

Aus dem Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

***In vitro-Analyse von Proteasominhibitoren als
Grundlage potentieller Therapieoptionen beim
malignen Melanom***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von **Jonas Kulla**

aus Frankfurt (Oder)

Magdeburg, 21.11.2024

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Kulla, Jonas: *In vitro*-Analyse von Proteasominhibitoren als Grundlage potentieller Therapieoptionen beim malignen Melanom. - 2024. – 100 Bl., 37 Abb., 19 Tab.

Kurzreferat

Das Proteasom dient dem Abbau von Proteinen in der Zelle. Die Inhibition des Proteasoms führt durch die Beeinflussung zentraler zellulärer Prozesse und Akkumulation nicht funktionsfähiger Proteine zu proteotoxischem Stress bis zum Zelltod. Proteasominhibitoren werden aufgrund des hohen Proteinstoffwechsels in malignen Zellen zur Therapie des Multiplen Myeloms in der Hämatologisch-Onkologie eingesetzt. Proteasominhibitoren können zudem über die Stabilisierung des Inhibitors von NF- κ B die entzündliche Aktivität in Tumoren beeinflussen. Das maligne Melanom bietet als Neoplasie mit hohem Maß an Inflammation und Metastasierung einen vielversprechenden Angriffspunkt für Proteasominhibitoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Proteasominhibitoren auf Melanomzellen analysiert. Es konnte bestätigt werden, dass der Proteasominhibitor BSc2189 die Proteasomaktivität der β 5- sowie β 5i-Proteasomaktivität und der Proteasominhibitor ONX-0914 die Proteasomaktivität der β 5i-Untereinheit inhibiert. Die Analyse der Zytotoxizität von Proteasominhibitoren zeigte eine Reduktion der Viabilität in mehreren Melanomzelllinien. Die Analyse des Inhibitors BSc2189 erbrachte den Nachweis der Beeinflussung des Zellzyklus, des Zelltodes und der Inflammation bei nur geringer Wirkung auf Fibroblasten.

Die *in vitro*-Analysen der Proteasominhibitoren BSc2189 und ONX-0914 in Melanomzellen dienen als vielversprechender Ausgangspunkt für *in vivo*-Versuche sowie für *in vitro*-Kombinationen mit anderen Chemotherapeutika und Immunmodulatoren. Dadurch kann die Rolle von Proteasomen in Neoplasien besser verstanden und deren Inhibition möglicherweise in Zukunft verbessert klinisch eingesetzt werden.

Schlüsselwörter:

Proteasom, Immunoproteasom, Melanom, Proteasominhibitor, BSc2189, ONX-0914

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Einführung.....	13
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	13
1.2 Das Proteasom	13
1.3 Das Immunoproteasom	14
1.4 Proteasom-abhängige zelluläre Prozesse und Signalwege	15
1.5 Proteasominhibitoren	17
1.6 Das maligne Melanom.....	18
1.7 Resistenzen in der medikamentösen Krebstherapie	19
1.8 Einsatz von Proteasominhibitoren in Melanomzellmodellen	20
1.9 Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Gebrauchs- und Pufferlösungen.....	22
2.1.4 Kits	23
2.1.5 Zytokine und Proteine	24
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.7 Nukleotide	24
2.1.8 Antikörper.....	25
2.1.9 Proteasominhibitoren	25
2.1.10 Sonstiges	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Zelllinien und Zellkultivierung	27

2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.4	Proteasomaktivitätsbestimmung.....	35
2.2.5	Kristallviolett Assay	36
2.2.6	Scratch Assay	36
2.2.7	Zelltod-Methoden	37
2.2.8	FACS-Transporter-Analyse	37
2.2.9	Bodipy-BSc2189-Analyse.....	38
2.2.10	Zellzyklus-Analyse	38
2.2.11	Biomathematische Methodik und statistische Auswertung.....	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Analyse der Proteasomkomplexe in Melanomzellen.....	40
3.1.1	Proteasomaufbau in humanen Melanomzellen.....	40
3.1.2	Stimulation des Immunoproteasoms in humanen MeWo-Zellen	40
3.1.3	Nachweis eines funktionalen IFN γ -Signalweges in MeWo- und MeWo _{Eto} -Zellen	41
3.2	Analyse der inhibitorischen Aktivität der Proteasominhibitoren.....	42
3.2.1	Charakterisierung von Proteasominhibitoren anhand gereinigter Proteasomkomplexe.....	42
3.2.2	Inhibition zellulärer Proteasomen humaner MeWo-Zellen durch BSc2189 und Bortezomib	45
3.3	Untersuchung der Zellviabilität unter Behandlung mit Proteasominhibitoren	47
3.3.1	Änderung von Zellwachstum und -morphologie von Melanomzellen durch Behandlung mit Proteasominhibitoren	47
3.3.2	Viabilität humaner MeWo-Zellen unter Proteasominhibition.....	48
3.3.3	Viabilitätsreduktion humaner Melanomzellen durch ONX-0914	50
3.3.4	Viabilitätsreduktion von BRAF-Wildtyp und BRAF-mutierten humanen Melanomzellen durch BSc2189 und Bortezomib	51
3.3.5	Viabilitätsreduktion von BRAF-Inhibitor-resistenten Melanomzellen durch Proteasominhibitoren	52

3.4	Analyse des Zelltods durch BSc2189 in MeWo-Zellen	53
3.4.1	Untersuchung des Zelltods.....	53
3.4.2	Aktivierung der Caspase-3	53
3.5	Analyse der Beeinflussung des Zellzyklus durch BSc2189.....	55
3.6	Vergleich des Effluxes von Proteasominhibitoren durch MDR-Transporter in MeWo-Zellen	56
3.7	Einfluss von BSc2189 auf den NF-κB-Signalweg	57
3.8	Analyse der Beeinflussung muriner Melanomzellen durch Proteasominhibitoren ...	58
3.8.1	Expression von Immunoproteasom-Untereinheiten in murinen Melanomzelllinien.....	58
3.8.2	Analyse von IκB α in Hgf-Cdk4-Zelllinien.....	59
3.8.3	Analyse der Viabilität muriner Melanomzellen	59
3.9	Migrationsbeeinflussung von Melanomzellen durch BSc2189	61
4.	Diskussion.....	62
4.1	Proteasomkomplexe in den untersuchten Melanomzelllinien.....	62
4.2	Inhibition von Proteasom-Untereinheiten.....	63
4.3	Zytotoxizität von BSc2189 und ONX-0914 auf Melanomzellen.....	64
4.4	Metastasierungsbeeinflussung unter Behandlung mit BSc2189	65
4.5	Beeinflussung von Signalkaskaden durch BSc2189	65
4.6	Proteasominhibitoren und die Ausbildung von Resistenzen	66
4.7	Klinischer Einsatz von Proteasominhibitoren beim malignen Melanom.....	69
5.	Zusammenfassung.....	72
	Literaturverzeichnis	73
	Danksagung	97
	Ehrenerklärung.....	99
	Darstellung des Bildungsweges.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems	13
Abbildung 2 – 20S-Proteasom	14
Abbildung 3 – Strukturformeln der verwendeten Proteasominhibitoren.....	26
Abbildung 4 – Zellviabilität nach Behandlung mit Etoposid	29
Abbildung 5 – Zellviabilität von BRAF-Inhibitor-resistenten Ma-Mel-66a-Zellen	29
Abbildung 6 – Immunoproteasomen-Komplexe in unstimulierten humanen Melanomzelllinien	40
Abbildung 7 – Aufbau des Proteasomkomplexes in MeWo- und MeWo _{Eto} -Zellen	40
Abbildung 8 – Proteasom-PCR-Analyse	41
Abbildung 9 – IFNy-abhängiger Signalweg.....	41
Abbildung 10 – Proteasomaktivität gereinigter Proteasomkomplexe.....	42
Abbildung 11 – Proteasomaktivität mit ONX-0914	43
Abbildung 12 – Proteasomaktivitäten gereinigter Proteasomkomplexe mit ONX-0914	44
Abbildung 13 – Proteasomaktivität gereinigter Proteasomkomplexe mit BSc2189.....	44
Abbildung 14 – Proteasomaktivität gereinigter Melanom-Proteasomkomplexe mit BSc2189.	45
Abbildung 15 – Zelluläre Proteasomaktivität nach Behandlung mit BSc2189	45
Abbildung 16 – Proteasomaktivität nach 24h Behandlung mit BSc2189	46
Abbildung 17 – Zelluläre Proteasomaktivität nach Behandlung mit Bortezomib	46
Abbildung 18 – Proteasomaktivität nach Behandlung mit PI-083.....	47
Abbildung 19 – Morphologische Veränderung unter Behandlung mit Proteasominhibitoren ..	47
Abbildung 20 – Zellviabilität.....	48
Abbildung 21 – Zellviabilität nach Behandlung mit Bortezomib	49
Abbildung 22 – Zellviabilität humaner Melanomzellen nach Behandlung mit ONX-0914.....	50
Abbildung 23 – Viabilität von BRAF-Wildtyp und BRAF-mutierten humanen Melanomzelllinien.....	51
Abbildung 24 – Viabilität von BRAF-Inhibitor-resistenten Zelllinien	52

Abbildung 25 – Trypanblau-Zelltod-Assay	53
Abbildung 26 – Caspase-3-Induktion.....	53
Abbildung 27 – Nachweis der aktiven Caspase-3 nach Inkubation mit BSc2189	54
Abbildung 28 – Zellzyklus.....	55
Abbildung 29 – Chemotherapie-Resistenz-Analyse in MeWo- und MeWo _{Eto} -Zellen.....	56
Abbildung 30 – FACS-Analyse des Transports von BSc2189.....	57
Abbildung 31 – NF-κB-Beeinflussung in MeWo-Zellen	57
Abbildung 32 – Nachweis von Immunoproteasom-Untereinheiten in murinen Melanomzellen	58
Abbildung 33 – IκB α -Degradation und Stabilisation in murinen Hgf-Cdk4-Melanomzellen ...	59
Abbildung 34 – Viabilität von murinen B16-F10-Zellen	59
Abbildung 35 – Viabilität von Hgf-Cdk4-Zelllinien	60
Abbildung 36 – Scratch Assay	61
Abbildung 37 – Scratch Assay-Analyse	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	9
Tabelle 2: Geräte.....	21
Tabelle 3: Chemikalien	21
Tabelle 4: Lösungen und Puffer.....	22
Tabelle 5: Kits	23
Tabelle 6: Zytokine und Proteine	24
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 8: Primer (je 5'-3')	25
Tabelle 9: Antikörper bzw. durch Antikörper detektierte Proteine.....	25
Tabelle 10: Proteasominhibitoren	25
Tabelle 11: Weitere Materialien	26
Tabelle 12: Verwendete humane Melanomzelllinien.....	28
Tabelle 13: Weitere verwendete humane Zelllinien	30
Tabelle 14: Verwendete murine Melanomzelllinien.....	30
Tabelle 15: Stimulationen	31
Tabelle 16: Exemplarisches PCR-Schema für GAPDH-PCR.....	34
Tabelle 17: IC50 von MeWo- und MeWo _{Eto} -Zellen sowie Fibroblasten nach 48h Behandlung mit BSc2189.....	49
Tabelle 18: IC50 von BRAF-Wildtyp und BRAF-mutierten humanen Melanomzelllinien nach Behandlung mit BSc2189 und MG-132 für 48h	52
Tabelle 19: IC50 anhand der Viabilität von Hgf-Cdk4-Melanomzelllinien	60

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	ATP-binding-cassette
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Arg / Arg-Substrat	Fluorogenes Z-Val-Gly-Arg-AMC Substrat (für Trypsin-ähnliche Aktivität der $\beta 2/\beta 2i$ -Untereinheit der Proteasomen)
Bodipy	Boron-dipyrromethene (Fluorogener Farbstoff)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CdK	Cyclin-abhängige Kinase
ctrl	Kontrolle
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
Da	Dalton (1 D = g/mol)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat(e)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Substrat für verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
Eto	Etoposid
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung / Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FU	Fluoreszenzeinheiten / Fluorescence Unit
g	Gewichtskraft

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
Hgf	hepatozytärer Wachstumsfaktor
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IFNy	Interferon-gamma
IMKI	Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität-Magdeburg
IP	Immunoproteasom(en/s)
IP-UE	Immunoproteasom-Untereinheit(en) bzw. Immunoproteasom-Komplexe
IkB	Inhibitor von nuclear factor kappa B (NF-κB)
IkBα	NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) Inhibitor alpha
i. Z. m.	In Zusammenarbeit mit
JE6	Klon der Jurkat T-Zelllinie (leukämischer T-Zell Lymphoblast)
k	Kilo
LM	n-Dodecyl β-D-maltosid / Lauryl-β-D-maltoside
LMP2	low molecular weight protein 2 (IP-UE β1i)
LMP7	low molecular weight protein 7 (IP-UE β5i)
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDR	Multi Drug Resistance
MECL-1	Multicatalytic endopeptidase complex-like 1 (IP-UE β2i)
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MeWo	MeWo-Zellen
MeWo-/MeWo _{Eto} -Zellen	MeWo- und MeWo _{Eto} -Zellen

MeWo _{Eto} -Zellen	Etoposid-resistente humane MeWo-Melanomzellen
MFI	Mediane Fluoreszenz Intensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
mut.	mutiert
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHDF	Fibroblasten / normal human dermal fibroblasts
OvGU	Otto-von-Guericke-Universität
p / P-	Phosphat / Phospho-
P/S	Penicillin und Streptomycin (in gleichen Anteilen)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLX	PLX-4032 (Vemurafenib)
rel.	relative(n)
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten / Relative Fluorescence Unit
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
RPMI	Zellkulturmedium RPMI-1640
S	Sedimentationskoeffizient
s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
t	Zeit
TAP	Antigenpeptid-Transporter / transporter associated with antigen processing
TBS	Tris gepufferte Saline

TNF	Tumornekrosefaktor(en)
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr / Tyr-Substrat	Fluorogenes Suc-LL-Val-Tyr-AMC Substrat (für Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der β 5/ β 5i-Untereinheit der Proteasomen)
u. a.	unter anderem
UE	Untereinheit(en)
UVB	Ultraviolettstrahlung im Wellenlängenbereich von 280 bis 315nm
vs.	versus
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
zVg	zur Verfügung gestellt

1. Einführung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Proteasom ist ein ubiquitär vorkommender, zytosolisch sowie nuklear exprimierter Proteinkomplex [1, 2]. Als Multi-Protease-Komplex spielt es eine große Rolle in der Proteinhomöostase sowie in weiteren Zellregulationsprozessen, wie zum Beispiel dem Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur [1, 3–6]. Das zelluläre Proteom ist permanent einem Wandel in Form von Proteinabbau und -aufbau ausgesetzt. Zu degradierende Proteine werden durch die verschiedenen Enzyme E1-3 ubiquitiniert (Abbildung 1) [7]. Das Proteasom erkennt

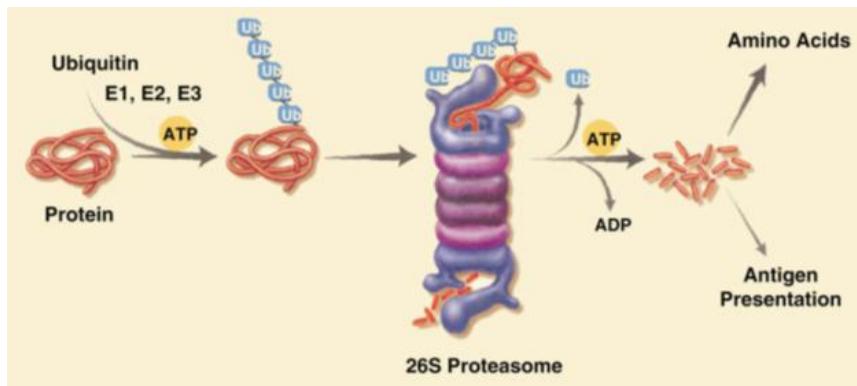


Abbildung 1 – Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems [1].

polyubiquitinierte Proteine mittels Bindung an die Ubiquitin-assoziierte Domäne und vermittelt deren Abbau [8]. Durch die hydrolysierenden β -Untereinheiten (UE) 1,2 und 5 des 20S-Proteasoms wird das

Protein schließlich durch irreversible Proteolyse abgebaut [9]. Dieser selektive Umsatz von kurzlebigen regulatorischen Proteinen oder beschädigten Proteinsubstraten durch das Proteasom ist wesentlich für die zellulären Funktionen wie Wachstum, Entwicklung und Lebensdauer [10–14]. Die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase ist besonders in Zellen mit hohem Proteinumsatz wie Krebszellen entscheidend, da eine Akkumulation von ubiquitinierten und beschädigten Proteinen zur Einschränkung der zellulären Funktion bis zum Zelluntergang führt [15]. Die durch das Ubiquitin-Proteasom-System entstandenen Oligopeptide können zur MHC-I-Antigen-Präsentation und zur Induktion des adaptiven Immunsystems dienen. Sie werden mittels TAP-Transporter ins ER transportiert und an der Zelloberfläche den zytotoxischen T-Zellen präsentiert [16]. Durch die Antigen-Präsentation von Peptiden intrazellulären Ursprungs kann es schließlich zu Identifizierung und Zerstörung zum Beispiel karzinogener Zellen durch das Immunsystem kommen [17].

1.2 Das Proteasom

Das Proteasom bildet einen wichtigen Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Es ist die zentrale Regulationsstelle der Degradation intrazellulärer, regulatorischer Proteine wie Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusfaktoren, Enzyme und fehlgefalteter Proteine [5]. Der ubiquitär vorkommende Proteinkomplex besteht aus einem 20S-Kern, der katalytischen und

proteolytischen Einheit. Bei der Entfaltung der Proteinsubstrate spielt der regulatorische 19S/PA700-Komplex eine Rolle [18]. Der 19S-Komplex wird in Assoziation mit dem 20S-Kernkomplex als 26S-Proteasom bezeichnet [16, 19, 20]. Substrat-Rezeptoren des 19S-Komplexes erkennen und die ATPase-UE des 19S-Komplexes katalysieren das Entfalten abzubauender Proteine sowie regulieren den Zugang zur proteolytisch-aktiven Kerneinheit [21]. Der IFNy-induzierbare 11S/PA28-Komplex kann an die Seiten des 20S-Kernkomplexes binden und so die Protein-Hydrolyse erhöhen beziehungsweise modifizieren [22, 23]. Der 20S-Kernkomplex ist aus vier heptameren Ringen zylindrisch aufgebaut. Der jeweils äußere Ring besteht aus α -UE, die beiden inneren Ringe aus β -UE (Abbildung 2). Jeder der Ringe besteht aus sieben UE. Nur drei der sieben β -UE sind relevant für die Proteolyse: $\beta 1/\Delta$, $\beta 2/Z$ und $\beta 5/MB1$. Wegen unterschiedlicher proteolytischer Eigenschaften werden diese als Caspase-ähnliche ($\beta 1$), Trypsin-ähnliche ($\beta 2$) und Chymotrypsin-ähnliche ($\beta 5$) Aktivitäten bezeichnet [8, 24, 25].

1.3 Das Immunoproteasom

In Säugetieren kann es als Antwort auf inflammatorische Zytokine wie Interferon-gamma (IFNy) zur *de novo* Synthese von Proteasomen mit anderen β -UE kommen [26, 27]. Diese Isoformen werden als Immunoproteasomen (IP) bezeichnet. Somit entsteht unter Vermittlung von Typ-I/II-Interferon ein IP durch Induktion der Expression und des Einbaus der katalytischen UE $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL-1$ und $\beta 5i/LMP7$ anstelle der katalytisch-aktiven β -UE des Standardproteasoms (Abbildung 2) [28–31]. Die Gene für $\beta 1i/LMP2$ und $\beta 5i/LMP7$ liegen auf

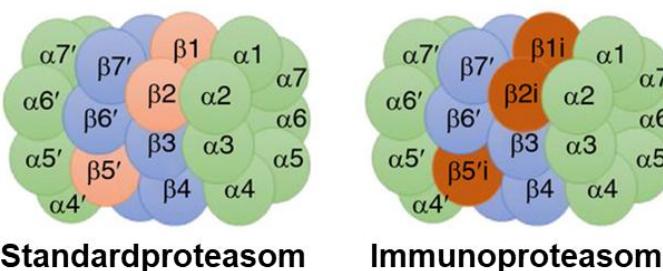


Abbildung 2 – 20S-Proteasom: Darstellung der zylindrisch aufgebauten 20S-Kernkomplexe des Proteasoms mit α und β -Untereinheiten. Im Vergleich zum Standardproteasom sind die im Immunoproteasom veränderten β -Untereinheiten $\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL-1$ und $\beta 5i/LMP7$ schematisch illustriert [36].

dem MHC-II-Genlokus des Chromosoms 6, benachbart zu dem Gen des für die Antigenprozessierung zuständigen Transporters in das ER (TAP1-2) [26, 32]. Das Gen für $\beta 5i/LMP7$ hat zwei Spleißvarianten, die als E1 und E2 bezeichnet werden [33, 34]. In Abwesenheit der inflammatorischen Signale werden anstelle der IP-UE

Untereinheiten der Standardproteasome gebildet [35, 36]. In Zellen der Hämatopoese und des Thymus erfolgt die Expression von Immunoproteasom-Komplexen (IP-UE) konstitutiv [21]. IP-UE sind auch ohne Induktion durch IFNy in verschiedenen nicht-malignen und maligne-entarteten Zellen exprimiert [37, 38]. Hierbei handelt es sich meist um „gemischte“ oder intermediäre Proteasomkomplexe, bestehend aus katalytischen UE sowohl des Standardproteasoms als auch des IP [36, 39–41]. Zudem kann sich die Expression der UE der

je 2 vorliegenden Ringe des Proteasoms und auch die Expression von IP-UE in Zellen eines Zellverbands unterscheiden. Aufgrund höherer proteolytischer Aktivität des IP-20S- und des IP-26S-Proteasoms unter inflammatorischen Bedingungen können IP-UE enthaltende Proteasomkomplexe Anforderungen an Zellen mit höherem Proteinumsatz besser nachkommen [17, 42, 43]. So entsteht bei der Expression von IP-UE in Antigen-präsentierenden Zellen wie z. B. dendritischen Zellen eine höhere Anzahl an Peptiden zur MHC-I-Präsentation [44]. Neben dieser höheren proteolytischen Aktivität wurde auch ein breiteres Repertoire der prozessierten Peptide zur Antigenpräsentation gezeigt [25, 45]. Der Einbau der IP-UE β 1i/LMP2 und β 2i/MECL-1 in Proteasomkomplexe erfolgt in Abhängigkeit der Expression von β 5i/LMP7 [37]. Wegen der Effizienz in der Proteindegradation spielen IP-UE eine bedeutende Rolle in der Regulation der Proteinhomöostase unter proinflammatorischen Bedingungen und somit der Zellproliferation, -differenzierung, Gentranskription sowie weiterer zellulärer Signalwege [21]. Es wurde zudem gezeigt, dass Immunoproteasomen oxidativen Stress durch den effizienten Umsatz geschädigter Proteine und damit die Bildung schädlicher Proteinaggregate verringern [43, 46, 47].

1.4 Proteasom-abhängige zelluläre Prozesse und Signalwege

Wie bereits erwähnt beeinflusst das Proteasom neben der Epitop-Prozessierung zur Antigen-Präsentation viele weitere miteinander verbundene Zellfunktionen wie Apoptose, Zellzyklus, Zellproliferation, Regulation von Transkriptionsfaktoren, Adhäsion, Migration und Chemotaxis [48–52].

Zellzyklus und Zellwachstum werden durch Cycline sowie Cyclin-abhängige Kinasen (CdK) reguliert, die wiederum der Kontrolle des proteasomalen Abbaus unterliegen [53]. Zellzyklus und Apoptose sind miteinander verbunden. Wird beispielsweise während der Synthese-Phase des Zellzyklus fehlerhafte DNA synthetisiert, deren Zusammensetzung nicht mehr durch Reparaturmechanismen korrigiert werden kann, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Die Apoptose läuft im Vergleich zur Nekrose, als weitere Form des Zelltods, als kontrollierter Zelltod ohne Entzündungsreaktion ab. Dabei werden morphologische Veränderungen in den Zellen durch Kondensation und DNA-Fragmentation ausgelöst [54]. Die Apoptose wird sowohl durch intrinsische Mechanismen (u. a. durch die Proteine Bim, Bax, Bak, PUMA und NOXA) als auch durch extrinsische Wege (u. a. „Todesrezeptoren“ wie TNF-Rezeptoren) initiiert [55]. Caspase-Kaskaden bilden die gemeinsame Endstrecke der intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Induktion. Die Signalgebung über Caspase-3 als Teil der Caspase-Kaskaden ist für Krebszellen etabliert [56, 57]. Die Apoptose kann weiterhin unter anderem über die Regulation von p53 durch das Proteasom beeinflusst werden [58]. p53 ist ein wichtiges Tumorsuppressorprotein, das als Transkriptionsfaktor bei der Vermeidung der Tumorgenese vieler Krebserkrankungen eine wichtige Rolle spielt, indem es bei Vorliegen eines fehlerhaften

Genoms einen Zellzyklusarrest zur Induktion von Reparaturmechanismen und auch zur Apoptose induzieren kann. Das Protein p53 unterliegt dem proteasomalen Abbau. Durch den Einsatz von Proteasominhibitoren kommt es zur Stabilisierung und Akkumulation von p53 und somit zur Apoptose [59–61]. Die Apoptoseinduktion durch Proteasominhibitoren wird weiterhin unter anderem auf die Caspase3/7-Aktivierung sowie die geförderte Expression von Bim und NOXA zurückgeführt [62–66].

Der Transkriptionsfaktor STAT1 wird durch verschiedene Zytokine wie IFNy mittels Phosphorylierung aktiviert. Die Aktivierung des STAT1-Signalwegs induziert die Apoptose, führt zum Zellzyklus-Arrest und damit zu verminderem Zellwachstum [67, 68]. Das durch Proteasominhibition stabilisierte STAT1 ist weiterhin an der Regulation von Zellmigration und -adhäsion beteiligt [69]. Es wurde gezeigt, dass die STAT1-Phosphorylierung unter Inhibition von β 5i/LMP7 reduziert ist [70].

Das Proteasom ist auch über die Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuklear faktor- κ B (NF- κ B) an vielen zellulären Prozessen beteiligt. So ist NF- κ B unter anderem ein wichtiger Mediator der Krebsentstehung und -progression [71]. Im unstimulierten Zustand ist das NF- κ B-Dimer durch Inhibitoren von NF- κ B wie I κ B α im Zytosol gebunden. Durch TNF α -Stimulation wird über den klassischen NF- κ B-Weg durch Phosphorylierung die I κ B-Kinase β aktiviert [72]. Dies führt zu einer Poly-Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau von I κ B α durch das Proteasom [73]. Durch die folgende Aktivierung von NF- κ B werden unter anderem inflammatorische Mediatoren und Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) freigesetzt, die über DNA-Schäden zu Mutationen und Tumorgenese führen [74]. In Kombination mit der Degradation der extrazellulären Matrix durch epithelial-mesenchymale Transition mit möglicher Loslösung von Tumorzellen aus einem Zellverband führt die NF- κ B-Aktivität zur einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit [75]. Des Weiteren werden durch den NF- κ B-Signalweg Gene für Zellwachstum (u. a. Cyclin-D), Chemokine und Zytokine aktiviert. Andererseits vermittelt NF- κ B auch die Immunüberwachung von Tumoren über die Aktivierung von T-Zellen [76]. Es zeigte sich, dass die NF- κ B-Aktivität über die Inhibition von I κ B α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Proteasominhibitoren hemmbar ist und es somit Auswirkungen auf diese zellulären Prozesse gibt [77]. I κ B α dient als Indikator für die Beeinflussung der zellulären Proteinhomöostase bei Proteasominhibition [78]. Zellalterungsprozesse durch fehlgefaltete Proteine, welche durch Proteasomkomplexe abgebaut werden, sowie Schäden durch oxidativen Stress unterstreichen das mutagene Potential der Dysfunktion von Proteasomen bis hin zu maligner Transformation [1, 79]. Aufgrund der erhöhten Proteinsynthese von malignen Zellen fallen mehr Proteine bei Hemmung des Proteasoms an [54, 58]. Die dabei akkumulierenden destruierten Proteine führen in entarteten Zellen mit hohem Proteinumsatz, wie z. B. in Plasmazellen beim Multiplen Myelom, zur Apoptose [80]. Dadurch erscheint eine Behandlung mit Proteasominhibitoren besonders wirkungsvoll [81].

1.5 Proteasominhibitoren

Proteasominhibitoren wurden historisch zunächst eingesetzt, um die katalytischen Zentren der Proteasomkomplexe zu hemmen und deren katalytischen Mechanismus näher zu verstehen [1]. Proteasomdysfunktion oder -inhibition führt zu intrazellulärer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen mit der Entstehung von ROS und schließlich zur Apoptose [43]. Aufgrund der Beeinflussung vieler verschiedener proteasomal-regulierter, zellulärer Funktionen hat der Einsatz von Proteasominhibitoren komplexe Auswirkungen auf Zellen und Organismen [52]. Dysregulation der Proteasomen spielt eine Rolle sowohl bei der Pathogenese als auch bei der Behandlung von Krebs, Infektionen, autoimmunen, neurodegenerativen sowie kardialen Erkrankungen [46].

Das reversibel-bindende Boronat Bortezomib (PS-341, Velcade) wurde als erster Proteasominhibitor 2003 zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen [82, 83]. Für Bortezomib wurde in Zellen des Multiplen Myeloms gezeigt, dass Chemotaxis, Neoangiogenese und die Expression von Adhäsionsmolekülen aufgrund der Transkription von NF- κ B-abhängigen Proteinen beeinflusst wird [84]. Während und nach der Therapie zeigten sich wiederkehrend starke Nebenwirkungen (u. a. Neurotoxizität, Kardiotoxizität, Hämatotoxizität, gastrointestinale Symptome und Elektrolytstörungen) [85]. Weiterhin besteht aufgrund von Resistenzen, Rezidiven und der geringen Spezifität für entartete Zellen die Notwendigkeit der Charakterisierung und Zulassung weiterer Proteasominhibitoren [83, 86–90]. Seitdem wurden mit Carfilzomib und dem reversibel-bindenden Boronat Ixazomib weitere Inhibitoren mit verbesserten Eigenschaften für die Therapie zugelassen, ohne Anwendungsbereiche solider Tumore erfolgreich zu erschließen [49, 91–93]. Die irreversibel-bindenden Epoxyketon Proteasominhibitoren Epoxomycin und Carfilzomib zeigen in geringer Konzentration eine spezifische Hemmung der β 5/ β 5i-UE und nachfolgend der β 2/ β 2i-UE [77]. Aufgrund geringerer allgemeiner Zytotoxizität wird Carfilzomib im Unterschied zu Epoxomycin klinisch verwendet [94–97]. Bortezomib, Ixazomib und Carfilzomib inhibieren mit ähnlich hoher Potenz die β 5/ β 5i-UE der Proteasomen [98, 99]. In höherer Konzentration oder längerer Applikation werden jedoch auch die β 1/ β 1i- und β 2/ β 2i-UE unspezifisch gehemmt [100–102].

MG-132 dient als reversibler und unspezifischer Proteasominhibitor vor allem als chemische Ausgangssubstanz zur Entwicklung weiterer Proteasominhibitoren und kommt aufgrund schwerer Neurotoxizität nicht für klinische Anwendungen in Frage [1, 103]. Ausgehend von der Struktur von MG-132 wurden die Proteasominhibitoren der BSc-Klasse synthetisiert. Dabei wurde als Vorteil für den Inhibitor BSc2118 im Vergleich zu MG-132 ein stärkerer Effekt auf die Zellviabilität von Melanomzellen beobachtet. Zudem wurde die Induktion des Zellzyklus-Arrests und eine I κ B α -Stabilisierung festgestellt [104]. Der hier verwendete Inhibitor BSc2189 zeigt entsprechend erster Analysen eine starke β 5-spezifische Hemmung mit nur geringer

Beeinflussung der β 1-UE [105–108]. Die weitere mechanistische und zytotoxische Analyse des bislang nur gering untersuchten Proteasominhibitors steht im Fokus dieser Arbeit.

Der reversible Proteasominhibitor PI-083 wurde nach strukturellem Screening *in silico* als β 5-Inhibitor identifiziert [109–111]. Dabei zeigte sich, dass PI-083 die Zellproliferation von malignen Zellen hemmt und Apoptose induziert. Zudem wird eine Beeinflussung der β 6-UE der Proteasomen und im folgenden Auswirkungen auf die katalytischen Einheiten proklamiert [109, 112]. Weitere präklinische Analysen des Inhibitors wurden für notwendig befunden, weswegen eine Miteinbeziehung dieser Substanz erfolgte [113].

Immunoproteasominhibitoren stellen aufgrund bislang nachgewiesener hoher Effektivität einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar [114]. Mehrere Substanzen wurden entwickelt und werden aktuell in präklinischen und klinischen Studien zur Therapie von Inflammation, Autoimmunerkrankungen und hämatologischen Neoplasien getestet [114]. Der irreversible Epoxyketon-basierte Proteasominhibitor ONX-0914 (PR-957) wurde aufgrund seiner Spezifität der Inhibition der IP-UE β 5i/LMP7 mit dem Ziel der Therapie von Autoimmunerkrankungen vielversprechend analysiert [70, 115–118]. In β 5i/LMP7-haltigen Krebszellen konnte dabei eine höhere Sensitivität der Therapie mit Proteasominhibitoren, insbesondere mit ONX-0914 gezeigt werden [119].

Die Wirkung der Proteasominhibitoren hängt von Dauer, Konzentration und Zellart ab. Entsprechend dieser Kriterien führt der Einsatz der Substanzen zum Zelltod durch Apoptose unter Beeinflussung des Zellzyklus [1]. Zusammenfassend bestätigen bisherige Analysen eine effektive Beeinflussung des Zellwachstums besonders von hochproliferativen Zellen wie Krebszellen durch Proteasominhibitoren [120].

