

Dissertation

Michael Plötz

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Berlin 2012

Untersuchung proapoptotischer Signalwege für das maligne
Melanom auf der Basis von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Michael Plötz

Berlin

2012

Die vorliegende Arbeit wurde vom SoSe 2008 bis zum SoSe 2012 in der AG Apoptoseregulation in Hauttumoren unter der Leitung von Herrn Privat-Dozent Dr. J. Eberle in der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Privat-Dozent Dr. J. Eberle
2. Gutachter: Professor Dr. R. Mutzel

Tag der Disputation: 09 . 10 . 2012

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	7
ABSTRACT	9
1. EINLEITUNG	11
1.1. DAS MALIGNNE MELANOM	11
1.1.1. <i>Epidemiologie und Progression</i>	11
1.1.2. <i>Klinische Charakteristika und Melanomtypen</i>	11
1.1.3. <i>Stadieneinteilung und Prognose</i>	13
1.1.4. <i>Therapie</i>	13
1.2. DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD (APOPTOSE).....	14
1.2.1. <i>Nekrose im Vergleich zur Apoptose</i>	15
1.2.2. <i>Signalwege der Apoptose</i>	15
1.2.3. <i>Der extrinsische (Todesrezeptor-kontrollierte) Apoptosesignalweg</i>	16
1.2.4. <i>Der intrinsische (mitochondriale) Apoptosesignalweg</i>	17
1.3. CASPASEN IN DER APOPTOSE	18
1.4. APOPTOSEREGULATION DURCH DIE BCL-2-PROTEINFAMILIE.....	20
1.4.1. <i>Die BH3-only Proteine</i>	23
1.4.2. <i>Die BH3-only Proteine Bim und Nbk</i>	24
1.4.3. <i>Apoptoseregulation durch Bcl-x</i>	26
1.5. FRAGESTELLUNG	28
2. ERGEBNISSE	29
2.1. UNTERSUCHUNG DER APOPTOSEINDUKTION AUF DER BASIS EINES NEUEN PROAPOPTOTISCHEN BCL-2-PROTEINS, BCL-X _{AK}	29
2.1.1. <i>Verspätete, aber effiziente Apoptoseinduktion durch Bcl-x_{AK}</i>	29
2.1.2. <i>Aktivierung der Caspasen und der Mitochondrien durch AdV-AK</i>	32
2.1.3. <i>Abhängigkeit von Bax und Bak</i>	34
2.1.4. <i>Blockierung der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptose durch antiapoptotische Bcl-2- Proteine</i>	36
2.1.5. <i>Keine Blockierung der mitochondrialen Translokation von Bcl-x_{AK} durch Bcl-2</i>	38
2.1.6. <i>Keine Interaktionen von Bcl-x_{AK} mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie</i>	39

2.2. UNTERSUCHUNG DER APOPTOSEINDUKTION AUF DER BASIS DES PROAPOPTOTISCHEN BCL-2-PROTEINS, BCL-X _S	41
2.2.1. <i>Effiziente Apoptoseinduktion durch AdV-XS</i>	41
2.2.2. <i>Aktivierung der Caspasen und Mitochondrien durch hohe Bcl-x_S-Expression</i>	43
2.2.3. <i>Bcl-x_S ist abhängig von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen</i>	45
2.2.4. <i>Keine Interaktion von Bcl-x_S mit anderen Bcl-2-Proteinen</i>	49
2.2.5. <i>Trennung der Interaktion von VDAC2 mit Bak durch Bcl-x_S</i>	50
2.2.6. <i>Blockierung der Bcl-x_S-induzierten Apoptose durch VDAC2</i>	53
2.3. UNTERSUCHUNG DER APOPTOSEINDUKTION AUF DER BASIS DES PROAPOPTOTISCHEN BCL-2-PROTEINS, BIM _L	55
2.3.1. <i>Die komplette Aufhebung der Zellproliferation in Melanomzellen durch Bim_L-Reexpression</i>	55
2.3.2. <i>Effiziente Apoptoseinduktion durch den mitochondrialen Signalweg</i>	56
2.3.3. <i>Aktivierung von Bax und Bak</i>	59
2.3.4. <i>Überwindung der durch antiapoptotisches Bcl-2 vermittelten Resistenz in Melanomzellen durch Bim_L</i>	60
2.3.5. <i>Bindung von Bim_L an alle antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in Melanomzellen</i>	62
3. DISKUSSION	63
3.1. APOPTOSEINDUKTION AUF DER BASIS VON BCL-X _{AK}	63
3.1.1. <i>Alternative Splicevarianten und Ähnlichkeiten von Bcl-x_{AK} mit anderen atypischen Domänenstrukturen</i>	63
3.1.2. <i>Mitochondrial abhängige Apoptoseinduktion durch Bcl-x_{AK}</i>	64
3.1.3. <i>Keine Hemmung der mitochondrialen Lokalisation von Bcl-x_{AK} durch Bcl-2</i>	65
3.1.4. <i>Wirkungsmechanismus von Bcl-x_{AK}</i>	66
3.2. APOPTOSEINDUKTION AUF DER BASIS VON BCL-X _S	67
3.2.1. <i>Apoptoseregulation durch Bcl-2-Proteine</i>	67
3.2.2. <i>Effiziente Apoptoseinduktion durch Bcl-x_S</i>	68
3.2.3. <i>Wirkungsmechanismus von Bcl-x_S</i>	69
3.3. APOPTOSEINDUKTION AUF DER BASIS VON BIM _L	70
3.3.1. <i>Apoptosedefizienz als charakteristisches Merkmal des malignen Melanoms</i>	70
3.3.2. <i>Überwindung der Bcl-2 vermittelten Resistenz im Melanom durch Bim_L</i>	71

