

# Proapoptotische Strategien gegen Melanomzellen

## Proapoptotic Strategies against Melanoma Cells

### Autoren

J. Eberle, B. M. Kurbanov

### Institut

Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
HTCC – Haut Tumor Centrum Charité

### Bibliografie

DOI 10.1055/s-2006-944873  
Akt Dermatol 2006; 32;  
474–480 © Georg Thieme  
Verlag KG Stuttgart · New York  
ISSN 0340-2541

### Korrespondenzadresse

**PD Dr. rer. nat. Jürgen Eberle**  
Charité – Universitätsmedizin  
Berlin  
Klinik für Dermatologie,  
Venerologie und Allergologie  
HTCC – Haut Tumor Centrum  
Charité  
Campus Benjamin Franklin  
Hindenburgdamm 30  
12203 Berlin  
juergen.eberle@charite.de

### Zusammenfassung

Die Apoptose stellt einen grundlegenden Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dar. Intrinsische proapoptotische Signalwege werden durch p53 induziert und greifen insbesondere auf der Ebene der Mitochondrien an. Demgegenüber basiert die extrinsische Induktion der Apoptose maßgeblich auf der Bindung von Todesliganden (TNF-alpha, CD95L/FasL, TRAIL) an ihre Rezeptoren sowie auf der Induktion der Caspasen-Kaskade. Für die Tumorprogression sowie für die Therapieresistenz maligner Tumoren ist die Inaktivierung proapoptotischer Signalwege eine notwendige Voraussetzung. So wurden auch verschiedene Mechanismen der Apoptoseresistenz für das im hohen Maße therapieresistente maligne Melanom identifiziert. Ziel verschiedener neuer Therapiekonzepte gegen Krebs ist daher insbesondere die

Überwindung dieser Apoptoseresistenz, wobei Todesliganden wichtige Hoffnungsträger darstellen. Insbesondere TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) hat aufgrund seiner hohen selektiven Effektivität gegen Tumorzellen bereits Eingang in klinische Studien gefunden. Das maligne Melanom war hierbei allerdings bisher weitgehend ausgeschlossen. TRAIL bindet an die zwei agonistischen Todesrezeptoren TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5. Neue Befunde an Melanomzelllinien und Biopsien von Melanom-Primärtumoren zeigten, dass TRAIL in Melanomzellen über DR4 sehr effizient Apoptose induzieren kann und dass die Mehrzahl der Primärmelanome den DR4 stark exprimieren. Apoptose-gestützte Strategien stellen einen wichtigen Schritt zur Entwicklung effektiver Tumorthérapien dar, und TRAIL könnte sich zu einer viel versprechenden Therapieoption auch beim malignen Melanom entwickeln.

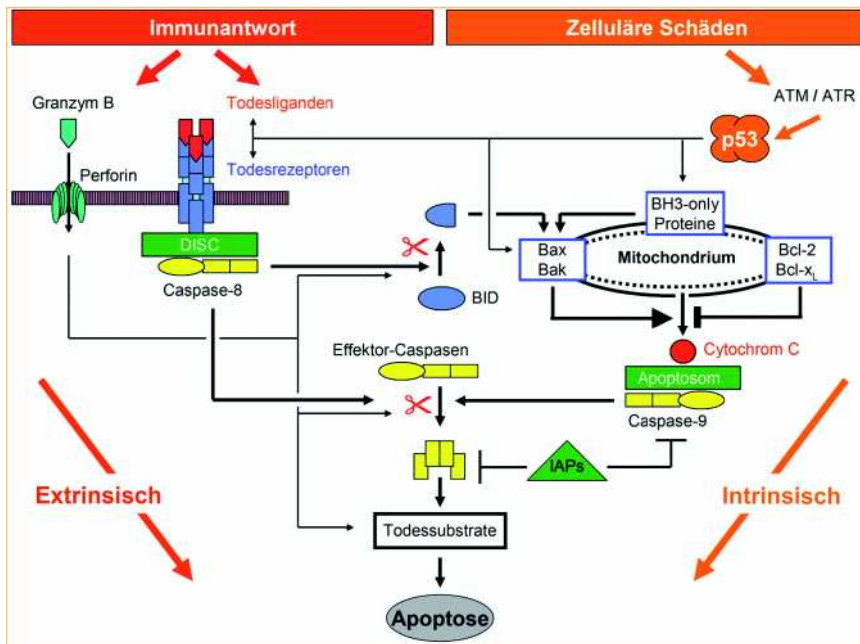
### Apoptose als ein Kontrollmechanismus der zellulären Homöostase

Für die Funktion des menschlichen Organismus ist die umfassende Regulation der Aktivitäten seiner Billionen von Einzelzellen eine unabdingbare Voraussetzung. Dabei wirkt eine noch unüberschaubare Zahl an molekularen Regulatoren mit, wie Zytokine, Rezeptoren, Kinasen, Signalproteine und Transkriptionsfaktoren. Insbesondere geht es um die Regulation von Zellteilung, Differenzierung und der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Die Apoptose ist somit ein elementarer Prozess in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase [46].