1.6 Das maligne Melanom

Krebserkrankungen sind mit 23,2% die 2.-häufigste Todesursache in Deutschland (2023, [121]). Das maligne Melanom ist mit 3,4% die 6.-häufigste Krebsart in Europa [122]. In Deutschland kam es von 1999 bis 2012 zur Zunahme der Inzidenz um die Hälfte bei weiter steigender Tendenz [123, 124]. Das metastasierte Melanom ist bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 10% für 60% der Mortalität aller Hautkrebsarten verantwortlich [125, 126]. In Deutschland starben 2023 4501 Menschen am malignen Melanom [121]. Die Letalität des malignen Melanoms ist auf eine frühe Metastasierung, hohe Plastizität und hohe Rate an Rekurrenz zurückzuführen [122]. Das maligne Melanom zeichnet sich aufgrund hoher NF- κ B-Aktivität durch ein hohes Maß an Inflammation und Metastasierung aus [74, 127].

In den letzten Jahren kam es durch die Einführung von BRAF- und MEK-Inhibitoren sowie Immunkontrollpunkt-Inhibitoren zu einer Erweiterung der Therapieoptionen [128]. Die 2002 erstmals beschriebenen Mutationen im Gen *BRAF* sind in über 40% der malignen Melanome

vorhanden [129, 130]. Die Mutation V600E macht dabei den größten Anteil aller BRAF-Mutationen aus [131, 132]. Die Rate der BRAF-Mutationen ist beim metastasierten Melanom mit 41-55% weiter erhöht [133]. Das Gen *BRAF* kodiert die Proteinkinase B-Raf, welche in den Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) Signalweg involviert ist [134]. Aufgrund der aktivierenden Mutation mit im Folgenden fehlregulierten Zellfunktionen wie Wachstum, Proliferation und Apoptose zählen die BRAF-Mutationen zu den wichtigsten onkogenen Mutationen beim malignen Melanom [135]. Es erfolgte die Entwicklung von BRAF-Inhibitoren und 2012 die Zulassung von Vemurafenib (PLX-4032) zur Therapie des malignen Melanoms in der Europäischen Union. Nach initialer Remission traten nach durchschnittlich 12 Monaten häufig Resistzenzen auf [136]. In Kombination mit MEK-Inhibitoren zeigt sich ein längeres Überleben und eine verzögerte Latenz im Auftreten von Resistzenzen [137, 138].

1.7 Resistzenzen in der medikamentösen Krebstherapie

Resistzenzen können in primäre (intrinsische) und sekundäre (erworbene) Resistzenzen unterteilt werden [139, 140]. Primäre Resistzenzen können durch vorherige Analyse von Mutationsstatus und Expressions-Leveln u. a. von BRAF, CTLA-4 und PD-L1 mit einigen Limitationen antizipiert werden [141]. Nach erworbenen Resistzenzen gegen die Therapie mit MEK/BRAF-Inhibitoren, u. a. durch die Reaktivierung des MAPK-Signalwegs, verbleibt die Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren [142]. Aufgrund der hohen Immunogenität mit einer hohen Anzahl von T-Zellen im Tumorstroma ist diese Therapie mittlerweile etabliert. Bei Tumoren mit niedriger T-Zellzahl im Tumorstroma ergeben sich jedoch Einschränkungen [143]. Strukturelle Resistenzmechanismen von Melanomzellen wie zum Beispiel Efflux des Agens, Defekte in der Apoptose, vermehrter ER-Stress und Überexpression von Onkogenen wurden unter anderem hinsichtlich der Resistenz von Topoisomerase-II-Hemmern wie Etoposid identifiziert [144–148]. Neben den Resistzenzen sind Tumorheterogenität, fehlendes Ansprechen und Immunevasion limitierende Faktoren der bisherigen systemischen Therapie. Somit besteht aufgrund der zunehmenden Inzidenz des Melanoms verbunden mit hohen Metastasierungs- und Resistenzraten ein Bedarf an weiteren Therapiestrategien [149, 150].

Das Proteasom spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Resistzenzen gegenüber Chemotherapeutika. In der A375-Melanomzelllinie wurden Fehlregulationen des Ubiquitin-abhängigen und Proteasom-regulierten Proteinkatabolismus als verantwortlich bei der Resistenzbildung gegen Cisplatin gezeigt [151]. Durch die Kombination mit Proteasominhibitoren ließen sich Resistzenzen unter anderem durch den damit ausgelösten ER-Stress und die Induktion extrinsischer Apoptose überwinden [104, 152, 153]. Resistzenzen gegen Proteasominhibitoren sind vor allem aufgrund von Mutationen oder Überexpression in der β 5-UE des Proteasoms sowie durch Multi Drug Resistance (MDR)-Effluxmechanismen beschrieben [97, 154–157]. Der klassische MDR-Resistenzmechanismus als Ursache für

erworbenen Resistenzen zeichnet sich durch Efflux des Agens, vermittelt durch ATP-binding-cassette-(ABC)-Transporter wie ABCC1, ABCG2 oder MDR, aus [158, 159].

1.8 Einsatz von Proteasominhibitoren in Melanomzellmodellen

Der Einsatz von Proteasominhibitoren zur Erweiterung einer möglichen Therapie des malignen Melanoms wurde mehrfach *in vitro* analysiert [152, 160–162]. Die Analyse der Behandlungen mit Proteasominhibitoren ergab eine signifikant höhere Apoptoseinduktion in ruhenden Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten [63, 163]. Schnell wachsende Melanomzellen werden dabei stärker durch Proteasominhibition beeinflusst [63, 164].

In einigen Melanomzelllinien wurden ohne vorherige Stimulation IP-UE nachgewiesen [165]. Aufgrund der Tumor-begleitenden Inflammation im inflammatorischen Mikromilieu ist mit einer vermehrten Expression von IP-UE zu rechnen [166, 167]. Eine Inhibition von IP-UE scheint damit ein vielversprechendes Therapieprinzip für maligne Melanome zu sein.

1.9 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit untersucht Proteasominhibitoren *in vitro* als mögliche Therapieoption für das maligne Melanom. Die Schwerpunkte liegen dabei auf der Analyse folgender Punkte:

- Aufbau der Proteasomkomplexe in Melanomzelllinien
- Proteasomaktivität unter Behandlung mit Proteasominhibitoren
- Zellviabilität unter Behandlung mit Proteasominhibitoren
- Zelltod und Zellzyklus in Melanomzellen unter Behandlung mit BSc2189
- Analyse der durch BSc2189-inhibierten und relevanten Proteasom-abhängigen Signalwege in Melanomzellen
- Proteasominhibition in resistenten Melanomzelllinien

Ein Augenmerk liegt dabei auf der Analyse verschiedener Melanomzelllinien sowie mehrerer strukturell und funktionell unterschiedlicher Proteasominhibitoren, insbesondere BSc2189 (inhibiert reversibel die Proteasomen-UE β 5/ β 5i) und ONX-0914 (inhibiert die IP-UE β 5i und auch β 1i). Durch die Arbeit sollen die bisherigen Ergebnisse des Einsatzes von Proteasominhibitoren erweitert und durch weitere Zellmodelle, Methoden und Proteasominhibitoren ergänzt werden. Ziel ist dabei eine multidimensionale Analyse der relevanten durch Proteasominhibitoren beeinflussten Faktoren. Die damit entstehende umfassende *in vitro*-Analyse soll als Grundlage für weitergehende *in vivo*- und *in vitro*-Versuche dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die verwendeten Materialien sind in Gruppen zusammengefasst und alphabetisch in tabellarischer Form aufgelistet. Geschützte Produkte wurden mit dem Warenzeichen gekennzeichnet. Dies erhebt jedoch keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Gerätebezeichnung	Herstellerangaben
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Biosciences
Elisa-Reader Safire	Tecan
Inkubator Heraeus Heracell 240	Thermo Fisher Scientific
Inverses Lichtmikroskop DM IL LED (für Scratch Assay)	Leica
Konfokales Fluoreszenzmikroskop DMIRE2	Leica
Lichtmikroskop CN-hFT (zur Zellzahlbestimmung und Zellkultur)	Hertel und Reuss
Magnetrührer MR 3000	Heidolph
Mikropipetten	Eppendorf
Sicherheitswerkbank Herasafe KS18	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zählkammer (Neubauer-improved)	Marienfeld Superior
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Substanz	Hersteller	Substanz	Hersteller
Acrylamid	Applichem	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Millipore
Alexa Fluor 488 Azide	Thermo Fisher Scientific	NP40	Calbiochem
Ammoniumpersulfat	Applichem	Paraformaldehyd	Merck Millipore
Ascorbinsäure	Merck Millipore	PBS (steril)	Biochrom
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	PEFA-Block	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	ROTH	Penicillin/Streptomycin (P/S)	Merck Millipore

Crystal Violet Solution	Sigma-Aldrich
CuSO ₄	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Merck Millipore
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza
EdU	Life Technologies
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Merck Millipore
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck Millipore
HBSS	Lonza
HEPES	Applichem
Igepal	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck Millipore
KCl	Merck Millipore
LM	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	ROTH
NaCl	Thermo Fisher Scientific
NaF	ROTH
Na-Orthovanadat	Calbiochem
Natrium Citrat	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich
Ponceau	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitor Complete	Roche Diagnostics
RIPA-Puffer	Thermo Fisher Scientific
Rotinanoquant	ROTH
RPMI-Medium	Merck Millipore
Salzsäure (HCl)	Thermo Fisher Scientific/ Merck Millipore
SDS-Proteinmarker	Fermentas Life Science
Substrat für verstärkte Chemiluminescence (ECL)	Thermo Fisher Scientific
Tetramethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Lonza
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck Millipore
RNase A	Thermo Fisher Scientific
Sucrose	Merck Millipore
Zellfärbepuffer	Biolegend

2.1.3 Gebrauchs- und Pufferlösungen

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Lösung und Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	ddH ₂ O, 1,5M NaCl, 74,54M KCl, 178M Na ₂ HPO ₄ , 139,09M KH ₂ PO ₄ , HCl (pH 6,6)
10x TBS	ddH ₂ O, 1,5M NaCl, 1M Tris-HCl (pH 7,5)
Assay-Lysepuffer	ddH ₂ O, 20mM Tris-HCl (pH 6,8), 50mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , 0,1% NP40, Proteaseinhibitor Complete

Assay-Puffer	ddH ₂ O, 30mM Tris (pH 7,5), 10mM KCl, 5mM MgCl ₂ , 10% Glycerol ¹
Blockpuffer	PBS, 0,1% Tween, 5% Milchpulver
Blotpuffer	Elektrophoresepuffer, 20% Methanol
Click-Reaktionspuffer	ddH ₂ O, 100mM Tris-HCl (pH 8,5), 4mM CuSO ₄ , 1µM Alexa Fluor 488 Azide, 50mM Ascorbinsäure, 0,25mg/ml RNase A
Elektrophoresepuffer	ddH ₂ O, 250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% SDS
Kristallviolettlösung	ddH ₂ O, 0,1M Crystal Violet Solution, 20% Ethanol
Kristallviolett-Solvens	ddH ₂ O, 1% SDS, 30% Essigsäure
LM/NP40-Lysepuffer	ddH ₂ O, 1% NP40, 1% LM, 1mM Na-Orthovanadat, 50mM Tris, 10 mM EDTA, NaF 10mM, 150mM NaCl, PEFA-Block, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
Permeabilisationspuffer	PBS, 0,5mM EDTA, 0,1% Igepal
RIPA-Puffer	ddH ₂ O, 1% NP40, 50mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0), 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1x Proteaseinhibitor Complete
Sammelgelpuffer	ddH ₂ O, 0,5M Tris (pH 6,8), 20% SDS
SDS-Probenpuffer ²	ddH ₂ O, 100mM Tris (pH 6,8), 10% Glycerin, 5% SDS, 1% Bromphenolblau
SDS-Sammelgel	ddH ₂ O, Sammelgelpuffer (46%), Ammoniumpersulfat, Tetramethylethyldiamin, 30%iges Acrylamid (20%)
SDS-Trenngel	ddH ₂ O, Trenngelpuffer, Ammoniumpersulfat, Tetramethylethyldiamin, 30%iges Acrylamid ³
TEA-Puffer	ddH ₂ O, 20 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM EDTA, 1mM DTT
Trenngelpuffer	ddH ₂ O, 1,5M Tris (pH 8,8), 20% SDS
TSDG-Lysepuffer	ddH ₂ O, 10mM Tris (pH 7,0), 25mM KCl, 10mM NaCl, 1,1mM MgCl ₂ , 10% Glycerol, 1mM DTT, Proteaseinhibitor Complete
Waschpuffer	1xPBS ⁴ , 0,1% Tween 20
Zellfärbungs-Puffer	PBS, 2mM EDTA
Zitratpuffer	ddH ₂ O, 40mM Natrium Citrat, 0,25M Sucrose (pH 7,4)

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Kits

Kit	Hersteller
DetachKit für NHDF	Promo Cell
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	Biolegend

¹ Bei der Proteasomaktivitätsbestimmung von 20S-Proteasomisolaten wurde kein Glycerol verwendet.

² Für 2fachen SDS-Probenpuffer beträgt der Glycerin-Anteil 20%, für 5fach SDS-Puffer 50%.

³ Je 33-49,6% bei Gelen zw. 10-15% in Abhängigkeit zur analysierenden Proteingröße.

⁴ Bei phosphorylierten Antikörpern wurde anstatt PBS TBS verwendet.

MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific

2.1.5 Zytokine und Proteine

Tabelle 6: Zytokine und Proteine

Substanz	Hersteller
Fibronectin	Roche Applied Science
IFNy, human	PeproTech
TNF α , human	PeproTech
TNF α , murin	Biolegend

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cryovial, 2ml	Sigma-Aldrich
Eppendorfgefäß	Eppendorf
FACS-Röhrchen	BD Bioscience
Magnetic Beads	Thermo Fisher Scientific
Mr. Frosty Einfrierbehälter	Thermo Fisher Scientific
Nitrozellulose-Membran	Thermo Fisher Scientific
QiaShredder-Säule	Qiagen
Röntgenfilm X-OMAT®LS	Kodak
Sterilfilter	Merck Millipore
Whatman®-Filterpapier	Sigma-Aldrich
Zellkulturflaschen	TPP
Zellkulturplatten/Wellplatten ⁵	TPP/Costar/BD Bioscience
Zellkulturschalen ⁵	TPP/BD

2.1.7 Nukleotide

In der folgenden Tabelle 8 sind die zur PCR eingesetzten Oligonukleotid-Primer aufgeführt.

⁵ Zellkultur wachstumsfördernd behandelt, Polystyren, gamma-sterilisiert, pyrogenfrei, RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei.

Tabelle 8: Primer (je 5'-3')

Bezeichnung	Forward Primer	Reverse Primer
ABCC1	CCGTGTACTCCAACGCTGACAT	ATGCTGTGCGTGACCAAGATCC
ABCG2	GTTCTCAGCAGCTCTCGGCTT	TCCTCCAGACACACCCACGGATA
GAPDH	CCGTCAAGGCTGAGAACGGG	GCCATGCCAGTGAGCTTCCC
Delta, human	AAGATGGCGGCTACCTTACTAGCT	TCAGGCGGGTGGTAAAGTGG
MB1, human	AGACATGGCGCTTGCCAGCGTGT	TCAGGGGGTAGAGCCACTAT
MECL-1, human	ATGCTGAAGCCAGCCCTGGA	TTACTCCACCTCCATAGCCTGCAC
LMP2	GTTGTGCGCTGTCCCAGG	GACCATACCAGGTTTGGCCCTAG
LMP7 E1	TGGTTTGTAAAGTGATG	GACCTCCCAGAGGGAGACC
LMP7 E2	GGGTGCTGGCGGTAT	GACCTCCCAGAGGGAGACC
MDR1	GCTGTCAAGGAAGCCAATGCCT	TGCAATGGCGATCCTCTGCTTC
TAP1	CGAGCATTGATCCGGAAACC	GTTTATGGGCCAGCATATGCC
TAP2	CTCCCTGACCTGAGACCCTG	GGGGTAGTCCTCTCGTCGC

2.1.8 Antikörper

Tabelle 9: Antikörper bzw. durch Antikörper detektierte Proteine

Antikörper	Hersteller	Antikörper	Hersteller
ABCG2-FITC	Santa Cruz	IkB α , human	Abcam
Sekundäre Antikörper: Anti-mouse, Anti-rabbit	Dianova	IkB α , murin	Cell signaling
β -Actin	Abcam/Sigma-Aldrich	LMP2, human	Enzo Lifescience
Caspase-3	Cell signaling	LMP2, murin	Biomol Enzo Lifescience
Caspase-3-FITC	Cell signaling	LMP7, human	Abcam
cleaved Caspase-3	New England Biolabs	LMP7, murin	Cell signaling
Delta, human	Abcam	MB1	Cell signaling
GAPDH	Abcam, Cell signaling	MDR1-APC	Thermo Fisher Scientific
		PA28 γ	Santa Cruz
		pSTAT1	Cell signaling

2.1.9 Proteasominhibitoren

Tabelle 10: Proteasominhibitoren

Proteasominhibitor	Hersteller / Bezugsquelle
Bodipy-BSc2189	zVg von Dr. Petra Henklein, Institut für Biochemie, Charité Berlin
Bortezomib (Velcade®)	Sellekchem

BSc2189	zVg von Prof. Boris Schmidt, Constantin Voss und Christian Walz [105], Fachbereich Chemie, TU Darmstadt
Epoxomycin	Sigma-Aldrich
MG-132	Calbiochem
ONX-0914 (PR-957)	Onyx Pharmaceuticals
PI-083	Sigma-Aldrich

Die Proteasominhibitoren wurden in DMSO gelöst. Die eingesetzten Verdünnungen haben in der Zellkultur eine maximale DMSO-Menge von 0,015µl enthalten, was eine dadurch begründete Toxizität unwahrscheinlich macht [168]. In Abbildung 3 sind die chemischen Strukturformeln der verwendeten Proteasom-inhibitoren dargestellt.

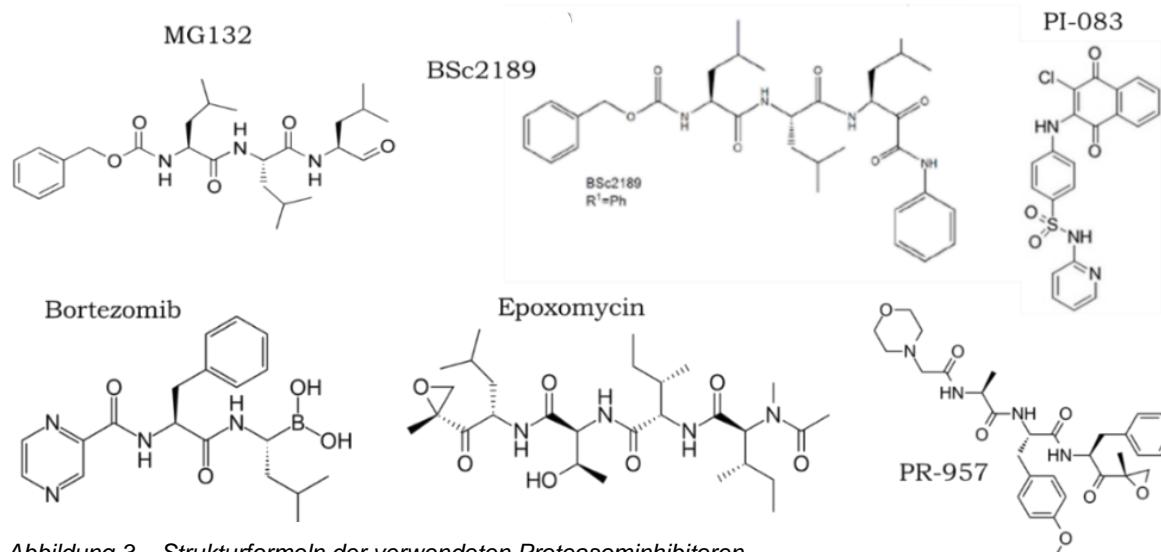


Abbildung 3 – Strukturformeln der verwendeten Proteasominhibitoren

2.1.10 Sonstiges

Tabelle 11: Weitere Materialien

weitere Materialien	Bezugsquelle
Etoposid	Bristol-Myers Squibb
Fluorogenes Suc-LL-Val-Tyr-AMC Substrat (für Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der β 5/ β 5i-Untereinheit)	Bachem
Fluorogenes Z-Val-Gly-Arg-AMC Substrat (für Trypsin-ähnliche Aktivität der β 2/ β 2i-Untereinheit)	Bachem
gereinigte JE6-Proteasomkomplexe	zVg von AG Seifert, IMKI, OvGU Magdeburg
gereinigte Proteasomkomplexe: T2 (Zellklon T2-2), T27, A375, JE6, Ma-Mel-63a, Ma-Mel-86a	zVg von Dr. Petra Henklein, Institut für Biochemie, Charité Berlin
Rapamycin	Biomol
Vemurafenib (PLX-4032)	zVg von Prof. D. Schadendorf und Prof. A. Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultivierung

Allgemeine Prinzipien:

Die adhärenten Melanomzellen wurden in Zellkulturschalen unterschiedlichen Durchmessers permanent in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert.

Standard-Medium: RPMI mit zugesetztem 10% FCS, 0,5 % Penicillin, 0,5% Streptomycin.

Auftauen der Zellen:

Es erfolgte ein sehr zügiger Auftauprozess um die Zytotoxizität durch DMSO gering zu halten. 5ml des auf 37°C vorgewärmten Mediums wurden in ein 15ml-Falcon vorgelegt. In das noch tiefgefrorene Kryoröhrchen wurde 1ml warmes Medium gegeben. Nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension erfolgte das Überführen in das vorbereitete Falcon. Nach 5min Zentrifugation bei 1200U/min wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet im warmen Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen in warmem Medium in Zellkulturschalen im Brutschrank.

Passagieren der Zellen:

Zum Passagieren bzw. Umsetzen der Zellen wurde das Medium aus der Zellkulturschale entfernt und einmalig mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhärenten Zellen wurde je nach Zellart eine möglichst geringe Menge an Trypsin (circa 1ml) hinzugefügt und 1-2min bei 37°C inkubiert. Nach vorsichtigem, leichtem Schütteln und Zufügen von 15ml vorgewärmten Mediums erfolgte das Überführen in ein 15ml-Falcon und anschließend die Zentrifugation. Das Zellpellet wurde in vorgewärmten Medium resuspendiert, gezählt und entsprechend der jeweils erforderlichen Zellzahl ausplattiert.

Kryokonservieren der Zellen:

Die Zellkultur wurde bei Subkonfluenz entsprechend obenstehenden Vorgehens von der Zellkulturschale abgelöst, gezählt und in 90% FCS mit Zugabe von 10% DMSO resuspendiert. Mindestens 1 x 10⁶ Zellen wurden in ein Kryoröhrchen überführt und im Isopropanol-gefüllten, vorgefrorenen Behälter für 24h bei -80°C eingefroren sowie schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

Weitere Bemerkungen:

Für die optimale Zellkultivierung und nachfolgende Assays wurden für alle eingesetzten Zelllinien zu Beginn Proliferationsrate und Konfluenz ermittelt. Die Adjustierung der geeigneten Zellzahl erfolgte mittels Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer. Es wurden regelmäßig Mycoplasmen-Kontrollen mittels Mycoplasma Detection Kit spätestens bei der 4.

Passage durchgeführt. Die maximale Anzahl der Passagen pro Zelllinie war sieben. Alle adhärenen Zelllinien wurden vor weiteren Analysen oder Zugabe von Inhibitoren nach Zelltransfer für minimal 15-24h in Kultur gehalten, damit sie adhärieren konnten.

Zelllinien und Zelllinienspezifika

Der Name der kultivierten humanen Melanomzelllinien, deren Ursprung, BRAF-Mutationsstatus, die Bezugsquelle und die über die allgemeinen Prinzipien hinausgehenden Spezifika zur Zellkultivierung sind der Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Verwendete humane Melanomzelllinien

Zelllinie	Ursprung	Kultivierung	BRAF-Mutationsstatus	Bezugsquelle
Ma-Mel-66a	Kutane oder subkutane Metastase [169]	RPMI-Medium mit 1% P/S und 20% FCS	BRAF V600E mut. mit Resistenz gegen BRAF-Inhibitor PLX-4032 (Vemurafenib) [169, 170]	zVg von Prof. D. Schadendorf und Prof. A. Paschen, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen
Ma-Mel-57	Lymphknoten [169]			
A375	Haut [171]	DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% P/S	BRAF V600E mut. [172, 173]	
Ma-Mel-15	Lymphknoten [169]		BRAF wt [169]	
Ma-Mel-54a	Lymphknoten [169]		BRAF V600E mut. [169]	
Ma-Mel-86a	Lymphknoten [169]		BRAF V600E mut. [169]	
UKRV-Mel-15a	Lymphknoten [169]		BRAF wt [174]	
UKRV-Mel-18a	Haut [175]		Nicht definiert	
UKRV-Mel-21a	Haut [175]			
MeWo	Lymphknoten [176]		BRAF wt [172]	
MeWo _{Eto}	Exposition und Selektion von MeWo-Zellen mit Etoposid über 24 Monate [177]	RPMI-Medium mit 1% P/S, 10% FCS und 1µM Etoposid	BRAF wt [172]	
SK-Mel-28	Haut [178]	RPMI-Medium mit 1% P/S und 10% FCS	BRAF mut. [173, 178]	

Den Etoposid-resistenten MeWo-Zellen wurden 24h nach Passagieren 1 μ g Etoposid pro ml Medium zugesetzt, sodass sie im adhärenten Zustand permanent mit entsprechendem Chemotherapeutikum kultiviert wurden [148, 176]. Während der Versuche mit Etoposid-resistenten MeWo-Zellen wurde, um Interaktionen zu vermeiden, kein Zytostatikum zusätzlich zu weiteren Inhibitoren zugegeben.

Zur Bestätigung der Resistenz und somit als Kontrolle des Systems aus MeWo- und Etoposid-resistenten MeWo-Zellen erfolgte unter anderem der in Abbildung 4 dargestellte Viabilitätsassay. Es bestand nach 48h Inkubation mit Etoposid eine signifikante Reduktion der

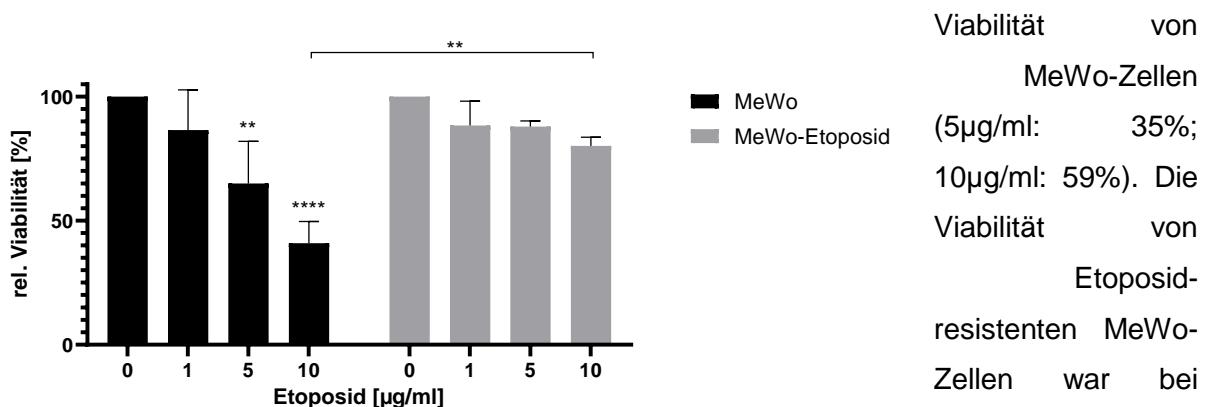


Abbildung 4 – Zellviabilität nach Behandlung mit Etoposid: Relative Viabilität von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 48h Inkubation mit Etoposid (n=3, **p < 0.01, ****p < 0,0001, Symbole an den Werten entsprechen Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle, signifikanter Unterschied zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen an Klammer).

Viabilität von MeWo-Zellen (5 μ g/ml: 35%; 10 μ g/ml: 59%). Die Viabilität von Etoposid-resistenten MeWo-Zellen war bei Zusatz von Etoposid nicht signifikant reduziert (5 μ g/ml: 12%). Es bestand somit ein signifikanter Unterschied in der Wirkung von Etoposid auf MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen als Bestätigung der Resistenz (5 μ g/ml: 23%, 10 μ g/ml: 39%).

Zur Bestätigung der Resistenz von Ma-Mel-66a-Zellen gegen den BRAF-Inhibitor PLX-4032 (PLX, Vemurafenib) bei bekannter intrinsischer Resistenz erfolgte der in Abbildung 5 dargestellte Viabilitätsassay [169, 170].

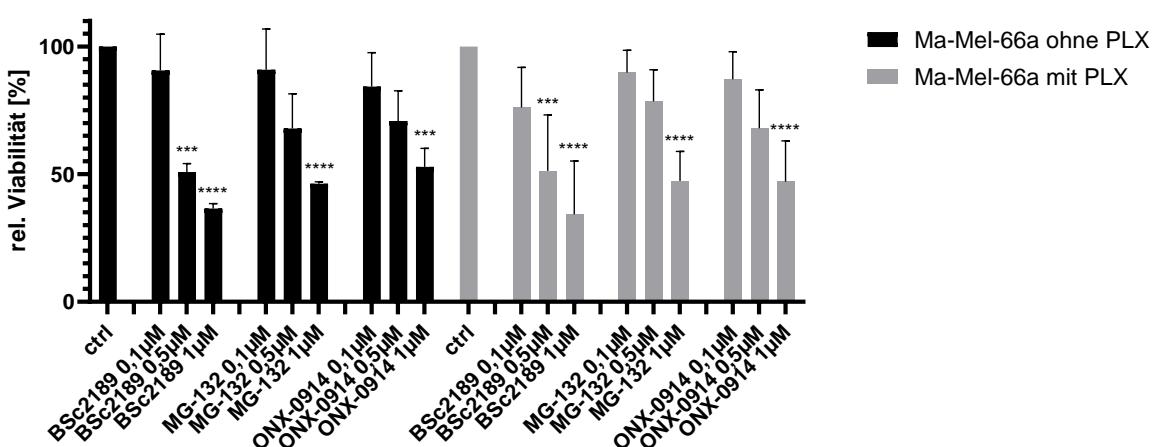


Abbildung 5 – Zellviabilität von BRAF-Inhibitor-resistenten Ma-Mel-66a-Zellen: Relative Viabilität von Ma-Mel-66a-Zellen mit und ohne PLX-4032 (PLX, Vemurafenib) nach 24h Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189, MG-132 und ONX-0914 (n=4, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, Symbole an den Werten/Datenpunkten entsprechen Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle).

Es bestanden nach 24h Inkubation mit und ohne PLX keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität der gegen den BRAF-Inhibitor PLX-4032 (PLX, Vemurafenib) intrinsisch resistenten Ma-Mel-66a-Zellen. Zudem zeigte sich kein additiver zytotoxischer Effekt in Kombination mit Proteasominhibitoren als Zeichen des Überwindens der hiermit bestätigten Resistenz.

In der Tabelle 13 sind die als Kontroll- und Bezugszellen kultivierten humanen Nicht-Melanomzelllinien angegeben.

Tabelle 13: Weitere verwendete humane Zelllinien

Zelllinie	Spezifika	Ursprung
JE6 (Jurkat T-Zellen)	Nicht-adhärente Zellen, kultiviert in RPMI und 10% FCS	IMKI
Fibroblasten / normal human dermal fibroblasts (NHDF), adult	Kultivierung ausschließlich entsprechend der Herstellerangaben und zugehörigem Material	Promo Cell

Der Tabelle 14 sind die verwendeten murinen Melanomzelllinien, deren Spezifika und Ursprung zu entnehmen.

Tabelle 14: Verwendete murine Melanomzelllinien

Zelllinie	Spezifika	Ursprung
B16-F10	Ablösen der Zellen mittels 2min Inkubation mit 2mM EDTA in PBS (steril)	American Type Culture Collection (ATCC)
384 (HCmel 3)	Langsames Wachstum	Kultivierung in RPMI-Medium mit 20% FCS und 1% P/S zVg von Prof. T. Tüting, Universitätshautklinik, OvGU Magdeburg
3156 (HCmel 31)	Intermediäres Wachstum	
1274 (HCmel 12)	Schnelles Wachstum	

Die Hgf-Cdk4^{R24C} murinen Melanomzelllinien wurden aus UVB-bestrahlten nackten Mäuse isoliert [179]. Die verwendeten Mäuse zeigten als Besonderheit eine mittels Knock-in erzeugte Überexpression des hepatozytären Wachstumsfaktors (Hgf) und einer klinisch relevanten Mutation der Zellzyklus-regulierenden Cyclin-abhängigen Kinase 4 (Cdk4^{R24C}) [180, 181]. Die hier analysierten Zelllinien unterscheiden sich in ihrem Wachstum, ihrer Entartung und Morphologie (Tabelle 14) [181].

Stimulation

Alle Zytokine wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller gelöst, aufbewahrt und eingesetzt. Die Stimulationen (Tabelle 15) erfolgten in der Zellkultur mit dem Ziel der Gewinnung von Lysaten für Western Blot- und PCR-Analyse.

Tabelle 15: Stimulationen

Zytokin	Zelllinien	Dauer der Stimulation	Konzentration
TNF α , human	MeWo	1h	2.000U
TNF α , murin	B16-F10 und Hgf-Cdk4	30min	10U, 50U
IFN γ , human	MeWo - für Protein-Analysen	24h/48h	200U
	MeWo - für PCR-Analyse	6h/16h	200U
	Ma-Mel-66a	24h/48h	200U

Die Stimulation mit TNF α diente der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch Induktion der durch das Proteasom vermittelten I κ B α -Degradation. Die Inhibition der Degradation erfolgte durch die Behandlung mit 1 μ M BSc2189 für 1h vor TNF α -Stimulation.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde LM/NP40-Puffer für die Herstellung von Proben zur Proteinanalyse mittels Immunoblot sowie die „Frier-Tau-Lyse“ mittels TSDG-Puffer genutzt. Der Unterschied zwischen beiden verwendeten Lyse-Methoden ist, dass im Gegensatz zur Lyse mittels LM/NP40-Puffer bei der Verwendung von TSDG-Puffer das Karyoplasma intakt bleibt und somit nur die zytoplasmatischen Proteine freigesetzt bzw. analysiert werden.