3.3.3. Wirkmechanismus von <i>Bim_L</i>	72
3.4. FAZIT	73
4. MATERIAL & METHODEN	75
4.1. MATERIAL	75
4.1.1. Material für die Zellkultur	75
4.1.1.1. Nährlösungen	75
4.1.1.2. Eukaryotische Zellen	75
4.1.2. Adenovirale Konstrukte von <i>Bcl-x_{AK}</i> , <i>Bcl-x_S</i> , <i>Bim_L</i> und <i>Bik/Nbk</i>	76
4.1.3. Proteinanalytik	77
4.1.4. Nachweis der Apoptose und Nekrose	79
4.1.5. Herstellung der Zellfraktionierungslysate	80
4.1.6. Nachweis des Membranpotentials und ROS (Reactive Oxygen Species)	80
4.1.7. Transfektion	80
4.1.7.1. Plasmide	80
4.1.7.2. siRNA-Sequenzen	80
4.1.8. Caspaseinhibitor	81
4.1.9. Antioxidantien	81
4.1.10. Chemikalien	81
4.1.11. Sonstiges Material	82
4.1.12. Geräte	83
4.2. METHODEN	84
4.2.1. Zellbiologische Methoden	84
4.2.1.1. Zellkultur – Kultivierung	84
4.2.1.2. Lagerung eukaryotischer Zellen	84
4.2.2. Durchflusszytometrie	85
4.2.3. Nachweismethoden – Apoptose	85
4.2.3.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	86
4.2.3.2. Propidiumjodid- und Annexin-V/PI-Färbung	87
4.2.4. Nachweis der Zytotoxizität	87
4.2.5. Wachstumskurven	88
4.2.6. Bisbenzimid-Färbung	88
4.2.7. Proteinanalytik (Western Blot Analyse)	88

4.2.7.1. Herstellung von Proteinextrakten mit einem Standard-Lysepuffer.....	89
4.2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bicinchoninsäure (BCA)...	89
4.2.7.3. Elektrophorese-Protokoll	90
4.2.7.4. Proteintransfer	90
4.2.7.5. Enhanced Chemilumineszenz (ECL)	91
4.2.8. Herstellung von Zellfraktionierungslysaten	91
4.2.9. Inhibition der Caspasen	91
4.2.10. Transfektion.....	91
4.2.11. Immunpräzipitation	92
4.2.12. Nachweismethode des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$)	92
4.2.13. Nachweismethode der reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species – ROS)	93
4.2.14. Nachweis der Zellproliferation und Zellviabilität.....	93
4.2.15. Untersuchung der Bax/Bak-Aktivierung	94
4.2.16. Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation).....	94
4.2.17. Adenovirus-Präparation	95
4.2.17.1. Adenovirus-Reinigung durch Ultrazentrifugation	95
4.2.17.2. Entfernung des CsCl-Salzes.....	95
4.2.17.3. Quantifizierung rekombinanter Adenoviren: Titer-Bestimmung (PFU).....	96
4.2.17.4. Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration.....	96
4.2.18. Statistische Auswertung der Ergebnisse	96
LITERATURVERZEICHNIS	97
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	110
PUBLIKATIONSLISTE	115
KONGRESSBEITRÄGE	116
LEBENS LAUF	117
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	118
DANKSAGUNG	119