Die besondere Morphologie der Apoptose und ihre prinzipielle Unterscheidung von der Nekrose, dem „Unfalltod der Zelle“, wurden erstmals 1972 beschrieben [32]. Die morphologischen Veränderungen betreffen die Chromatinkonden-

sation, Zellschrumpfung und die Bildung apoptotischer, von Membranen umschlossener Zellfragmente (apoptotic bodies). Darüber hinaus sind eine Reihe von charakteristischen biochemischen Veränderungen zu verzeichnen, darunter die DNA-Fragmentierung. Demgegenüber bleibt die Membran-Integrität erhalten.

Auf verschiedene exogene und endogene Signale stellt die Apoptose die adäquate physiologische Antwort dar. Insbesondere auch Krebszellen sind diversen proapoptotischen Signalen ausgesetzt. Diese entstehen einerseits aufgrund von vielfältigen zellulären Fehlregulationen und chromosomalen Aberrationen in den Krebszellen sowie andererseits aufgrund des Angriffs zytotoxischer T-Lymphozyten im Rahmen der Immunantwort gegen den Tumor [24]. Daher ist die Inaktivierung apoptotischer Signalwege als eine notwendige Voraussetzung für die Tumorprogression anzusehen. Während zelluläre Schäden, auch



**Abb. 1** Proapoptische Signalwege. DISC: death-inducing signaling complex; IAPs: Inhibitoren der Apoptose. Weitere Erläuterungen im Text.

solche nach Chemotherapie, vornehmlich intrinsische Apoptosewege über p53 aktivieren [20], werden durch Immunzellen vornehmlich extrinsische Apoptosewege über die Todesliganden CD95L, TRAIL und TNF- $\alpha$  sowie über die Protease Granzyme B aktiviert [49].

### Signalwege der Apoptose

Proapoptische Signalwege besitzen weit reichende Konsequenzen für das Schicksal der Einzelzellen und das betroffene Gewebe und sind daher mehrfach abgesichert und gegenreguliert (Abb. 1). Gerade diese für das Überleben der normalen Zellen notwendige Option zur Gegenregulation beinhaltet vielfältige Möglichkeiten für Tumorzellen, der Apoptose zu entkommen.

Intrinsische proapoptische Signalwege greifen auf der Ebene der Mitochondrien an. Nach Auftreten von zellulären Schäden werden verschiedene Kinasen wie ATM (ataxia telangiectasia-mutated) und ATR (ATM- and rad3-related) aktiviert. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53 durch diese Kinasen führt zu seiner Stabilisierung und zur Transkriptionsaktivierung verschiedener Gene, darunter proapoptische Bcl-2-Proteine (B-cell lymphoma 2) wie Bax, Bik/Nbk, Noxa und PUMA [20]. Diese sind als Gegenspieler zu den antiapoptischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> zu sehen und induzieren die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen ins Zytosol [5]. Das dabei freigesetzte Cytochrom C initiiert im Zytosol die Bildung eines Multiproteinkomplexes (das Apoptosom), in dem die Initiatorcaspase-9 aktiviert wird. Caspasen (Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen) spalten ihre Zielproteine jeweils nach der Aminosäure Aspartat und führen grundlegende Funktionen in der Regulation der Apoptose aus [39].

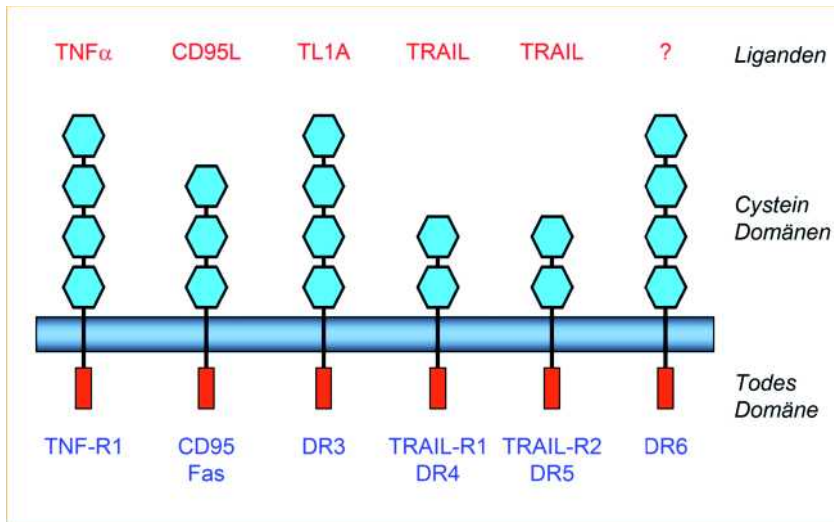
Charakteristisch für die extrinsische Induktion der Apoptose durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen ist die Sezernierung der Protease Granzyme B sowie der „Todesliganden“ TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor), CD95L (CD95/Fas-Ligand) und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Ihre Bindung an „Todesrezeptoren“ führt zur Rezeptor-Oligomerisierung und

