden die Mäuse mit Camptothecin, KINK-1 und Bortezomib allein im Vergleich zu den jeweiligen Kombinationen aus Zytostatikum und NF- κ B-Inhibitor behandelt. Beide Kombinationen zeigten eine signifikante Reduktion des Lungengewichts im Vergleich zu Camptothecin allein. Diese Arbeit konnte also den Nutzen aus NF- κ B-Inhibition in Kombination mit Zytostatika für die hier verwendeten Substanzen bekräftigen und dabei einige molekulare Unterschiede aufdecken.

6. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Apaf-1	Apoptotic protease aktivating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	B-Cell Lymphoma (Protein)
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BH	Bcl Homologie (Domäne)
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin
Caspase	Cysteiny Aspartat-spezifische Protease
cDNA	komplementär DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cox-2	Cyclooxygenase-2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotid Triphosphat
DTIC	Dacarbazin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
G	Gauge
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Gro	growth related oncogene
H ₂ O	Wasser

IAP	Inhibitor of apoptosis
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B Kinase Komplex
IL	Interleukin
KINK-1	kinase inhibitor of nuclear factor-kappaB-1
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar (Mol/Liter)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metallo-Protease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF κ B	Nuclear Factor kappaB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
p-value	probability value
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	signal transducers and activators of transcription
T	Thymin
Temed	N', N', N', N', Tetramethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
US-FDA	United States Food and Drug Administration
UV	Ultraviolett
V	Volt

VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl	vergleiche
XIAP	X-Chromosome-Linked Inhibitor of Apoptosis

7. Literaturverzeichnis

- Afshari CA, Barrett JC. 1993. Cell cycle controls: potential targets for chemical carcinogens? *Environ Health Perspect* 101 Suppl 5:9-14.
- Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6:203-208.
- Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. 2004. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 64:4912-4918.
- Amschler K, Schön MP, Pletz N, Wallbrecht K, Erpenbeck L, Schön M. 2010. NF-kappaB inhibition through proteasome inhibition or IKKbeta blockade increases the susceptibility of melanoma cells to cytostatic treatment through distinct pathways. *J Invest Dermatol* 130:1073-1086.
- Arlt A, Gehrz A, Muerkoster S, Vorndamm J, Kruse ML, Folsch UR, Schafer H. 2003. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 22:3243-3251.
- Atallah E, Flaherty L. 2005. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 6:185-193.
- Atkins MB. 2006. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 12:2353s-2358s.
- Baier PK, Eggstein S, Wolff-Vorbeck G, Baumgartner U, Hopt UT. 2005. Chemokines in human colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 25:3581-3584.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648.
- Balch CM, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Halpern NB, Maddox WA. 1978. A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg* 188:732-742.
- Baldwin AS. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 107:241-246.

- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376:167-170.
- Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, Montserrat E, Colomer D. 2002. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1810-1816.
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. 2000. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68:1-8.
- Bian X, McAllister-Lucas LM, Shao F, Schumacher KR, Feng Z, Porter AG, Castle VP, Opipari AW, Jr. 2001. NF-kappa B activation mediates doxorubicin-induced cell death in N-type neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 276:48921-48929.
- Boccardo M, Morgan G, Cavenagh J. 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* 5:18.
- Buell JF, Gross TG, Woodle ES. 2005. Malignancy after transplantation. *Transplantation* 80:S254-264.
- Busam KJ, Antonescu CR, Marghoob AA, Nehal KS, Sachs DL, Shia J, Berwick M. 2001. Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. *Am J Clin Pathol* 115:856-860.
- Caamano J, Hunter CA. 2002. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 15:414-429.
- Campbell KJ, Perkins ND. 2004. Post-translational modification of RelA(p65) NF-kappaB. *Biochem Soc Trans* 32:1087-1089.
- Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. 2005. Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:465-476.
- Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Mitsiades C, Schlossman R, Munshi N, Richardson P, Cotter FE, Anderson KC. 2004a. Targeting mitochondria to overcome conventional and bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in multiple myeloma (MM) cells. *Blood* 104:2458-2466.

- Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Shringarpure R, Catley L, Mitsiades C, Munshi N, Tai YT, Suh N, Gribble GW, Honda T, Schlossman R, Richardson P, Sporn MB, Anderson KC. 2004b. The bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 and triterpenoid CDDO-Im induce synergistic anti-multiple myeloma (MM) activity and overcome bortezomib resistance. *Blood* 103:3158-3166.
- Chawla-Sarkar M, Bae SI, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. 2004. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 11:915-923.
- Chuang SE, Yeh PY, Lu YS, Lai GM, Liao CM, Gao M, Cheng AL. 2002. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 63:1709-1716.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. 2005. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 115:813-824.
- Ciechanover A, Schwartz AL. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2727-2730.
- Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656.
- Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. 2006. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* 81:500-507.
- Cusack JC, Jr., Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin AS, Jr. 2001. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 61:3535-3540.
- Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. 2002. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 46:715-722.
- Das KC, White CW. 1997. Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 272:14914-14920.

- Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S. 2001. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 61:303-308.
- Desai SD, Li TK, Rodriguez-Bauman A, Rubin EH, Liu LF. 2001. Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res* 61:5926-5932.
- Desai SD, Liu LF, Vazquez-Abad D, D'Arpa P. 1997. Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem* 272:24159-24164.
- Dhawan P, Richmond A. 2002. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol* 72:9-18.
- Di Pucchio T, Pilla L, Capone I, Ferrantini M, Montefiore E, Urbani F, Patuzzo R, Pennacchioli E, Santinami M, Cova A, Sovena G, Arienti F, Lombardo C, Lombardi A, Caporaso P, D'Atri S, Marchetti P, Bonmassar E, Parmiani G, Belardelli F, Rivoltini L. 2006. Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors. *Cancer Res* 66:4943-4951.
- Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Pallares J, Cabero A, Schoenenberger JA, Comella JX, Matias-Guiu X. 2006. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem* 281:22118-22130.
- Dora CL, Alvarez-Silva M, Trentin AG, de Faria TJ, Fernandes D, da Costa R, Stimamiglio M, Lemos-Senna E. 2006. Evaluation of antimetastatic activity and systemic toxicity of camptothecin-loaded microspheres in mice injected with B16-F10 melanoma cells. *J Pharm Pharm Sci* 9:22-31.
- Eck M, Schmausser B, Scheller K, Brandlein S, Muller-Hermelink HK. 2003. Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma. *Clin Exp Immunol* 134:508-515.
- Eckholm SV, Reed SI. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12:676-684.

- Erpenbeck L, Nieswandt B, Schön M, Pozgajova M, Schön MP. 2010. Inhibition of platelet GPIb alpha and promotion of melanoma metastasis. *J Invest Dermatol* 130:576-586.
- Essner R, Lee JH, Wanek LA, Itakura H, Morton DL. 2004. Contemporary surgical treatment of advanced-stage melanoma. *Arch Surg* 139:961-966; discussion 966-967.
- Fadeel B, Ottosson A, Pervaiz S. 2008. Big wheel keeps on turning: apoptosome regulation and its role in chemoresistance. *Cell Death Differ* 15:443-452.
- Fernandez Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Opipari AW, Jr., Lowe SW, Soengas MS. 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 65:6294-6304.
- Fukuyama R, Ng KP, Cicek M, Kelleher C, Nicolaita R, Casey G, Sizemore N. 2007. Role of IKK and oscillatory NFkappaB kinetics in MMP-9 gene expression and chemoresistance to 5-fluorouracil in RKO colorectal cancer cells. *Mol Carcinog* 46:402-413.
- Fulda S, Debatin KM. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798-4811.
- Gardiner PS, Gilmer JF. 2003. The medicinal chemistry implications of the anticancer effects of aspirin and other NSAIDs. *Mini Rev Med Chem* 3:461-470.
- Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, Lyakh LA, Karseladze A, Slaga TJ, Budunova IV. 2002. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 115:141-151.
- Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, Mantovani A, Mordoh J, Wainstok R. 2007. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J Invest Dermatol* 127:2031-2041.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-857.
- Green SP, Chuntharapai A, Curnutte JT. 1996. Interleukin-8 (IL-8), melanoma growth-stimulatory activity, and neutrophil-activating peptide selectively