Zusammenfassung

Derzeit gibt es keine wirksame Therapie für das metastasierte maligne Melanom. Die gezielte Induktion der Apoptose erscheint als ein vielversprechender Ansatz. Dabei stehen die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der B-Zell-Lymphom-(Bcl)-2-Proteinfamilie im besonderen Fokus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion der Apoptose durch die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bcl- x_{AK} , Bcl- x_S und Bim $_L$ in Melanomzellen untersucht. Für die effiziente Überexpression wurde die cDNA von Bcl- x_{AK} , Bcl- x_S und Bim $_L$ durch die Klonierung in einen adenoviralen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines Tet-OFF-Promotors (Tetracyclin) gestellt.

Bcl- x_{AK} ist ein proapoptotisches Spliceprodukt des *bcl-x* Gens, dem die BH3(Bcl-2-homologe)-Domäne fehlt und das stattdessen die BH2-, BH4- und Transmembrandomäne (TM) besitzt. Die BH3-Domäne der proapoptotischen Bcl-2-Proteine galt bisher für die Apoptoseinduktion und für die wechselseitige Regulation der Bcl-2-Proteine als unabdingbar, weshalb es unklar blieb, wie Bcl- x_{AK} die Apoptose induzierte. Das adenovirale Konstrukt (AdV-AK) vermittelte sowohl eine starke Apoptoseinduktion als auch eine Abnahme der Zellproliferation und Zellviabilität in Melanom- und Nicht-Melanomzelllinien. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) und das Freiwerden von Cytochrom c aus den Mitochondrien indizierten eine klare Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges. Demzufolge schien die hier aufgezeigte mitochondriale Translokation von Bcl- x_{AK} selbst der essentielle und initiale Schritt der Apoptoseinduktion zu sein. Die Bcl- x_{AK} induzierte Apoptose war entscheidend von Bax oder Bak abhängig und wurde sowohl unter Bax/Bak-Doppel-Knockdown-Bedingungen als auch unter Bcl-2- oder Bcl- x_L -Überexpressionsbedingungen aufgehoben. Eine direkte Interaktion mit den Proteinen der Bcl-2-Familie Bcl-2, Bax, Bad, Noxa oder Puma konnte mittels Immunpräzipitation jedoch nicht nachgewiesen werden. Das heißt, neben der BH3-vermittelten Interaktion existiert für die gegenseitige Regulation der Bcl-2-Proteine ein zusätzlicher Weg, der unabhängig von der BH3-Domäne ist.

Das proapoptotische Bcl-2-Protein Bcl- x_S umfasst die Bcl-2-homologen Domänen BH3 und BH4 und induziert Apoptose in Abhängigkeit von Bak. Für die Untersuchung der Effizienz und des Signalweges von Bcl- x_S wurde wiederum ein adenoviraler Vektor (AdV-XS) verwendet. Die Überexpression von Bcl- x_S resultierte in einer effizienten Apoptoseinduktion und Aktivierung der Caspasen. Anzeichen für den mitochondrialen Apoptosesignalweg waren der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c, AIF und Smac aus den Mitochondrien. In Melanomzellen zeigte sich eine signifikante

Aktivierung von Bak durch Bcl-x_S. Der Knockdown gegen Bak und die Bcl-x_L-Überexpression verhinderten die Bcl-x_S induzierte Apoptose, während der Knockdown von Mcl-1 dafür sensitivierte. Im Bezug auf die spezifische Rolle von VDAC2 (voltage-dependent anion channel) als Inhibitor von Bak konnten wir eine bemerkenswerte Interaktion zwischen Bcl-x_S und VDAC2 in Melanomzellen identifizieren, welche sich mit einer reziproken Koimmunpräzipitationsanalyse bestätigte. Darüber hinaus zeigte Bcl-x_S keine direkte Interaktion mit Bak. Des Weiteren war die Bindung von Bcl-x_S an VDAC2 unabhängig von der Bak-Expression. Aus der Bcl-x_S-Überexpression resultierte die Spaltung der VDAC2-Bak-Interaktion und führte zu einem Freiwerden von Bak aus dem VDAC2-Bak-Komplex. Die mechanistischen Zusammenhänge wurden durch die Tatsache unterstützt, dass die Bcl-x_S induzierte Apoptose nach Überexpression von VDAC2 stark reduziert wurde.