Ausbildung eines membrangebundenen Proteinkomplexes (DISC: death-inducing signaling complex) unter Einbeziehung von FADD (Fas-associated death domain) und der Initiatorcaspase-8. Durch das Zusammenbringen der Caspase-Moleküle in räumlicher Nähe (induced proximity) oder durch autokatalytische Proteolyse wird hier die Caspase-8 aktiviert [43]. Zur Familie der Todesrezeptoren, einer Unterfamilie der TNF-Rezeptoren, gehören TNF-Rezeptor I, CD95/Fas, die TRAIL-Rezeptoren I und II (DR4, DR5) sowie die Todesrezeptoren 3 und 6 (DR3/TRAMP; DR6; Abb. 2). Querverbindungen zwischen extrinsischen und intrinsischen proapoptischen Signalwegen bestehen in der Aktivierung der Transkription von Todesliganden und ihren Rezeptoren durch p53 sowie in der durch Caspase-8 vermittelten Spaltung und Aktivierung des proapoptischen Bcl-2-Proteins Bid. Dieses wechselt darauf in die mitochondriale Membran und aktiviert dort über Bax und Bak den mitochondrialen Signalweg.

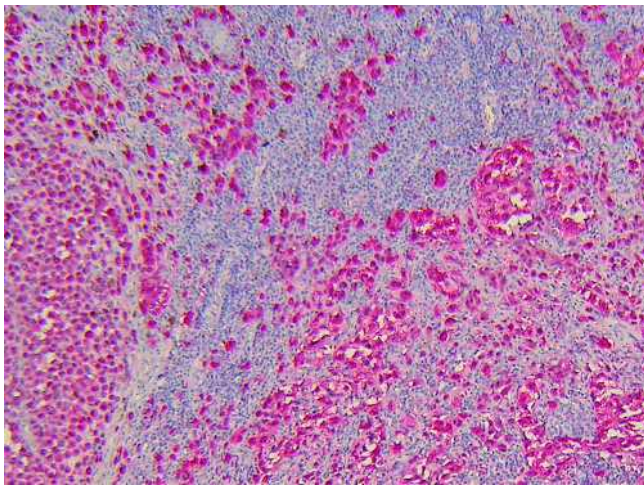
In der Endphase konvergieren beide Signalwege, wobei die aktivierten Initiatorcaspasen -8 und -9 nun Effektorcaspasen wie die Caspase-3, -6 und -7 durch proteolytische Spaltung aktivieren können. Ziele der Effektorcaspasen sind eine große Zahl an zellulären Proteinen (Todessubstrate), darunter DNAsen, DNA-Reparaturenzyme und diverse Struktur- wie Signalmoleküle, was schließlich die Apoptose unwiderruflich ins Werk setzt [12]. Die von zytotoxischen T-Lymphozyten sezernierte Protease Granzyme B greift auf mehreren der hier dargestellten Schritte an und führt so zur Apoptoseinduktion in den Zielzellen. So wurde gezeigt, dass das durch Mithilfe von Perforin in die Zielzelle gelangende Granzyme B ähnlich den Caspasen sowohl Bid als auch Caspase-3 und ICAD spalten kann [49].

### Apoptoseresistenz von Melanomzellen

Das maligne Melanom stellt aufgrund seiner ausgeprägten Therapieresistenz, der in den letzten Jahrzehnten stetig angestiegenen Inzidenz und seiner ungebrochen hohen Mortalität eine der größten Herausforderungen für den Dermatologen dar. Tumorzellen zeichnen sich durch vielfache genetische Veränderungen



**Abb. 2** Todesrezeptoren und ihre Liganden. Dargestellt sind sechs bekannte Todesrezeptoren mit ihrer Proteindomänenstruktur (extrazelluläre Cystein-domänen, Transmembrandomäne und intrazelluläre Todesdomäne) sowie darüber namentlich aufgelistet die an diese Rezeptoren bindenden Todesliganden. Der Ligand für Todesrezeptor 6 (DR6) ist noch unbekannt. An die Todesdomäne binden intrazellulär die Proteine des DISC (death-inducing signaling complex).



**Abb. 3** Immunogenität des malignen Melanoms. Gezeigt ist ein massives lymphozytäres Tumordinfiltrat in einem malignen Melanoms nach immunhistologischer Anfärbung. Die Melanomzellen sind rot angefärbt, die kleineren Lymphozyten erscheinen grau.

und zelluläre Dysfunktionen aus, was in normalen Zellen zu einer Aktivierung der intrinsischen Apoptosewege führen sollte. Darüber hinaus besitzen die Tumorzellen veränderte Proteine, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden können und so zur Auslösung einer Immunantwort gegen den Tumor führen können. Bezeichnenderweise ist das maligne Melanom ein immunologisch hoch reaktiver Tumor wie an den häufig zahlreichen, den Tumor infiltrierenden Lymphozyten leicht zu erkennen ist (Abb. 3). Eine weit reichende Blockierung der Apoptose erscheint somit als notwendige Voraussetzung für das Tumorstadium.

