

Summary

The inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) is a group of proteins implicated in the regulation of apoptotic cell death during development and disease. IAPs inhibit caspases, in the intrinsic apoptotic pathway, thereby increasing apoptotic resistance. The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is thought to be the most potent member of the IAP family. XIAP activates pro-survival NF- κ B signaling pathway, inhibits Caspase-3, -7 and -9 and promotes various cell signaling events. Elevated expression of XIAP has been detected in various types of cancer including in melanoma, and frequently correlates with the resistance to anti-cancer therapy. Recent discoveries, however, indicated that XIAP is involved in a number of additional cellular activities independent of its caspase inhibitory function for example cell migration. To analyze, at a molecular level, whether and how XIAP is implicated in the regulation of cell migration during the invasion, a stable down-regulation approach of XIAP in BLM melanoma cells was used. Silencing XIAP decreased invasion of melanoma cells in an *in vitro* invasion system. Accordingly, collective melanoma cell migration was reduced in shXIAP BLM cells on uncoated and more significantly on fibronectin-coated surfaces. In contrast to controls, shXIAP BLM cells failed to organize their vinculin-mediated network on fibronectin and displayed reduced numbers of focal contacts. vimentin was further identified and verified as a binding partner XIAPs. In melanoma cells in contact with fibronectin, XIAP was detected in small granules associated with vimentin along the intermediate filaments, while in the absence of fibronectin as substrate, XIAP was found accumulated around perinuclear areas. Importantly, as a result of XIAP deletion invasion of melanoma cells in either skin explants or transwell invasion assays was significantly reduced.

Down-regulation of XIAP in melanoma cells also decreased dramatically the formation of vascular networks *in vitro* in 3D Matrigel matrices. The tube-like structures that are formed had diminished length compared to control cells and displayed altered actin organization and tubulin polymerization. This reduction was not due to enhanced apoptosis but could be explained by an impairment of melanoma cell migration on Matrigel-coated surfaces. Additional factors implicated in the defective VM upon XIAP down-regulation including MMP14, CDH5, VEGF-R1, and EphA2, were reduced in shXIAP BLM cells grown in Matrigel. In addition to these, also soluble factors released by melanoma cells seeded on matrigel were found down-regulated. Among these are proteins involved in angiogenesis and cancer progression, such as GDNF, IGFBF-3, LAP(TGF β 1) and DPPIV, that can potentially affect VM. On the contrary, anti-apoptotic proteins such as angiostatin, platelet factor 4 and thrombospondin-2 were increased in shXIAP clones when compared to BLM-scr thus suggesting additional possible mechanisms implicated in inhibition of VM formation.

By deletion of specific domains of the XIAP by CRISPR/Cas XIAP in B16F1 melanoma cells, BIR3 and the RING-domain were identified as the mediators of the XIAP-mediated regulation of VM. This effect could be partly reproduced by treatment of melanoma cells with the SMAC mimetic birinapant.

To summarize, our work indicates that *in vitro* XIAP is involved in cell migration, invasion and tube formation by mechanisms unrelated to its function as an inhibitor of apoptosis. Furthermore, in human melanoma, XIAP expression correlates with the formation of VM structures thus strengthening its role in this process also *in vivo*.