Für das proapoptotische BH3-only Protein Bim wurde keine signifikante Expression in einem Panel von verschiedenen Melanomzelllinien gefunden. Die Bim_L-Überexpression in Melanomzellen nach der Transduktion mit dem adenoviralen Vektor (AdV-BimL) resultierte in einer hoch effizienten Induktion der Apoptose mit einer kompletten Aufhebung der Zellproliferation. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges wurde durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, dem Freiwerden von mitochondrialen Apoptose induzierenden Faktoren und der Prozessierung der Caspase 9 ersichtlich. Einzel-Knockouts gegen Bax oder Bak konnten die Bim_L-induzierte Apoptose nicht unterdrücken. Demzufolge ist die Bim_L vermittelte Apoptose von Bax oder Bak abhängig. Besonders bemerkenswert war, dass Bim_L die Bcl-2-Überexpression, die als ein wesentlicher antiapoptotischer Faktor im Melanom gilt, komplett überwinden konnte. Diese deutliche Effizienz in Melanomzellen wurde mit der Interaktion von Bim_L mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen in Verbindung gebracht. Diese Interaktionen konnten durch Koimmunpräzipitationsanalysen für Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 und Bcl-w gezeigt werden. Auf diese Weise zeigte Bim_L ein außergewöhnlich hohes proapoptotisches Potential in Melanomzellen. Strategien für die Reexpression von Bim_L erscheinen somit von besonderem Interesse. Derartige Strategien wurden für den B-Raf-Inhibitor (Vemurafenib) berichtet, dessen Effizienz und Effektivität zumindest teilweise der Reexpression von Bim zugeschrieben werden konnte.

Die hier identifizierte besondere Rolle der proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bcl-x_{AK}, Bcl-x_S und Bim_L in der Apoptoseregulation von Melanomzellen könnte bei der Behandlung des malignen Melanoms genutzt werden, um die Apoptoseresistenz der Melanomzellen zu überwinden und die Wirksamkeit bestehender Therapieformen zu optimieren.

Abstract

Apoptosis is a defined genetic death program that leads to ordered destruction of cellular components while membrane integrity is preserved. It also represents a safeguard mechanism against tumor formation, due to the elimination of altered and mutated cells. Thus, apoptosis resistance is characteristic for tumor cells, and therapeutic strategies aim to overcome this resistance. In the present study, the mechanism of Bcl- x_{AK} -, Bcl- x_S - and Bim $_L$ -induced apoptosis was investigated in melanoma cells. For efficient overexpression, Bcl- x_{AK} , Bcl- x_S and Bim $_L$ were subcloned in an adenoviral vector under Tet-OFF control.

We recently described Bcl- x_{AK} , a proapoptotic splice product of the bcl-x gene, which lacks BH3 but encloses BH2, BH4 and a transmembrane domain. The BH3 domain of Bcl-2 proteins was regarded as indispensable for apoptosis induction and for mutual regulation of family members. It remained however unclear, how Bcl- x_{AK} may trigger apoptosis. The construct resulted in strong apoptosis induction with up to 50% apoptotic cells in melanoma and nonmelanoma cell lines as well as decreased cell proliferation and survival. Disruption of mitochondrial membrane potential, and cytochrome c release clearly indicated activation of the mitochondrial apoptosis pathways. Both Bax and Bak were activated as shown by clustering and conformation analysis. Mitochondrial translocation of Bcl- x_{AK} appeared as an essential and initial step. Bcl- x_{AK} was critically dependent on either Bax or Bak, and apoptosis was abrogated in Bax/Bak double knockout conditions as well by overexpression of Bcl-2 or Bcl- x_L . A direct interaction with Bcl-2, Bax, Bad, Noxa or Puma was however not seen by immunoprecipitation. Thus besides BH3-mediated interactions, there exists an additional way for mutual regulation of Bcl-2 proteins, which is independent of the BH3.