Grundlage der Apoptoseresistenz sind Defekte in den pro- und antiapoptotisch wirkenden Signalwegen. Bei epithelialen Tumoren stehen Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 im Vordergrund und korrelieren mit einer ungünstigen Prognose [20]. Obwohl p53-Mutationen beim Melanom eher selten vorkommen, gibt es auch hier Indizien für eine Inaktivierung des betreffenden Signalweges [33,50]. Eine Blockierung des mitochondrialen Weges könnte auch auf der Ebene des Adapterproteins Apaf-1 bestehen, für das in vielen Melanom-Zelllinien ein Ver-

lust der Heterozygotie (LOH) sowie DNA-Methylierung des verbliebenen Allels beschrieben wurde [55].

Die proapoptotischen Apoptosewege laufen auf der Ebene der Effektorcaspasen zusammen (Abb. 1). Hier greifen zelleigene Proteininhibitoren, IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) an. In Melanom-Zelllinien, Melanommetastasen und auch in invasiven Primärtumoren fand sich hohe Expression von *Survivin*, einem Inhibitor der Effektor-Caspasen 3 und 7, [16]. Auch fand sich in einigen Melanomzelllinien Expression von *Livin/ML-IAP*, einem Inhibitor der Caspase-9 [29,40].

Für eine Blockierung extrinsischer Signalwege spricht die in Melanomzellen und in Melanommetastasen hohe Expression von cFLIP (flice-inhibitory protein), ein kompetitiver Inhibitor der Caspase-8 [25]. Eine weitere Möglichkeit zur Blockierung der extrinsischen Signalwege liegt in der Herabregulation oder Mutation der Todesrezeptoren, was relativ häufig in hämatologischen wie in soliden Tumoren anzutreffen ist [38].

Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre wiesen auf eine besondere Bedeutung des mitochondrialen Signalweges in Melanomzellen hin [23,44]. Die Bcl-2-Proteine als wichtige Regulatoren dieses Signalweges erscheinen somit von besonderer Bedeutung für die Apoptoseregulation in Melanomzellen. Typisch für Melanome ist die hohe Expression von Bcl-2 [18] sowie von Bcl-x<sub>L</sub> [21]. Als kritischer Faktor für die Apoptosensitivität von Melanomzellen erwies sich das Expressionsverhältnis von pro- zu anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen [45].

Schließlich gehen verschiedene antiapoptotische Programme auf die Aktivitäten der Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie (nuclear factor-kappaB) zurück, die neben essentiellen proinflammatorischen Funktionen auch die Expression antiapoptotischer Faktoren aus den Familien der Bcl-2-Proteine sowie der IAPs regulieren [8].

### Strategien zur Überwindung der Apoptoseresistenz beim malignen Melanom

Die Mehrzahl der zytotoxischen und hormonellen Therapiekonzepte sowie die Strahlentherapie zielen schließlich darauf ab, Krebszellen durch Induktion der Apoptose zu eliminieren. Dementsprechend kann die Inaktivierung apoptotischer Signalwege auch die Ursache für Resistenzen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie darstellen [53]. Gerade die ausgeprägte klinische



Chemotherapie-Resistenz des Melanoms lässt auf eine Blockierung der Apoptose-Programme in Melanomzellen schließen [56]. Ziel verschiedener neuer Therapiekonzepte gegen Krebs ist deshalb insbesondere die Überwindung der Apoptoseresistenz in den Tumorzellen [13,46].

Die hohe Bcl-2-Expression in Melanomzellen war Anlass für therapeutische Strategien unter Verwendung von antisense-Molekülen gegen Bcl-2 (Oblimersen). Diese zeigten in-vitro sowie in Tierexperimenten ein hohes anti-Tumor Potential und befinden sich in der klinischen Erprobungsphase [27,34]. Erste publizierte Ergebnisse konnten allerdings bisher keine entscheidenden Verbesserungen im Krankheitsverlauf beim metastasierten Melanom belegen [13].

Komplementär zur Herabregulation von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen ist die Überexpression von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen. Dieser Ansatz zeigte sich in vitro sowie in Tiermodellen geeignet zur effizienten Induktion von Apoptose in Melanomzellen sowie zur Sensitivierung für Chemotherapeutika [21,22,42]. Die wichtige Rolle des mitochondrialen Signalweges und der proapoptotischen Bcl-2-Proteine für die Apoptoseregulation in Melanomzellen wurde weiter durch immunhistologische Befunde unterstrichen, die zeigten, dass ein Verlust der proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak in primären Melanomen mit verschlechterten Prognose der Patienten korreliert ist [11]. Neue Strategien unter Verwendung von Peptiden sowie natürlich vorkommenden Proteinen mit Homologie zur proapoptotischen BH3-Domäne der Bcl-2-Proteine werden als mögliche Therapieoptionen diskutiert [13].