Die Zellkultur-Probe wurde zunächst mit Inhibitor bzw. Stimulanz behandelt. Nach Pelletieren der Zellen entsprechend 2.2.1 wurden diese in PBS resuspendiert, in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert. Bei der Lyse für die Proteinanalyse mittels Immunoblot erfolgte das Resuspendieren des Zellpellets in 4°C LM/NP40-Lysepuffer gefolgt von der Lyse für 30min unter mehrmaligem Benutzen des Vortex-Mischers auf Eis. Für die Frier-Tau-Lyse wurde das Zellpellet in TSDG-Lysepuffer resuspendiert. Es folgte viermalig abwechselnd das Schockfrieren für circa 20s in flüssigem Stickstoff und das Auftauen schüttelnd für 5min bei 37°C. Das Lysat wurde mittels Sedimentation durch Zentrifugation von den Zellfragmenten getrennt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Vor der weiteren Verwendung des Lysats erfolgte die Messung der Proteinkonzentration.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung von Lysaten nach Bradford wurden 50 μ l BSA-Proteinstandard zur Eichung der Messung in Wells einer Flachbodenplatte mit 96 Vertiefungen vorgelegt. In die freien Wells erfolgte die Zugabe von 50 μ l 1:50 in ddH₂O verdünnten Lysats als Zweifachbestimmung. Direkt vor der Messung der Absorption im ELISA-Plattenreader wurde pro Probe 200 μ l 1:5 verdünntes Rotinanoquant hinzugefügt. Anschließend erfolgte die

Messung der Absorption bei 595nm und die Berechnung der Proteinkonzentration über eine Standardkurve [182].

SDS-Polyacrylamidgelektrophorese

Zur Untersuchung der Proteine mittels Immunoblot erfolgte die SDS-Polyacrylamidgelektrophorese [183]. Entsprechend der Probenanzahl sowie der Größe des Zielproteins wurde zunächst ein SDS-Polyacrylamidgel (10cm x 10cm) aus Trengel und Sammelgel gegossen. Dazu mischten wir die unter 2.1.3 angegeben Puffer-Lösungen zügig. Daraus wurde ein Trengel gegossen. Nach dem Polymerisieren der Gele für eine Stunde erfolgte die Zugabe des Sammelgelansatzes und das Einsetzen eines Probenkamms. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde bei 4°C feucht gelagert und innerhalb von 24h verwendet. Für die Proben wurde 5µl 6xSDS-Probenpuffer in beschriftete Eppendorf-Gefäße gegeben. SDS bindet dabei die Proteinbindungsstellen und ermöglicht somit das Auftrennen der Proteine nach Größe mittels Elektrophorese. Die Proteinmenge in den Zelllysaten wurde so kalkuliert, dass eine gleichmäßige Proteinmenge dem Ansatz hinzugefügt wurde. Das Gesamtvolumen nach Zugabe von ddH₂O betrug 30µl. Die Proben wurden 5min bei 95°C aufgekocht und anschließend bei 4°C abgekühlt. Nach kurzem Zentrifugieren versetzten wir die Proben sowie einen Protein-Marker mit SDS-Probenpuffer und überführten die Proben in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels. Der Marker dient dabei zur Kontrolle des Proteintransfers und zur Einordnung der Molekulargewichte der detektierten Proteine. In den verschlossenen Gefäßen wurde das Gel vollständig mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Bis zum Erreichen der Lauffront des Trenngels wurde mit einer Spannung von 80V und anschließend mit 120V gearbeitet. Endpunkt war dabei das Erreichen der gewünschten Proteinauf trennung, die anhand des Markers ersichtlich ist.

Western Blot

Zum Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde in einer Semi-dry-Blotkammer das Gel zwischen dreilagigem, in Blotpuffer getränktem Whatman-Filterpapier eingespannt.

Bei einer Spannung entsprechend der Anzahl der Gele in der Blotkammer (1 Gel - 180mA, 2 Gele - 260mA, 3 Gele - 300mA, 4 Gele - 350mA) erfolgte der Proteintransfer auf eine in Richtung Anode unter das Gel gelegte Nitrocellulose-Membran für 1h. Zur Evaluierung der gleichmäßigen Proteinladung und -übertragung wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt und anschließend 5min in Waschpuffer entfärbt. Zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen der Membran wurde sie für 1h in Blockpuffer unter Schwenken gesättigt.

Immunodetektion

Die Färbung spezifischer Proteine erfolgte nach Waschen der Membran mittels Waschpuffer durch einen primären Antikörper (siehe 2.1.8). Dieser band in entsprechender Verdünnung in Waschpuffer über Nacht bei 4°C unter Schwenken an die Proteine auf der Membran. Durch viermaliges Waschen der Membran für jeweils 5min in circa 15ml Waschpuffer wurde der Antikörper wieder entfernt. Anschließend inkubierte die Membran unter Schwenken für 1h mit sekundären Anti-rabbit- oder Anti-mouse-Antikörper (1:5.000), der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet war. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5min in circa 15ml Waschpuffer erfolgte das Färben der mit Antikörpern gebundenen Nitrocellulose-Membran mittels ECL-Lösung entsprechend der Herstellerangaben. Dafür wurden 2ml ECL-Substrat mit H₂O₂ gemischt und im Dunkeln 1min mit der Membran inkubiert. Die feuchte Membran wurde in eine Kassette überführt und das Signal mittels Chemolumineszenz im Dunkeln auf einen Röntgenfilm übertragen sowie dieser entwickelt. Anschließend wurde die Membran dreimal jeweils 5min in circa 15ml Waschpuffer gewaschen, um die Inkubation mit einem weiteren primären Antikörper zu ermöglichen. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Ladung von Proteinen auf das Gel sowie deren Übertragung mittels Blotting auf die Membran erfolgte abschließend die Inkubation des Blots mit einem zur Ladekontrolle verwendeten Antikörper gegen die ubiquitär vorkommenden Proteine β-Actin oder GAPDH. Die Proteinquantifizierung der Western Blots wurde mittels Densitometrie mit dem Programm ImageJ durchgeführt [184].

Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation (in Zusammenarbeit mit N. Riemann) wurden 150µg Protein von jedem zu analysierenden Zelllysat in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 3µl Antikörper hinzugegeben. Nach Auffüllen mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 500µl erfolgte die Inkubation über Nacht unter Rotation. Am folgenden Tag wurden entsprechend der Probenanzahl je 100µl Magnetic Beads dreimalig mittels PBS+0,1% Tween gewaschen sowie die Kontrollen angesetzt (Antikörper-Kontrolle: Antikörper und Beads, Bead-Kontrolle: Lysat und Beads). Nach Zugabe der Ansätze folgte eine vierstündige rotierende Inkubation bei 4°C. Anschließend wurde der Überstand abgenommen sowie die verbleibenden Proben inklusive Beads dreimal mit PBS+1% NP40, einmal mit PBS+0,1% Tween und einmal mit ddH₂O gewaschen. Nach Zugabe von 30µl zweifachem SDS-Probenpuffer erfolgte die Inkubation für 10min bei 70°C und die Zentrifugation für 2min bei 6000 Umdrehungen pro Minute. Die Proben wurden anschließend entsprechend obenstehender Anleitung mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation zur Durchführung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR, in Zusammenarbeit mit N. Riemann) erfolgte mittels RNeasy Mini Kit entsprechend der Herstellerangaben. Das zu analysierende Zellpellet wurde in 350µl RLT-Puffer resuspendiert, auf die QiaShredder-Säule überführt und 2min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 70% Ethanol sowie das Überführen auf die RNeasy Mini Spin Column. Diese wurde mehrfach zentrifugiert und gewaschen. Nach einem DNase-Verdau und weiterem Waschen erfolgten die RNA-Extraktion und die Aufbewahrung der Ziel-RNA bei -80°C im RNase-freien Milieu.

Reverse Transkription

Zur Reversen Transkription wurde der Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit sowie der Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. 800ng RNA wurden mit Oligo-dT-Primer, Reaction Mix, Desoxynukleotid-Mix und der Reversen Transkriptase zu einem Gesamtvolumen von 20µl mit ddH₂O aufgefüllt. Es folgte das Mischen der Probe, die Inkubation für 60min bei 42°C sowie anschließend das Terminieren der Reaktion mittels Erhitzen auf 70°C für 5min. Nach Abkühlung auf 4°C und Zentrifugation wurde der Reaktions- und Enzym-Mix zugegeben. Es folgten die Inkubationen für 20min bei 25°C, für 15min bei 50°C sowie das Denaturieren der Reversen Transkriptase bei 85°C für 5min. So konnte eine cDNA-Konzentration von circa 2000ng/µl erreicht werden.

DNA-Amplifikation mittels PCR

Für den PCR-Ansatz wurden jeweils 200-300ng cDNA eingesetzt. Dazu wurden MgCl₂, spezifische Primer, dNTPs, Taq-Polymerase, Puffer und ddH₂O mit dem Zielvolumen von 25µl gemischt. Die PCR wurde im Thermocycler entsprechend des in der Tabelle 16 dargestellten PCR-Schemas mit 25 Synthesezyklen durchgeführt.

Tabelle 16: Exemplarisches PCR-Schema für GAPDH-PCR

Segment	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	2,5 min
Annealing	62°C	30 sec
Synthese	72°C	je 1 min bei 25 Zyklen
Finale Synthese	72°C	5 min
Ende	4°C	bis Ende

Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese im 2%igen Agarosegel in TEA-Puffer aufgetrennt. Durch einen Größenstandardmarker sowie Ethidiumbromidfärbung erfolgte die Darstellung und Auswertung [185].

2.2.4 Proteasomaktivitätsbestimmung

Zur Proteasomaktivitätsbestimmung wurden drei verschiedene Arten von Proben verwendet:

- gereinigte Proteasomkomplexe bzw. Proteasomisolate [186]
- zytoplasmatisches Proteinlysat aus Zellpellets
- direktes Lysieren von in der Assay-Well-Platte kultivierten Zellen (zelluläre Proteasom-Analyse)

Zur Herstellung des zytoplasmatischen Zelllysats wurden die mit Proteasominhibitoren behandelten Zellen pelletiert und nach einmaligem Waschen in 4°C PBS in TSDG-Lysepuffer mittels Frier-Tau-Lyse lysiert (2.2.1). Die gereinigten Proteasomkomplexe und Zelllysate wurden entsprechend der gemessenen Proteinkonzentration auf 150ng bzw. 3µg Protein pro 9µl adjustiert und in eine schwarze 96-Well Flachbodenplatte überführt. Es erfolgte die Inkubation mit 1µl vorgelegtem Inhibitor in Assaypuffer über 30min bei 37°C.

Für die zelluläre Proteasom-Analyse wurden 1×10^4 Zellen für 24h in der schwarzen 96-Wellplatte kultiviert. Nach 24h erfolgte die Behandlung der Zellen mit entsprechendem Reagenz bzw. Inhibitor. Anschließend wurden den Wells nach einmaligem Waschen mit PBS 10µl Assay-Lysepuffer hinzugefügt. Die Lyse erfolgte 30min auf Eis unter kurzem Schütteln alle 5min [104].

Vor der Proteasomaktivitätsmessung erfolgte das Lösen der verwendeten fluorogenen Substrate in DMSO in dunkler Umgebung. Diese 100mM Lösung wurde lichtgeschützt für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert. Den Proben inklusive Kontrollen und Leerwerten fügten wir in dunkler Umgebung bei 4°C 100µl 100µM Suc-LL-Val-Tyr-AMC (Tyr-Substrat) bzw. 200µM Z-Val-Gly-Arg-AMC (Arg-Substrat) in Assaypuffer jeweils als Dreifachbestimmung zu.

Die vor Licht geschützte Platte wurde für 1min geschüttelt und anschließend die Fluoreszenz als Kinetikmessung alle 5-15min für 180min bei 37°C im Elisa-Reader gemessen (Emissions-Wellenlänge $\lambda=460\text{nm}$, Anregungswellenlänge $\lambda=360\text{nm}$).

Die Darstellung der Fluoreszenzintensität erfolgte nach Abzug des Leerwerts als Fluoreszenzeinheiten (FU) oder als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) in Prozent in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (ctrl). Dabei wurde in der vergleichenden Darstellung von gereinigten Proteasomkomplexen der Wert nach 60min und bei Zelllysaten nach 180min

kinetischer Messung aufgrund der dann determinierten Unterschiede abgebildet. Suc-LL-Val-Tyr-AMC (Tyr-Substrat) diente dabei zur Messung der β 5- bzw. β 5i/LMP7-Proteasomaktivität und Z-Val-Gly-Arg-AMC (Arg-Substrat) zur Messung der β 2- bzw. β 2i/MECL-1-Proteasomaktivität.

2.2.5 Kristallviolett Assay

Zur Analyse der zytotoxischen bzw. zytostatischen Effekte der eingesetzten Proteasominhibitoren auf Zellproliferation und Lebensfähigkeit wurde die Zellviabilität mittels Kristallviolett Assay untersucht. 8×10^3 resuspendierte Melanomzellen in je 100 μ l Medium wurden in eine 96-Well-Platte gegeben, verteilt und für 24h adhärieren gelassen. Nach vorsichtigem Abnehmen des Mediums erfolgte die Zugabe von 100 μ l Medium ggf. mit Inhibitor in Dreifach-Bestimmung inklusive Kontrollen und Leerwerte. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation wurde das Medium entfernt und 10min mit 50 μ l Kristallviolettlösung inkubiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde einmal mit 150 μ l PBS gewaschen und 100 μ l Kristallviolett-Solvans hinzugegeben. Nach 10min Inkubation auf dem Plattschüttler und Erreichen einer gleichmäßigen Färbung wurde die Absorption bei 585nm im Elisa Reader bestimmt [187, 188]. Die Angabe des Ergebnisses erfolgte nach Abzug des Leerwerts als relative Viabilität in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Relative Viabilität = $(Ae - Ab) \times 100 / (Ac - Ab)$, Ab = Leerwert/Hintergrund, Ae= Messwert, Ac= unbehandelte Kontrolle) [104]. Die Kalkulation der IC50 erfolgte anhand der Dosis-Wirkungskurve der dargestellten Versuche mittels Graphpad Prism Software. Der Vergleich der Viabilität verschiedener Zellarten bezieht sich dabei auf den Vergleich der relativen Reduktion der Absorption. Aufgrund der Methodik ist trotz Zelltod bis zum vollständigen Verlust der Adhärenz der Melanomzellen keine Absorption von 0 zu messen [189].

2.2.6 Scratch Assay

Für die Analyse des Migrationsverhaltens in der Zellkultur wurden $0,3 \times 10^6$ B16-F10-Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte überführt und mit dem Ziel einer 90%igen Konfluenz für 24h kultiviert [190]. Die Zellen wurden anschließend mittels Serum Starvation in der G0-Phase des Zellzyklus für 6h mit RPMI mit 1% FCS synchronisiert [191, 192]. Es erfolgte ein gerader Scratch auf der Welloberfläche mit einer 10 μ l Pipetten-Spitze ohne die Well-Beschichtung zu zerstören. Die dabei abgelösten Zellen wurden mittels zweimaligen, vorsichtigen Waschens mit PBS entfernt. Zum Start wurde das Medium mit 10% FCS und ggf. Proteasominhibitor zugegeben. Anhand einer Markierung erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS und Wechseln des Mediums alle 8h die fotografische Dokumentation. Die Objektivierung des Scratches erfolgte durch das Messen des Abstands der Ränder mittels des Programms

ImageJ mit drei Messpunkten pro Ansatz. Dabei wurden die randomisierten Bilder ausgehend von einer Zellstruktur ohne Zellausläufer neutral gemessen [193]. Die statistische Auswertung gibt den relativen Abstand im Bezug zum 0h-Wert bzw. Start an.

2.2.7 Zelltod-Methoden

Trypanblau-Assay

Zur ersten Analyse der Zytotoxizität erfolgte ein eigens modifizierter Trypanblau-Assay [194, 195]. Dafür wurden die Zellen in 6-Well-Platten überführt und für 24h inkubiert. Nach 24h-Behandlung mit Proteasominhibitoren wurden die Zellen entsprechend 2.2.1 abgelöst. Jede Probe wurde doppelt mittels 0,5% Trypanblau-Lösung gefärbt. Die Trypanblau-Exklusion zur Unterscheidung lebender und toter Zellen erfolgte mikroskopisch mittels Zählkammer in fünffacher Messung pro Probe. Die Auswertung erfolgte als prozentualer Anteil lebender Zellen zur unbehandelten Kontrolle.

Intrazelluläre FACS-Analyse von Caspase-3

Die Analyse des Apoptose-assoziierten zytosolischen Proteins Caspase-3 erfolgte durch intrazelluläre FACS-Färbung. Dafür wurden die behandelten Zellen nach Zentrifugation in 500µl PBS+3,5% Paraformaldehyd gevortext und 10min bei 37°C inkubiert. Nach 1min auf Eis erfolgte die Zentrifugation und ggf. Resuspension in 500µl -20°C Methanol sowie Lagerung über Nacht bei -20°C. Nach Überführen in FACS-Röhrchen erfolgte die Zentrifugation und Resuspension in 100µl PBS+0,5% BSA zur 10-minütigen Inkubation. Anschließend wurden die Zellen mit 100µl der Lösung des primären Antikörpers in PBS+0,5% BSA inkubiert. Nach Waschen in PBS+0,5% BSA erfolgte die Resuspension in 500µl PBS und die durchflusszytometrische Analyse mit Gating anhand der unbehandelten Kontrolle. Das Ergebnis wurde als Fold Induction bzw. relativer MFI als Äquivalent der relative Änderung der Fluoreszenzintensität in Bezug zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

2.2.8 FACS-Transporter-Analyse

Zur durchflusszytometrischen Analyse der MDR-Proteine ABCG2 und MDR1 erfolgte die Oberflächen-Färbung der Zellen und FACS-Analyse. Dazu wurden die aus der Zellkultur entnommenen Zellen in 10ml Zellfärbepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-gebundenem Antikörper für 20min im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen in 5ml PBS+0,5% BSA führten wir die durchflusszytometrische Analyse mit Gating anhand der unbehandelten Kontrolle durch.

2.2.9 Bodipy-BSc2189-Analyse

Zur weiteren Analyse des Proteasominhibitors BSc2189 hinsichtlich möglicher Resistenz durch MDR-basierten Efflux verwendeten wir einen mit dem 520-600nm absorbierenden Bodipy-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten BSc2189. Dieses Konjugat wurde als zytoplasmatisches Protease-Substrat genutzt. Die zu analysierenden Zellen wurden für 1h mit 0,1 μ M Bodipy-BSc2189 behandelt. Anschließend gaben wir Inhibitor-freies Medium hinzu. Alle 30min wurden die Zellen mit PBS gewaschen. In der Probe mit Einsatz des MDR-Transportinhibitors Rapamycin wurde dieser dauerhaft dem Medium zugesetzt. Bei Erreichen der Zielzeit nahmen wir die Zellen entsprechend 2.2.1 aus der Zellkultur. Nach einmaligem Waschen in PBS und zweimaligem Waschen in PBS+0,5% BSA erfolgte die Fixierung der Zellen in PBS+2% Paraformaldehyd. Zur Analyse wurden die Proben in PBS gewaschen und in 300 μ l PBS resuspendiert. Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch im FITC-Kanal bei 488nm gemessen. Eine hohe Protease-Aktivität korrelierte mit einer höheren Fluoreszenz und eine hohe Transporteraktivität mit einer geringeren Fluoreszenz. Das Ergebnis wurde als MFI im Vergleich zur fehlenden Fluoreszenz der unbehandelten Kontrollen unter 3.6 angegeben.

2.2.10 Zellzyklus-Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus erfolgte entsprechend der Literatur [196]. Nach Behandlung der Zellen für 24 und 48 Stunden mit BSc2189 (0-1 μ mol/l) wurden sie mit in 4°C kaltem PBS+80% Ethanol fixiert und bei 0°C für mindestens 12h inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS+0,5% BSA wurden die Zellen mit 50 μ g/ml Propidiumiodid und 100 μ g/ml DNase-freier RNase A für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Durchführung und Analyse erfolgte durch Dr. Lüder Wiebusch (Charité Berlin) mit dem FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) und der Software FACSDiva, CellQuest-Pro (BD Biosciences), FlowJo (FlowJo LLC) und ModFit-LT (Verity Software House).

2.2.11 Biomathematische Methodik und statistische Auswertung

Alle Experimente wurden inklusive Kontrollen und Leerwert durchgeführt. Die zellbasierten Analysen erfolgten jeweils als Dreifachbestimmung. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach Abzug des Leerwerts entsprechend der Angaben im Methoden- und Ergebnisteil. Bei Angabe des relativen Ergebnisses erfolgte die prozentuale Angabe der Änderung bezogen auf die unbehandelte Kontrolle bzw. der Differenz bezogen auf die angegebene Zellkultur. Dabei werden zwischen Angabe der rel. Fluoreszenz sowie der Änderung der relativen Fluoreszenzreduktion unterschieden. Die im Ergebnisteil angegebene Zahl „n“ gibt die Anzahl der in die Auswertung eingeflossenen, unabhängig durchgeführten Versuche wieder. Bei n>1

erfolgte die Angabe der Standardabweichung als Maß der Streuung um den abgebildeten Mittelwert innerhalb der Abbildung. In der Abbildungen 10 wurde zur Übersichtlichkeit auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet.

Die biomathematische Analyse und das Erstellen der Grafiken erfolgte mit Graphpad Prism Software Version 8. Zur Berechnung der Signifikanz erfolgte die Analyse mittels multidirektionaler ANOVA-Varianzanalyse mit post-hoc Tukey-T-Test. Die Signifikanzen wurden als p-Wert und somit als Wahrscheinlichkeit einer rein zufälligen Korrelation in Form des Symbols „*“ angegeben. Ein $p>0,05$ wurde als nicht signifikant, ein $p < 0,05$ als signifikant (*), $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) und $p < 0,001$ bzw. $p < 0,0001$ als höchst signifikant (*** bzw. ****) gewertet. Bei Angabe der Symbole direkt am Wert auf der xy-Achse ist dieser im Vergleich zum Ausgangswert ohne Inhibitor bzw. zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Weiterer Signifikanzbezug wird mittels Klammern dargestellt. Diese Signifikanzen an Klammern entsprechen dabei Unterschiede verschiedener Zellkulturen zueinander. Die Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) erfolgte anhand der kalkulierten Dosis-Wirkungskurve der dargestellten Viabilitätsassays (Determinationskoeffizient bei $IC50<1000nM$ über 0,82) bzw. der logarithmierten Inhibition der Proteasomen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Proteasomkomplexe in Melanomzellen

3.1.1 Proteasomaufbau in humanen Melanomzellen

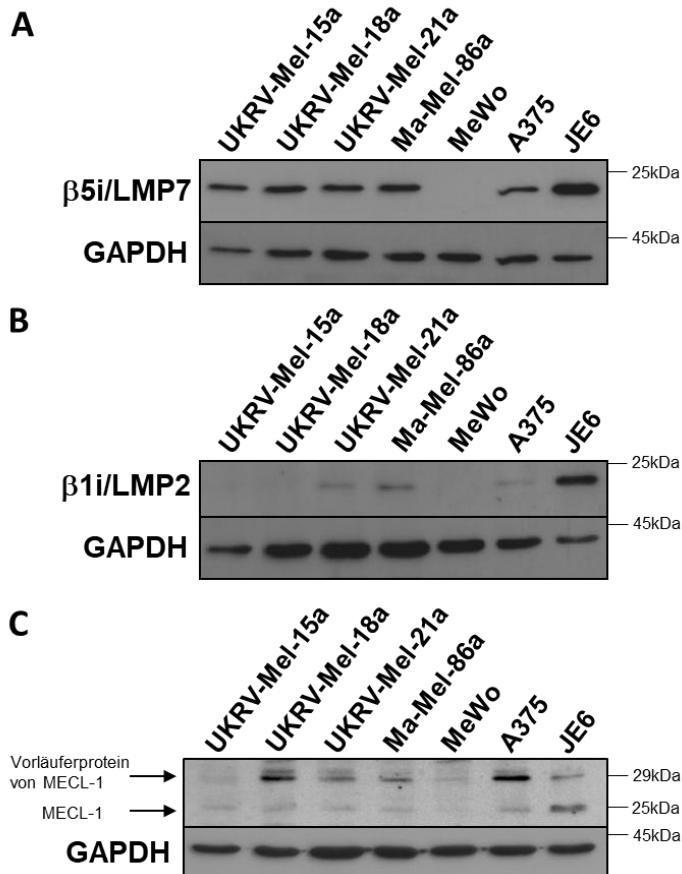


Abbildung 6 – Immunoproteasomen-Komplexe in unstimulierten humanen Melanomzelllinien: Expression der IP-UE β 5i/LMP7 (A), β 1i/LMP2 (B) und des β 2i/MECL-1-Vorläuferproteins (C) in unstimulierten Zellen mittels Western Blot-Analyse ($n=2$). Jurkat T-Zellen (JE6) wurden als Positivkontrolle und GAPDH als Ladekontrolle verwendet.

Für die Auswahl geeigneter Inhibitoren, die die Proteasome der Melanomzellen inhibieren, erfolgte die Analyse der Expression der katalytischen Untereinheiten (UE) des Immunoproteasoms (IP) in Melanomzelllinien (Abbildung 6). Die Mehrzahl der analysierten humanen Zelllinien exprimieren die Immunoproteasom-Untereinheit (IP-UE) β 5i/LMP7 entsprechend vorheriger Analysen [197, 198]. Die Expression von β 1i/LMP2 zeigte sich in den Zelllinien UKRV-Mel-21a, Ma-Mel-86a und A375. Das Vorläuferprotein von β 2i/MECL-1 konnte in den Zelllinien UKRV-Mel-18a, UKRV-Mel-21a, Ma-Mel-86a und A375 nachgewiesen werden. Die Zelllinie MeWo zeigte keine Expression der IP-UE.

3.1.2 Stimulation des Immunoproteasoms in humanen MeWo-Zellen

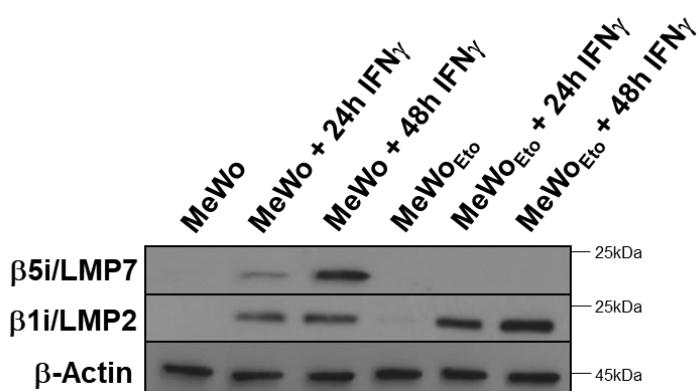


Abbildung 7 – Aufbau des Proteasomkomplexes in MeWo- und MeWo Eto -Zellen: Induktion der IP-UE β 5i/LMP7 und β 1i/LMP2 nach IFN γ -Stimulation in den humanen MeWo- und MeWo Eto -Zelllinien, mittels Western Blot Analyse nachgewiesen ($n=5$).

Da die Expression von IP-UE durch Interferone induziert wird, wurde geprüft, ob durch IFN γ -Stimulation β 5i/LMP7 und β 1i/LMP2 in MeWo-Zellen hervorgerufen werden kann (Abbildung 7). In Abhängigkeit der Expositionsduer der MeWo-Zellen gegenüber IFN γ zeigt sich eine vermehrte Expression der IP-UE β 5i/LMP7 und β 1i/LMP2.

Im Vergleich dazu konnte in den Etoposid-resistenten MeWo-Zellen (MeWo_{Eto}) im Gegensatz zu β 1i/LMP2 kein β 5i/LMP7 auf Proteinebene induziert werden.

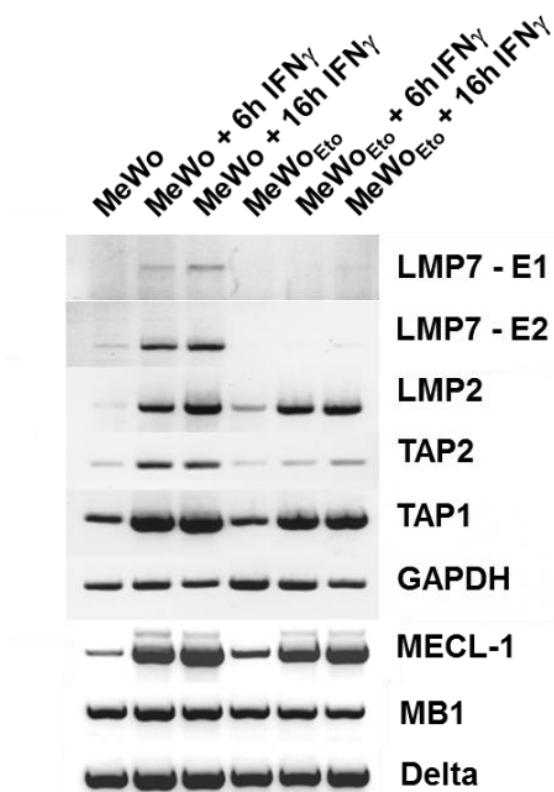


Abbildung 8 – Proteasom-PCR-Analyse: Induktion der mRNA von β 5i/LMP7 (E1- und E2-Variante), β 1i/LMP2, β 2i/MECL-1, TAP1 und TAP2 nach IFN γ -Behandlung für 6h und 16h in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen bei konstanter Expression der Standardproteasom-UE MB1 und Delta. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt (i. Z. m. N. Riemann).

Diese Ergebnisse konnten auf RNA-Ebene bestätigt werden. Es zeigte sich in MeWo_{Eto}-Zellen keine Induktion von β 5i/LMP7, weder seiner Spleißvariante E1 noch E2 (Abbildung 8). Die im benachbarten Genlokus zu β 5i/LMP7 liegenden Genabschnitte TAP1 und TAP2 waren vorhanden und konnten stimuliert werden. Durch IFN γ -Stimulation wurde die Expression der IP-UE β 1i/LMP2 und β 2i/MECL-1 induziert. Die mRNA der Standardproteasom-UE β 5/MB1 und β 1/Delta war konstant exprimiert. Zusammengefasst konnten in MeWo-Zellen IP-UE durch IFN γ stimuliert werden. In MeWo_{Eto}-Zellen im Vergleich zu MeWo-Zellen zeigte sich auf RNA- und Protein-Ebene eine β 5i/LMP7-Defizienz. Da IP-UE nur in einem Teil der untersuchten Melanomzelllinien exprimiert sind, wurden im Folgenden Proteasominhibitoren verwendet, die sowohl die Aktivität des Standardproteasoms als auch des IP inhibieren.

3.1.3 Nachweis eines funktionalen IFN γ -Signalweges in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen

Zum Ausschluss einer eingeschränkten Funktion des IFN γ -Signalweges als Ursache fehlender β 5i/LMP7-Expression nach Stimulation in MeWo_{Eto}-Zellen wurde die IFN γ -abhängige Phosphorylierung von STAT1 in den Zelllinien MeWo und MeWo_{Eto} verglichen (Abbildung 9).

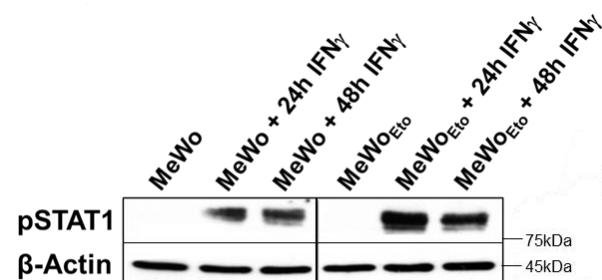


Abbildung 9 – IFN γ -abhängiger Signalweg: pSTAT1-Expression in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 24h und 48h IFN γ -Stimulation mittels Western Blot-Analyse. β -Actin wurde als Ladekontrolle eingesetzt (n=2).

In MeWo und MeWo_{Eto}-Zellen konnte 24h und 48h nach Behandlung mit IFN γ eine STAT1-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Ein dysfunktionaler IFN γ -Signalweg ist als Ursache für die β 5i/LMP7-Defizienz in MeWo_{Eto}-Zellen damit unwahrscheinlich.

3.2 Analyse der inhibitorischen Aktivität der Proteasominhibitoren

Zur Analyse der inhibitorischen Aktivität der Proteasominhibitoren erfolgten kinetische Messungen der Proteasomaktivitäten in An- und Abwesenheit von Proteasominhibitoren.

3.2.1 Charakterisierung von Proteasominhibitoren anhand gereinigter Proteasomkomplexe

Zunächst wurden gereinigte Proteasomkomplexe aus den Zelllinien T2 (B-lymphoblastoide Zelllinie mit Defizienz für die IP-UE β 5i/LMP7 und β 1i/LMP2 [31, 199], Klon T2-2), T27 (Überexpression der IP-UE β 5i/LMP7- und β 1i/LMP2 und damit auch Einbau der Untereinheit β 2i/MECL-1 [37, 200]) und JE6 (Expression der IP-UE) verwendet, um die Inhibition der katalytischen UE des Standardproteasoms und des IP durch Proteasominhibitoren zu untersuchen. In Abbildung 10 wurde die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität der β 5/ β 5i-UE gereinigter T2-Standardproteasomkomplexe mit der Aktivität gereinigter Immunoproteasom-Komplexe der JE6 T-Zelllinie unter Inhibition mit BSc2189, dem β 5i/LMP7-spezifischen Inhibitor ONX-0914 und Bortezomib verglichen [115].