The proapoptotic Bcl-2 protein Bcl- x_S encloses the Bcl-2 homology domains BH3 and BH4 and triggers apoptosis via the multidomain protein Bak, however the mechanism remained elusive. For investigating Bcl- x_S efficacy and pathways, an adenoviral vector was constructed with its cDNA under Tet-Off control. Bcl- x_S overexpression resulted in efficient apoptosis induction and caspase activation in melanoma cells.

Indicative of mitochondrial apoptosis pathways, Bcl- x_S translocated to mitochondria, disrupted the mitochondrial membrane potential and induced release of cytochrome c, AIF and Smac. In melanoma cells, Bcl- x_S resulted in significant Bak activation, and Bak knockdown as well as Bcl- x_L overexpression abrogated Bcl- x_S -induced apoptosis, whereas Mcl-1 knockdown resulted in a sensitization. With regard to the particular role of VDAC2 (voltage-dependent anion channel) for inhibition of Bak, we identified here a notable interaction between Bcl- x_S

and VDAC2 in melanoma cells, which was proven in reciprocal coimmunoprecipitation analyses. On the other hand, Bcl-x_S showed no direct interaction with Bak, and its binding to VDAC2 appeared as also independent of Bak expression. Suggesting a new proapoptotic mechanism, Bcl-x_S overexpression resulted in disruption of the VDAC2-Bak interaction leading to release of Bak.

No significant expression of the proapoptotic Bcl-2 protein Bim was obtained in a panel of melanoma cell lines. For re-expression, an adenoviral vector was constructed with the full-length cDNA of Bim_L under control of an inducible promoter. Bim_L overexpression resulted in highly efficient apoptosis induction in melanoma cells associated with complete abrogation of cell proliferation. Activation of mitochondrial apoptosis pathways was evident by disruption of the mitochondrial membrane potential, release of mitochondrial apoptogenic factors and caspase-9 processing. Apoptosis was induced both via Bax and Bak, and single knockdown of either Bax or Bak could not prevent Bim_L-induced apoptosis. Of particular note, Bim_L completely overrode the apoptosis blockade by Bcl-2 overexpression, which represents a main antiapoptotic factor in melanoma. This pronounced efficacy was related to Bim_L interaction with all antiapoptotic Bcl-2 family members in melanoma cells, as shown by coimmunoprecipitation analyses for Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 and Bcl-w. Thus, Bim_L bears an extraordinary high proapoptotic potential in melanoma cells, and strategies for its re-expression appear of particular interest. Such strategies have been reported with the B-Raf inhibitors, and their efficacy may be partly attributed to Bim_L re-expression.

This identified specific role of these proapoptotic Bcl-2 proteins Bcl-x_{AK}, Bcl-x_S and Bim_L in apoptosis regulation of melanoma cells could be used for treatment of malignant melanoma to overcome the apoptosis resistance and to optimize the efficiency of current therapies. Thus, the identification of new proapoptotic domains may be finally employed for the development of small molecules, in analogy to BH3 mimetics.

1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom

1.1.1. Epidemiologie und Progression

Das Melanom ist ein invasiver, maligner Tumor, dessen Inzidenz und Mortalität weltweit in den letzten Jahrzehnten drastisch angestiegen ist. Besonders häufig tritt das Melanom bei hellen Hauttypen und gleichzeitig hoher Sonnenexposition auf (Balch et al, 2001). Ausgesprochen hoch sind die Mortalitätsraten in Australien, wo das Melanom die dritthäufigste Tumorerkrankung darstellt. Bezeichnend für die Malignität des Melanoms sind insbesondere die äußerst hohe Mortalität im metastasierten Zustand sowie die hohe Überlebensfähigkeit und die Apoptotseresistenz der Melanomzellen, was ein Auftreten von Fernmetastasen auch noch Jahre nach Entfernung des Primärtumors möglich macht (Garbe und Leiter, 2009).

Neben dem malignen Melanom sind die häufigsten Tumore der Haut das Plattenepithelkarzinom und das Basalzellkarzinom. Auf Grund der Inzidenz und Mortalität stellt das maligne Melanom die aggressivste Form der Hauttumoren dar. Primäre Melanome entstehen aus melanozytären Nävi (Muttermalen) oder als Neubildungen. In der radialen Wachstumsphase (radial growth phase – RGP) sind die Zellen zwar lokal invasiv, weisen jedoch noch keine metastasierenden Eigenschaften auf. In der sich anschließenden vertikalen Wachstumsphase (vertical growth phase – VGP) infiltrieren Melanomzellen als Cluster die Dermis und entfalten metastasierende Eigenschaften, wobei Fernmetastasen den letzten Schritt darstellen (Clark, 1991). Die Entstehung eines Melanoms wird durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt. Dazu gehört ein heller Hauttyp (Hauttyp I und II), eine hohe Sonnenexposition in der Kindheit, mehrere starke Sonnenbrände in der Kindheit, eine große Anzahl von Nävi, die familiäre Disposition und ein höheres Lebensalter.