- mediate priming of the neutrophil NADPH oxidase through the type A or type B IL-8 receptor. *J Biol Chem* 271:25400-25405.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118:285-296.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911.
- Grossman D, Altieri DC. 2001. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* 20:3-11.
- Guedat P, Colland F. 2007. Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochem* 8 Suppl 1:S14.
- Gugasyan R, Grumont R, Grossmann M, Nakamura Y, Pohl T, Nestic D, Gerondakis S. 2000. Rel/NF-kappaB transcription factors: key mediators of B-cell activation. *Immunol Rev* 176:134-140.
- Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. 2004. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol* 35:309-318.
- Haenssle HA, Korpas B, Hansen-Hagge C, Buhl T, Kaune KM, Johnsen S, Rosenberger A, Schön MP, Emmert S. 2010. Selection of patients for long-term surveillance with digital dermoscopy by assessment of melanoma risk factors. *Arch Dermatol* 146:257-264.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hassa PO, Hottiger MO. 1999. A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 380:953-959.
- Hauschild A, Garbe C, Bauer J, Hamm H, Kerl H, Reusch M, Rompel R, Schlaeger M. 2006. [Melanocytic nevi]. *J Dtsch Dermatol Ges* 4:686-697.
- Helmbach H, Kern MA, Rossmann E, Renz K, Kissel C, Gschwendt B, Schadendorf D. 2002. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J Invest Dermatol* 118:923-932.
- Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. 2001. Drug-resistance in human melanoma. *Int J Cancer* 93:617-622.

- Hess V, Herrmann R, Veelken H, Schwabe M. 2007. Interleukin-2-based biochemotherapy for patients with stage IV melanoma: long-term survivors outside a clinical trial setting. *Oncology* 73:33-40.
- Hickman JA. 1992. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 11:121-139.
- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. 2002. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277:16639-16647.
- Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. 2005. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 87:307-314.
- Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. 2000. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 191:245-256.
- Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Seufzer BJ, Shumway SD, Kurama T, Boothman DA, Miyamoto S. 2000. NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem* 275:9501-9509.
- Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. 2003. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 22:3152-3161.
- Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, Huang SX, Zhou H, Hei TK. 2008. Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp Cell Res* 314:1163-1176.
- Jensen P, Hansen S, Moller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, Fauchald P, Simonsen S. 1999. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 40:177-186.
- Johnson DG, Walker CL. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:295-312.
- Karin M. 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441:431-436.

- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2:301-310.
- Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. 2004. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3:17-26.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256:42-49.
- Keutgens A, Robert I, Viatour P, Chariot A. 2006. Deregulated NF-kappaB activity in haematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 72:1069-1080.
- Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. 2006. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 13:738-747.
- Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T. 2008. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 365:279-284.
- Kroemer G, Reed JC. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513-519.
- Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, Demo SD, Bennett MK, van Leeuwen FW, Chanan-Khan AA, Orlowski RZ. 2007. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 110:3281-3290.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. 2004. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 82:434-448.
- Laurent G, Jaffrezou JP. 2001. Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood* 98:913-924.
- Lens M. 2008. Current clinical overview of cutaneous melanoma. *Br J Nurs* 17:300-305.
- Lens MB, Eisen TG. 2003. Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 4:2205-2211.
- Li Q, Verma IM. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2:725-734.
- Li Y, Ahmed F, Ali S, Philip PA, Kucuk O, Sarkar FH. 2005. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased

- apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res* 65:6934-6942.
- Liu LF. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 58:351-375.
- Loch-Neckel G, Nemen D, Puhl AC, Fernandes D, Stimamiglio MA, Alvarez Silva M, Hangai M, Santos Silva MC, Lemos-Senna E. 2007. Stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin: in-vitro and in-vivo activity on B16-F10 melanoma. *J Pharm Pharmacol* 59:1359-1364.
- Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T. 2005. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* 104:1794-1807.
- Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, Wu ZQ, Borad MJ, Frantzen M, Roussos E, Neeser J, Mikail A, Adams J, Sjak-Shie N, Vescio RA, Berenson JR. 2003. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 9:1136-1144.
- Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, Saito M, Kawagoe J, Takahashi K, Yada-Hashimoto N, Sakata M, Motoyama T, Kurachi H, Tasaka K, Murata Y. 2004. Inhibition of NFkappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *J Biol Chem* 279:23477-23485.
- Mackie RM, Hauschild A, Eggermont AM. 2009. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6:vi1-7.
- Maeda S, Omata M. 2008. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci* 99:836-842.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. 2000. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164:6509-6519.
- Matsuzaki T, Yokokura T, Mutai M, Tsuruo T. 1988. Inhibition of spontaneous and experimental metastasis by a new derivative of camptothecin, CPT-11, in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 21:308-312.

- Melnikova VO, Bar-Eli M. 2008. Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer Biol Ther* 7:997-1003.
- Miyamoto S, Chiao PJ, Verma IM. 1994. Enhanced I kappa B alpha degradation is responsible for constitutive NF-kappa B activity in mature murine B-cell lines. *Mol Cell Biol* 14:3276-3282.
- Moreira JN, Santos A, Simoes S. 2006. Bcl-2-targeted antisense therapy (Oblimersen sodium): towards clinical reality. *Rev Recent Clin Trials* 1:217-235.
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 56:554-558.
- Nakanishi C, Toi M. 2005. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 5:297-309.
- Nencioni A, Schwarzenberg K, Brauer KM, Schmidt SM, Ballestrero A, Grunebach F, Brossart P. 2006. Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood* 108:551-558.
- Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, Goulet D, Viallet J, Belec L, Billot X, Acoca S, Purisima E, Wiegmans A, Cluse L, Johnstone RW, Beauparlant P, Shore GC. 2007. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19512-19517.
- Nikiforov MA, Riblett M, Tang WH, Gratchouck V, Zhuang D, Fernandez Y, Verhaegen M, Varambally S, Chinnaiyan AM, Jakubowiak AJ, Soengas MS. 2007. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19488-19493.
- Nyormoi O, Bar-Eli M. 2003. Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma. *Clin Exp Metastasis* 20:251-263.
- O'Connell MA, Cleere R, Long A, O'Neill LA, Kelleher D. 1995. Cellular proliferation and activation of NF kappa B are induced by autocrine production of tumor necrosis factor alpha in the human T lymphoma line HuT 78. *J Biol Chem* 270:7399-7404.
- Obiol-Pardo C, Granadino-Roldan JM, Rubio-Martinez J. 2008. Protein-protein recognition as a first step towards the inhibition of XIAP and Survivin anti-apoptotic proteins. *J Mol Recognit* 21:190-204.

- Orlowski RZ, Kuhn DJ. 2008. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 14:1649-1657.
- Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.
- Palmieri G, Casula M, Ascierto PA, Tanda F, Cossu A. 2007. Molecular classification of patients with malignant melanoma for new therapeutic strategies. *J Clin Oncol* 25:e20-21.
- Papageorgiou A, Kamat A, Benedict WF, Dinney C, McConkey DJ. 2006. Combination therapy with IFN-alpha plus bortezomib induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5:3032-3041.
- Paramore A, Frantz S. 2003. Bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* 2:611-612.
- Parmiani G, Castelli C, Rivoltini L, Casati C, Tully GA, Novellino L, Patuzzo A, Tosi D, Anichini A, Santinami M. 2003. Immunotherapy of melanoma. *Semin Cancer Biol* 13:391-400.
- Patel PS, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. 2002. Regulation of constitutive and induced NF-kappaB activation in malignant melanoma cells by capsaicin modulates interleukin-8 production and cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res* 22:427-435.
- Payne AS, Cornelius LA. 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 118:915-922.
- Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 107:257-264.
- Perkins ND. 2004. Regulation of NF-kappaB by atypical activators and tumour suppressors. *Biochem Soc Trans* 32:936-939.
- Petrella T, Quirt I, Verma S, Haynes AE, Charette M, Bak K. 2007. Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol* 14:21-26.
- Piret B, Piette J. 1996. Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells. *Nucleic Acids Res* 24:4242-4248.
- Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix MJ, Rizzo P, Miele L, Nickoloff BJ. 2005.

- Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65:6282-6293.
- Quirt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M. 2007. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *Oncologist* 12:1114-1123.
- Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. 2001. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 117:333-340.
- Rath PC, Aggarwal BB. 1999. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19:350-364.
- Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. 2003. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 10:361-369.
- Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS, Jr., Liu R, Adams J, Elliott P, Cusack JC, Jr. 2001. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:183-193.
- Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM. 2007. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS ONE* 2:e594.
- Satyamoorthy K, Herlyn M. 2002. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 1:14-17.
- Schadendorf D. 2002. Is there a standard for the palliative treatment of melanoma? *Onkologie* 25:74-76.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. 2007. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 8:377-397.
- Schön M, Wienrich BG, Kneitz S, Sennefelder H, Amschler K, Vohringer V, Weber O, Stiewe T, Ziegelbauer K, Schön MP. 2008. KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment. *J Natl Cancer Inst* 100:862-875.

- Sen R, Baltimore D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46:705-716.
- Serrone L, Zeuli M, Segal FM, Cognetti F. 2000. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 19:21-34.
- Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. 2008. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* 233:21-31.
- Shah KV, Chien AJ, Yee C, Moon RT. 2008. CTLA-4 Is a Direct Target of Wnt/beta-Catenin Signaling and Is Expressed in Human Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol*.
- Shibue T, Takeda K, Oda E, Tanaka H, Murasawa H, Takaoka A, Morishita Y, Akira S, Taniguchi T, Tanaka N. 2003. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* 17:2233-2238.
- Shishodia S, Aggarwal BB. 2002. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol* 35:28-40.
- Shumway SD, Miyamoto S. 2004. A mechanistic insight into a proteasome-independent constitutive inhibitor kappaBalpha (IkappaBalpha) degradation and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation pathway in WEHI-231 B-cells. *Biochem J* 380:173-180.
- Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, Chatta G, Zhong H, Han B, Ferris RL. 2006. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev* 25:333-356.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*.
- Situm M, Buljan M, Bulic SO, Simic D. 2007. The mechanisms of UV radiation in the development of malignant melanoma. *Coll Antropol* 31 Suppl 1:13-16.
- Soengas MS, Lowe SW. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22:3138-3151.
- Spinella F, Rosano L, Di Castro V, Decandia S, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. 2007. Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via

- hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells. *Cancer Res* 67:1725-1734.
- Streit M, Detmar M. 2003. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 22:3172-3179.
- Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* 23:9247-9258.
- Tanaka M, Kaneda Y, Fujii S, Yamano T, Hashimoto K, Huang SK, Hoon DS. 2002. Induction of a systemic immune response by a polyvalent melanoma-associated antigen DNA vaccine for prevention and treatment of malignant melanoma. *Mol Ther* 5:291-299.
- Tang ZY, Wu YL, Gao SL, Shen HW. 2008. Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 145:111-123.
- Tapia MA, Gonzalez-Navarrete I, Dalmases A, Bosch M, Rodriguez-Fanjul V, Rolfe M, Ross JS, Mezquita J, Mezquita C, Bachs O, Gascon P, Rojo F, Perona R, Rovira A, Albanell J. 2007. Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to doxorubicin. *Cell Cycle* 6:2284-2292.
- Tarhini AA, Agarwala SS. 2006. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther* 19:19-25.
- Tergaonkar V. 2006. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1647-1653.
- Ueda Y, Richmond A. 2006. NF-kappaB activation in melanoma. *Pigment Cell Res* 19:112-124.
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302:1036-1038.
- Wang CY, Cusack JC, Jr., Liu R, Baldwin AS, Jr. 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5:412-417.