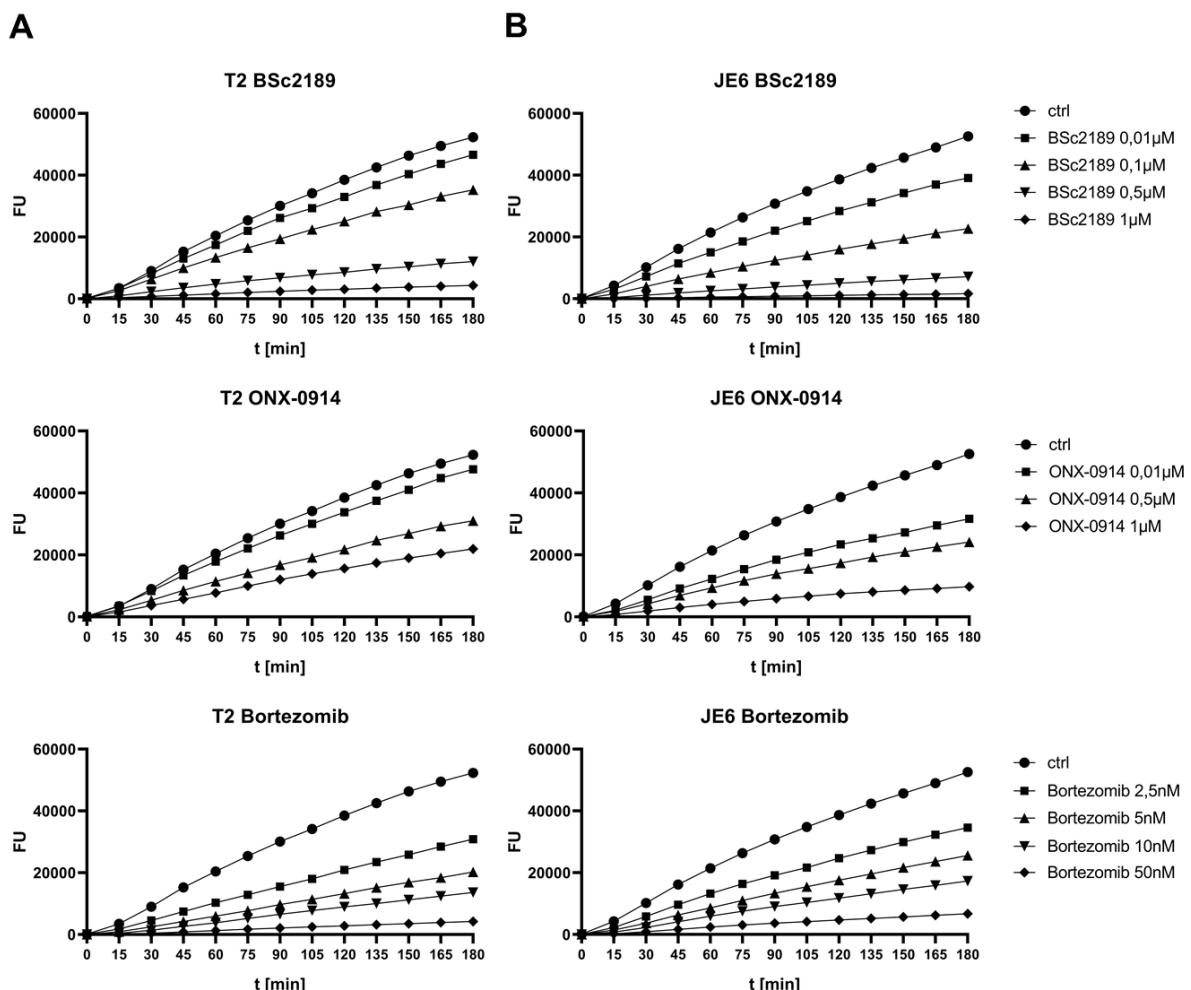


Abbildung 10 – Proteasomaktivität gereinigter Proteasomkomplexe: Kinetik der konzentrationsabhängigen Reduktion der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität der β 5-UE angegeben als Fluoreszenzeinheiten (FU) mittels Suc-LL-Val-Tyr-AMC in T2/Standardproteasomen (A) und JE6/Immunoproteasom-Komplexe (B) nach Zugabe der Proteasominhibitoren BSc2189, ONX-0914 und Bortezomib (n=2).

In der kinetischen Darstellung war eine Zunahme der Fluoreszenz als Äquivalent zum freigesetzten fluorogenen Substrat über die Zeit festzustellen. Nach Zugabe der zu untersuchenden Inhibitoren – BSc2189, ONX-0914 und Bortezomib – konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proteasomaktivität gezeigt werden. In den in Abbildung 10 dargestellten Proteasomaktivitäten der Proteasominhibitoren BSc2189, ONX-0914 und Bortezomib ergeben sich Unterschiede in der Reduktion der Proteasomaktivität in Abhängigkeit der gereinigten Proteasomkomplexe. Die Analyse von BSc2189 zeigte in geringer Konzentration eine stärkere Inhibition der Proteasomaktivität von IP-UE in gereinigten JE6-Proteasomkomplexe im Vergleich zu konstitutiv-exprimierten Standardproteasomen in gereinigten T2-Proteasomen. In hoher Konzentration ergab sich eine ausgeprägte Hemmung sowohl in gereinigten T2- als auch in JE6-Proteasomen. Bortezomib zeigte in geringer Konzentration eine starke Inhibition der gereinigten Proteasomkomplexe ohne Unterschied in der Hemmung des Immuno(JE6)- und des Standardproteasoms (T2, Abbildung 10).

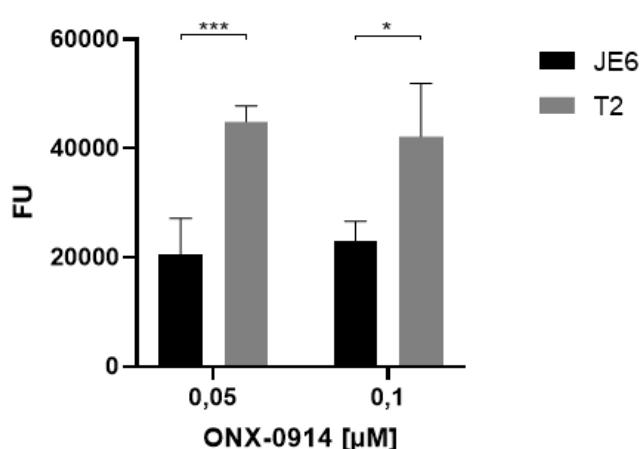


Abbildung 11 – Proteasomaktivität mit ONX-0914: Signifikante Unterschiede der β 5-Proteasomaktivität mit ONX-0914, 0,05 μ M und 0,1 μ M behandelter gereinigter JE6/Immunoproteasom-Komplexe im Vergleich zu T2/Standardproteasomen angegeben als Fluoreszenzeinheiten (FU) nach Abzug des Leerwertes ($n=2$, Dreifachbestimmung, $^*p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$).

ONX-0914 zeigte in geringer Konzentration von 0,01 μ M ausschließlich eine Inhibition der Aktivität der β 5i/LMP7-haltigen gereinigten JE6-Proteasomen. In höherer Konzentration reduzierte sich ebenfalls die Proteasomaktivität der gereinigten T2-Proteasomen. Der in Abbildung 11 dargestellte Versuch zeigt einen unabhängigen Ansatz, der den signifikanten Unterschied in der Proteasomaktivität bei geringen Konzentrationen von ONX-0914 bestätigte.

Die in Abbildung 10 gezeigte Proteasominhibition durch ONX-0914 wurde im Folgenden durch die Aktivitätsanalyse von gereinigten Proteasomkomplexen erweitert. In Abbildung 12 und 13 ist die Chymotrypsin-ähnliche Proteasomaktivität der β 5/ β 5i-UE (gemessen mittels Suc-LL-Val-Tyr-AMC [Tyr-Substrat]) und die Trypsin-ähnliche Proteasomaktivität der β 2/ β 2i-UE (gemessen mittels Val-Gly-Arg-AMC [Arg-Substrat]) dargestellt. Untersucht wurden gereinigte Proteasomkomplexe aus T27-Zellen (Expression von β 5i/LMP7-, β 1i/LMP2 und β 2i/MECL-1), A375-Melanomzellen (Expression von β 5i/LMP7, siehe Abbildung 6) im Vergleich zu T2-Zellen (Expression der UE des Standardproteasoms, hier nicht gezeigt).

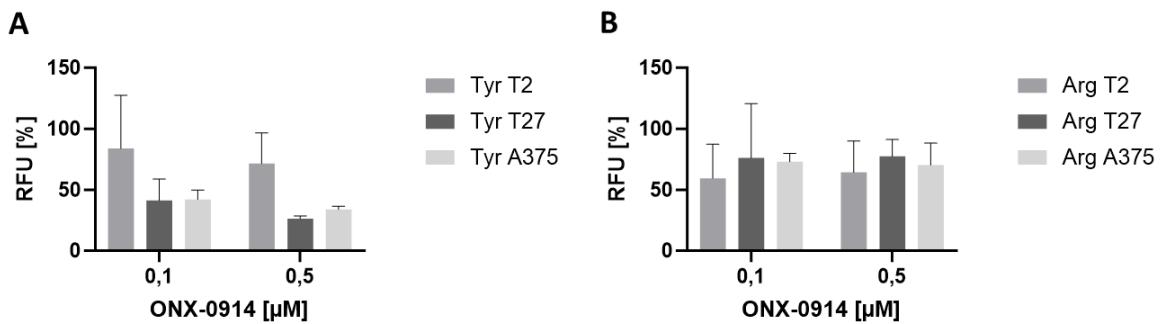


Abbildung 12 – Proteasomaktivitäten gereinigter Proteasomkomplexe mit ONX-0914: Chymotrypsin-ähnliche/β5/β5i (Tyr)-Proteasomaktivität von β5i/LMP7-haltigen T27- und A375-Proteasomen gemessen mittels Suc-LL-Val-Tyr-AMC (A, n=2) sowie Trypsin-ähnliche/β2/β2i (Arg)-Proteasomaktivität von β2i/MECL-1-haltigen T27-Proteasomen gemessen mittels Val-Gly-Arg-AMC (B, n=3) im Vergleich zur Standardproteasom-UE in T2-Proteasomen behandelt mit 0,1μM und 0,5μM ONX-0914 angegeben als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

Durch die Behandlung mit ONX-0914 zeigte sich eine Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen β5/β5i-Proteasomaktivität der T27- und A375-Proteasomkomplexe. Im Vergleich dazu wurde die β5-Aktivität der T2-Standardproteasomen durch ONX-0914 in mittlerer Konzentration (0,1μM) nur gering gehemmt. Bei höherer Konzentration (ONX-0914 0,5μM) ergab sich eine mäßige Fluoreszenzreduktion der T2-Proteasomen, was auf unspezifische Nebeneffekte hinweist. Die Trypsin-ähnliche/β2/β2i-Proteasomaktivität aller Proteasomen wurde durch ONX-0914 kaum beeinflusst.

In Abbildung 13 wurde die Proteasomaktivität von gereinigten Proteasomkomplexen nach Inhibition mit BSc2189 analysiert.

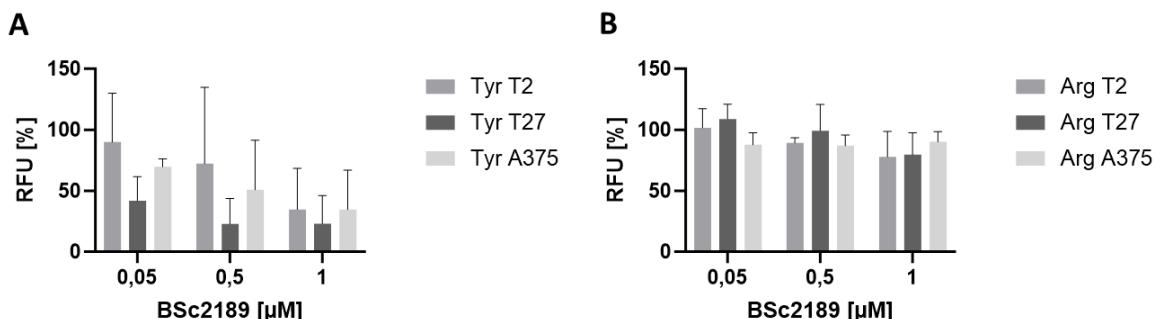


Abbildung 13 – Proteasomaktivität gereinigter Proteasomkomplexe mit BSc2189: Chymotrypsin-ähnliche/β5/β5i (Tyr)-Proteasomaktivität von β5i/LMP7-haltigen T27- und A375-Proteasomen (A) sowie Trypsin-ähnliche/β2/β2i (Arg)-Proteasomaktivität von β2i/MECL-1-haltigen T27-Proteasomen (B) im Vergleich zur Standardproteasom-UE in T2-Proteasomen behandelt mit 0,05, 0,5 und 1μM des Inhibitors BSc2189 angegeben als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (n=2).

Analog zu den in Abbildung 10 dargestellten Ergebnissen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proteasomaktivität durch BSc2189. In geringer Konzentration ergab sich wie bei JE6-Proteasomkomplexen eine deutliche Inhibition von gereinigten T27-Proteasomkomplexen aufgrund der Überexpression von β5i/LMP7, aber auch von β5/MB1. Im Vergleich dazu zeigte sich eine geringere Hemmung der β5-Aktivität gereinigter T2-Standardproteasomkomplexe. Die Proteasomaktivität der aus A375-Zellen

gereinigten Proteasomkomplexe mit Expression sowohl von β 5i/LMP7 als auch von β 5/MB1 zeigte wie bei Inhibition durch ONX-0914 eine mittelstarke Proteasominhibition [201]. Es ist somit anzunehmen, dass durch BSc2189 konzentrationsabhängig sowohl die β 5i-, als auch die β 5-Proteasomaktivität gehemmt wird. Die Trypsin-ähnliche/ β 2/ β 2i-Proteasomaktivität wurde durch BSc2189 nicht beeinflusst.

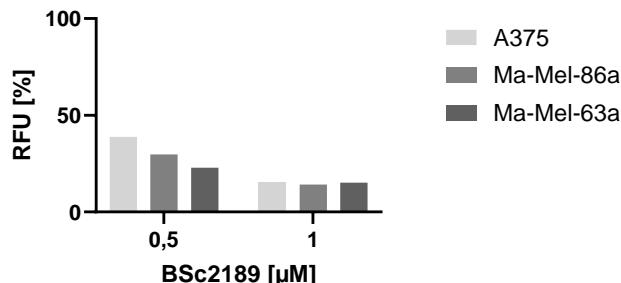


Abbildung 14 – Proteasomaktivität gereinigter Melanom-Proteasomkomplexe mit BSc2189: Chymotrypsin-ähnliche/ β 5i- β 5i-Proteasomaktivität gereinigter Proteasomkomplexe von Melanomzellen nach Behandlung mit 0,5 μ M und 1 μ M des Proteasominhibitors BSc2189 angegeben als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (n=1).

Die Analyse der Inhibition gereinigter Proteasomkomplexe weiterer humaner Melanomzelllinien, die die IP-UE β 5i/LMP7 exprimieren (siehe Abbildung 6, [197]), ist der Abbildung 14 zu entnehmen. Hierbei wurde eine deutliche Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasomaktivität durch den Proteasominhibitor BSc2189 nachgewiesen.

Zusammenfassend wurde somit für ONX-0914 in geringer Konzentration (bis 0,1 μ M) eine β 5i/LMP7-spezifische Hemmung bestätigt [26]. BSc2189 inhibiert sowohl die IP-UE β 5i/LMP7 als auch die Standardproteasom-UE β 5/MB1, wobei in geringer Konzentration die Aktivität β 5i/LMP7-haltiger Proteasomkomplexe stärker reduziert zu sein scheint.

3.2.2 Inhibition zellulärer Proteasomen humaner MeWo-Zellen durch BSc2189 und Bortezomib

Entsprechend der unter 2.2.4 dargestellten verschiedenen Varianten von Analysen der Proteasomaktivität ist in der Abbildung 15 die Analyse der zellulären Proteasominhibition in MeWo-/MeWo_{Eto}-Zellen durch BSc2189 dargestellt.

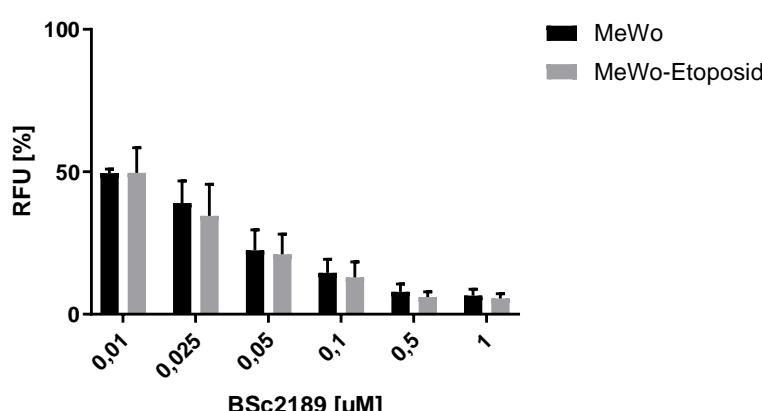
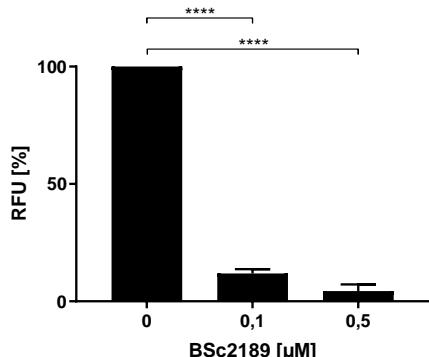


Abbildung 15 – Zelluläre Proteasomaktivität nach Behandlung mit BSc2189: Chymotrypsin-ähnliche/ β 5-Proteasomaktivität von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 1h-Inkubation mit BSc2189 als relative Fluoreszenz nach 60min kinetischer Messung (n=3, sämtliche Werte entsprechend ***p < 0,0001 signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

Es zeigte sich eine hoch signifikante konzentrations-abhängige Reduktion der β 5-Aktivität der MeWo-Zellen in der zellulären Proteasomaktivitätsbestimmung. Bei gleicher Expression des β 5-Standardproteasoms (siehe 3.1.2) war kein Unterschied der β 5-Aktivität zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen

festzustellen. Ab einer Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ BSc2189 scheint keine weitere Reduktion der zellulären Proteasomaktivität möglich zu sein. Die Proteasomkomplexe der MeWo-Zellen sind ab dieser Konzentration somit als vollständig gehemmt anzusehen. Die kalkulierte IC₅₀ der Hemmung der Aktivität zytoplasmatischer Proteasomkomplexe der MeWo-Zellen, also zytosolischer Extrakte, liegt bei einem R^2 von 0,9767 bei 10,42nM.



In der Abbildung 16 ist die Analyse der Proteasomaktivität im zytoplasmatischen MeWo-Proteinlysats nach 24h Inkubation mit BSc2189 dargestellt. Es zeigte sich nach einmaliger Zugabe des reversiblen Inhibitors eine über 24h andauernde signifikante Inhibition der Proteasomkomplexe.

Abbildung 16 – Proteasomaktivität nach 24h Behandlung mit BSc2189: Chymotrypsin-ähnliche/ β 5-Proteasomaktivität von für 24h mit BSc2189 behandelten MeWo-Zellen als relative Fluoreszenz (RFU) nach 180min kinetischer Messung ($n=3$, $****p < 0,0001$).

Zur Analyse der Inhibition des klinisch verwendeten Proteasominhibitors Bortezomib erfolgte die zelluläre Proteasomaktivitätsbestimmung in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen (Abbildung 17).

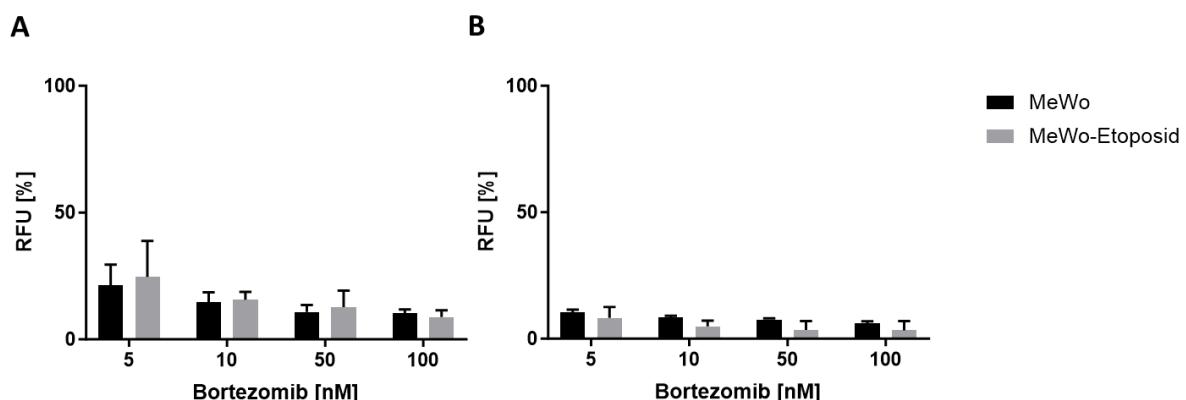


Abbildung 17 – Zelluläre Proteasomaktivität nach Behandlung mit Bortezomib: Chymotrypsin-ähnliche/ β 5-Proteasomaktivität von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 1h- (A) und 4h- (B) Inkubation mit Bortezomib nach 60min kinetischer Messung angegeben als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ($n=3$, sämtliche Werte entsprechend $****p < 0,0001$ signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

Die β 5-Aktivität zeigte sich in der geringsten verwendeten Konzentration von Bortezomib hoch signifikant reduziert, mit weiterer konzentrationsabhängiger Abnahme. Entsprechend der Ergebnisse für BSc2189 ergaben sich keine Unterschiede zwischen MeWo-/MeWo_{Eto}-Zellen.

Die Analyse der β 5-Proteasomenaktivität von MeWo-Zellen nach 24h Behandlung mit dem Proteasominhibitor PI-083 ist der Abbildung 18 zu entnehmen (siehe folgende Seite 47).

Im Vergleich mit den zuvor dargestellten Proteasominhibitoren ergab sich nur eine geringe Reduktion der Proteasomaktivität.

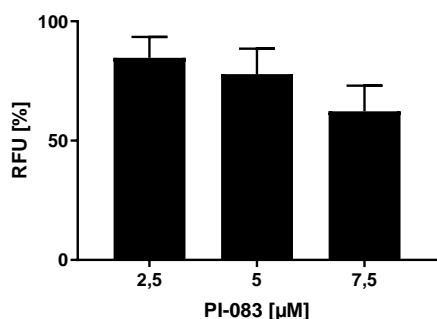


Abbildung 18 – Proteasomaktivität nach Behandlung mit PI-083: Chymotrypsin-ähnliche/β5-Proteasomaktivität von MeWo-Zellsäten nach 24h Behandlung mit PI-083 angegeben als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) in % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (n=2).

Zusammenfassend konnte für Bortezomib und BSc2189 eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Reduktion der zellulären Proteasomaktivität gezeigt werden. Der Proteasominhibitor PI-083 zeigt nur eine geringe Inhibition der β5-Aktivität.

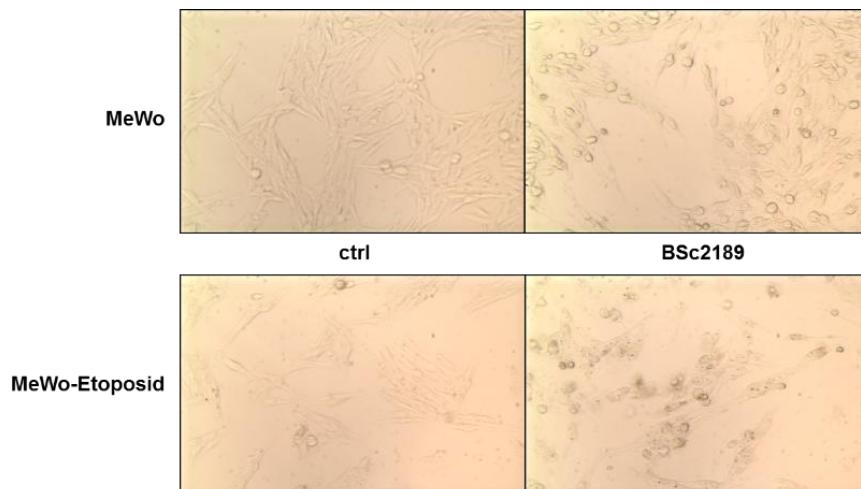
Die Ergebnisse der Inhibition der Proteasomaktivitäten in Abhängigkeit der Expression von IP-UE dienen als Grundlage für die folgenden Analysen zur zytotoxischen Wirkung der Proteasominhibitoren.

3.3 Untersuchung der Zellviabilität unter Behandlung mit Proteasominhibitoren

Die Inhibition des Proteasoms beeinflusst das Überleben von Tumorzellen [54, 202–204]. Aufgrund dessen analysierten wir die zellulären Auswirkungen der Behandlung von Proteasominhibitoren auf Melanomzellen. Dafür erfolgte die Untersuchung der Viabilität mittels Kristallviolett Assay [205]. Die Viabilität bezieht unter anderem Proliferation sowie Zelltod ein und gibt somit annäherungsweise die Zytotoxizität eines Inhibitors an. Die pharmakologisch-toxikologische Wirkung der Inhibitoren wird am Ende jeden Abschnitts als mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) angegeben.

3.3.1 Änderung von Zellwachstum und -morphologie von Melanomzellen durch Behandlung mit Proteasominhibitoren

In Abbildung 19 sind exemplarisch MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen mikroskopisch dargestellt.



Unter Behandlung mit Proteasominhibitoren zeigte sich eine Reduktion des Zytoplasmas, des Zellwachstums und der zellulären Ausläufer. Abhängig von der Konzentration des Proteasominhibitors

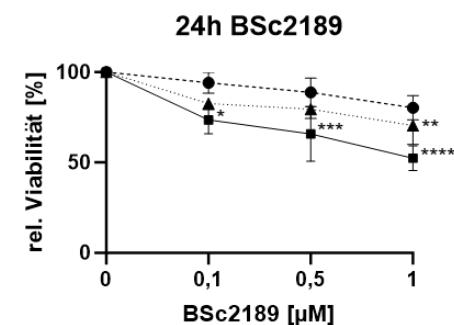
Abbildung 19 – Morphologische Veränderung unter Behandlung mit Proteasominhibitoren: Mikroskopische Beobachtung von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 24h Behandlung mit 2µM BSc2189.

sowie der Inkubationszeit lassen sich zytotoxische Effekte beobachten.

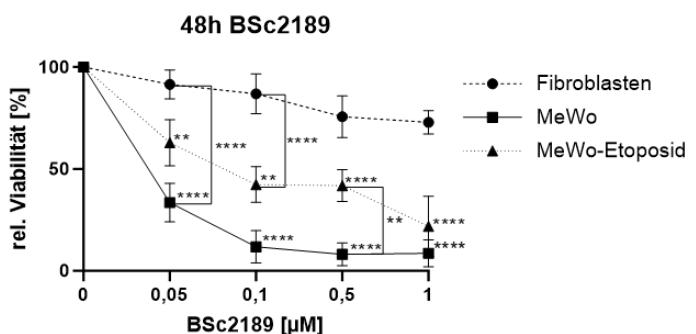
3.3.2 Viabilität humaner MeWo-Zellen unter Proteasominhibition

Zur Analyse des zytotoxischen Effekts in humanen Melanomzellen im Vergleich zu Chemotherapie-resistenten und nicht-entarteten Zellen erfolgte die in Abbildung 20 dargestellte Viabilitätsanalyse von MeWo-, MeWo_{Eto}-Zellen und Fibroblasten (NHDF).

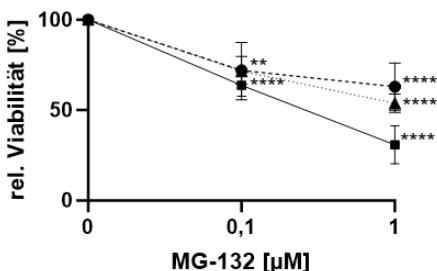
A



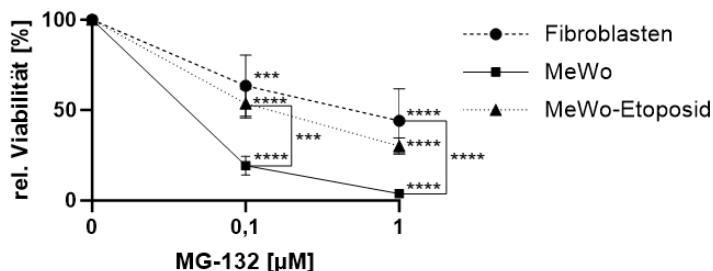
B



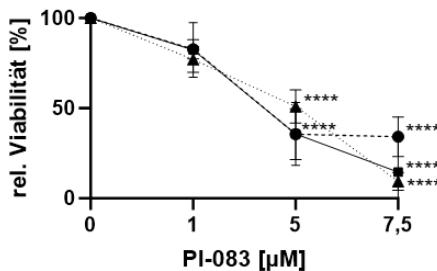
24h MG-132



48h MG-132



24h PI-083



48h PI-083

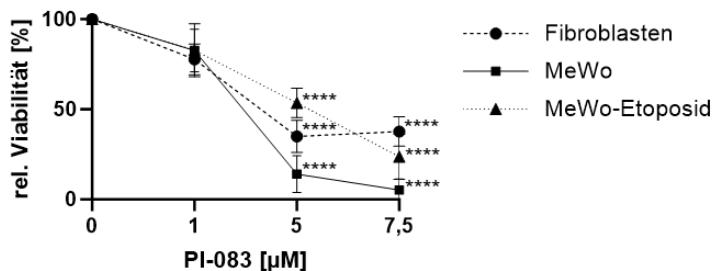


Abbildung 20 – Zellviabilität: relative Viabilität von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen sowie Fibroblasten 24h (A, n=5) und 48h (B, n=4) nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189, MG-132 und PI-083 in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, Symbole an den Werten/Datenpunkten entsprechen Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle, Signifikanzen an Klammern entsprechen Unterschiede verschiedener Zellkulturen zueinander).

Allgemein bestätigte sich eine geringere Viabilität bei höherer Konzentration und längerer Inkubation der Proteasominhibitoren. Nach 24h Behandlung von MeWo-Zellen mit 0,1 μM BSc2189 zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen Viabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (26%, p<0,0001) und zu humanen Fibroblasten (20%, p=0,0023).

Nach 48h Inkubation mit BSc2189 zeigte sich eine weitere Zunahme der Zytotoxizität in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen ohne signifikante Auswirkungen in Fibroblasten. In geringer Konzentration (BSc2189 0,05µM) ergab sich nach 48h eine hoch signifikante Reduktion der Viabilität in MeWo-Zellen um 66% und in MeWo_{Eto}-Zellen um 37%. Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Viabilitätsreduktion der drei Zelllinien untereinander im Vergleich: MeWo vs. Fibroblasten BSc2189 0,05µM – 58% (p<0,0001), MeWo_{Eto} vs. Fibroblasten BSc2189 0,1µM – 52% (p<0,0001), MeWo vs. MeWo_{Eto} BSc2189 0,1µM – 34% (p=0,0276).

Zusammenfassend zeigte sich somit eine hohe Zytotoxizität von BSc2189 auf MeWo-Zellen bei geringer, nicht-signifikanter Beeinflussung von Fibroblasten sowie eine, im Vergleich zu MeWo-Zellen, geringere Viabilitätsreduktion von MeWo_{Eto}-Zellen. Dies wird durch die Unterschiede der IC50-Werte verdeutlicht (Tabelle 17).

Tabelle 17: IC50 von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen sowie Fibroblasten nach 48h Behandlung mit BSc2189.

IC50 [nM]	MeWo	MeWo _{Eto}	Fibroblasten
BSc2189	45	80	5816

Im Vergleich der Zytotoxizität von BSc2189 und MG-132 auf MeWo-Zellen zeigte sich nach 24h und 48h kein signifikanter Unterschied, bei jedoch höherer Zytotoxizität von MG-132 auf Fibroblasten. In der Analyse der Viabilität von MeWo-/MeWo_{Eto}-Zellen und Fibroblasten mit PI-083 ließ sich nach 24h und 48h in allen drei Zelllinien eine signifikante Zytotoxizität ab einer Konzentration von 5µM ohne signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien feststellen.

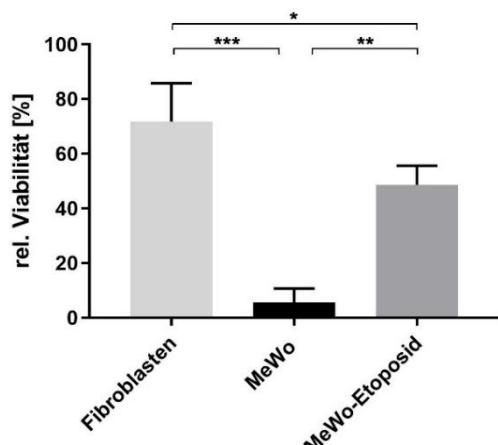


Abbildung 21 – Zellviabilität nach Behandlung mit Bortezomib: Relative Viabilität von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen sowie Fibroblasten 48h nach Behandlung mit 10nM Bortezomib (n=3, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, Signifikanzen an Klammern entsprechen Unterschiede zwischen Fibroblasten, MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen).

In Abbildung 21 ist die Viabilität von MeWo-, MeWo_{Eto}-Zellen und Fibroblasten unter Behandlung mit Bortezomib dargestellt. Es bestand ein signifikanter Unterschied in der zytotoxischen Wirkung von Bortezomib auf MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen und Fibroblasten bei geringen Konzentrationen. Im Vergleich mit der Inhibition der Proteasomaktivität (3.2) und der Viabilität unter BSc2189 zeigt sich durch Bortezomib auf Fibroblasten eine höhere Zytotoxizität.

Zusammenfassend zeigt sich ein Unterschied in der Viabilitätsreduktion durch die verwendeten Proteasominhibitoren MG-132, Bortezomib und BSc2189 zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen vor allem bei geringen Konzentrationen. BSc2189 hat eine ausgeprägte Zytotoxizität auf MeWo-Zellen bei nur geringer Viabilitätsreduktion in Fibroblasten.

Nach 48h Inkubation mit BSc2189 zeigte sich eine weitere Zunahme der Zytotoxizität in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen ohne signifikante Auswirkungen in Fibroblasten. In geringer Konzentration (BSc2189 0,05µM) ergab sich nach 48h eine hoch signifikante Reduktion der Viabilität in MeWo-Zellen um 66% und in MeWo_{Eto}-Zellen um 37%. Es bestand ein signifikanter Unterschied in der Viabilitätsreduktion der drei Zelllinien untereinander im Vergleich: MeWo vs. Fibroblasten BSc2189 0,05µM – 58% (p<0,0001), MeWo_{Eto} vs. Fibroblasten BSc2189 0,1µM – 52% (p<0,0001), MeWo vs. MeWo_{Eto} BSc2189 0,1µM – 34% (p=0,0276).