Zusammenfassung

Die Apoptose-Inhibitor Proteine (IAPs) sind eine Gruppe von Proteinen, die an der Regulation des apoptotischen Zelltods nicht nur während der Entwicklung sondern auch an Erkrankungen beteiligt sind. IAPs inhibieren Caspasen auf dem intrinsischen-Weg der Apoptose und erhöhen dadurch die apoptotische Resistenz der Zelle. Das X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) gilt als das potenteste Mitglied der IAP-Familie. XIAP aktiviert den überlebensfördernden NF- κ B-Signalweg, hemmt Caspase-3, -7 und -9 und fördert verschiedene Zellsignaleereignisse. Eine erhöhte Expression von XIAP wurde bei verschiedenen Krebsarten, einschließlich Melanomen, festgestellt und korreliert häufig mit der Resistenz gegenüber einer Krebstherapie. Jüngste Entdeckungen zeigen jedoch, dass XIAP an einer Reihe zusätzlicher zellulärer Aktivitäten beteiligt ist, unabhängig von seiner Caspase-inhibitorischen Funktion, zum Beispiel in der Zellmigration. Um auf molekularer Ebene zu analysieren ob und wie XIAP an der Regulation der Zellmigration während der Invasion beteiligt ist, verwendeten wir BLM-Melanomzellen mit stabiler Runterregulierung von XIAP. Die Runterregulierung von XIAP verringerte die Invasion von Melanomzellen in einem *in-vitro* Invasionssystem. Dementsprechend war die kollektive Zellmigration der XIAP runterregulierten BLM Melanonzellen, auf unbeschichteten und signifikant auf Fibronectin beschichteten Oberflächen, verringert. Im Gegensatz zu Kontroll-Zellen konnten die shXIAP BLM-Zellen ihr Vinculin Netzwerk nicht auf Fibronectin organisieren und zeigten dementsprechend eine verringerte Anzahl von fokalen Adhäsionen. Vimentin wurde als Bindungspartner für XIAP identifiziert und verifiziert. In Melanomzellen, die mit Fibronectin in Kontakt standen, wurde XIAP in kleinen Granulen nachgewiesen, diese waren mit Vimentin entlang der Zwischenfilamente assoziiert, während sich XIAP in Abwesenheit von Fibronectin um perinukleare Bereiche in der Zelle ansammelte. Wichtig ist, dass infolge der XIAP Runterregulierung die Invasion von Melanomzellen in Hautexplantaten und in *in-vitro* Invasionen signifikant verringert wurden.

Die Runterregulierung von XIAP in Melanomzellen verringerte die Bildung von Gefäßnetzwerken dramatisch, *in vitro* in 3D-Matrigel-Matrizen. Die gebildeten Gefäßnetzwerke, hatten im Vergleich zu Kontrollzellen, eine verringerte Länge und zeigten eine veränderte Actin-Organisation und Tubulin-Polymerisation. Diese Reduktion war nicht auf einen verstärkten Zelltod zurückzuführen, sondern konnte durch eine Beeinträchtigung der Melanomzellmigration auf Matrigel-beschichteten Oberflächen erklärt werden. Zusätzliche Faktoren spielen bei der defekten Gefäßnetzwerk Bildung nach Herunterregulierung von XIAP eine wichtige Rolle, wie z.B. MMP14, CDH5, VEGF-R1 und EphA2, diese wurden in shXIAPBLM-Zellen, die in Matrigel kultiviert wurden, reduziert. Zusätzlich wurden, im Vergleich zu scr-Kontroll-Zellen, in shXIAP BLM-Zellen Proteine runterreguliert, die von den Melanomzellen selbst an ihre Umgebung abgegeben werden. Darunter liegen Proteine, die an

der Angiogenese und dadurch dem Fortschreiten von Krebs beteiligt sind, wie z.B. GDNF, IGFBF-3, LAP (TGF β 1) und DPPIV, die möglicherweise den vaskulären Mimikry beeinflussen. Im Gegensatz dazu waren anti-apoptotische Proteine wie Angiostatin, Thrombozytenfaktor 4 und Thrombospondin-2 in shXIAP BLM-Zellen im Vergleich zu scr-Kontroll-Zellen erhöht, die möglicherweise Mechanismen hervorrufen, die zur Hemmung der Gefäßnetzwerk Bildung führen.

Durch Deletion spezifischer Domänen des XIAP Proteins, mithilfe von CRISPR/Cas in B16F1-Melanomzellen, wurden die BIR3- und die RING-Domäne als Mediatoren für die Gefäßnetzwerk Bildung identifiziert. Dieser Effekt konnte zum Teil durch die Behandlung von Melanomzellen mit dem SMAC-Mimetikum Birinapant reproduziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass XIAP *in vitro* an der Zellmigration, -invasion und Gefäßnetzwerk Bildung beteiligt ist. Diese Funktionen stehen nicht in Zusammenhang mit XIAP als Apoptosehemmer. Darüber hinaus korreliert die XIAP Expression beim menschlichen Melanom mit der Bildung von Gefäßnetzwerken und stärkt seine Rolle in diesem Prozess auch *in vivo*.