- Wang H, Nemoto-Sasaki Y, Kondo T, Akiyama M, Mukaida N. 2003. Potential involvement of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2 in IL-4-mediated tumor immunity through inducing dendritic cell migration into the draining lymph nodes. *Int Immunopharmacol* 3:627-642.
- Wang JC. 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65:635-692.
- Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, Bart RS. 2001. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 44:837-846.
- Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. 2007. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas--does origin matter? *Br J Dermatol* 156:72-76.
- Wolter KG, Verhaegen M, Fernandez Y, Nikolovska-Coleska Z, Riblett M, de la Vega CM, Wang S, Soengas MS. 2007. Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ* 14:1605-1616.
- Wood KM, Roff M, Hay RT. 1998. Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B. *Oncogene* 16:2131-2139.
- Wu L, Pu Z, Feng J, Li G, Zheng Z, Shen W. 2008. The ubiquitin-proteasome pathway and enhanced activity of NF- κ B in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 97:439-444.
- Yang J, Amiri KI, Burke JR, Schmid JA, Richmond A. 2006. BMS-345541 targets inhibitor of κ B kinase and induces apoptosis in melanoma: involvement of nuclear factor κ B and mitochondria pathways. *Clin Cancer Res* 12:950-960.
- Yang J, Richmond A. 2001. Constitutive I κ B kinase activity correlates with nuclear factor- κ B activation in human melanoma cells. *Cancer Res* 61:4901-4909.
- Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Ea CK, Cheng AL. 2002. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF κ B activation. *Biochem Pharmacol* 63:1423-1430.
- Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL, Koeffler HP. 2005. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 24:344-354.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Schön für die Vergabe des Themas und die freundliche Begleitung und Unterstützung bedanken, die ich während des ganzen Projekts erhalten habe. Durch sein Wirken konnte dir Arbeit zügig publiziert werden, wofür ich mich ausdrücklich bedanke. Herrn Prof. Dr. Rosenwald danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Margarete Schön, die diese Arbeit betreut hat und die stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Vor allem das Diskutieren neuer Ergebnisse und ihre motivierende Worte waren für das Weiterkommen entscheidend. Beiden danke ich für die Mithilfe beim Verfassen dieser Arbeit.

Was den praktischen Teil der Arbeit angeht, bin ich Frau Helga Sennefelder zu tiefem Dank verpflichtet: Sie führte mich sorgfältig in die Laborarbeit ein und war mir auch später bei der Durchführung der Experimente eine große Hilfe.

Außerdem möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern der damaligen AG Schön im Rudolf-Virchow-Zentrum, namentlich Dr. Stephanie Schlickum, Dr. Katrin Wallbrecht, Dr. Kai Michaelis sowie Luise Erpenbeck bedanken. Es herrschte eine nette Arbeitsatmosphäre und jeder einzelne stand mir bei Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Ein letzter Dank gilt meinen Eltern, ohne die mir das Medizinstudium und die Promotion nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Katharina Maria Amschler

geb. am 10. Juli 1983 in Schweinfurt

SCHULABSCHLUSS UND STUDIUM

- 1994-2003 Alexander-von-Humboldt Gymnasium, Schweinfurt
- 09/2003-
05/2010 **Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg**
- 09/2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 05/2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

FORSCHUNG & FAMULATUREN

- 03/2006 Famulatur in der **Anästhesie** an der Uniklinik Würzburg
- 08/2006-08/2008 **Dissertationsarbeit am Rudolph-Virchow-Zentrum** in Würzburg
- 08/2007 klinisch-theoretische Famulatur am **Rudolph-Virchow-Zentrum**
- 04/2008 Famulatur in der **Neurologie** am Juliusspital in Würzburg
- 09/2008 Famulatur in der Inneren Medizin/ **Kardiologie** am Chelsea and Westminster Hospital in London

PRAKTISCHES JAHR

- 02-06/2009 **Universität Würzburg**, Terial Chirurgie
- 06-10/2009 **Universität Würzburg**, Terial Dermatologie
- 10/2009-01/2010 **Klinikum Aschaffenburg**, Terial Innere Medizin

Würzburg, im September 2010