1.1.2. Klinische Charakteristika und Melanomtypen

Das maligne Melanom kann klinisch durch die ABCD-Kriterien diagnostiziert werden:

Asymmetry – Asymmetrie: Das Melanom lässt sich nicht durch eine Spiegelebene in zwei gleiche Hälften teilen (Abb. 1a). Border irregularity - Begrenzung: Die Ränder des Melanoms sind unregelmäßig und gezackt (Abb. 1b). Color variability – Color: Das Melanom ist nicht einheitlich gefärbt, sondern weist rote, braune, schwarze, bläuliche oder auch ungefärbte

Bereiche auf (Abb. 1c). Diameter – Durchmesser: Der Durchmesser des Melanoms beträgt mehr als 5 mm bzw. ist kleiner, aber hat sich in kurzer Zeit stark vergrößert (Abb. 1d).

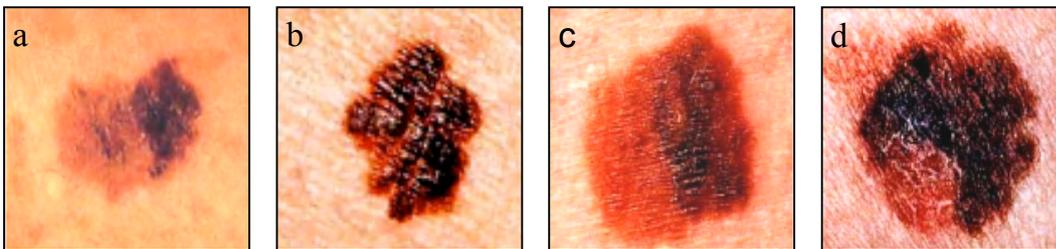


Abb. 1: Die ABCD-Kriterien beim malignen Melanom. (a) Asymmetrie: Das Pigmentmal hat eine asymmetrische, nicht runde oder ovale Form; (b) Begrenzung: Die Begrenzung des Pigmentmals ist unscharf und verwaschen; (c) Color: Man findet mehrere Farbtöne wie braun, grau, schwarz, rot und blau; (d) Durchmesser: Das Pigmentmal ist größer als 5 mm oder in letzter Zeit gewachsen.

Einteilung des Melanoms in vier Haupttypen:

1. Superfiziell spreitendes Melanom (SSM). Dieses stellt die häufigste Form des malignen Melanoms dar. Die Läsion ist zu Beginn flach und wächst horizontal, in späteren Phasen ist die Begrenzung unregelmäßig und die Oberfläche inhomogen (Abb. 2a).
2. Noduläres Melanom (NM). Diese Form des Melanoms zeichnet sich durch ein frühes vertikales Wachstum mit schneller Invasion in die Dermis aus. Es ist in der Regel blauschwarz und knotig oder halbkugelig mit scharf begrenzten Rändern (Abb. 2b).
3. Lentigo malignes Melanom (LMM). Diese Form weist eher eine langsame Wachstumsgeschwindigkeit auf und metastasiert aus diesem Grund nur in den seltensten Fällen. Typischerweise ist es eine große, bräunliche Läsion (Abb. 2c).
4. Akrolentiginöses Melanom (ALM). Diese Form tritt an Händen oder Füßen oder auch unter den Nägeln auf und zeigt oftmals Ulzerationen (Geschwüre). Diese Form tritt gehäuft bei dunkelhäutigen Menschen auf (Abb. 2d).
5. Andere seltene Melanomformen. Hierunter fallen das Uvea-Melanom, das aus den Melanozyten der Aderhaut hervorgeht, und das Schleimhaut-Melanom, das im Mund, im Genitalbereich, dem Respirations- oder dem Gastrointestinaltrakt vorkommen kann.