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B für die Apoptoseresistenz von Tumorzellen ist die Basis für therapeutische Strategien unter Verwendung von Proteasom-Inhibitoren, die den Abbau des Inhibitors von NF- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) verzögern [59]. Dadurch wird die durch NF- $\kappa$ B gesteuerte Expression von antiapoptotischen Faktoren unterbunden. Diese durch NF- $\kappa$ B transkriptionell aktivierten Faktoren schließen antiapoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl- $x_L$  sowie Caspase-Inhibitoren wie cIAP-1, cIAP-2, XIAP als auch cFLIP ein [28]. Proteasom-Inhibitoren befinden sich bereits für einige Tumoren in der klinischen Erprobungsphase [47]. In vitro sowie im Mausmodell konnte der Antitumor-Effekt solcher Inhibitoren auch beim Melanom bereits demonstriert werden [1].

Schließlich gelten Todesliganden als wichtige Hoffnungsträger für künftige therapeutische Konzepte gegen Krebs. In seiner Bedeutung für die Apoptoseregulation in Melanomzellen wurde das CD95-Signalsystem bisher kontrovers diskutiert [3,17]. Die Überexpression von CD95L erwies sich aber als eine effiziente Strategie zur Induktion von Apoptose in Melanomzellen sowohl in vitro als auch in Melanom-Mausmodellen [9]. Insbesondere auch der Vergleich mit anderen Tumorzelllinien belegte eine besondere Sensitivität von Melanomzellen gegenüber diesem Todesliganden. Eine selektive Apoptoseinduktion in Melanomzellen konnte durch eine über den Tyrosinasepromotor gesteuerte Expression des CD95L erreicht werden, wichtige Voraussetzung für mögliche gentherapeutische Weiterentwicklungen dieses Systems [10].

## Therapeutische Konzepte unter Verwendung von TRAIL



Die pharmakologische, nicht selektive Applikation von CD95L erscheint allerdings aufgrund von in Tiermodellen zu beobachtenden massiven Nebenwirkungen, wie insbesondere Leber-Toxizität, derzeit nicht möglich [41]. Ähnlich ungünstig erscheint eine generalisierte, pharmakologische Verwendung des Todesliganden TNF- $\alpha$  aufgrund von massiven, durch TNF- $\alpha$  induzierten Entzündungsreaktionen [2]. Allerdings wurde TNF- $\alpha$  bei der isolierten Extremitätenperfusion für multiple regionale Melanommetastasen teilweise erfolgreich eingesetzt [48]. Die Probleme der systemischen Toxizität scheinen demgegenüber für den dritten Todesliganden TRAIL nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Fünf TRAIL-Rezeptoren wurden identifiziert, wobei TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 als agonistische Todesrezeptoren parallel zu CD95 die Caspasen-Kaskade sowie, abhängig vom Zelltyp, den mitochondrialen Signalweg, MAP-Kinasen und NF- $\kappa$ B aktivieren können [6,7]. Demgegenüber sind die TRAIL-Rezeptoren DcR1, DcR2 und OPG antagonistisch. Sie führen nicht zu einer Weiterleitung der Signalkaskade und unterdrücken so das Todessignal. Die proapoptotische Signalkaskade schließt Rezeptor-Oligomerisierung, Bildung des DISC (death-inducing signalling complex), Aktivierung von Initiatorcaspasen, Spaltung von Effektorcaspasen und schließlich DNA-Fragmentierung ein [61].

Die besondere Signifikanz von TRAIL für therapeutische Erwägungen beruht auf seiner Eigenschaft, Apoptose bevorzugt in Tumorzellen zu induzieren, während viele nicht-maligne Zellen nicht oder weniger sensitiv auf TRAIL reagierten [37,63]. Bezeichnenderweise wird TRAIL auch von verschiedenen normalen Gewebszellen exprimiert, was nur mit einer relativ guten Verträglichkeit normaler Zellen vereinbar ist [62].

Auch in Tiermodellen resultierte die Behandlung mit TRAIL als Einzeltherapie oder in Kombination mit Chemotherapeutika in einer Suppression des Tumorwachstums ohne ersichtliche Zeichen von systemischer Toxizität. So zeigte sich das hohe Potential von TRAIL in Mäusen und in Primaten, wenn es einzeln oder in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht wurde. Unterdrückung des Wachstums von Tumoren in diesen Modellen ohne Hinweise auf systemische Toxizität qualifizierten TRAIL als einen vielversprechenden Kandidaten für Tumorthapien [37,51,60]. Darüber hinaus belegten Experimente mit TRAIL-defizienten Mäusen (knockout) seine tragende Rolle auch in der körpereigenen Tumorabwehr durch Immunzellen [4,54].

Zur selektiven Aktivierung jeweils eines einzelnen der zwei agonistischen TRAIL-Rezeptoren wurden rekombinante TRAIL-Derivate sowie agonistische monoklonale DR4- und DR5-Antikörper entwickelt und als vergleichbar effizient in Mäusen getestet [31,58]. Seine Selektivität gegenüber Tumorzellen ermutigten zu verschiedenen klinischen Studien unter Verwendung von TRAIL oder von agonistischen Antikörpern gegen TRAIL-Rezeptoren bei Patienten mit Lungenkrebs, Non-Hodgkin-Lymphom und kolorektalem Karzinom, deren Ergebnis mit großer Hoffnung erwartet wird [13].