3.3.3 Viabilitätsreduktion humaner Melanomzellen durch ONX-0914

Die Analyse der zellulären Viabilität unter Behandlung mit dem β 5i/LMP7-spezifischen Proteasominhibitor ONX-0914 erfolgte anhand der β 5i/LMP7-exprimierenden Melanomzelllinien A375 mit *BRAF*-V600E-Mutation und UKRV-Mel-18a im Vergleich zu Fibroblasten und der β 5/MB1-exprimierenden *BRAF*-Wildtyp MeWo-Zelllinie (Abbildung 22).

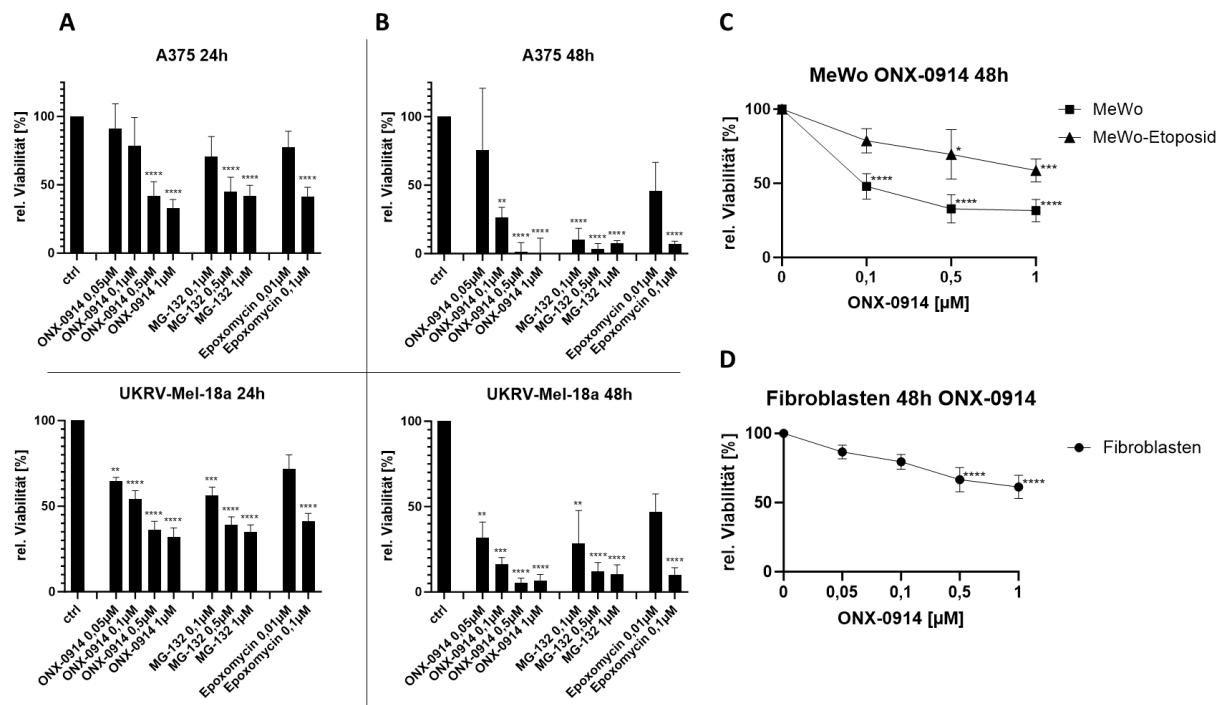


Abbildung 22 – Zellviabilität humaner Melanomzellen nach Behandlung mit ONX-0914: Relative Viabilität von A375- und UKRV-Mel-18a-Zellen nach 24h (A) und 48h (B) Inkubation mit ONX-0914 im Vergleich zu MG-132 und Epoxyomycin ($n=3$). Zellviabilität nach 48h Behandlung mit ONX-0914 von MeWo-/MeWo_{Eto}-Zellen (C, $n=3$) und Fibroblasten (D, $n=2$, Dreifachbestimmung; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Symbole an den Werten/Datenpunkten entsprechen Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle).

In allen untersuchten Zelllinien war eine konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität durch die Behandlung mit ONX-0914 festzustellen. Für die Melanomzelllinien A375 und UKRV-Mel-18a zeigte sich dabei eine hoch signifikante Zytotoxizität durch Behandlung mit ONX-0914 im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48h Inkubation ergab sich im Vergleich zu 24h eine weitere Reduktion der Viabilität. Die Behandlung von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen mit ONX-0914 zeigte sowohl im Vergleich zu den Melanomzelllinien A375 und UKRV-Mel-18a als auch zur Behandlung anderer Proteasominhibitoren (3.3.2) eine geringere Zytotoxizität. Die Behandlung von Fibroblasten mit ONX-0914 ergab eine geringe Reduktion der Viabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welches wie die Viabilitätsreduktion von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen mit Expression der β 5-UE des Standardproteasoms auf unspezifische Nebeneffekte oder eine mögliche partielle Inhibition der β 5-UE zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kam es in den β 5i/LMP7-exprimierenden Melanomzelllinien A375 und UKRV-Mel-18a durch ONX-0914 zu einer hoch signifikanten Zytotoxizität bei einer IC50 von

25,6nM für UKRV-Mel-18a. Im Vergleich zeigte sich die Reduktion der Viabilität von Fibroblasten sowie der MeWo- und MeWo_{Eto}-Zelllinie mit Expression der β5-UE des Standardproteasoms deutlich geringer und vor allem in hohen Konzentrationen bestehend.

3.3.4 Viabilitätsreduktion von BRAF-Wildtyp und BRAF-mutierten humanen Melanomzellen durch BSc2189 und Bortezomib

Onkogene Mutationen im Gen *BRAF*, welches die Proteinkinase B-Raf des MAPK-Signalweges kodiert, sind aufgrund ihrer Verbreitung von 40-50% und fehlregulierten Zellfunktionen wie Proliferation beim malignen Melanom relevant (1.6, [131]). Zur Analyse der Zytotoxizität von Proteasominhibitoren auf Melanomzellen in Abhängigkeit des *BRAF*-Mutationsstatus erfolgte die Untersuchung von *BRAF*-Wildtyp (Ma-Mel-15) und *BRAF*-mutierten (SK-Mel-28 und Ma-Mel-54a) Melanomzelllinien (Abbildung 23) [206].

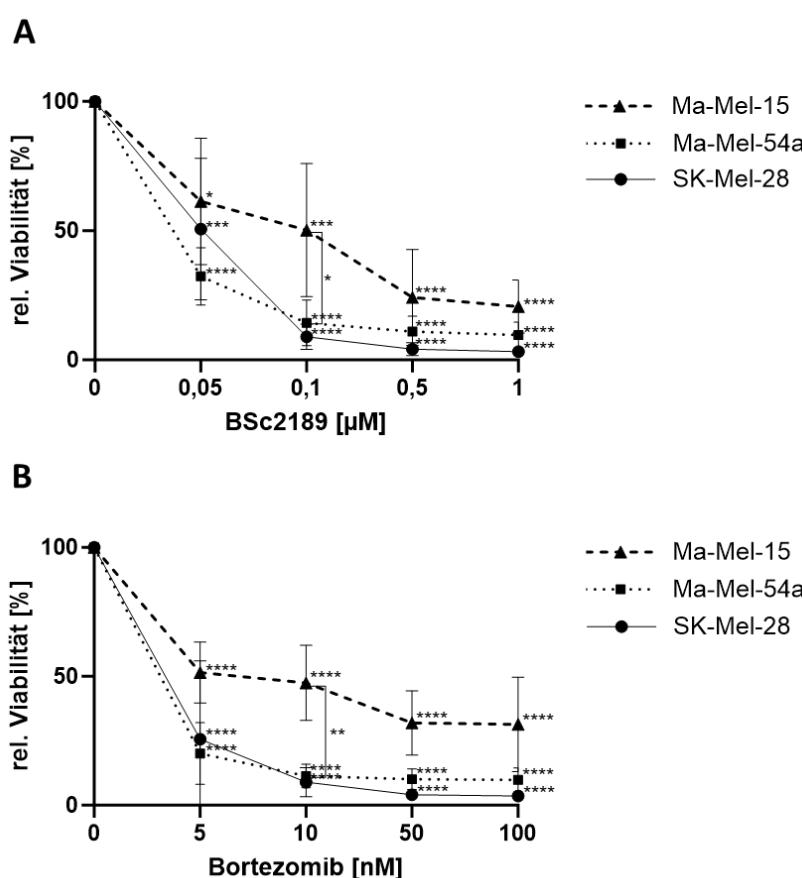


Abbildung 23 – Viabilität von *BRAF*-Wildtyp und *BRAF*-mutierten humanen Melanomzelllinien: Kristallviolett Assay von *BRAF*-mutierten SK-Mel-28- und Ma-Mel-54a-Zellen sowie *BRAF*-Wildtyp Ma-Mel-15-Zellen nach Behandlung mit BSc2189 (A) und Bortezomib (B) für 48h ($n=4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Symbole an den Werten/Datenpunkten entsprechen Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle, Signifikante Unterschiede zwischen Ma-Mel-15 und beiden *BRAF*-mutierten Zellen an Klammern).

Behandlung mit 10nM Bortezomib beobachtet werden. Die analysierten *BRAF*-mutierten Melanomzellen reagierten somit sensibler auf die Behandlung mit Proteasominhibitoren.

Die Viabilität aller Zelllinien wurde durch BSc2189 und Bortezomib bereits bei der geringsten verwendeten Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert. Es zeigte sich weiterhin eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zytotoxizität. Im Vergleich der Melanomzelllinien untereinander zeigten sich bei BSc2189 0,1μM signifikante Unterschiede von über 35% zwischen den *BRAF*-mutierten Zelllinien Ma-Mel-54a und SK-Mel-28 sowie den *BRAF*-wt-Zellen Ma-Mel-15. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der

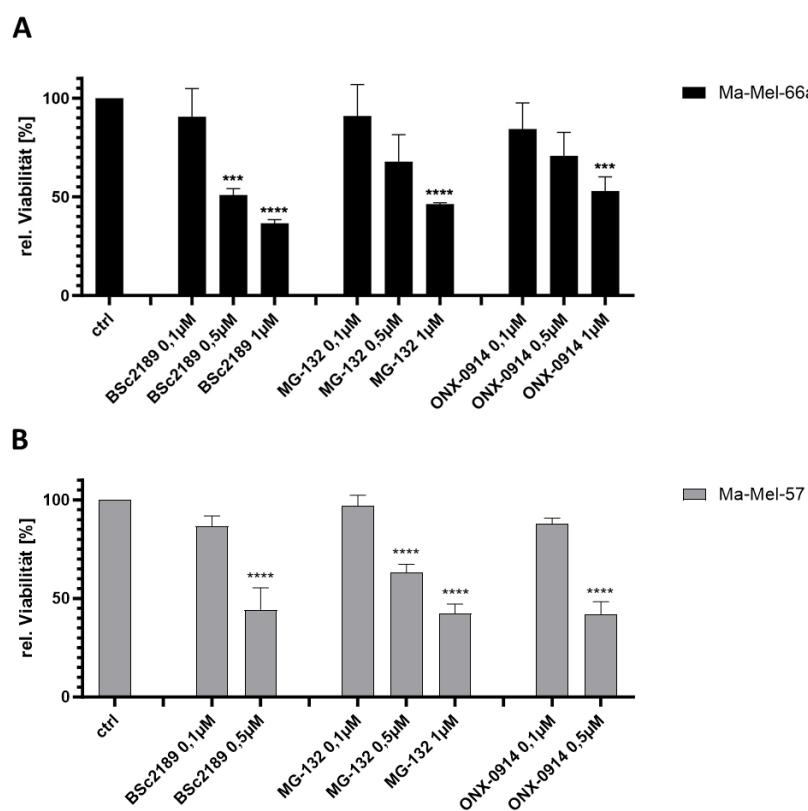
Entsprechend der Kalkulation der IC50 (Tabelle 18) zeigte BSc2189 im Vergleich zu MG-132 (in Abbildung 23 nicht dargestellt) eine niedrigere IC50 als Beleg des größeren Potentials.

Tabelle 18: IC50 von BRAF-Wildtyp und BRAF-mutierten humanen Melanomzelllinien nach Behandlung mit BSc2189 und MG-132 für 48h

IC50 [nM]	Ma-Mel-15	SK-Mel-28	Ma-Mel-54a
BSc2189	104,2	50,35	23,34
MG-132	105,4	157,4	59,78

3.3.5 Viabilitätsreduktion von BRAF-Inhibitor-resistenten Melanomzellen durch Proteasominhibitoren

In Abbildung 24 ist die Viabilitätsanalyse der BRAF-Inhibitor-resistenten humanen Ma-Mel-66a- und Ma-Mel-57-Zellen unter Behandlung mit Proteasominhibitoren dargestellt. Dabei zeichnen sich die Ma-Mel-66a-Zellen durch intrinsische Resistenz und die Ma-Mel-57-Zellen durch erworbene Resistenz gegen den BRAF-Inhibitor PLX-4032 (PLX, Vemurafenib) aus [169, 170].



*Abbildung 24 – Viabilität von BRAF-Inhibitor-resistenten Zelllinien: Ma-Mel-66a-Zellen (A, n=4) und Ma-Mel-57-Zellen (B, n=3) nach 24h Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189, MG-132 und ONX-0914 (***p < 0,001, ****p < 0,0001).*

können somit in BRAF-Inhibitor-resistenten Zelllinien sowohl mit intrinsischer als auch erworbener Resistenz eine signifikante Zytotoxizität auslösen.

Es bestand eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität in Ma-Mel-66a- und Ma-Mel-57-Zellen nach 24h Behandlung mit BSc2189 und ONX-0914 (je 0,5µM). Durch BSc2189 war eine höhere Zytotoxizität als mit ONX-0914 in Ma-Mel-66a-Zellen mit mäßiger β5i/LMP7-Expression ([207]) im Vergleich zu Ma-Mel-57-Zellen erkennbar, jedoch ohne ein signifikantes Resultat zu erzeugen.

Proteasominhibitoren

3.4 Analyse des Zelltods durch BSc2189 in MeWo-Zellen

Das Proteasom beeinflusst den Zelluntergang durch die Regulation apoptotischer und zellregulatorischer Proteine wie Caspase-3 [62]. Die Zytotoxizität durch Proteasominhibitoren besteht u. a. durch die Induktion des Zelltods in Form von Apoptose und Nekrose. Somit ist die Analyse dessen ein wichtiger Teil der Untersuchung von BSc2189.

3.4.1 Untersuchung des Zelltods

Zur Beurteilung des Zelltods von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen erfolgte zunächst der in Abbildung 25 gezeigte Trypanblau-Zelltod-Assay.

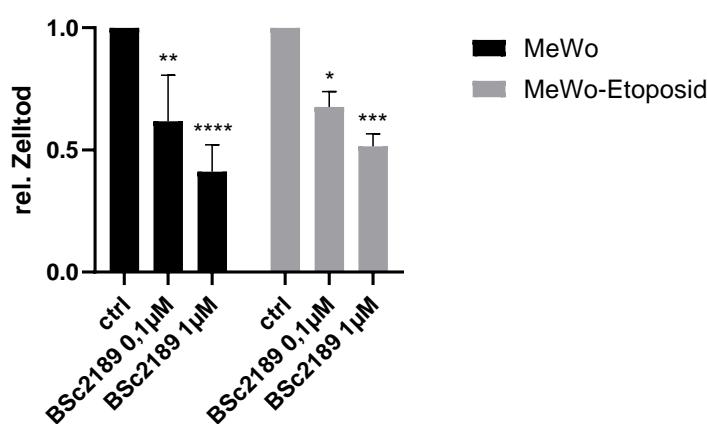


Abbildung 25 – Trypanblau-Zelltod-Assay: relativer Zelltod im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 24h Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189 und PI-083 ($n=3$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$).

Die Anzahl der lebenden Zellen nach 24h Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189 und PI-083 wurde im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Konzentrationsabhängig besteht ein Zelltod von bis zu 59% (1 μ M BSc2189). Es ergab sich – anders als bei der Viabilitätsanalyse – kein signifikanter Unterschied zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen.

3.4.2 Aktivierung der Caspase-3

Zur Untersuchung der Apoptoseinduktion auf Proteinebene erfolgte die Analyse von Caspase-3 in MeWo-Zellen mittels Western Blot (Abbildung 26).

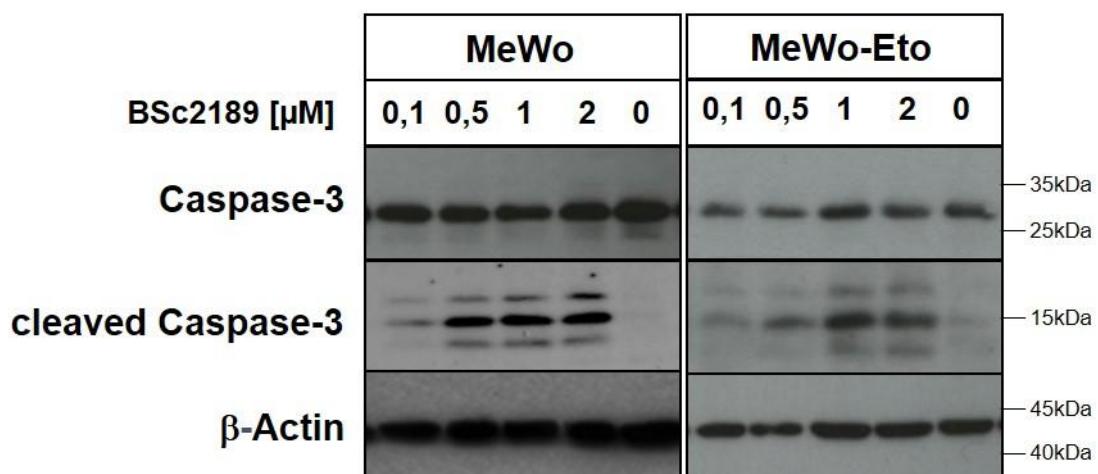


Abbildung 26 – Caspase-3-Induktion: Western Blot-Analyse der konzentrationsabhängigen Spaltung und Aktivierung der Caspase-3 durch Behandlung mit BSc2189 für 24h (A, $n=4$).

Nach 24h Behandlung von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen mit BSc2189 zeigte sich eine konzentrationsabhängige Spaltung (cleaved Caspase-3) und somit Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In MeWo-Zellen scheint im Vergleich zu MeWo_{Eto}-Zellen bereits bei BSc2189 0,5µM ein deutlicher Anstieg der cleaved Caspase-3 zu bestehen. Aufgrund begrenzter Möglichkeit zur Quantifizierung der Caspase-3-Spaltung im Western Blot und zur Bestätigung in einem zweiten Verfahren erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der aktiven Caspase-3 nach 24h und 48h Behandlung mit BSc2189 (Abbildung 27).

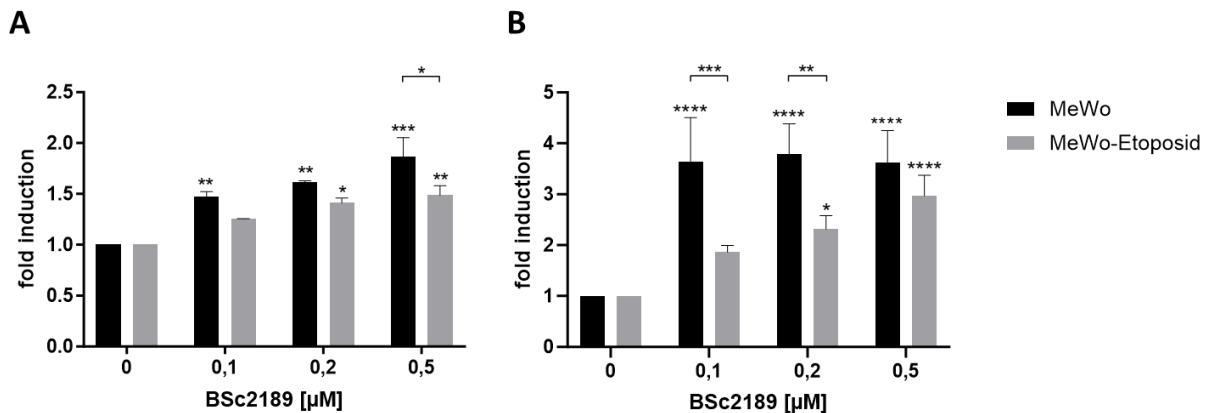


Abbildung 27 – Nachweis der aktiven Caspase-3 nach Inkubation mit BSc2189: Durchflusszytometrische Analyse der Induktion der aktiven Caspase-3 in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nach 24h (A, n=2) und 48h (B, n=4) Behandlung mit steigender Konzentration von BSc2189. Dargestellt ist die relative Zunahme der aktiven Caspase-3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, Symbole an den Werten/Datenpunkten entsprechen Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle, Signifikanzen an Klammern entsprechen Unterschiede zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen).

Nach 24h Behandlung mit BSc2189 war bereits in geringer Konzentration ein signifikanter Anstieg der Aktivierung von Caspase-3 in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen festzustellen. In MeWo-Zellen ergab sich eine höhere Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu MeWo_{Eto}-Zellen. Nach 48h zeigte sich im Vergleich zu 24h Behandlung mit BSc2189 eine Zunahme der aktiven Caspase-3. Es ließ sich dabei insbesondere in geringer Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen feststellen. In MeWo-Zellen nahm nach 48h Behandlung mit BSc2189 die aktive Caspase-3 bei steigender Konzentration anders als in MeWo_{Eto}-Zellen nicht weiter zu.

Zusammenfassend konnte sowohl mittels Western Blot als auch mittels Durchflusszytometrie die Caspase-3-Aktivierung als Mechanismus zur Induktion der Apoptose für BSc2189 nachgewiesen werden.

3.5 Analyse der Beeinflussung des Zellzyklus durch BSc2189

Aufgrund der Regulation von beispielsweise Cyclinen durch das Proteasom kommt es durch Proteasominhibitoren zu Veränderungen im Zellzyklus. Die Analyse des Zellzyklus in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen unter Behandlung mit BSc2189 ist in Abbildung 28 dargestellt.

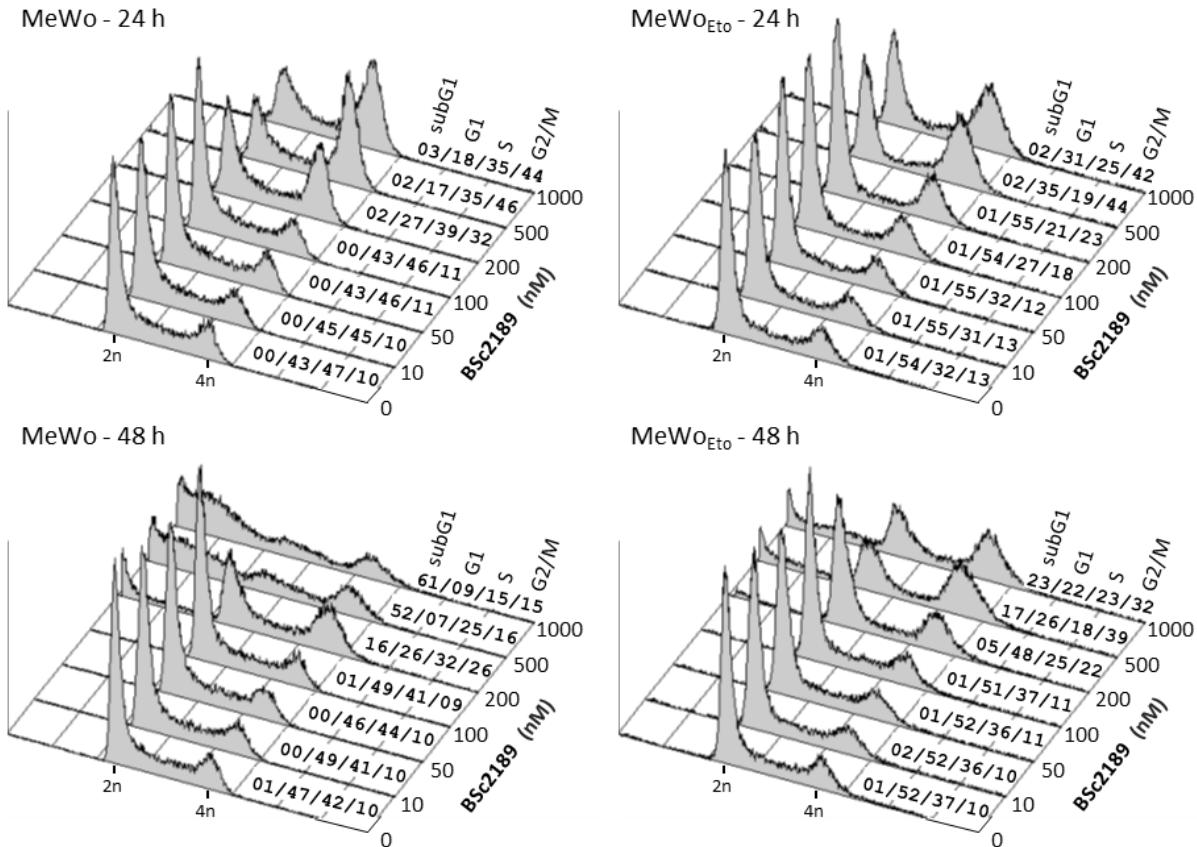


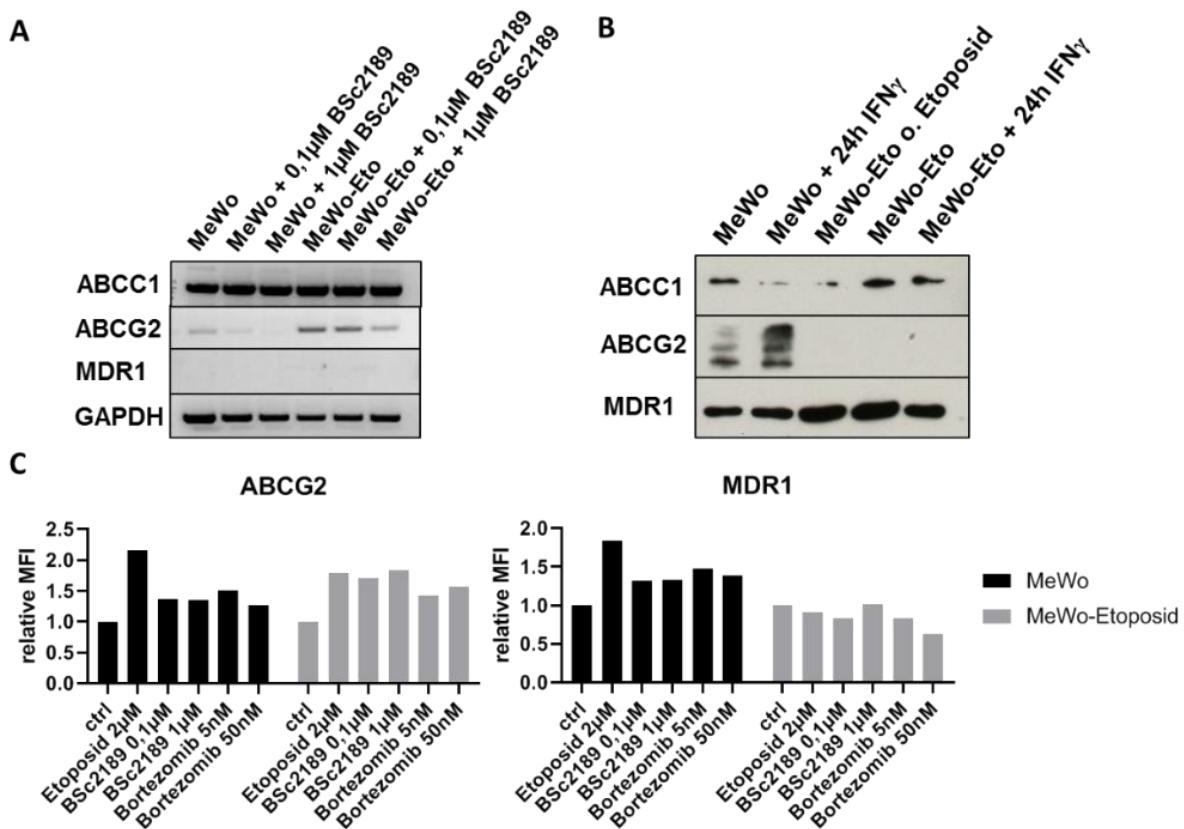
Abbildung 28 – Zellzyklus: durchflusszytometrische Analyse des Anteils der MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen subG1, G1, S- und G2/M-Phase nach 24h und 48h Behandlung mit dem Proteasominhibitor BSc2189. In den DNA-Histogrammen sind die Zellzahl (y-Achse) gegen den DNA-Gehalt (x-Achse) aufgetragen (zVg von Dr. Lüder Wiebusch, Charité, Berlin).

Unter Behandlung mit dem Proteasominhibitor BSc2189 zeigte sich in MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zellen in der G2/M-Phase mit Abnahme der Zellen in S- und G1-Phase. Nach 48h zeigte sich insbesondere in MeWo- im Vergleich zu MeWo_{Eto}-Zellen ein hoher Anteil der Zellen in der subG1-Phase, welche Zellen mit degraderter DNA und somit unter anderem apoptotischen Zellen entsprechen [208].

Somit konnte für BSc2189 ein konzentrationsabhängiger Arrest in der G2/M-Phase sowie subG1-Phase und somit die Beeinflussung des Zellzyklus nachgewiesen werden.

3.6 Vergleich des Effluxes von Proteasominhibitoren durch MDR-Transporter in MeWo-Zellen

Zur Untersuchung weiterer möglicher Ursachen der signifikant unterschiedlichen Auswirkungen der Proteasominhibitoren auf MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen erfolgte die Analyse der Expression der Multi Drug Resistance (MDR)-Transporter (Abbildung 29) sowie die funktionelle Auswertung eines möglichen Effluxes der Proteasominhibitoren (Abbildung 30). Die Expression der ATP-binding-cassette-(ABC)-Transporter wie ABCC1, ABCG2 oder MDR1 gelten als Ursache für erworbene Resistenzen durch Efflux des Agens [158, 159].



basierte Expressionskontrolle von ABCG2 und MDR1 (Abbildung 29-C). Dabei zeigte sich im Vergleich der unbehandelten Kontrollen von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen kein Unterschied in der Expression sowie kein Unterschied in der Expressionsänderung unter Behandlung mit Proteasominhibitoren und Etoposid.

Zur funktionellen Analyse eines möglichen Effluxes von Proteasominhibitoren durch MeWo_{Eto}-Zellen als Erklärung für die geringere Viabilitätsreduktion im Vergleich zu MeWo-Zellen erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit Hilfe des fluoreszierenden Inhibitors Bodipy-BSc2189 (Abbildung 30). Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Detektion des freigesetzten

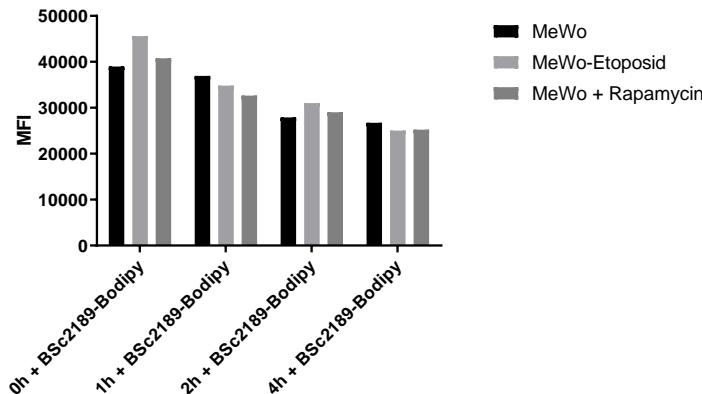


Abbildung 30 – FACS-Analyse des Transports von BSc2189: Durchflusszytometrische Analyse von MeWo, MeWo_{Eto} sowie mit Rapamycin behandelten MeWo-Zellen nach Zugabe des farbstoffgebundenen Bodipy-BSc2189 für 0h, 1h, 2h und 4h (n=1).

Bodipy-Fluoreszenzfarbstoffs nach Exposition mit BSc2189 im Vergleich von MeWo- zu MeWo_{Eto}-Zellen bei Reduktion der Fluoreszenz mit Zunahme der Inkubationszeit. Durch die Hemmung von MDR-Transportern durch den Transporterinhibitor Rapamycin in MeWo-Zellen konnte in zusammenfassender Betrachtung dieser Ergebnisse

belegt werden, dass die unterschiedliche Viabilität von MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen nicht auf eine veränderte Expression und Funktion von MDR-Transportern zurückzuführen ist.

3.7 Einfluss von BSc2189 auf den NF-κB-Signalweg

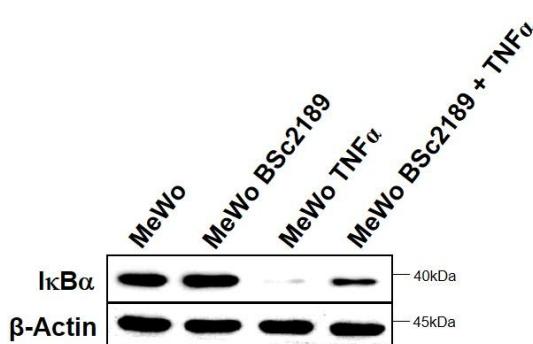


Abbildung 31 – NF-κB-Beeinflussung in MeWo-Zellen: IκBα-Degradation und Stabilisation in MeWo-Zellen nach Behandlung mit 1μM BSc2189 und Stimulation mit TNFα allein und in Kombination (n=3).

Das Proteasom ist u. a. über die Degradation von IκBα an der Regulation der Aktivität des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB beteiligt. Aufgrund der wichtigen Rolle von NF-κB in Prozessen der Zellproliferation und Apoptose erfolgte die Proteinanalyse von IκBα (Abbildung 31). Nach Behandlung der MeWo-Zellen mit TNFα und dadurch Aktivierung der IκB-Kinase β zeigte sich die Degradation des Proteins IκBα (s. 1.4). Nach vorangegangener

Proteasominhibition mit 1μM BSc2189 war hingegen eine Stabilisierung von IκBα deutlich. BSc2189 verhindert somit die Aktivierung von NF-κB. Für den Proteasominhibitor BSc2189 wurde zusammenfassend die IκBα-Stabilisierung und somit die Beeinflussung der Regulation des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB nachgewiesen.