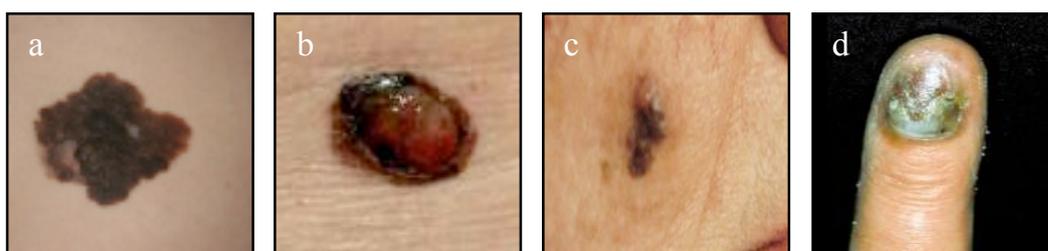


Abb. 2: Die vier Haupttypen beim malignen Melanom. (a). Superfiziell spreitendes Melanom (SSM), (b). Noduläres Melanom (NM), (c) Lentigo Malignes Melanom (LMM), (d) Akrolentiginöses Melanom (ALM).

1.1.3. Stadieneinteilung und Prognose

Die Dicke und die Invasionstiefe des Primärtumors in der Dermis sind die wichtigsten prognostischen Indikatoren für eine mögliche Metastasierung beim malignen Melanom.

Zur Tumorcharakterisierung bezüglich Tumordicke und Invasionslevel werden folgende Parameter herangezogen:

1. Tumordicke: Hierfür wird die Tumordicke von der Granularzellschicht der Epidermis bis zur tiefsten Stelle des Tumors gemessen (Breslow, 1978).

2. Invasionslevel: Hierfür wird die Eindringtiefe des Tumors in die verschiedenen Schichten der Haut bestimmt (Clark et al, 1984).

Level I: In situ: Tumor befindet sich innerhalb der Epidermis

Level II: Invasion ins Stratum papillare der Dermis

Level III: Invasion ins Stratum reticulare der Dermis

Level IV: Invasion ins Stratum papillare und Stratum reticulare

Level V: Invasion in das subkutane Fettgewebe

Die Stadieneinteilung richtet sich nach der Dicke des Primärtumors, regionären Lymphknoten- und Fernmetastasen. Allgemein gilt, je dicker der Tumor und je mehr Lymphknoten- oder Fernmetastasen, desto höher wird das Stadium eingestuft. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist in entscheidendem Maße vom Stadium abhängig. Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem kleinen Primärtumor (< 1,0 mm) bei 95 % liegt, reduziert sie sich bei Fernmetastasen bis auf 18 %.

1.1.4. Therapie

Der wichtigste Schritt in der Therapie ist die Erkennung des malignen Melanoms in einem frühen Stadium. Durch vollständige operative Entfernung des Primärtumors ergibt sich dadurch eine Überlebensrate von über 90%. Das fortgeschrittene Melanom metastasiert in verschiedene Organe wie Lunge, Leber, Knochen oder Gehirn, was die operativen Entfernungsmöglichkeiten stark eingrenzt (Balch et al, 2001). Die schlechte Prognose für die Überlebensrate und die geringe Ansprechrate auf herkömmliche Chemotherapeutika beim metastasierten Melanom basieren auf einer Therapieresistenz, die mit Defekten in der proapoptotischen Signalkaskade in Verbindung gebracht werden. Die Chemotherapieresistenz bezüglich der Apoptose wird mit drei verschiedenen molekularen Veränderungen in Zusammenhang gebracht: (i) Aktivierung von antiapoptotischen Faktoren, (ii) Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren und (iii) Reaktivierung von Überlebenssignalen (Soengas und

Lowe, 2003; Eberle et al, 2007). Verschiedene Chemotherapeutika sowie Interferon-alpha (IFN-alpha) und Interleukin-2 (IL-2) werden bei Patienten mit einem Melanom im fortgeschrittenen Stadium angewendet. Insgesamt ergeben sich bei diesen Therapieansätzen nur geringe Ansprechraten für die Melanompatienten (Keilholz und Gore, 2002).

Die hohen Sterberaten beim metastasierten Melanom und die geringe Effektivität herkömmlicher Chemotherapeutika verdeutlichen die Notwendigkeit zur Entwicklung von neuen wirksamen Strategien, um die hohe Therapieresistenz des malignen Melanoms zu überwinden.