## TRAIL-Sensitivität und Expression der TRAIL-Rezeptoren in Melanomzellen

Die Verwendung von TRAIL als Anti-Tumor-Therapie beruht auf der Funktionalität der entsprechenden agonistischen Rezeptoren. Entgegen den Befunden bei epithelialen Tumoren mit vorherrschender Rolle des DR4 [30,57] wurde bisher für Melanomzellen angenommen, dass ihre Sensitivität für TRAIL insbesondere von der Aktivität des DR5 abhängt. Die biologische Signifikanz des DR4 wurde dagegen vernachlässigt [19,65].

Unsere Untersuchungen an Melanomzelllinien zeigten dem gegenüber, dass DR4 ein entscheidender Regulator für die TRAIL-Sensitivität in Melanomzellen ist. Während DR5 konsistent in Melanom-Zelllinien exprimiert war, fand sich signifikante Expression von DR4 zwar nur in nur 2/7 Zelllinien, doch zeichneten sich die DR4-positiven Melanomzellen durch hohe Sensitivität gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose aus. Demgegenüber zeigten DR5-Zellen (DR4-negativ) eine verminderte und zeitlich verzögerte Antwort (2/7 Zelllinien) oder waren komplett resistent (3/7 Zelllinien). Die Verwendung von selektiven DR4/DR5 blockierenden Antikörpern belegte zweifelsfrei die vorherrschende Rolle des DR4 auch in den Melanomzellen, die beide Rezeptoren exprimierten [36].

Die Bedeutung dieser Befunde für die In-vivo-Situation zeigte sich aufgrund von immunhistochemischen Untersuchungen. Diese belegten erstmals eine signifikante Expression beider Rezeptoren in der überwiegenden Mehrzahl von Primärmelanomen. Diese Befunde lassen auf eine hohe Eignung von TRAIL auch für therapeutische Strategien beim Melanom hoffen [36].

## Ursachen für Resistenzen gegen TRAIL

Allerdings erscheint das relativ häufige Auftreten von Resistenzen gegen TRAIL problematisch für die Entwicklung effizienter Therapien [61]. Als Ursachen für die Resistenz gegen TRAIL wurden verstärkte Expression von antiapoptotischen Faktoren wie c-FLIP, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) vorgeschlagen [64]. Da der Transkriptionsfaktor NF-κB von TRAIL aktiviert wird und seinerseits die Transkription verschiedener dieser antiapoptotischen Proteine steuert, wurde eine entscheidende Rolle von NF-κB für die Resistenz gegen TRAIL angenommen [14,26].

Unsere Untersuchungen zeigten jedoch in Melanomzellen keinen direkten Zusammenhang zwischen TRAIL-Resistenz und der durch TRAIL induzierten Aktivierung von NF-κB sowie der Expression antiapoptotischer Faktoren. Vielmehr ergaben sich in einem Melanom-Zellkulturmodell für TRAIL-Resistenz deutliche Hinweise auf eine Bedeutung der Herabregulation von proapoptotischen Faktoren wie den Initiatorcaspasen und des DR4 für die TRAIL-Resistenz.

## Apoptose-gestützte Therapien

Derzeit wird eine große Zahl von neuen therapeutischen Konzepten entwickelt und befindet sich auf der Stufe der klinischen Anwendung. Diese neuen Konzepte schließen verschiedene proapoptotische Strategien ein [13,46]. Neben den vorgenannten Strategien der Blockierung der Bcl-2-Expression und der Blockierung der NF-κB-Aktivierung sind hier insbesondere die Untersuchungen mit TRAIL relativ weit gediehen.

Aufgrund früherer Einschätzungen erschien allerdings die Verwendung von TRAIL beim Melanom eher weniger viel versprechend. Dies beruhte insbesondere auf einer Unterschätzung der Bedeutung des DR4 für die TRAIL-induzierte Apoptose in Melanomzellen. Die kürzlich erhobenen Befunde der Expression von DR4 in Primärmelanomen und der hohen Effizienz der über DR4 vermittelten Apoptose in Melanomzellen lassen TRAIL und insbesondere auf DR4 basierende Strategien als besonders aussichtsreich mit Hinblick auf neue Therapieansätze beim Melanom erscheinen.

Einer TRAIL-Resistenz auf der Basis einer Herabregulation des DR4 oder der Initiatorcaspasen könnte mit kombinierten Behandlungsstrategien begegnet werden. So wurde gezeigt, dass die TRAIL-Todesrezeptoren nach Chemotherapie hoch reguliert werden [52], während die Expression von Caspasen durch Interferon-γ gesteigert werden konnte [15]. Weitere, intensive Forschung wird nötig sein, um geeignete Bedingungen zu entwickeln, die schließlich erfolgreiche therapeutische Ansätze für das maligne Melanom auf der Basis von TRAIL oder von anderen proapoptotischen Faktoren ermöglichen. Erste Erfolge sprechen aber dafür, dass Apoptose-gestützte Strategien einen wichtigen Schritt zur Entwicklung effektiver Tumortherapien darstellen können.