3.8 Analyse der Beeinflussung muriner Melanomzellen durch Proteasominhibitoren

Als Grundlage für murine Tierversuche erfolgte die Analyse der Proteasomzusammensetzung von murinen B16-F10 und Hgf-Cdk4-Zelllinien. Die aus UVB-bestrahlten nackten Mäusen isolierten Hgf-Cdk4^{R24C}-Melanomzelllinien wurden als murines Melanommodell aufgrund der klinisch relevanten Mutation der Zellzyklus-regulierenden Cyclin-abhängigen Kinase 4 (Cdk4^{R24C}), die Unterschiede in Wachstum, Entartung und Morphologie der Melanomzelllinien 1274, 384 und 3158 begründet, verwendet [179–181]. Die B16-F10-Zellen wurden vielfach analysiert und zeichnen sich durch hohe Proliferation aus.

3.8.1 Expression von Immunoproteasom-Untereinheiten in murinen Melanomzelllinien

Die Expression der IP-UE in den verwendeten murinen B16-F10 und Hgf-Cdk4-Zellen ist der Abbildung 32 zu entnehmen.

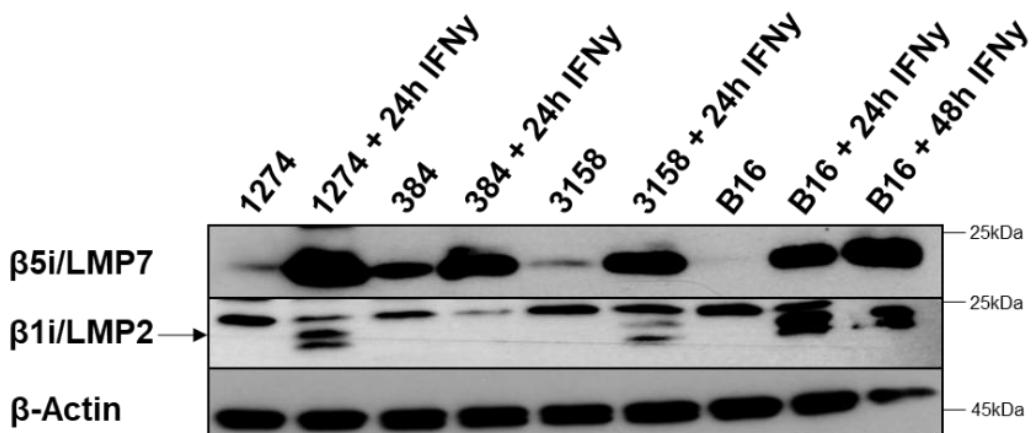


Abbildung 32 – Nachweis von Immunoproteasom-Untereinheiten in murinen Melanomzellen: IFN γ -Stimulation der IP-UE $\beta 5i/LMP7$ und $\beta 1i/LMP2$ in murinen Hgf-Cdk4- und B16-F10-Zellen (n=2).

Nach IFN γ -Stimulation zeigte sich in den Hgf-Cdk4-Zelllinien 1274 und 3158 sowie in der B16-F10-Zelllinie eine starke Induktion von $\beta 5i/LMP7$ und $\beta 1i/LMP2$ bei geringer Expression im unstimulierten Zustand.

3.8.2 Analyse von IκBα in Hgf-Cdk4-Zelllinien

Die proinflammatorischen Eigenschaften der Melanomzellen werden durch die Analyse von IκBα in Hgf-Cdk4-Zelllinien mit Unterschieden in der Proliferation unterstrichen (Abbildung 33) [206].

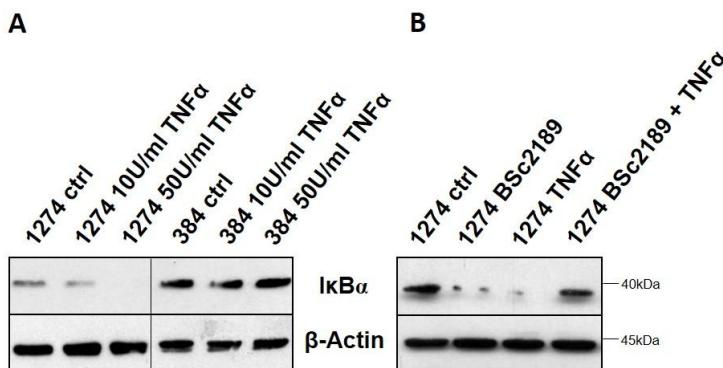


Abbildung 33 – IκBα-Degradation und Stabilisation in murinen Hgf-Cdk4-Melanomzellen: Konzentrationsabhängige Degradation von IκBα in 1274 und 384-Zellen unter TNFα-Stimulation (A, n=2). IκBα-Stabilisation in 1274-Zellen nach Zugabe von 1 μM BSc2189 und TNFα im Vergleich zur Kontrolle sowie zur alleinigen Behandlung mit BSc2189 und TNFα (B, n=4). β-Actin wurde als Ladekontrolle eingesetzt.

In hochproliferativen 1274-Zellen war im Vergleich zu langsam wachsenden 384-Zellen eine konzentrations-abhängige IκBα-Degradation unter Stimulation mit TNFα deutlich. Der NF-κB Signalweg war im Gegensatz dazu in langsam wachsenden 384-Zellen kaum aktivierbar. IκBα konnte in 1274-Zellen nach vorheriger Inkubation mit BSc2189 wieder stabilisiert werden (Abbildung 33-B).

3.8.3 Analyse der Viabilität muriner Melanomzellen

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Proteasominhibitoren auf murine Zelllinien erfolgte die Viabilitätsanalyse von B16-F10-Zellen (Abbildung 34) und Hgf-Cdk4-Zellen (Abbildung 35).

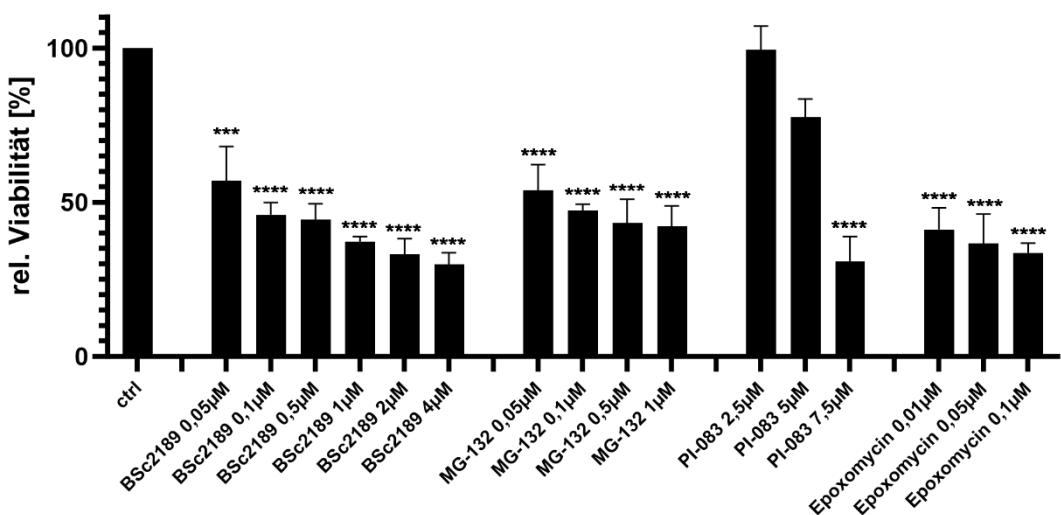


Abbildung 34 – Viabilität von murinen B16-F10-Zellen: Relative Viabilität von B16-F10-Zellen nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189, MG-132, PI-083 und Epoxomycin für 24h bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (n=3, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle).

Entsprechend der bisher dargestellten Kristallviolett Assays zeigte sich eine konzentrations-abhängige, signifikante Reduktion der relativen Viabilität insbesondere durch den Proteasominhibitor BSc2189.

Die Viabilität der sich in Proliferation und morphologischer Entartung unterscheidender muriner Hgf-Cdk4-Zelllinien unter Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189 und ONX-0914 ist in Abbildung 35 dargestellt.

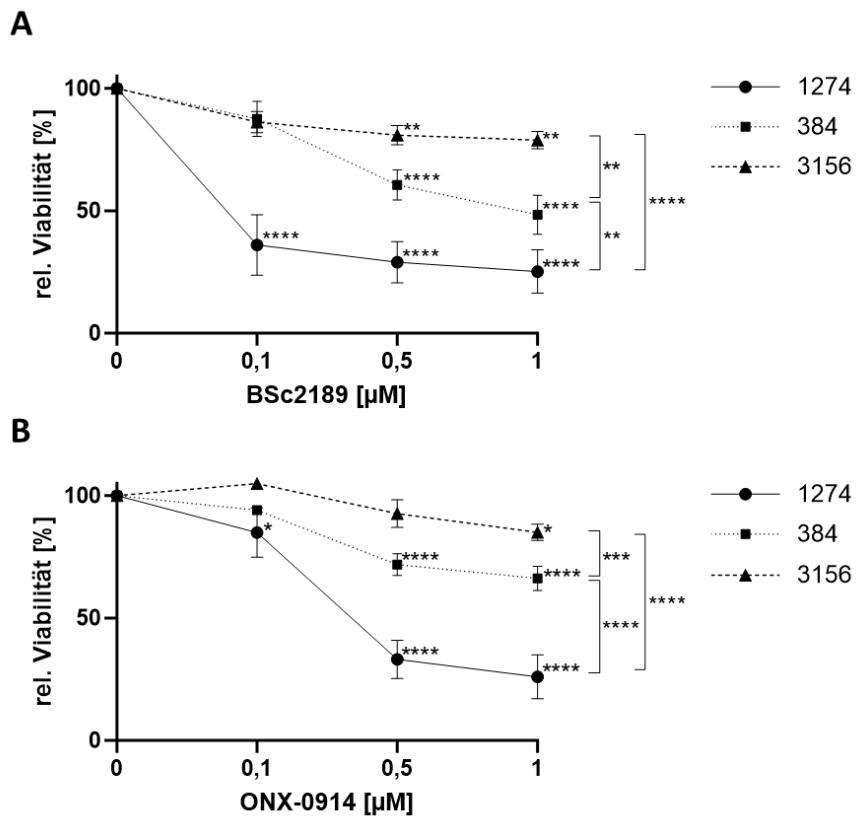


Abbildung 35 – Viabilität von Hgf-Cdk4-Zelllinien: Zellviabilität der murinen Hgf-Cdk4-Zelllinien 1274, 384 und 3156 nach 24h Behandlung mit den Proteasominhibitoren BSc2189 (A, n=4) und ONX-0914 (B, n=4, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, Signifikanzen an Klammern entsprechen Unterschiede der Zellen untereinander an Konzentrationen 0,5μM und 1μM).

Unter Behandlung mit BSc2189 war bereits in geringer Konzentration eine signifikante Reduktion der Viabilität hochproliferativer 1274-Zellen zu messen (BSc2189 0,1μM 64%). 384- und 3156-Zellen zeigten erst unter Behandlung mit 0,5μM BSc2189 eine signifikante Reduktion der Viabilität (384: 39%; 3156: 19%). In geringer Konzentration des β5i/LMP7-spezifischen Proteasominhibitors ONX-0914 zeigte sich aufgrund der geringen

Expression der LMP7/β5i-UE im nicht-induziertem Zustand in den Hgf-Cdk4-Zelllinien (3.8.1) nur in 1274-Zellen eine geringe signifikante Reduktion der Viabilität. In höherer Konzentration zeigte sich in 1274- und 384-Zellen eine deutliche signifikante Zytotoxizität (ONX-0914 0,5μM 1274: 67%; 384: 28%) bei nur geringer signifikanter Zytotoxizität in 3156-Zellen. Entsprechend der in der Grafik angegebenen Signifikanzen lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien nachweisen.

Tabelle 19: IC50 anhand der Viabilität von Hgf-Cdk4-Melanomzelllinien

IC50 [nM]	1274	384
BSc2189	71,46	888,3
ONX-0914	330,8	1838

Die stark divergierenden IC50-Kalkulationen unterstreichen das unterschiedliche Potential der Proteasominhibitoren BSc2189 und ONX-0914 bei den Hgf-Cdk4-Zelllinien in Abhängigkeit von den

Unterschieden im Wachstum, Entartung und Morphologie sowie Expression der LMP7/β5i-UE.

3.9 Migrationsbeeinflussung von Melanomzellen durch BSc2189

Zur Evaluation der Auswirkung des Proteasominhibitors BSc2189 auf die Metastasierung erfolgte die *in vitro*-Migrationsanalyse von B16-F10-Zellen mittels Scratch Assay, welcher

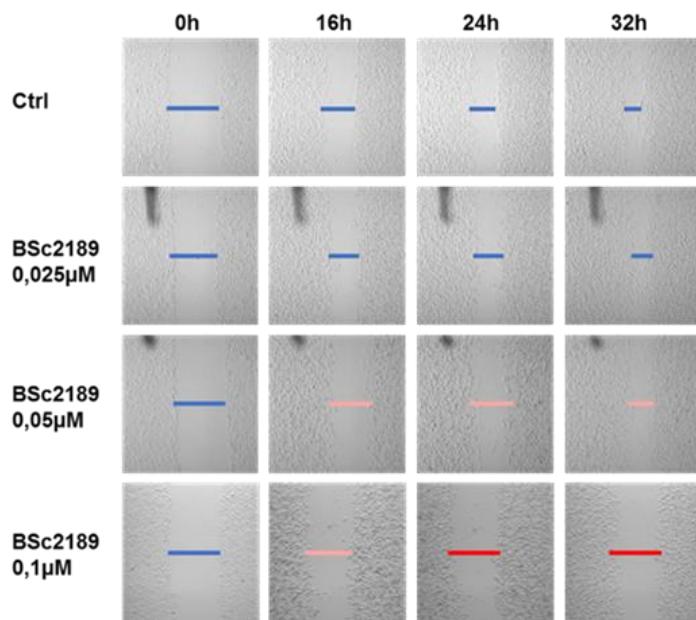


Abbildung 36 – Scratch Assay: Scratch Assay muriner B16-F10-Zellen mit mikroskopischer Aufzeichnung der Viabilität, Migration und morphologischer Veränderungen unter Behandlung mit BSc2189 mit keiner (-blau), mäßiger (-rosa) und ausgeprägter/zytotoxischer (-rot) Auswirkung entsprechend der Breite des zugefügten „Ritzen“ (n=3).

Faktoren wie Zelladhärenz, Proliferation, Zelltod und Geschwindigkeit der Migration miteinbezieht (Abbildung 36 und 37) [209–211]. In unbehandelten Zellen kam es nach Zufügen des „Ritzen“ im Zellverband bei 0h zu einem vollständigen Schluss nach 32 bis 40h. Unter Behandlung mit BSc2189 kam es ab einer Konzentration von 0,05µM einem reduzierten, jedoch weiterhin bestehendem Abstand und somit zu einer deutlich sichtbaren Verzögerung der *in vitro*-Migration.

Die Behandlung von B16-F10-Zellen mit 0,1µM BSc2189 zeigte

spätestens nach 24h Behandlung zelluläre Zytotoxizität mit morphologischen Veränderungen, wie unter Punkt 3.3.1 gezeigt. Die statistische Auswertung der Scratch Assay-Versuche mit B16-F10-Zellen nach Inkubation mit BSc2189 bestätigte die verzögerte Abstandsreduktion schon in geringer Konzentration (Abbildung 37).

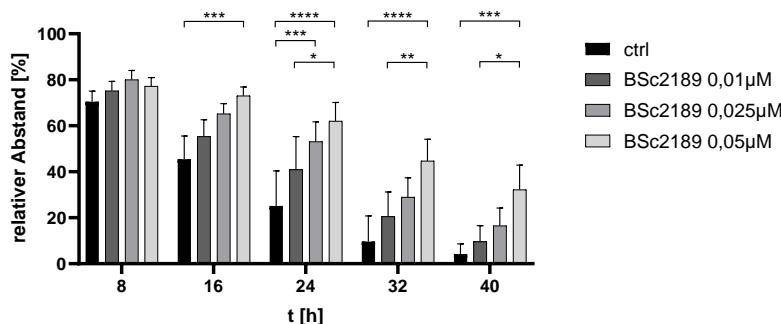


Abbildung 37 – Scratch Assay-Analyse: Statistische Auswertung der Messung des Abstands des „Ritzen“ in B16-F10-Zellen nach Behandlung mit BSc2189 (n=4, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, Signifikanzen an Klammern entsprechen Unterschiede zwischen den Konzentrationen zu entsprechendem Zeitpunkt).

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Migration zwischen Kontrolle und BSc2189 0,05µM nach 16h sowie zwischen Kontrolle und BSc2189 0,025µM nach 24h. Aufgrund der in Abbildung 34 und 36 dargestellten zytotoxischen Wirkung auf B16-F10-Zellen

unter Behandlung mit 0,1µM BSc2189 war keine sinnvolle statistische Auswertung möglich.

Die zelluläre Migration und Proliferation von B16-F10-Zellen zeigte sich somit durch den Proteasominhibitor BSc2189 bereits in geringer Konzentration (0,05µM) gehemmt.

4. Diskussion

Proteasominhibitoren stellen aufgrund der Vielzahl der durch das Ubiquitin-Proteasom-System regulierten zellulären Prozesse einen wichtigen Angriffspunkt in der antineoplastischen Therapie dar. Im Folgenden werden die relevanten Ergebnisse der Analyse von Proteasominhibitoren bezogen auf das maligne Melanom diskutiert.

4.1 Proteasomkomplexe in den untersuchten Melanomzelllinien

In der Analyse des Proteasomaufbaus konnten wir die Expression von Immunoproteasom-Untereinheiten (IP-UE) in Proteasomkomplexen von unstimulierten humanen und murinen Melanomzelllinien nachweisen (3.1.1 und 3.8.1). Auch in anderen malignen und teilweise nicht-malignen Zelllinien konnten IP-UE nachgewiesen werden [38, 212]. Das Immunoproteasom (IP) hat im Melanommodell eine gegen Krebszellen gerichtete Aktivität und hinsichtlich des klinischen Verlaufs eine bessere Prognose [166]. Sowohl für Patient_innen mit malignem Melanom als auch mit Brustkrebs konnte bei Expression von IP-UE in Abhängigkeit von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten ein besseres Überleben gezeigt werden [213, 214]. Dies ist unter anderem auf die Antigenpräsentation einhergehend mit einer erhöhten antitumoralen Immunität zurückzuführen. Unter inflammatorischen Bedingungen zeigen Immunoproteasomen im Vergleich zu Standardproteasomen eine gesteigerte proteolytische Aktivität, wodurch der höhere Proteinstoffwechsel der malignen Zellen aufrechterhalten werden kann. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass entartete Melanomzellen mit hoher Proliferation häufig eine Expression der IP-UE zeigen [165]. Durch Inhibition der Proteasomen kommt es zu einer Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen und zur Induktion der Apoptose/Nekrose. Die Zerstörung maligner Zellen resultiert in einer Inflammationsreaktion mit IFNy-Freisetzung in der Mikroumgebung der Tumorzellen [215]. Mittels IFNy-Stimulation konnten wir analog zur Analyse *in vivo* die gesteigerte Expression von IP-UE in humanen Melanomzelllinien nachweisen (3.1.2; [166]). Zudem scheint das IP in einem anderen Zusammenhang als funktionelle Verbindung zwischen chronischer Entzündung und Krebsentstehung zu fungieren [166]. In einem murinen Colitis-Modell wurde die Entstehung eines Colitis-assoziierten Karzinoms bei Expression von IP-UE und damit verbundener Freisetzung tumorigener Zytokine ausgelöst. Inhibition der Proteasomen und insbesondere der IP-UE sind somit ein vielversprechender Angriffspunkt in der Therapie des malignen Melanoms.

4.2 Inhibition von Proteasom-Untereinheiten

Mittels Proteasomaktivitätstestung erfolgte die Analyse der Dauer und Ausprägung der Inhibition der katalytischen Untereinheiten der Proteasomkomplexe durch die Proteasominhibitoren.

Für das in klinischer Behandlung eingesetzte Bortezomib zeigte sich eine gleiche Hemmung der β 5- und der β 5i-Untereinheit (UE). Dies entspricht den veröffentlichten Analysen [216–218].

Der Proteasominhibitor ONX-0914 zeigte in Konzentrationen bis $0,1\mu\text{M}$ eine signifikant stärkere Inhibition der β 5i- im Vergleich zur β 5-UE. Mit zunehmender Konzentration nahm, bei weiterhin stärkerer Hemmung der β 5i-UE, dieser Unterschied ab. Dies ist möglicherweise auf eine partielle Inhibition der Proteasomaktivität der β 5-UE bzw. der β 1i-UE oder andere unspezifische Nebeneffekte zurückzuführen. Es zeigte sich keine Beeinflussung der β 2/ β 2i-Aktivität. Damit ist ONX-0914, wie bereits beschrieben, in geringer Konzentration als spezifischer β 5i/LMP7-Inhibitor anzusehen [115].

Der zuvor gering untersuchte reversible Proteasominhibitor BSc2189 zeigt ein hohes Potential aufgrund der bekannten, starken und spezifischen Hemmung der β 5/ β 5i-UE sowie der hochaktiven α -Ketoamid Gruppe mit der damit postulierten Möglichkeit tief in solide Tumore einzudringen [105–108]. Die β 2/ β 2i-Aktivität wurde nicht beeinflusst. Nach einmaliger Applikation von BSc2189 zeigte sich in unseren Versuchen bereits nach 1h eine nicht steigerbare Inhibition der β 5-UE, welche 24h anhielt (3.2.2). Unter anderem damit lassen sich strukturelle und mechanistische Vorteile von BSc2189 im Vergleich zu anderen Proteasominhibitoren postulieren [219].

Wie dargestellt wurde, zeigen viele Melanomzelllinien eine Expression von IP-UE. Das IP spielt im Vergleich zum Standardproteasom aufgrund seiner höheren Effizienz im Abbau von ubiquitinierten Proteinen unter inflammatorischen Bedingungen eine wichtige Rolle in der Zellregulation [21, 41]. Aufgrund dieser Punkte ist eine Inhibition von IP-UE in Melanomzellen ein rationaler Therapieansatz, welcher auch bei anderen IP-UE-exprimierenden Tumorzellen evaluiert wurde [220]. In Zellen mit überwiegender Expression der β 5-UE des Standardproteasoms hingegen, wie in MeWo-Zellen, bietet BSc2189 gegenüber ONX-0914 einen Vorteil. Aufgrund der Inhibition der β 5i/LMP7-IP-UE und β 5-UE des Standardproteasoms ergibt sich insbesondere für BSc2189 ein großes Potential mit im Folgenden weiter zu untersuchenden Auswirkungen auf die Zytotoxizität und die Aktivierung von Signalwegen [105–108].

4.3 Zytotoxizität von BSc2189 und ONX-0914 auf Melanomzellen

Für den zuvor gering analysierten Proteasominhibitor BSc2189 erfolgte eine Zytotoxizitätsanalyse anhand verschiedener Melanomzelllinien. Demnach zeigte sich in geringer Konzentration eine signifikante Reduktion der Viabilität unter anderem in MeWo, BRAF-Wildtyp und BRAF-mutierten sowie BRAF-Inhibitor-resistenten Melanomzelllinien. Im Vergleich der verwendeten Zelllinien untereinander zeigte sich, dass der zytotoxische Effekt bei Zellen mit höherer Proliferation, wie zum Beispiel den murinen B16-F10-Zellen oder der Hgf-Cdk4-Zelllinie 1274 im Vergleich zur Hgf-Cdk4-Zelllinie 384, ausgeprägter ist [141]. Die Zytotoxizität wurde durch die BSc2189-induzierte Apoptose mit Anstieg von Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus sowie mechanistisch durch die durch BSc2189 gesteigerte Expression der aktiven Caspase-3 belegt. Die Proliferationshemmung beruht nach unserer Analyse unter anderem auf dem hier belegten Proteasominhibitor-induzierten G2/M-Zellzyklus-Arrest, welcher im Vergleich zur Viabilitätsreduktion erst in höherer Konzentration nachweisbar war. Ein Proteasominhibitor konzentrationsabhängiger G2/M-Arrest mit daraus hervorgehender Apoptose für Melanomzellen ist mehrfach publiziert worden [104, 221, 222]. Hingegen ist beschrieben worden, dass Melanomzellen im G1-Arrest, z. B. induziert durch Inhibitoren des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) – Signalweges, resistent gegenüber einer durch Bortezomib-induzierten Apoptose sind [221, 223–225]. Im Vergleich zum Proteasominhibitor BSc2118 scheint der durch BSc2189 induzierte G2/M-Arrest ähnlich zu sein, wobei BSc2118 in geringerer Konzentration den Eindruck einer höheren Viabilitätsreduktion macht [104]. BSc2189 führt ähnlich der Analyse für BSc2118 nur zu einer geringen Beeinflussung von Fibroblasten.

Der Proteasominhibitor ONX-0914 zeigte hinsichtlich der Zytotoxizität in Melanomzellen mit Expression der IP-UE β 5i/LMP7 eine hoch signifikante Reduktion der Viabilität, welche in Melanomzellen mit β 5-UE des Standardproteasoms deutlich geringer und oftmals nicht signifikant war. Dieser Unterschied in der Hemmung zwischen dem β 5i/LMP7-spezifischen Proteasominhibitor ONX-0914 im Vergleich zum Proteasominhibitor BSc2189 zeigte sich deutlich in der Viabilitätsanalyse der murinen Hgf-Cdk4-Zelllinien bei einer ONX-0914 Konzentration bis zu 0,1 μ M. Als Ursache der dennoch bestehenden Zytotoxizität bei höheren Konzentrationen von ONX-0914, trotz auf Proteinebene nur geringer Expression der IP-UE β 5i/LMP7, lassen sich die partielle Inhibition der Proteasomaktivität der β 5-UE, der β 1i-UE oder unspezifische Nebeneffekte diskutieren (3.8.3). Die Behandlung von Fibroblasten mit ONX-0914 wies eine im Vergleich zu Bortezomib geringere Reduktion der Viabilität auf, die entsprechend der Analysen jedoch größer als die durch BSc2189 ist. Damit ergeben sich hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung die wenigsten unerwünschten Nebeneffekte auf nicht-maligne Zellen, als Zeichen geringerer Nebenwirkungen, für BSc2189 gefolgt von ONX-0914 im Vergleich zu Bortezomib.

Insgesamt zeigte sich eine vielversprechende Wirkung von ONX-0914 in β 5i/LMP7-haltigen Zelllinien. Der Einsatz von Inhibitoren des IP könnte möglicherweise die aufgrund der nichtselektiven Proteasomhemmung aufgetretenen Probleme wie Nebenwirkungen reduzieren, wie bereits in klinischen Untersuchungen gezeigt werden konnte [114]. Der Inhibitor wurde hinsichtlich einer möglichen klinischen Verwendung bei Autoimmunerkrankungen untersucht [226–228]. Die oftmals limitierende Neurotoxizität von Bortezomib scheint bei ONX-0914 geringer ausgeprägt zu sein, was die Chancen auf einen klinischen Einsatz verbessert [229]. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potential von BSc2189 und ONX-0914 mit möglicherweise besserer Verträglichkeit, was weitere *in vitro*- und *in vivo*-Analysen in onkologischen Modellen empfehlen lässt [230, 231].

4.4 Metastasierungsbeeinflussung unter Behandlung mit BSc2189

In der Analyse der Beeinträchtigung der Migration und Metastasierung von murinen B16-F10-Melanomzellen mittels Scratch Assays konnte durch Behandlung mit dem Proteasominhibitor BSc2189 in geringer Konzentration eine signifikante Beeinflussung gezeigt werden. Da in dieser Analyse die Viabilität und Proliferation oft mit abgebildet werden, wurde dies in diesem Versuchsansatz durch Serum-Starvation und FCS-Reduktion versucht zu reduzieren. Erhöhte NF- κ B-Aktivität führt durch die Degradation der extrazellulären Matrix durch epithelial-mesenchymale Transition mit möglicher Loslösung von Tumorzellen aus einem Zellverband zur einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit [75]. Durch die Hemmung der NF- κ B-Aktivität über die Inhibition von I κ B α durch Proteasominhibitoren besteht zum Beispiel durch die verringerte Expression von Matrix-Metalloproteinase 2 und 9 mit Reduktion der Migration und Invasion von Melanomzellen eine mögliche Erklärung dieser Beeinflussung [232].

Eine Hemmung der Adhäsion von Endothelzellen bei Patient_innen mit Multiplem Myelom konnte in begrenztem Maße für eine Behandlung mit Bortezomib gezeigt werden [84]. Zudem wurde die Chemotaxis und Kapillarproliferation beeinflusst. Unseren weiteren Analysen der Metastasierungsbeeinflussung mittels Adhäsions Assays und Boyden Chamber scheiterte trotz verschiedener Settings und der Analyse verschiedener Zellen sowie Chemokine. Ob die Behandlung mit BSc2189 gezielte Auswirkungen auf die Metastasierung hat, ist in weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen zu untersuchen.

4.5 Beeinflussung von Signalkaskaden durch BSc2189

Neben der Analyse der zytologischen Auswirkungen der Behandlung von Melanomzellen mit Proteasominhibitoren erfolgte für den zuvor gering analysierten Proteasominhibitor BSc2189 die Analyse der wichtigsten regulatorischen Funktionen in der Zelle.

Der durch das Proteasom regulierte NF- κ B-Signalweg ist eine wichtige Schnittstelle für zelluläre Prozesse wie Wachstum, Inflammation und maligne Entartung [71]. Das Proteasom

ist unter anderem aufgrund der Regulation der NF-κB-Aktivität ein wichtiger Angriffspunkt in inflammatorischen Prozessen und hat somit Potential in der antineoplastischen Therapie des malignen Melanoms [127]. Entzündung fördert die Entdifferenzierung und Entartung von Zellen. In diesem Zusammenhang spielen Tumornekrosefaktoren (TNF) eine wichtige Rolle [206]. TNF sind wichtige Induktoren des NF-κB Signalwegs [233]. Eine proinflammatorische Mikroumgebung beim Melanom mit aktiviertem NF-κB-Signalweg und hohen Leveln von TNF α wurde nachgewiesen [234]. Wir konnten für das MeWo- und das Hgf-Cdk4-Melanommodell zeigen, dass nach Stimulation mit TNF α I κ B α degradiert und bei Behandlung mit BSc2189 wieder stabilisiert wird. Die I κ B α -Stabilisation belegt somit erstmals die anti-inflammatorische Wirkung von BSc2118 bzw. BSc2189 [104, 207]. Somit kann postuliert werden, dass BSc2189 und andere Proteasominhibitoren wie BSc2118 einen mechanistischen Vorteil in der Therapie insbesondere des malignen Melanoms aufgrund der Beeinflussung der durch Inflammation getriebenen Tumorgenese und des Tumorwachstums haben könnten.

Hinsichtlich der Apoptoseinduktion zeigten wir die konzentrationsabhängige Spaltung von Caspase-3 in MeWo-Zellen im Western Blot. In der durchflusszytometrischen Analyse vom MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen ergab sich eine Zunahme der Expression der aktiven Caspase-3. Analog zu anderen Proteasominhibitoren lässt sich daher eine Apoptoseinduktion mittels Caspase-3-Spaltung und somit deren Aktivierung durch BSc2189 anführen [62, 104, 235, 236].

Die hier gezeigte Beeinflussung der Signalkaskaden durch Proteasominhibition verstärkt das Verständnis der Wirkung von Proteasominhibitoren unter anderem für die Kombination mit weiteren Chemotherapeutika. Eine synergistische Apoptoseinduktion durch Proteasominhibitoren wurde mechanistisch unter anderem aufgrund geringerer Expression von anti-apoptotischen Proteinen sowie höherer Expression pro-apoptotischer Proteine wie Noxa gezeigt [237]. Zudem wurden durch Kombinationen mit Chemotherapeutika Arzneimittel-Efflux-Transporter gehemmt und so Resistenzen verringert [237].

4.6 Proteasominhibitoren und die Ausbildung von Resistenzen

Aufgrund der klinischen Relevanz erfolgte die Analyse der Umgehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika sowie gegen BRAF-Inhibitoren in Kombination mit Proteasominhibitoren.

Resistenzen gegen Chemotherapeutika in Melanomzellen sind mechanistisch unter anderem durch Agentien-Transport, Enzyminduktion oder Unterschiede in der DNA-Reparatur bekannt [144]. Für mehrere Proteasominhibitoren (u. a. ONX-0914 und Carfilzomib) wurde sowohl eine Mutation in den Genen der Transport-Proteine als auch der ATP-binding cassette Transporter medierte Efflux als Resistenzmechanismus gezeigt [238]. Zur Beurteilung von Resistenzen von Melanomzellen gegenüber Chemotherapeutika und dem Einfluss von

Proteasominhibitoren auf resistente Zellen untersuchten wir MeWo-Zellen und deren Etoposid-resistente Variante (MeWo_{Eto}). Dahingehend erfolgte die Analyse der Expression und Funktion der ATP-binding-cassette-(ABC)-Transporter zur Eruierung der Unterschiede zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen in der Viabilitätsreduktion unter Behandlung mit Proteasominhibitoren. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der Transporter ABCC1, ABCG2 und MDR. Zudem zeigten wir mittels des Transporterinhibitors Rapamycin, dass sich der Efflux von Proteasominhibitoren aus MeWo-Zellen in Anwesenheit von Rapamycin nicht veränderte. Dies entspricht Ergebnissen für den Proteasominhibitor Bortezomib, in denen hinsichtlich der Ausbildung von Resistenzen eine Änderung des zellulären Effluxes des Proteasominhibitors aufgrund von Unterschieden in der Expression von MDR-Transportern ausgeschlossen wurde [239].