## Danksagung

Die Arbeit wurde gefördert durch die Berliner Stiftung für Dermatologie, die Deutsche Krebshilfe und die Islamische Bank für Entwicklung.

## Abstract

### Proapoptotic Strategies against Melanoma Cells

Apoptosis represents a basic mechanism for maintenance of cellular homeostasis. Intrinsic proapoptotic pathways are induced by p53 and employ especially the mitochondrial level. In contrast, the extrinsic induction of apoptosis is based on the binding of death ligands (TNF-alpha, CD95L/FasL, TRAIL) to their respective receptors and on induction of the caspase cascade. For tumor progression and for therapy resistance of malignant tumors, the inactivation of proapoptotic pathways is a prerequisite. Thus, several mechanisms of apoptosis resistance have been identified for the highly therapy resistant malignant melanoma. Therefore many new anti-cancer concepts aim especially to overcome this apoptosis resistance, and death ligands may supply promising strategies. Especially with TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) several clinical studies have been initiated because of its high and selective efficiency against tumor cells. However, these studies so far largely excluded melanoma. TRAIL binds the two agonistic death receptors TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5. New data on melanoma cell lines and biopsies revealed that TRAIL can efficiently induce apoptosis in melanoma cells via DR4, and the majority of primary melanomas do express DR4. Apoptosis-based strategies represent an important step in development of tumor therapies, and TRAIL may evolve into a promising therapeutic option also for melanoma.

## Literatur

- 1 Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A. Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 2004; 64: 4912–4918
- 2 Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420–430
- 3 Chappell DB, Zaks TZ, Rosenberg SA, Restifo NP. Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res* 1999; 59: 59–62
- 4 Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168: 1356–1361
- 5 Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 2003; 39: 73–88
- 6 Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001; 15: 1022–1032
- 7 Di Pietro R, Zauli G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* 2004; 201: 331–340
- 8 Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446: 475–482
- 9 Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Wieder T, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* 2003; 22: 9131–9141
- 10 Fecker LF, Geilen CC, Hossini AM, Schwarz C, Fechner H, Bartlett DL, Orfanos CE, Eberle J. Selective induction of apoptosis in melanoma cells by tyrosinase promoter-controlled CD95 ligand overexpression. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 221–228
- 11 Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM, Schwarz C, Daniel PT, Eberle J. Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1366–1371
- 12 Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10: 76–100
- 13 Fischer U, Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 2005; 12: 942–961
- 14 Franco AV, Zhang XD, Van Berkel E, Sanders JE, Zhang XY, Thomas WD, Nguyen T, Hersey P. The role of NF- $\kappa$ B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* 2001; 166: 5337–5345
- 15 Fulda S, Debatin KM. 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN- $\gamma$  cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene* 2006; Epub ahead of print
- 16 Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1076–1081
- 17 Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363–1366
- 18 Hakansson A, Gustafsson B, Abdiu A, Krysanter L, Hakansson L. Bcl-2 expression in metastatic malignant melanoma. Importance for the therapeutic efficacy of biochemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 249–254
- 19 Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 142–150
- 20 Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 177–181
- 21 Hossini AM, Eberle J, Fecker LF, Orfanos CE, Geilen CC. Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts. *FEBS Lett* 2003; 553: 250–256
- 22 Hossini AM, Geilen CC, Fecker LF, Daniel PT, Eberle J. A novel Bcl-x splice product, Bcl-xAK, triggers apoptosis in human melanoma cells without BH3 domain. *Oncogene* 2006; 25: 2160–2169
- 23 Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 2003; 199: 275–288
- 24 Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277–288
- 25 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190–195
- 26 Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 3152–3161
- 27 Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, van Elsas A, Muller M, Wolff K, Eichler HG, Pehamberger H. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* 1998; 4: 232–234
- 28 Karin M, Greten FR. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749–759
- 29 Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238–3246
- 30 Kazhdan I, Marciniak RA. Death receptor 4 (DR4) efficiently kills breast cancer cells irrespective of their sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Cancer Gene Ther* 2004; 11: 691–698
- 31 Kelley RF, Totpal K, Lindstrom SH, Mathieu M, Billeci K, Deforge L, Pai R, Hymowitz SG, Ashkenazi A. Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 2205–2212
- 32 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239–257
- 33 Kichina JV, Rauth S, Das Gupta TK, Gudkov AV. Melanoma cells can tolerate high levels of transcriptionally active endogenous p53 but are sensitive to retrovirus-transduced p53. *Oncogene* 2003; 22: 4911–4917
- 34 Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12: 193–213
- 35 Kurbanov BM, Fecker LF, Geilen CC, Sterry W, Eberle J. Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF- $\kappa$ B but is related to downregulation of initiator caspases and DR4. Submitted 2006
- 36 Kurbanov BM, Geilen CC, Fecker LF, Orfanos CE, Eberle J. Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Invest Dermatol* 2005; 125: 1010–1019
- 37 LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003; 10: 66–75
- 38 Li-Weber M, Krammer PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* 2003; 15: 145–157
- 39 Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 2001; 22: 31–34
- 40 Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, Drize O, Kadouri L, Lotem M, Peretz T, Mandelboim O, Ben Yehuda D. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 6340–6349
- 41 Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993; 364: 806–809
- 42 Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J. Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk/Bik. *Oncogene* 2005; 24: 7369–7380
- 43 Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26–35
- 44 Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE, Geilen CC. Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 2000; 473: 27–32
- 45 Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 333–340
- 46 Reed JC, Pellicchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 2005; 106: 408–418
- 47 Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S, Wen PY, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Siegel DS, Irwin D, Schuster M, Srkalovic G, Alexanian R, Rajkumar SV, Limentani S, Alsina M, Orlowski RZ, Najarian K, Esseltine