Entsprechend der Literatur wurden Unterschiede in der Induktion der Apoptose als Ursache von Resistenzen in Melanomzellen identifiziert [148, 177]. Der Unterschied zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen lag dabei in einer veränderten Aktivität der Apoptose und der Topoisomerase-II [240, 241]. Entsprechend unserer Analysen bestätigte sich ein signifikanter Unterschied in der Caspase-3-Aktivität schon in geringen Konzentrationen von BSc2189 zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen als Ursache der Unterschiede in der Apoptoseinduktion und Viabilität [207]. Die gezeigten geringeren Unterschiede in der Viabilitätsreduktion und Beeinflussung des Zellzyklus durch höhere Konzentration des Proteasominhibitors BSc2189 in MeWo_{Eto}-Zellen im Vergleich zu MeWo-Zellen sprechen für den Bedarf eines stärkeren Stimulus zur Apoptoseinduktion in Etoposid-resistenten MeWo-Zellen. Dies stimmt mit der beschriebenen höheren Resistenz in Bezug auf die Proteasominhibition von Cisplatin-resistenten MeWo-Zellen überein [104]. Unterschiede im Signalweg von IκBα oder der Proteasominhibition in den analysierten Proteasomaktivitäten als Ursache der Unterschiede in der Apoptose zwischen MeWo- und MeWo_{Eto}-Zellen wurden nicht nachgewiesen.

Als weiterer Unterschied im Vergleich von MeWo_{Eto}- zu MeWo-Zellen ist die β5i/LMP7-Defizienz von MeWo_{Eto}-Zellen auch unter IFNy-Stimulation sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu nennen (3.1.2). In vorherigen Untersuchungen wurde neben genetischen Variationen für einige Zelllinien die Expression eines funktionslosen β5i/LMP7-E1-Gens anstelle von β5i/LMP7-E2 gezeigt [34, 114]. Dies war jedoch im MeWo-/MeWo_{Eto}-Modell nicht der Fall. Des Weiteren konnten wir eine pSTAT1-Defizienz als Ursache eines defekten IFNy-Signalwegs und somit fehlender Induktion von β5i/LMP7 ausschließen. In vorherigen Analysen dieses Melanommodells wurde eine erhöhte Mutationsrate für die Etoposid-resistenten Zellen analysiert [242]. Dies könnte auch der Grund für die β5i/LMP7-Defizienz sein, beispielsweise beim Vorliegen einer inaktivierenden Mutation im β5i/LMP7-Gen. Ursächlich könnte hier ein Topoisomerase-II-induzierter DNA-Doppelstrangbruch, möglicherweise durch lange Kultivierung mit Etoposid, sein [243]. Anhand des hier gewählten

MeWo-Modells β 5i/LMP7-Defizienz wäre die Rolle von IFNy und β 5i/LMP7 in Kombination mit Proteasominhibitoren weiter zu ergründen. Die weitere Analyse der Proteasominhibition und Zytotoxizität unter Behandlung mit BSc2189 und ONX-0914 bei gleichzeitiger IFNy-Stimulation zum Beispiel entsprechend des physiologischen Milieus wäre unter anderem aufgrund der Rolle der IP-UE interessant.

Für Bortezomib sind Resistenzen ein wichtiger Faktor im klinischen Einsatz. Es wurde gezeigt, dass Resistenzen aufgrund von β 5-Mutationen auftreten [157, 239]. Hingegen ergab sich eine Sensitivierung resistenter Zellen durch IFNy mit einhergehender β 5i/LMP7-Induktion [244]. Im Vergleich zu Bortezomib könnte dabei durch ONX-0914 aufgrund der spezifischen β 5i/LMP7-Inhibition und somit verbesserter spezifischer Wirkung ein Vorteil erzielt werden. Die gezeigte Zunahme der Expression von IP-UE unter IFNy-Stimulation konnte Zellen des Multiplen Myeloms für die Therapie mit dem β 5i/LMP7-spezifischen Inhibitor ONX-0914, jedoch nicht mit Carfilzomib sensibilisieren [245]. In weiteren Versuchen ist zu prüfen, ob diese Ergebnisse auch auf BSc2189 übertragbar sind. Dies unterstreicht das Potential der Hemmung durch ONX-0914 oder BSc2189, insbesondere bei vorheriger IFNy-Stimulation und Expression der IP-UE β 5i/LMP7. Jedoch lässt sich aufgrund der analysierten β 5i/LMP7-Defizienz in MeWo_{Eto}-Zellen unseres MeWo-Modells postulieren, dass auch mit Resistenzen gegenüber Immunoproteasominhibitoren zu rechnen ist.

Neben dem Etoposid-resistenten MeWo-Zellmodell erfolgte die Analyse der klinisch relevanten Resistenz gegenüber BRAF-Inhibitoren. Wir zeigten entsprechend der Literatur, dass BRAF-mutierte Zellen im Vergleich zum Wildtyp eine hohe Sensitivität gegenüber Proteasominhibitor-Behandlung aufweisen (3.3.4, [236]). Eine Kombination von BRAF-Inhibitoren mit Proteasominhibitoren wurde aufgrund synergistischer Beeinflussung der Apoptose nach Verlust der Zellkontakte im Zellverbund (Anoikis) erfolgreich evaluiert und sollte weiter verfolgt werden [246–249]. Konkret wurden unter anderem die gesteigerte Expression der pro-apoptotischen Proteine p53, NOXA und Bim in Tumorzellen sowie die mitochondriale Dysregulation durch Verlust des mitochondrialen Membranpotentials mit Freisetzung von Cytochrom C festgestellt. In BRAF-Inhibitor-resistenten Zellen ergab die Behandlung mit Proteasominhibitoren in unserer Analyse keinen Unterschied in der Viabilitätsreduktion bei gleicher Zytotoxizität wie der bei nicht-BRAF-Inhibitor-resistenten Zellen. Der BRAF-Inhibitor wurde während der Zellkultivierung zweimal wöchentlich zu den resistenten Zellen hinzugegeben. Eine Sensitivierung der BRAF-Inhibitor-resistenten Melanomzellen auf BRAF-Inhibitor bzw. additiv-zytotoxische Effekte durch Kombination mit Proteasominhibitor zeigten sich somit nicht.

Hinsichtlich der Ausbildung von Resistenzen ist die Aktivierung des NF- κ B- unter anderem mit folgender Transskriptionsregulation von anti-apoptotischen Faktoren in Melanomzellen

beschrieben [250]. Durch die Hemmung der NF-κB-Aktivität über die Stabilisierung von IκBα durch Proteasominhibitoren besteht hiermit eine Möglichkeit der Beeinflussung. Unter anderem aufgrund dieses Mechanismus konnte die Therapie mit Proteasominhibitoren Melanom-spezifische zytotoxische T-Zellen sensitivieren und so Resistenzen überwunden werden [250]. Es besteht demnach die Empfehlung zur weiteren Analyse von Proteasominhibitoren sowie der Entstehung und Überwindung relevanter Resistenzen *in vivo*. Das Ziel dabei ist die Evaluation weiterer Effekte von Kombinationstherapien für den klinischen Nutzen.

4.7 Klinischer Einsatz von Proteasominhibitoren beim malignen Melanom

Wegen ausgeprägter Aggressivität und früher multipler Metastasierung mit hoher Letalität sowie Resistenzen gegen bisherige Therapien besteht der Bedarf zur Evaluation weiterer Therapien des malignen Melanoms [251].

Der Proteasominhibitor Bortezomib ist seit 2003 zur Behandlung hämatologischer Neoplasien zugelassen [252]. Nach vielversprechenden *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen scheiterte der klinische Einsatz alleiniger Bortezomib-Therapie beim malignem Melanom aufgrund geringer Ansprechraten und hoher Toxizität in einer Phase-II-Studie [253]. Die Kombinationen von Proteasominhibitoren und anderen Substanzen wurden schon mehrfach erfolgreich analysiert [254]. Eine Kombination von Proteasominhibitoren mit herkömmlichen Chemotherapeutika als mögliche Therapie beim metastasierten Melanom wurde aufgrund der synergistischen Beeinflussung einiger Signalwege unter anderem der ROS-bedingten Apoptoseinduktion postuliert [152, 255]. Eine Kombination von Bortezomib mit Paclitaxel und Carboplatin in einer klinischen Phase-II-Studie ergab jedoch wenig klinischen Nutzen bei hohen Nebenwirkungen [256].

Kombinationen von Bortezomib mit Substanzen der gezielten Krebstherapie zeigten mechanistisch Vorteile, wie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib, wobei die Reduktion der Zellviabilität über Caspase-3-induzierte Apoptose vermittelt wird [257]. Die Kombination von Bortezomib mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib zeigte synergistische Mechanismen wie zum Beispiel Apoptoseinduktion mit Bestätigung der Verträglichkeit und Therapieansprechen in einer klinischen Phase-I-Studie [258, 259]. Weitere positive Effekte ergaben sich unter anderem in Kombination von Bortezomib mit Temozolomid, Rosiglitazone, Imatinib und Calpain-Inhibitoren [164, 259–261]. Aufgrund der hohen Rate und Intensität von Nebenwirkungen durch Bortezomib erfolgte die Entwicklung und letztendlich Zulassung weiterer Proteasominhibitoren wie Carfilzomib und Ixazomib mit geringeren Nebenwirkungen und höherer Potenz hinsichtlich des *in vivo*-Einsatzes [51]. Ixazomib zeigt dabei in

Melanomzellen sowohl als alleinige Therapie als auch in Kombination mit IFN α vielversprechende Ergebnisse mit Apoptoseinduktion über Caspase und Reduktion der Proliferation [172]. Eine weitere Möglichkeit der Kombination des Proteasominhibitors Marizomib mit einem Histon-Deacytelase-Inhibitor zeigte Vorteile mit einem verringerten Tumorzellwachstum und vermehrten Zellen in der sub-G0/G1-Phase des Zellzyklus. Dies war auch in einer Phase-I-Studie ohne zugenommene Toxizität in Kombination mit 39% Therapieansprechen nachweisbar [162, 262, 263]. In der Kombination aus Carfilzomib und Bortezomib in dem auch hier verwendeten B16-Zellmodell und *in vivo* zeigten sich deutliche Vorteile durch ein reduziertes Tumorzellwachstum mit der Möglichkeit der Dosisreduktion und damit verbundener Ausbildung von weniger Nebenwirkungen [264]. Die Forschung zum Einsatz von Proteasominhibitoren in Kombination mit weiteren Substanzen zur Erschließung potentieller Therapiestrategien sollte weiter verfolgt werden [265].

Die Auswirkungen der Behandlung mit Proteasominhibitoren sind auch abhängig von der BRAF-Expression. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir dabei zeigen, dass die Behandlung mit Proteasominhibitoren in BRAF-mutierten A375-Zellen in einer höheren Viabilitätsreduktion und somit mehr Zytotoxizität als in MeWo-Zellen ohne BRAF-Mutation resultiert [172]. Dies wurde auch für Zellen des Kolon-Karzinoms gezeigt [236]. Es ist entsprechend der Ergebnisse zu diskutieren, ob BRAF-V600E-mutierte Zellen sensitiver für eine Behandlung mit Proteasominhibitoren sind. Aufgrund der in 40-50% der Menschen mit malignem Melanom vorkommenden BRAF-Mutationen scheint neben der Therapie mit BRAF-Inhibitoren auch die Therapie mit Proteasominhibitoren und weiteren Kombinationen eine weiter zu verfolgende Strategie zu sein [266–268]. Wie gezeigt wurde, wird in BRAF-Inhibitor-resistenten Zellen mehr IFN γ produziert [269]. Dadurch wären aufgrund der Induktion der IP-UE durch IFN γ im proinflammatorischen Tumormilieu insbesondere Immunoproteasomen ein spannender Angriffspunkt.

Aufgrund seiner Immunogenität und der proinflammatorischen Tumormikroumgebung mit aktiviertem NF- κ B-Signalweg ist das maligne Melanom ein vielversprechendes Analysefeld hinsichtlich des Einsatzes von Proteasominhibitoren [164, 234, 270]. Wie gezeigt werden konnte, ist das Proteasom unter anderem aufgrund der Regulation der NF- κ B-Aktivität ein wichtiger Angriffspunkt in inflammatorischen Prozessen und hat somit Potential in der antineoplastischen Therapie des malignen Melanoms [127, 271]. Dabei könnte die Entzündungsreaktion als Treiber für Tumorgenese und -wachstum beeinflusst werden. Durch die mittlerweile etablierte Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren gegen CTLA-4 und PD-1 und damit einer vermehrten Aktivierung von T-Lymphozyten kommt es zu einer weiteren Zunahme der Inflammation mit IFN γ -Produktion [272, 273]. Weitere Folgen dadurch sind neben der Zunahme der Expression der IP-UE die Differenzierung von T-Helferzellen, die Aktivierung von NK-Zellen sowie anti-proliferative, anti-angiogenetische und pro-apoptotische

Effekte [274]. Es konnte vice versa gezeigt werden, dass die Expression von IP-UE die Tumormikroumgebung reguliert und die Immunantwort gegen Tumorzellen verstärkt [166, 275]. So zeigte sich aufgrund tumorinfiltrierender zytotoxischer T-Zellen mit verbesserter Epitop-Erkennung eine höhere Wirksamkeit einer Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie [214]. Demnach ist eine hohe Expression von IP-UE in Patienten mit Melanom mit einem verbesserten Therapieansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren assoziiert, was auch in Zellen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms gezeigt wurde [276]. Damit lässt sich ein zusätzlicher Nutzen der Kombination von Immuncheckpoint-Inhibitoren und Proteasominhibitoren insbesondere gegen Tumorzellen mit Expression der IP-UE β 5i/LMP7 postulieren, was durch weitere Analysen zu evaluieren ist [277, 278].

Die Rolle vom IP bei der Karzinogenese hängt auch von der tumorspezifischen Umgebung ab. So konnte gezeigt werden, dass IP-UE anti-kanzerogenes Potenzial aufweisen, unter anderem aufgrund der Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen, die von zytotoxischen, Epitopspezifischen T-Lymphozyten erkannt werden und dadurch Anti-Tumor-Immunität induzieren [166, 214]. Somit könnte jedoch eine Inhibition von IP-UE *in vivo* auch zu einer Hemmung der Antigenpräsentation und der T-Zell-vermittelten antineoplastischen Aktivität führen. Daher sollten weitere *in vivo*-Analysen mit Reevaluation des inflammatorischen Tumormilieus sowie der Expression und Rolle von IP-UE in Melanomzellen und gegen den Tumor gerichtete Immunzellen unter anderem unter Inhibition durch Proteasominhibitoren durchgeführt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit kann die Rolle des Proteasoms und dessen Inhibition in Zellen des malignen Melanoms besser verstanden werden. Wie verdeutlicht wurde, gibt es vor allem aufgrund von Synergien in Kombination mit anderen Substanzen eine klinische Relevanz von Proteasominhibitoren in Melanomzellen. Aufgrund divergenter Zytotoxizität in malignen und nicht-malignen Zellen gilt dies vor allem für die hier untersuchten Proteasominhibitoren BSc2189 und ONX-0914. Es zeigt sich ein vielversprechendes therapeutisches Potential insbesondere aufgrund der Inhibition der IP-UE β 5i/LMP7 mit erhöhter Relevanz durch IFN γ -Stimulation aufgrund des proinflammatorischen Tumormilieus, was durch weitere Versuche klinisch zu evaluieren ist [279]. Dabei ist es denkbar, das therapeutische Spektrum auch auf andere onkologische Erkrankungen zu übertragen.

5. Zusammenfassung

Das Proteasom reguliert als zellulärer Proteasekomplex wichtige Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Inflammation und Zellzyklus. Proteasominhibitoren werden aufgrund der Hemmung des Proteasoms mit damit verbundenem Zelluntergang in der Hämato-Onkologie verwendet. Unspezifische Therapieeffekte und somit relevante klinische Nebenwirkungen der bisherigen Substanzen wie Bortezomib machen die Entwicklung weiterer Substanzen notwendig. Proteasomkomplexe mit Immunoproteasom-Untereinheiten bieten aufgrund erhöhter Aktivität unter inflammatorischen Bedingungen und Expression in vielen maligne-entarteten Zellen einen interessanten Angriffspunkt spezifischer Inhibition. Die Behandlung des malignen Melanoms ist als häufige Neoplasie aufgrund hoher Rate an Metastasierung und Resistenzentwicklung herausfordernd. Aufgrund hoher Immunogenität und hohem Proteinstoffwechsel in Melanomzellen bietet der Einsatz von Proteasominhibitoren einen vielversprechenden Angriffspunkt.

Wir konnten bestätigen, dass Melanomzellen konstitutiv Immunoproteasom-Untereinheiten exprimieren und dies unter Stimulation mit Zytokinen wie IFNy zunimmt. Die bislang in diesem Zusammenhang nur gering analysierten Proteasominhibitoren BSc2189 und ONX-0914 zeigten eine ausgeprägte konzentrationsabhängige und anhaltende Inhibition der Proteasomaktivität, insbesondere der Immunoproteasom-Untereinheit β 5i/LMP7. Unter Behandlung mit BSc2189 und ONX-0914 ergab sich in der Analyse der Zytotoxizität eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität von Melanomzellen bei nur geringer Zytotoxizität in humanen Fibroblasten als Zeichen möglicher geringer Nebenwirkungen *in vivo*. Für den Proteasominhibitor BSc2189 erfolgte die Analyse des Wirkmechanismus. Es wurde unter anderem die Stabilisierung von $I\kappa B\alpha$ als Zeichen für die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs, ein G2/M-Arrest als Beeinflussung des Zellzyklus und die Zunahme der Apoptose über Caspase-3-Spaltung nachgewiesen. Bisherige systemische Therapien des malignen Melanoms zeigen Limitationen unter anderem aufgrund von Resistzenzen und dem Therapieansprechen. In Etoposid-resistenten Melanomzellen konnten wir eine β 5i/LMP7-Defizienz im Proteasomkomplex feststellen. Im Vergleich zu nicht-Etoposid-resistenten Zellen zeigte sich zudem eine geringere Caspase-3-Aktivität als mögliche Ursache geringerer Viabilitätsreduktion. Melanomzellen mit Resistenz gegen den BRAF-Inhibitor PLX-4032 (Vemurafenib) zeigten durch Proteasominhibitoren ausgelöste Zytotoxizität, die derjenigen von nicht-resistenten bzw. sensitiven Zellen entsprach.

Die *in vitro*-Analysen der Proteasominhibitoren BSc2189 und ONX-0914 dienen als vielversprechender Ausgangspunkt kommender *in vivo*-Versuche sowie *in vitro*-Kombinationen mit anderen Substanzen zur Erschließung weiterer klinischer Einsatzgebiete insbesondere des malignen Melanoms.

Literaturverzeichnis

- [1] Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology* 2001;8:739–758.
- [2] Mikecz A von, Chen M, Rockel T, Scharf A. The nuclear ubiquitin-proteasome system: visualization of proteasomes, protein aggregates, and proteolysis in the cell nucleus. *Methods Mol Biol* 2008;463:191–202.
- [3] Baugh JM, Pilipenko EV. 20S proteasome differentially alters translation of different mRNAs via the cleavage of eIF4F and eIF3. *Mol Cell* 2004;16:575–586.
- [4] Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2007;35:12–17.
- [5] Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801–847.
- [6] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;82:373–428.
- [7] Cammann C, Israel N, Slevogt H, Seifert U. Recycling and Reshaping-E3 Ligases and DUBs in the Initiation of T Cell Receptor-Mediated Signaling and Response. *Int J Mol Sci* 2022;23.
- [8] Finley D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* 2009;78:477–513.
- [9] Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:55–72.
- [10] Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770–774.
- [11] Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol* 2001;11:294–297.
- [12] Yewdell JW. Immunology. Hide and seek in the peptidome. *Science* 2003;301:1334–1335.
- [13] Krüger E, Kloetzel P-M. Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Curr Opin Immunol* 2012;24:77–83.
- [14] Kapetanou M, Athanasopoulou S, Gonos ES. Transcriptional regulatory networks of the proteasome in mammalian systems. *IUBMB Life* 2022;74:41–52.

- [15] Vilchez D, Saez I, Dillin A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* 2014;5:5659.
- [16] Kloetzel P-M. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:225–233.
- [17] Kloetzel P-M, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:76–81.
- [18] Vigneron N, van den Eynde BJ. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules* 2014;4:994–1025.
- [19] Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E. The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell* 1998;92:367–380.
- [20] Strehl B, Seifert U, Krüger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel P-M. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19–30.
- [21] Ebstein F, Kloetzel P-M, Krüger E, Seifert U. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:2543–2558.
- [22] Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1992;267:22369–22377.
- [23] Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K. Hybrid Proteasomes. *J Biol Chem* 2000;275:14336–14345.
- [24] Wolf DH, Hilt W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:19–31.
- [25] Groettrup M, Khan S, Schwarz K, Schmidtke G. Interferon- γ inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: Why? *Biochimie* 2001;83:367–372.
- [26] Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 2010;10:73–78.
- [27] Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, van Kaer L, Monaco JJ, Colbert RA. Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of Interferon γ (IFN- γ)-inducible Subunits. *J Exp Med* 1998;187:97–104.
- [28] Namiki S, Nakamura T, Oshima S, Yamazaki M, Sekine Y, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS Lett* 2005;579:2781–2787.

- [29] Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 1991;353:355–357.
- [30] Früh K, Yang Y, Arnold D, Chambers J, Wu L, Waters JB, Spies T, Peterson PA. Alternative exon usage and processing of the major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits. *J Biol Chem* 1992;267:22131–22140.
- [31] Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997;94:8970–8975.
- [32] Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 1991;353:357–360.
- [33] Früh K, Yang Y, Arnold D, Chambers J, Wu L, Waters JB, Spies T, Peterson PA. Alternative exon usage and processing of the major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits. *J. Biol. Chem.* 1992;267:22131–22140.
- [34] Heink S, Fricke B, Ludwig D, Kloetzel P-M, Krüger E. Tumor cell lines expressing the proteasome subunit isoform LMP7E1 exhibit immunoproteasome deficiency. *Cancer Res* 2006;66:649–652.
- [35] Ebstein F, Voigt A, Lange N, Warnatsch A, Schröter F, Prozorovski T, Kuckelkorn U, Aktas O, Seifert U, Kloetzel P-M, Krüger E. Immunoproteasomes are important for proteostasis in immune responses. *Cell* 2013;152:935–937.
- [36] Colberg L, Cammann C, Greinacher A, Seifert U. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system in platelets. *J Thromb Haemost* 2020;18:771–780.
- [37] Basler M, Groettrup M. On the Role of the Immunoproteasome in Protein Homeostasis. *Cells* 2021;10.
- [38] Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, van Holle B, Parvizi G, Bousquet-Dubouch M-P, Théate I, Parmentier N, van den Eynde BJ. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:18599–18604.
- [39] Dahlmann B. Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function. *Arch Biochem Biophys* 2016;591:132–140.
- [40] Vigneron N, Abi Habib J, van den Eynde BJ. Learning from the Proteasome How To Fine-Tune Cancer Immunotherapy. *Trends Cancer* 2017;3:726–741.
- [41] Abi Habib J, Lesenfants J, Vigneron N, van den Eynde BJ. Functional Differences between Proteasome Subtypes. *Cells* 2022;11.

- [42] Krüger E, Kuckelkorn U, Sijts A, Kloetzel P-M. The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;148:81–104.
- [43] Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel P-M, Krüger E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010;142:613–624.
- [44] Kniepert A, Groettrup M. The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci* 2014;39:17–24.
- [45] Eggers, M. , B. Boes-Fabian, T. Ruppert, P. M. Kloetzel, and U. H. Koszinowski. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J Exp Med* 1995;182:1865–1870.
- [46] Angeles A, Fung G, Luo H. Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1904–1916.
- [47] Freitas Chama LL de, Ebstein F, Wiesrecker B, Wagh PR, Hammer E, Weiss FU, Junker H, Studencka-Turski M, Lerch MM, Krüger E, Sendler M. Immunoproteasome impairment via β 5i/LMP7-deletion leads to sustained pancreatic injury from experimental pancreatitis. *J Cell Mol Med* 2021;25:6786–6799.
- [48] Hershko A. The Ubiquitin System. Edited by Peters J-M, Harris JR, Finley D. Boston, MA, Springer US, 1998, pp. 1–17.
- [49] Thibaudeau TA, Smith DM. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol Rev* 2019;71:170–197.
- [50] Frankland-Searby S, Bhaumik SR. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2012;1825:64–76.
- [51] Johnson DE. The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocr Relat Cancer* 2015;22:T1-17.
- [52] Aliabadi F, Sohrabi B, Mostafavi E, Pazoki-Toroudi H, Webster TJ. Ubiquitin–proteasome system and the role of its inhibitors in cancer therapy. *Open Biol* 2021;11.
- [53] Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 1999;97:431–434.
- [54] Drexler HCA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:855–860.

- [55] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495–516.
- [56] Brazeau E, Mahalingam R, Gilden D, Wellish M, Kaufer BB, Osterrieder N, Pugazhenthi S. Varicella-zoster virus–induced apoptosis in MeWo cells is accompanied by down-regulation of Bcl-2 expression. *J Neurovirol* 2010;16:133–140.
- [57] Liu X, Li Q, Dowdell K, Fischer ER, Cohen JI. Varicella-Zoster Virus ORF12 Protein Triggers Phosphorylation of ERK1/2 and Inhibits Apoptosis. *J Virol* 2012;86:3143–3151.
- [58] Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 2004;4:349–360.
- [59] Lopes UG, Erhardt P, Yao R, Cooper GM. p53-dependent Induction of Apoptosis by Proteasome Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1997;272:12893–12896.
- [60] Dietrich C, Bartsch T, Schanz F, Oesch F, Wieser RJ. p53-dependent cell cycle arrest induced by N-acetyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal in platelet-derived growth factor-stimulated human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10815–10819.
- [61] Blagosklonny MV. P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int. J. Cancer* 2002;98:161–166.
- [62] Westerberg CM, Hägglund H, Nilsson G. Proteasome inhibition upregulates Bim and induces caspase-3-dependent apoptosis in human mast cells expressing the Kit D816V mutation. *Cell Death Dis* 2012;3:e417.
- [63] Fernández Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Opiari AW, Lowe SW, Soengas MS. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 2005;65:6294–6304.
- [64] Roccaro AM, Sacco A, Aujay M, Ngo HT, Azab AK, Azab F, Quang P, Maiso P, Runnels J, Anderson KC, Demo S, Ghobrial IM. Selective inhibition of chymotrypsin-like activity of the immunoproteasome and constitutive proteasome in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2010;115:4051–4060.
- [65] Chauhan D, Singh AV, Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, Raje N, Richardson P, Anderson KC. A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2010;116:4906–4915.
- [66] Aichberger KJ, Gleixner KV, Mirkina I, Cerny-Reiterer S, Peter B, Ferenc V, Kneidinger M, Baumgartner C, Mayerhofer M, Gruze A, Pickl WF, Sillaber C, Valent P. Identification of proapoptotic Bim as a tumor suppressor in neoplastic mast cells: role of KIT D816V and effects of various targeted drugs. *Blood* 2009;114:5342–5351.

- [67] Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996;272:719–722.
- [68] Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17:5328–5337.
- [69] Xie B, Zhao J, Kitagawa M, Durbin J, Madri JA, Guan JL, Fu XY. Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem* 2001;276:19512–19523.
- [70] Kalim KW, Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. *J Immunol* 2012;189:4182–4193.
- [71] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013;12:86.
- [72] May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunology Today* 1998;19:80–88.
- [73] Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009;458:430–437.
- [74] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol* 2011;12:715–723.
- [75] Mirzaei S, Saghari S, Bassiri F, Raesi R, Zarrabi A, Hushmandi K, Sethi G, Tergaonkar V. NF- κ B as a regulator of cancer metastasis and therapy response: A focus on epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Physiol* 2022;237:2770–2795.
- [76] Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity, Elsevier, 2006, pp. 1–50.
- [77] Meng L, Mohan R, Kwok BHB, Elofsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10403–10408.
- [78] Qureshi AA, Zuvanich EG, Khan DA, Mushtaq S, Silswal N, Qureshi N. Proteasome inhibitors modulate anticancer and anti-proliferative properties via NF- κ B signaling, and ubiquitin-proteasome pathways in cancer cell lines of different organs. *Lipids Health Dis* 2018;17:62.

- [79] Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:369–381.
- [80] Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, Hahn S, Schreiber S, Wilhelm S, Herrmann M, Jäck H-M, Voll RE. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 2007;67:1783–1792.
- [81] Shah SA, Potter MW, Callery MP. Ubiquitin proteasome pathway: implications and advances in cancer therapy. *Surg Oncol* 2001;10:43–52.
- [82] Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:2955–2960.
- [83] Gilardini A, Marmiroli P, Cavaletti G. Proteasome inhibition: a promising strategy for treating cancer, but what about neurotoxicity? *Curr Med Chem* 2008;15:3025–3035.
- [84] Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, Anderson KC. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res* 2006;66:184–191.
- [85] Chauhan D, Hideshima T, Mitsiades C, Richardson P, Anderson KC. Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2005;4:686–692.
- [86] Richardson P, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, Chauhan D, Munshi N, Anderson K. The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:317–323.
- [87] Petroski MD. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem* 2008;9 Suppl 1:S7.
- [88] Meregalli C, Canta A, Carozzi VA, Chiorazzi A, Oggioni N, Gilardini A, Ceresa C, Avezza F, Crippa L, Marmiroli P, Cavaletti G. Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiological and pathological study in rats. *Eur J Pain* 2010;14:343–350.
- [89] Nowis D, Maczewski M, Mackiewicz U, Kujawa M, Ratajska A, Wieckowski MR, Wilczyński GM, Malinowska M, Bil J, Salwa P, Bugajski M, Wójcik C, Siński M, Abramczyk P, Winiarska M, Dabrowska-Iwanicka A, Duszyński J, Jakóbisiak M, Golab J. Cardiotoxicity of the anticancer therapeutic agent bortezomib. *Am J Pathol* 2010;176:2658–2668.

- [90] Groll M, Huber R, Moroder L. The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J Pept Sci* 2009;15:58–66.
- [91] Miller Z, Ao L, Kim KB, Lee W. Inhibitors of the Immunoproteasome: Current Status and Future Directions. *CPD* 2013;19:4140–4151.
- [92] Scagliotti G. Proteasome inhibitors in lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;58:177–189.
- [93] Papandreou CN, Logothetis CJ. Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:5036–5043.
- [94] Groll M, Huber R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim Biophys Acta* 2004;1695:33–44.
- [95] Kisseelev AF, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* 2006;281:8582–8590.
- [96] Carmony K, Lee W, Kim KB. High-Resolution Snapshots of Proteasome Inhibitors in Action Revise Inhibition Paradigms and Inspire Next-Generation Inhibitor Design. *Chembiochem* 2016;17:2115–2117.
- [97] Lee MJ, Miller Z, Park JE, Bhattacharai D, Lee W, Kim KB. H727 cells are inherently resistant to the proteasome inhibitor carfilzomib, yet require proteasome activity for cell survival and growth. *Sci Rep* 2019;9:4089.
- [98] Kisseelev AF. Site-Specific Proteasome Inhibitors. *Biomolecules* 2021;12.
- [99] Wang J, Fang Y, Fan RA, Kirk CJ. Proteasome Inhibitors and Their Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Metabolism. *Int J Mol Sci* 2021;22.
- [100] Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN, Jiang J, Laidig GJ, Lewis ER, Parlati F, Shenk KD, Smyth MS, Sun CM, Vallone MK, Woo TM, Molineaux CJ, Bennett MK. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* 2007;67:6383–6391.
- [101] Lee SJ, Levitsky K, Parlati F, Bennett MK, Arastu-Kapur S, Kellerman L, Woo TF, Wong AF, Papadopoulos KP, Niesvizky R, Badros AZ, Vij R, Jagannath S, Siegel D, Wang M, Ahmann GJ, Kirk CJ. Clinical activity of carfilzomib correlates with inhibition of multiple proteasome subunits: application of a novel pharmacodynamic assay. *Br J Haematol* 2016;173:884–895.
- [102] Berkers CR, Verdoes M, Lichtman E, Fiebiger E, Kessler BM, Anderson KC, Ploegh HL, Ovaa H, Galardy PJ. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods* 2005;2:357–362.

- [103] Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, Lindow S, Kaiser M, Dudler R. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* 2008;452:755–758.
- [104] Mlynarczuk-Biały I, Roeckmann H, Kuckelkorn U, Schmidt B, Umbreen S, Gołab J, Ludwig A, Montag C, Wiebusch L, Hagemeier C, Schadendorf D, Kloetzel P-M, Seifert U. Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. *Cancer Res* 2006;66:7598–7605.
- [105] Braun HA, Umbreen S, Groll M, Kuckelkorn U, Mlynarczuk I, Wigand ME, Drung I, Kloetzel P-M, Schmidt B. Tripeptide mimetics inhibit the 20 S proteasome by covalent bonding to the active threonines. *J Biol Chem* 2005;280:28394–28401.
- [106] Stubba D, Bensinger D, Steinbacher J, Proskurjakov L, Salcedo Gómez Á, Schmidt U, Roth S, Schmitz K, Schmidt B. Cell-Based Optimization of Covalent Reversible Ketoamide Inhibitors Bridging the Unprimed to the Primed Site of the Proteasome β 5 Subunit. *ChemMedChem* 2019;14:2005–2022.
- [107] Voss C, Scholz C, Knorr S, Beck P, Stein ML, Zall A, Kuckelkorn U, Kloetzel P-M, Groll M, Hamacher K, Schmidt B. α -Keto phenylamides as P1'-extended proteasome inhibitors. *ChemMedChem* 2014;9:2557–2564.
- [108] Stein ML, Cui H, Beck P, Dubiella C, Voss C, Krüger A, Schmidt B, Groll M. Systematic comparison of peptidic proteasome inhibitors highlights the α -ketoamide electrophile as an auspicious reversible lead motif. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53:1679–1683.
- [109] Kazi A, Lawrence H, Guida WC, McLaughlin ML, Springett GM, Berndt N, Yip RM, Sebti SM. Discovery of a novel proteasome inhibitor selective for cancer cells over non-transformed cells. *Cell Cycle* 2009;8:1940–1951.
- [110] Xu K, Xiao Z, Tang YB, Huang L, Chen C-H, Ohkoshi E, Lee K-H. Design and synthesis of naphthoquinone derivatives as antiproliferative agents and 20S proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2012;22:2772–2774.
- [111] Lawrence HR, Kazi A, Luo Y, Kendig R, Ge Y, Jain S, Daniel K, Santiago D, Guida WC, Sebti SM. Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone analogs as a novel class of proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2010;18:5576–5592.
- [112] Lawrence HR, Kazi A, Luo Y, Kendig R, Ge Y, Jain S, Daniel K, Santiago D, Guida WC, Sebti SM. Synthesis and Biological Evaluation of Naphthoquinone Analogs as a Novel Class of Proteasome Inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2010;18:5576–5592.