- D, Anderson KC, Amato AA. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3113–3120
- 48 Rossi CR, Foletto M, Mocellin S, Pilati PL, Campana L, Ribello D, Lise M. TNF-based limb perfusion for cutaneous melanoma in transit metastases: suggestions for modification of the perfusional schedule. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; 22: 103–107
- 49 Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 323–370
- 50 Satyamoorthy K, Chehab NH, Waterman MJ, Lien MC, El Deiry WS, Herlyn M, Halazonetis TD. Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells. *Cell Growth Differ* 2000; 11: 467–474
- 51 Shankar S, Chen X, Srivastava RK. Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* 2005; 62: 165–186
- 52 Singh TR, Shankar S, Chen X, Asim M, Srivastava RK. Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res* 2003; 63: 5390–5400
- 53 Sjoström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *BMJ* 2001; 322: 1538–1539
- 54 Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H. Nature's TRAIL – on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* 2003; 18: 1–6
- 55 Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207–211
- 56 Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22: 3138–3151
- 57 Strater J, Hinz U, Walczak H, Mechtersheimer G, Koretz K, Herfarth C, Moller P, Lehnert T. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3734–3740
- 58 Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H, Kojima Y, Hayakawa Y, Tanner JE, Sayers TJ, Seki N, Okumura K, Yagita H, Smyth MJ. Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy. *J Exp Med* 2004; 199: 437–448
- 59 Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6316–6325
- 60 Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 157–163
- 61 Wang S, El Deiry WS. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003; 22: 8628–8633
- 62 Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673–682
- 63 Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; 95: 777–783
- 64 Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 228–237
- 65 Zhang XY, Zhang XD, Borrow JM, Nguyen T, Hersey P. Translational control of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor expression in melanoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 10606–10614

## Buchbesprechung

### Atlas der Dermatologie (DVD-ROM)

T. L. Diepgen, M. Simon, A. Bittdorf, M. Fartasch, G. Schuler  
 Berlin: Springer, 2005 (in Englisch, Deutsch, Spanisch). 49,95  
 ISBN 3-540-00043-7

Die Autorengemeinschaft Diepgen, Simon, Bittdorf, Fartasch und Schuler legen die zweite Auflage der DVD-ROM vor, mit der wahlweise in Englisch, Deutsch oder Spanisch gearbeitet werden kann. Die Atlas CD-ROM funktioniert mit den üblichen Betriebssystemen, wenn ein Web-Browser installiert ist; falls nicht, kann er von der CD-ROM geladen werden. Nach der Sprachentscheidung gelangt man auf eine geführte Tour, auf der sich die Drei-Gliederung in alphabetisch geordnete Diagnosen, Lokalisation der Läsionen und Quiz erschließt. 600 Diagnosen stehen zur Verfügung, zu fast allen sind mehrere Bilder hinterlegt, insgesamt 4000. Beim Arbeiten im Abschnitt Lokalisation finden sich dann auch seltene Diagnosen, die im alphabetischen Diagnosenverzeichnis nicht gelistet sind. Im Quiz kann nicht nur die Diagnose aufgelöst werden, es kann auch zu einem Informationskasten mit Erläuterungen zur Diagnose gesprungen werden. Differenzialdiagnosen werden angeboten. Bilddetails können per Zoom vergrößert werden. Die Bilder haben gute Qualität, die Bibliographie ist kurz gehalten, die Handhabung gut zu verstehen und die Abfolge der Bilder oder Textkästen erfolgt schnell. Zielgruppe ist sicherlich der dermatologische Nachwuchs und dessen Lehrer, die kostenfrei zu Unterrichtszwecken Bilder herunterladen können. Gewerbliche Nutzer werden gebeten, einen Obolus zu entrichten. Im Ganzen liegt für Fachinteressierte aus der Dermatologie und Industrie ein modernes Bildarchiv vor. Der Quizteil lädt zum Knobeln ein und macht mindestens soviel Spaß wie Günther Jauchs „Millionen-Quiz“.

Christiane Bayerl, Wiesbaden