- [113] Grant S. Selectively killing transformed cells through proteasome inhibition. *Cell Cycle* 2009;8:3073–3077.
- [114] Tubío-Santamaría N, Ebstein F, Heidel FH, Krüger E. Immunoproteasome Function in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cells* 2021;10.
- [115] Muchamuel T, Basler M, Aujay MA, Suzuki E, Kalim KW, Lauer C, Sylvain C, Ring ER, Shields J, Jiang J, Shwonek P, Parlati F, Demo SD, Bennett MK, Kirk CJ, Groettrup M. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 2009;15:781–787.
- [116] Zilberman J, Matos J, Dziopa E, Dziopa L, Yang Z, Kirk CJ, Assefnia S, Korngold R. Inhibition of the Immunoproteasome Subunit LMP7 with ONX 0914 Ameliorates Graft-versus-Host Disease in an MHC-Matched Minor Histocompatibility Antigen-Disparate Murine Model. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21:1555–1564.
- [117] Huber EM, Basler M, Schwab R, Heinemeyer W, Kirk CJ, Groettrup M, Groll M. Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 2012;148:727–738.
- [118] Nagayama Y, Nakahara M, Shimamura M, Horie I, Arima K, Abiru N. Prophylactic and therapeutic efficacies of a selective inhibitor of the immunoproteasome for Hashimoto's thyroiditis, but not for Graves' hyperthyroidism, in mice. *Clin Exp Immunol* 2012;168:268–273.
- [119] Niewerth D, Franke NE, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, Degenhardt J, Anderl J, Schimmer AD, Zweegman S, Haas V de, Horton TM, Kaspers GJL, Cloos J. Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica* 2013;98:1896–1904.
- [120] Voorhees PM, Orlowski RZ. The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:189–213.
- [121] Statistisches Bundesamt. Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland: - Ausführliche vierstellige ICD10-Klassifikation - Jahrgang 2022; Stand 19.08.2024 https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html; letztmalig abgerufen am 03.11.2024.
- [122] Gil J, Betancourt LH, Pla I, Sanchez A, Appelqvist R, Miliotis T, Kuras M, Oskolas H, Kim Y, Horvath Z, Eriksson J, Berge E, Burestedt E, Jönsson G, Baldetorp B, Ingvar C, Olsson H, Lundgren L, Horvatovich P, Murillo JR, Sugihara Y, Welinder C, Wieslander

- E, Lee B, Lindberg H, Pawłowski K, Kwon HJ, Doma V, Timar J, Karpati S, Szasz AM, Németh IB, Nishimura T, Corthals G, Rezeli M, Knudsen B, Malm J, Marko-Varga G. Clinical protein science in translational medicine targeting malignant melanoma. *Cell Biol Toxicol* 2019.
- [123] Friedrich S, Kraywinkel K. Faktenblatt: Epidemiologie des malignen Melanoms in Deutschland. *Onkologe* 2018;24:447–452.
- [124] Garbe C, Keim U, Eigentler TK, Amaral T, Katalinic A, Holleczeck B, Martus P, Leiter U. Time trends in incidence and mortality of cutaneous melanoma in Germany. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019;33:1272–1280.
- [125] Zhang P, Zhang M, Di Yu, Liu W, Hu L, Zhang B, Zhou Q, Cao Z. Lycorine inhibits melanoma cell migration and metastasis mainly through reducing intracellular levels of β -catenin and matrix metallopeptidase 9. *J Cell Physiol* 2018.
- [126] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11–30.
- [127] Ueda Y, Richmond A. NF- κ B activation in melanoma. *Pigment Cell Res* 2006;19:112–124.
- [128] Pelster MS, Amaria RN. Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials. *Ther Adv Med Oncol* 2019;11:1758835919830826.
- [129] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507–2516.
- [130] Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–819.
- [131] Ottaviano M, Giunta EF, Tortora M, Curvietto M, Attademo L, Bosso D, Cardalesi C, Rosanova M, Placido P de, Pietroluongo E, Riccio V, Mucci B, Parola S, Vitale MG, Palmieri G, Daniele B, Simeone E. BRAF Gene and Melanoma: Back to the Future. *Int J Mol Sci* 2021;22.
- [132] Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2017;17:676–691.

- [133] Rossi A, Roberto M, Panebianco M, Botticelli A, Mazzuca F, Marchetti P. Drug resistance of BRAF-mutant melanoma: Review of up-to-date mechanisms of action and promising targeted agents. *Eur J Pharmacol* 2019;862:172621.
- [134] Peyssonnaux C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001;93:53–62.
- [135] Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.
- [136] Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:41–50.
- [137] Long GV, Stroyakovskiy DL, Gogas H, Levchenko E, Braud F de, Larkin JMG, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion-Sileni V, Lebbe C, Mandalà M, Millward M, DeMarini DJ, Irani JG, Le N, Casey M, Patel K, Flaherty K. COMBI-d: A randomized, double-blinded, Phase III study comparing the combination of dabrafenib and trametinib to dabrafenib and trametinib placebo as first-line therapy in patients (pts) with unresectable or metastatic BRAF V600E/K mutation-positive cutaneous melanoma. *JCO* 2014;32:9011.
- [138] Stadler S, Weina K, Gebhardt C, Utikal J. New therapeutic options for advanced non-resectable malignant melanoma. *Adv Med Sci* 2015;60:83–88.
- [139] Garbe C. Chemotherapy and chemoimmunotherapy in disseminated malignant melanoma. *Melanoma Res* 1993;3:291–299.
- [140] Zaal EA, Berkers CR. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front Oncol* 2018;8.
- [141] Hölzel M, Bovier A, Tüting T. Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat Rev Cancer* 2013;13:365–376.
- [142] Bai X, Flaherty KT. Targeted and immunotherapies in BRAF mutant melanoma: where we stand and what to expect. *Br J Dermatol* 2020.
- [143] Ascierto PA, Lewis KD, Di Giacomo AM, Demidov L, Mandalà M, Bondarenko I, Herbert C, Mackiewicz A, Rutkowski P, Guminski A, Simmons B, Ye C, Hooper G, Wongchenko MJ, Goodman GR, Yan Y, Schadendorf D. Prognostic impact of baseline tumour immune infiltrate on disease-free survival in patients with completely resected, BRAFv600 mutation-positive melanoma receiving adjuvant vemurafenib. *Ann Oncol* 2020;31:153–159.
- [144] Röckmann H, Schadendorf D. Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities. *Onkologie* 2003;26:581–587.

- [145] Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 2003;278:9100–9106.
- [146] Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, Howell SB. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:1763–1767.
- [147] Lage H, Christmann M, Kern MA, Dietel M, Pick M, Kaina B, Schadendorf D. Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* 1999;80:744–750.
- [148] Helmbach H, Rossmann E, Kern MA, Schadendorf D. Drug-resistance in human melanoma. *Int J Cancer* 2001;93:617–622.
- [149] Didier R, Mallavialle A, Ben Jouira R, Domdom MA, Tichet M, Auberger P, Luciano F, Ohanna M, Tartare-Deckert S, Deckert M. Targeting the Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzyme USP14 Impairs Melanoma Cell Survival and Overcomes Resistance to MAPK-Targeting Therapies. *Mol Cancer Ther* 2018;17:1416–1429.
- [150] Tripp MK, Watson M, Balk SJ, Swetter SM, Gershenwald JE. State of the Science on Prevention and Screening to Reduce Melanoma Incidence and Mortality: The Time is Now. *CA Cancer J Clin* 2016.
- [151] Ko T, Li S. Genome-wide screening identifies novel genes and biological processes implicated in cisplatin resistance. *FASEB J* 2019:fj201801534RR.
- [152] Shahshahan MA, Beckley MN, Jazirehi AR. Potential usage of proteasome inhibitor bortezomib (Velcade, PS-341) in the treatment of metastatic melanoma: basic and clinical aspects. *Am J Cancer Res* 2011;1:913–924.
- [153] Li X, Li M, Ruan H, Qiu W, Xu X, Zhang L, Yu J. Co-targeting translation and proteasome rapidly kills colon cancer cells with mutant RAS/RAF via ER stress. *Oncotarget* 2017;8:9280–9292.
- [154] Ri M, Iida S, Nakashima T, Miyazaki H, Mori F, Ito A, Inagaki A, Kusumoto S, Ishida T, Komatsu H, Shiotsu Y, Ueda R. Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress. *Leukemia* 2010;24:1506–1512.
- [155] McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 2008;11:164–179.

- [156] Huber EM, Heinemeyer W, Groll M. Bortezomib-resistant mutant proteasomes: structural and biochemical evaluation with carfilzomib and ONX 0914. *Structure* 2015;23:407–417.
- [157] Franke NE, Niewerth D, Assaraf YG, van Meerloo J, Vojtekova K, van Zantwijk CH, Zweegman S, Chan ET, Kirk CJ, Geerke DP, Schimmer AD, Kaspers GJL, Jansen G, Cloos J. Impaired bortezomib binding to mutant β 5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia* 2012;26:757–768.
- [158] Nooter K, Stoter G. Molecular Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Pathology - Research and Practice* 1996;192:768–780.
- [159] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11:265–283.
- [160] Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal* 2011;5:101–110.
- [161] Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Pérez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, Casanova JM, Soria X, Egido R, Llombart A, Vilella R, Matias-Guiu X, Martí RM. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *Br J Dermatol* 2008;158:496–504.
- [162] Grazia G, Penna I, Perotti V, Anichini A, Tassi E. Towards combinatorial targeted therapy in melanoma: from pre-clinical evidence to clinical application (review). *Int J Oncol* 2014;45:929–949.
- [163] Qin J-Z, Ziffra J, Stennett L, Bodner B, Bonish BK, Chaturvedi V, Bennett F, Pollock PM, Trent JM, Hendrix MJC, Rizzo P, Miele L, Nickoloff BJ. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005;65:6282–6293.
- [164] 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.
- [165] Ebstein F, Textoris-Taube K, Keller C, Golnik R, Vigneron N, van den Eynde BJ, Schuler-Thurner B, Schadendorf D, Lorenz FKM, Uckert W, Urban S, Lehmann A, Albrecht-Koepke N, Janek K, Henklein P, Niewienda A, Kloetzel PM, Mishto M. Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitopes. *Sci Rep* 2016;6:24032.

- [166] Leister H, Luu M, Staudenraus D, Krol AL, Mollenkopf H-J, Sharma A, Schmerer N, Schulte LN, Bertrams W, Schmeck B, Bosmann M, Steinhoff U, Visekruna A. Pro- and anti-tumorigenic capacity of immunoproteasomes in shaping the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2021;9:682–692.
- [167] Leister H, Krause FF, Mahdavi R, Steinhoff U, Visekruna A. The Role of Immunoproteasomes in Tumor-Immune Cell Interactions in Melanoma and Colon Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2022;70:5.
- [168] Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 1986;76:61–90.
- [169] Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, Rittgen W, Hemminki K, Becker JC, Kumar R, Schadendorf D. B-RAF and N-RAS Mutations Are Preserved during Short Time In Vitro Propagation and Differentially Impact Prognosis. *PLoS ONE* 2007;2.
- [170] Bloethner S, Chen B, Hemminki K, Müller-Berghaus J, Ugurel S, Schadendorf D, Kumar R. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* 2005;26:1224–1232.
- [171] ATCC. A-375: CRL-1619, A-375 [A375] is a cell line exhibiting epithelial morphology that was isolated from the skin of a 54-year-old, female patient with malignant melanoma. This cell line is the ideal control for NRAS mutant-A375 isogenic cell line (ATCC CRL-1619IG-2). <https://www.atcc.org/products/crl-1619>, zuletzt abgerufen am 03.11.2024.
- [172] Suarez-Kelly LP, Kemper GM, Duggan MC, Stiff A, Noel TC, Markowitz J, Luedke EA, Yildiz VO, Yu L, Jaime-Ramirez AC, Karpa V, Zhang X, Carson WE. The combination of MLN2238 (ixazomib) with interferon-alpha results in enhanced cell death in melanoma. *Oncotarget* 2016;7:81172–81186.
- [173] Takahashi T, Abe N, Kanoh H, Banno Y, Seishima M. Synergistic effects of vemurafenib and fingolimod (FTY720) in vemurafenib-resistant melanoma cell lines. *Mol Med Rep* 2018;18:5151–5158.
- [174] Sun Y, Jurgovsky K, Möller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D. Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 1998;5:481–490.
- [175] Sun Y, Möller P, Berking C, Schlüpen EM, Volkenandt M, Schadendorf D. In vivo selective expansion of a tumour-specific cytotoxic T-cell clone derived from peripheral blood of a melanoma patient after vaccination with gene-modified autologous tumour cells. *Immunology* 1999;98:535–540.

- [176] Kern MA, Helmbach H, Artuc M, Karmann D, Jurgovsky K, Schadendorf D. Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposide: modulation of proto-oncogene expression. *Anticancer Res* 1997;17:4359–4370.
- [177] Helmbach H, Kern MA, Rossmann E, Renz K, Kissel C, Gschwendt B, Schadendorf D. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J Invest Dermatol* 2002;118:923–932.
- [178] Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1976;73:3278–3282.
- [179] Noonan FP, Recio JA, Takayama H, Duray P, Anver MR, Rush WL, Fabo EC de, Merlino G. Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 2001;413:271–272.
- [180] Tormo D, Ferrer A, Gaffal E, Wenzel J, Basner-Tschakarjan E, Steitz J, Heukamp LC, Gütgemann I, Buettner R, Malumbres M, Barbacid M, Merlino G, Tüting T. Rapid growth of invasive metastatic melanoma in carcinogen-treated hepatocyte growth factor/scatter factor-transgenic mice carrying an oncogenic CDK4 mutation. *Am J Pathol* 2006;169:665–672.
- [181] van der Weyden L, Arends MJ, Brenn T, Tuting T, Adams DJ. Widespread spontaneous hyperproliferation, melanosis and melanoma in Hgf-Cdk4R24C mice. *Melanoma Res* 2018;28:76–78.
- [182] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
- [183] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
- [184] Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J. Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 2009;30:1845–1855.
- [185] Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [186] Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol* 2000;303:643–653.

- [187] Mickuviene I, Kirveliene V, Juodka B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2004;18:639–648.
- [188] Bonnekoh B, Wevers A, Jugert F, Merk H, Mahrle G. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. *Arch Dermatol Res* 1989;281:487–490.
- [189] Martin A, Clynes M. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 1993;11:49–58.
- [190] Siripong P, Rassamee K, Piyaviriyakul S, Yahuafai J, Kanokmedhakul K. Anti-metastatic Effects on B16F10 Melanoma Cells of Extracts and Two Prenylated Xanthones Isolated from Maclura amboinensis Bl. Roots. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012;13:3519–3528.
- [191] Mitrus I, Bryndza E, Kazura M, Smagur A, Sochanik A, Cichon T, Szala S. Properties of B16-F10 murine melanoma cells subjected to metabolic stress conditions. *Acta Biochim Pol* 2012;59.
- [192] Di Serio C, Cozzi A, Angeli I, Doria L, Micucci I, Pellerito S, Mirone P, Masotti G, Moroni F, Tarantini F. Kynurenic acid inhibits the release of the neurotrophic fibroblast growth factor (FGF)-1 and enhances proliferation of glia cells, in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2005;25:981–993.
- [193] Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329–333.
- [194] Mickuviene I, Kirveliene V, Juodka B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2004;18:639–648.
- [195] Kazi A, Lawrence H, Guida WC, McLaughlin ML, Springett GM, Berndt N, Yip RML, Sebti SM. Discovery of a novel proteasome inhibitor selective for cancer cells over non-transformed cells. *Cell Cycle* 2009;8:1940–1951.
- [196] Wiebusch L, Hagemeier C. Use of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine labelling and flow cytometry to study cell cycle-dependent regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Methods Mol Biol* 2014;1119:123–132.
- [197] Textoris-Taube K, Cammann C, Henklein P, Topfstedt E, Ebstein F, Henze S, Liepe J, Zhao F, Schadendorf D, Dahlmann B, Uckert W, Paschen A, Mishto M, Seifert U. ER-aminopeptidase 1 determines the processing and presentation of an immunotherapy-relevant melanoma epitope. *Eur J Immunol* 2020;50:270–283.
- [198] Keller M, Ebstein F, Bürger E, Textoris-Taube K, Gorny X, Urban S, Zhao F, Dannenberg T, Sucker A, Keller C, Saveanu L, Krüger E, Rothkötter H-J, Dahlmann B,

- Henklein P, Voigt A, Kuckelkorn U, Paschen A, Kloetzel P-M, Seifert U. The proteasome immunosubunits, PA28 and ER-aminopeptidase 1 protect melanoma cells from efficient MART-126-35 -specific T-cell recognition. *Eur J Immunol* 2015;45:3257–3268.
- [199] Salter RD, Cresswell P. Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J* 1986;5:943–949.
- [200] Kuckelkorn U, Frentzel S, Kraft R, Kostka S, Groettrup M, Kloetzel PM. Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1995;25:2605–2611.
- [201] Bergamo P, Cocca E, Palumbo R, Gagliettino M, Rossi M, Palmieri G. RedOx status, proteasome and APEH: insights into anticancer mechanisms of t10,c12-conjugated linoleic acid isomer on A375 melanoma cells. *PLoS ONE* 2013;8:e80900.
- [202] Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, Grever MR, Orlowski M, Dang CV. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 1998;58:4342–4348.
- [203] An B, Goldfarb RH, Siman R, Dou QP. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ* 1998;5:1062–1075.
- [204] Masdehors P, Omura S, Merle-Béral H, Mentz F, Cosset JM, Dumont J, Magdelénat H, Delic J. Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* 1999;105:752–757.
- [205] Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;2016:pdb.prot087379.
- [206] Riesenbeck S, Groetchen A, Siddaway R, Bald T, Reinhardt J, Smorra D, Kohlmeyer J, Renn M, Phung B, Aymans P, Schmidt T, Hornung V, Davidson I, Goding CR, Jönsson G, Landsberg J, Tüting T, Hözel M. MITF and c-Jun antagonism interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. *Nat Commun* 2015;6:8755.
- [207] Cammann C, Kulla J, Wiebusch L, Walz C, Zhao F, Lowinus T, Topfstedt E, Mishra N, Henklein P, Bommhardt U, Bossaller L, Hagemeier C, Schadendorf D, Schmidt B, Paschen A, Seifert U. Proteasome inhibition potentiates Kv1.3 potassium channel expression as therapeutic target in drug-sensitive and -resistant human melanoma cells. *Biomed Pharmacother* 2023;168:115635.

- [208] Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry A* 2007;71:125–131.
- [209] Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol* 2020;2109:225–229.
- [210] Vang Mouritzen M, Jenssen H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. *J Vis Exp* 2018.
- [211] Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* 2004;4:21.
- [212] Kumar R, Dhaka B, Sahoo S, Jolly MK, Sabarinathan R. Prognostic association of immunoproteasome expression in solid tumours is governed by the immediate immune environment. *Mol Oncol* 2023;17:1041–1059.
- [213] Rouette A, Trofimov A, Haberl D, Boucher G, Lavallée V-P, D'Angelo G, Hébert J, Sauvageau G, Lemieux S, Perreault C. Expression of immunoproteasome genes is regulated by cell-intrinsic and -extrinsic factors in human cancers. *Sci Rep* 2016;6:34019.
- [214] Kalaora S, Lee JS, Barnea E, Levy R, Greenberg P, Alon M, Yagel G, Bar Eli G, Oren R, Peri A, Patkar S, Bitton L, Rosenberg SA, Lotem M, Levin Y, Admon A, Ruppin E, Samuels Y. Immunoproteasome expression is associated with better prognosis and response to checkpoint therapies in melanoma. *Nat Commun* 2020;11:896.
- [215] Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009;9:353–363.
- [216] Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 2004;22:304–311.
- [217] Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002;7:9–16.
- [218] Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott PJ. Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* 2000;46:673–683.
- [219] Schrader J, Henneberg F, Mata RA, Tittmann K, Schneider TR, Stark H, Bourenkov G, Chari A. The inhibition mechanism of human 20S proteasomes enables next-generation inhibitor design. *Science* 2016;353:594–598.
- [220] Tripathi SC, Vedpathak D, Ostrin EJ. The Functional and Mechanistic Roles of Immunoproteasome Subunits in Cancer. *Cells* 2021;10.

- [221] Beaumont KA, Hill DS, Daignault SM, Lui GYL, Sharp DM, Gabrielli B, Weninger W, Haass NK. Cell Cycle Phase-Specific Drug Resistance as an Escape Mechanism of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol* 2016;136:1479–1489.
- [222] Larsson P, Olsson M, Sarathchandra S, Fälldt Beding A, Forssell-Aronsson E, Kovács A, Karlsson P, Helou K, Parris TZ. Multi-omics analysis identifies repurposing bortezomib in the treatment of kidney-, nervous system-, and hematological cancers. *Sci Rep* 2024;14.
- [223] Ling Y-H, Liebes L, Jiang J-D, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R. Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2003;9:1145–1154.
- [224] Selimovic D, Porzig BBOW, El-Khattouti A, Badura HE, Ahmad M, Ghanjati F, Santourlidis S, Haikel Y, Hassan M. Bortezomib/proteasome inhibitor triggers both apoptosis and autophagy-dependent pathways in melanoma cells. *Cell Signal* 2013;25:308–318.
- [225] Tamura D, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Matsumoto K, Kudo K, Aomatsu K, Fujita Y, Watanabe T, Saijo N, Kotani Y, Nishimura Y, Nishio K. Bortezomib potentially inhibits cellular growth of vascular endothelial cells through suppression of G2/M transition. *Cancer Sci* 2010;101:1403–1408.
- [226] Liu H, Wan C, Ding Y, Han R, He Y, Xiao J, Hao J. PR-957, a selective inhibitor of immunoproteasome subunit low-MW polypeptide 7, attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing Th17-cell differentiation and regulating cytokine production. *FASEB J* 2017;31:1756–1766.
- [227] Basler M, Mundt S, Bitzer A, Schmidt C, Groettrup M. The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33:S74-9.
- [228] Xi J, Zhuang R, Kong L, He R, Zhu H, Zhang J. Immunoproteasome-selective inhibitors: An overview of recent developments as potential drugs for hematologic malignancies and autoimmune diseases. *Eur J Med Chem* 2019;182:111646.
- [229] Brzezinski L von, Säring P, Landgraf P, Cammann C, Seifert U, Dieterich DC. Low Neurotoxicity of ONX-0914 Supports the Idea of Specific Immunoproteasome Inhibition as a Side-Effect-Limiting, Therapeutic Strategy. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2017;7:234–245.
- [230] Koerner J, Brunner T, Groettrup M. Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice. *Oncotarget* 2017;8:50873–50888.

- [231] Mlynarczuk-Bialy I, Doeppner TR, Golab J, Nowis D, Wilczynski GM, Parobczak K, Wigand ME, Hajdamowicz M, Bialy LP, Aniolek O, Henklein P, Bähr M, Schmidt B, Kuckelkorn U, Kloetzel P-M. Biodistribution and Efficacy Studies of the Proteasome Inhibitor BSc2118 in a Mouse Melanoma Model. *Transl Oncol* 2014;7:570–579.
- [232] Poudel B, Lee Y-M, Kim D-K. DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF-κB pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2015;47:292–298.
- [233] Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-κB by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 2014;26:253–266.
- [234] Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wölfel T, Hözel M, Tüting T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012;490:412–416.
- [235] Meister S, Schubert U, Neubert K, Herrmann K, Burger R, Gramatzki M, Hahn S, Schreiber S, Wilhelm S, Herrmann M, Jäck H-M, Voll RE. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 2007;67:1783–1792.
- [236] Zecchin D, Boscaro V, Medico E, Barault L, Martini M, Arena S, Cancelliere C, Bartolini A, Crowley EH, Bardelli A, Gallicchio M, Di Nicolantonio F. BRAF V600E is a determinant of sensitivity to proteasome inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2950–2961.
- [237] Narayanan S, Cai C-Y, Assaraf YG, Guo H-Q, Cui Q, Wei L, Huang J-J, Ashby CR, Chen Z-S. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway to overcome anti-cancer drug resistance. *Drug Resist Updat* 2020;48:100663.
- [238] Verbrugge SE, Assaraf YG, Dijkmans BAC, Scheffer GL, Al M, den Uyl D, Oerlemans R, Chan ET, Kirk CJ, Peters GJ, van der Heijden JW, Gruijl TD de, Scheper RJ, Jansen G. Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein (multidrug resistance-associated protein/ATP-binding cassette B1) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy of (immuno)proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341:174–182.
- [239] Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, Scheffer GL, Debiprasad K, Vojtekova K, Lemos C, van der Heijden JW, Ylstra B, Peters GJ, Kaspers GL, Dijkmans BAC, Scheper RJ, Jansen G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 2008;112:2489–2499.

- [240] Kissel CK, Schadendorf D, Röckmann H. The altered apoptotic pathways in cisplatin and etoposide-resistant melanoma cells are drug specific. *Melanoma Res* 2006;16:527–535.
- [241] Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer* 2000;82:488–491.
- [242] Rünger TM, Emmert S, Schadendorf D, Diem C, Epe B, Hellfritsch D. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J Invest Dermatol* 2000;114:34–39.
- [243] Sciascia N, Wu W, Zong D, Sun Y, Wong N, John S, Wangsa D, Ried T, Bunting SF, Pommier Y, Nussenzweig A. Suppressing proteasome mediated processing of topoisomerase II DNA-protein complexes preserves genome integrity. *Elife* 2020;9.
- [244] Niewerth D, Kaspers GJL, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, Anderl J, Blank JL, van de Ven PM, Zweegman S, Jansen G, Cloos J. Interferon- γ -induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *J Hematol Oncol* 2014;7:7.
- [245] Downey-Kopyscinski S, Daily EW, Gautier M, Bhatt A, Florea BI, Mitsiades CS, Richardson PG, Driessen C, Overkleef HS, Kisseelev AF. An inhibitor of proteasome β 2 sites sensitizes myeloma cells to immunoproteasome inhibitors. *Blood Adv* 2018;2:2443–2451.
- [246] Boisvert-Adamo K, Aplin AE. Mutant B-RAF mediates resistance to anoikis via Bad and Bim. *Oncogene* 2008;27:3301–3312.
- [247] Tsumagari K, Abd Elmageed ZY, Sholl AB, Green EA, Sobti S, Khan AR, Kandil A, Murad F, Friedlander P, Boulares AH, Kandil E. Bortezomib sensitizes thyroid cancer to BRAF inhibitor in vitro and in vivo. *Endocr Relat Cancer* 2018;25:99–109.
- [248] Cartlidge RA, Thomas GR, Cagnol S, Jong KA, Molton SA, Finch AJ, McMahon M. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:534–544.
- [249] Neuendorf HM, Simmons JL, Boyle GM. Therapeutic targeting of anoikis resistance in cutaneous melanoma metastasis. *Front Cell Dev Biol* 2023;11.
- [250] Jazirehi AR, Baritaki S, Koya RC, Bonavida B, Economou JS. Molecular mechanism of MART-1+/A*0201+ human melanoma resistance to specific CTL-killing despite functional tumor-CTL interaction. *Cancer Res* 2011;71:1406–1417.

- [251] Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Larkin J, Liszkay G, Maio M, Mandala M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, La Cruz-Merino L de, Atkinson V, Dutriaux C, Garbe C, Chang I, Hack SP, Ribas A. coBRIM: a phase 3, double-blind, placebo-controlled study of vemurafenib versus vemurafenib + cobimetinib in previously untreated BRAFV600 mutation-positive patients with unresectable locally advanced or metastatic melanoma (NCT01689519). *J Transl Med* 2015;13:O4.
- [252] Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:2955–2960.
- [253] Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, Fracasso PM, Fitch T, Lorusso P, Adjei AA, Erlichman C. A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 2005;103:2584–2589.
- [254] Tundo GR, Sbardella D, Santoro AM, Coletta A, Oddone F, Grasso G, Milardi D, Lacal PM, Marini S, Purrello R, Graziani G, Coletta M. The proteasome as a druggable target with multiple therapeutic potentialities: Cutting and non-cutting edges. *Pharmacol Ther* 2020;213:107579.
- [255] Caillot M, Dakik H, Mazurier F, Sola B. Targeting Reactive Oxygen Species Metabolism to Induce Myeloma Cell Death. *Cancers (Basel)* 2021;13.
- [256] Croghan GA, Suman VJ, Maples WJ, Albertini M, Linette G, Flaherty L, Eckardt J, Ma C, Markovic SN, Erlichman C. A study of paclitaxel, carboplatin, and bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma: a phase 2 consortium study. *Cancer* 2010;116:3463–3468.
- [257] Yeramian A, Sorolla A, Velasco A, Santacana M, Dolcet X, Valls J, Abal L, Moreno S, Egido R, Casanova JM, Puig S, Vilella R, Llombart-Cussac A, Matias-Guiu X, Martí RM. Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway. *Int. J. Cancer* 2012;130:967–978.
- [258] Kumar SK, Jett J, Marks R, Richardson R, Quevedo F, Moynihan T, Croghan G, Markovic SN, Bible KC, Qin R, Tan A, Molina J, Kaufmann SH, Erlichman C, Adjei AA. Phase 1 study of sorafenib in combination with bortezomib in patients with advanced malignancies. *Invest New Drugs* 2013;31:1201–1206.
- [259] Yu C, Friday BB, Lai J-P, Yang L, Sarkaria J, Kay NE, Carter CA, Roberts LR, Kaufmann SH, Adjei AA. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH₂-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2378–2387.

- [260] An J, Rettig MB. Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2007;6:61–69.
- [261] Freudlsperger C, Thies A, Pfüller U, Schumacher U. The proteasome inhibitor bortezomib augments anti-proliferative effects of mistletoe lectin-I and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone in human melanoma cells. *Anticancer Res* 2007;27:207–213.
- [262] Millward M, Price T, Townsend A, Sweeney C, Spencer A, Sukumaran S, Longenecker A, Lee L, Lay A, Sharma G, Gemmill RM, Drabkin HA, Lloyd GK, Neuteboom STC, McConkey DJ, Palladino MA, Spear MA. Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. *Invest New Drugs* 2012;30:2303–2317.
- [263] Lai F, Guo ST, Jin L, Jiang CC, Wang CY, Croft A, Chi MN, Tseng H-Y, Farrelly M, Atmadibrata B, Norman J, Liu T, Hersey P, Zhang XD. Cotargeting histone deacetylases and oncogenic BRAF synergistically kills human melanoma cells by necrosis independently of RIPK1 and RIPK3. *Cell Death Dis* 2013;4:e655-.
- [264] Lee MS, Lim SH, Yu A-R, Hwang CY, Kang I, Yeo E-J. Carfilzomib in Combination with Bortezomib Enhances Apoptotic Cell Death in B16-F1 Melanoma Cells. *Biology (Basel)* 2021;10.
- [265] Roeten MSF, Cloos J, Jansen G. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018;81:227–243.
- [266] Hertzman Johansson C, Egyhazi Brage S. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2014;142:176–182.
- [267] Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol* 2010;80:561–567.
- [268] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–954.
- [269] Tabolacci C, Cordella M, Mariotti S, Rossi S, Senatore C, Lintas C, Levati L, D'Arcangelo D, Facchiano A, D'Atri S, Nisini R, Facchiano F. Melanoma Cell Resistance to Vemurafenib Modifies Inter-Cellular Communication Signals. *Biomedicines* 2021;9.

- [270] El Yaagoubi OM, Oularbi L, Bouyahya A, Samaki H, El Antri S, Aboudkhil S. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in skin cancer development: 26S proteasome-activated NF-κB signal transduction. *Cancer Biol Ther* 2021;22:479–492.
- [271] Karst AM, Gao K, Nelson CC, Li G. Nuclear factor kappa B subunit p50 promotes melanoma angiogenesis by upregulating interleukin-6 expression. *Int. J. Cancer* 2009;124:494–501.
- [272] Minn AJ. Interferons and the Immunogenic Effects of Cancer Therapy. *Trends Immunol* 2015;36:725–737.
- [273] Marshall HT, Djamgoz MBA. Immuno-Oncology: Emerging Targets and Combination Therapies. *Front Oncol* 2018;8:315.
- [274] Cheon H, Borden EC, Stark GR. Interferons and their stimulated genes in the tumor microenvironment. *Semin Oncol* 2014;41:156–173.
- [275] Dissemond J, Goette P, Moers J, Lindeke A, Goos M, Ferrone S, Wagner SN. Immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 downregulation in primary malignant melanoma lesions: association with lack of spontaneous regression. *Melanoma Res* 2003;13:371–377.
- [276] Hwang S, Kwon A-Y, Jeong J-Y, Kim S, Kang H, Park J, Kim J-H, Han OJ, Lim SM, An HJ. Immune gene signatures for predicting durable clinical benefit of anti-PD-1 immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 2020;10:643.
- [277] Ok CY, Young KH. Checkpoint inhibitors in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2017;10:103.
- [278] Widjaja CE, Olvera JG, Metz PJ, Phan AT, Savas JN, Bruin G de, Leestemaker Y, Berkers CR, Jong A de, Florea BI, Fisch K, Lopez J, Kim SH, Garcia DA, Searles S, Bui JD, Chang AN, Yates JR, Goldrath AW, Overkleft HS, Ovaa H, Chang JT. Proteasome activity regulates CD8+ T lymphocyte metabolism and fate specification. *J Clin Invest* 2017;127:3609–3623.
- [279] Cromm PM, Crews CM. The Proteasome in Modern Drug Discovery: Second Life of a Highly Valuable Drug Target. *ACS Cent Sci* 2017;3:830–838.

**Die Danksagung ist in der Version aus
Datenschutzgründen nicht enthalten**

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„*In vitro*-Analyse von Proteasominhibitoren als Grundlage
potentieller Therapieoptionen beim malignen Melanom“**

im Institut für klinische und Molekulare Immunologie mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ulrike Seifert ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Neubrandenburg, den 21.11.2024

Unterschrift

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.