1.2. Der programmierte Zelltod (Apoptose)

Apoptose, der programmierte Zelltod, hat seinen Ursprung im Griechischen und stand ursprünglich für das Abfallen der Blätter. Die Biologie verwendet den Begriff, um das Absterben von Zellen durch ein definiertes Programm zu beschreiben. Daher wird Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet (Kerr et al, 1972; Lockshin und Zakeri, 2004). Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein in der Evolution hoch konservierter Mechanismus mit essentieller Bedeutung für die embryonale Entwicklung und die Gewebshomöostase (Reed, 2004). Charakteristika der Apoptose sind das Schrumpfen der Zellen, die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung, wobei die Membranintegrität erhalten bleibt (Ellis et al, 1991). Während der Apoptose schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab, die Fragmente der Zelle enthalten und als apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) bezeichnet werden. Zum Schluss werden die Zellreste durch Makrophagen bzw. Nachbarzellen aufgenommen, wobei cytosolische Bestandteile nicht in den extrazellulären Raum austreten können (Abb. 3). Dieser Prozess wird als Phagocytose bezeichnet (Hengartner, 2000; Harada und Grant, 2003). Bei der Apoptose handelt es sich um einen aktiven, ATP-abhängigen regulierten biochemischen Prozess. Auf eine Reihe von exogenen und endogenen Stimuli stellt die Apoptose eine adäquate physiologische Antwort dar. Im Allgemeinen verfügt jede Zelle des menschlichen Körpers über die Möglichkeit, Apoptosesignalwege zu aktivieren und sich so aus dem Zellverband zu entfernen (altruistischer Zelltod).

In Krebszellen ist das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose entscheidend gestört und aufgrund von Defekten in den apoptotischen Signalwegen gelingt es den Tumorzellen, trotz vielfacher genetischer Veränderungen, zu überleben. Die Apoptosedefizienz ist also für das Tumorwachstum (Malignität) von grundlegender Bedeutung und spielt darüber hinaus bei der Vermittlung von Therapieresistenz gegenüber Zytostatika

sowie immuntherapeutischen Ansätzen eine wesentliche Rolle (Eberle et al, 2007; Fulda et al, 2010).

1.2.1. Nekrose im Vergleich zur Apoptose

Neben der Apoptose stellt die Nekrose einen weiteren Zelltodmechanismus dar. Im Gegensatz zur Apoptose führt die Nekrose zu allgemeinen Zellschäden, bei denen die Membranintegrität zerstört wird und es zum Anschwellen und schließlich zum Platzen der Zellen kommt (Abb. 3). Darüber hinaus ist die Nekrose im Gegensatz zur Apoptose kein energieabhängiger Prozess. Der nekrotische Zelltod kann nach mechanischen Verletzungen, Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie), sowie Bakterieninfektionen der Zelle auftreten (Leist und Jaattela, 2001). Obwohl die Nekrose als Unfalltod der Zelle beschrieben ist, weisen neuere Ergebnisse darauf hin, dass auch hier spezifische Signalwege beteiligt sind. Da es hierbei zu Überschneidungen mit den Apoptosesignalwegen kommt, kam es zu der Prägung des Begriffes Nekroptose (Degterev und Yuan, 2008; Vandenabeele et al, 2010).

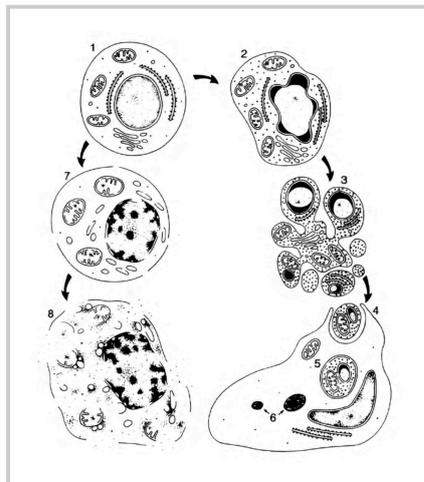


Abb. 3: Vergleich zwischen einer apoptotischen (rechts) und nekrotischen (links) Zelle. Im Zuge der Apoptose zeigen normale Zellen (1) eine Kondensation des Chromatins (2), ein Zellschrumpfen sowie eine Abschnürung von apoptotischen Körperchen (3) und letztendlich die Aufnahme durch Nachbarzellen (4). Im Vergleich dazu ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zellen, einem Aufbrechen der Zellmembran (7) und letztendlich einem Auslaufen der Zelle (8) und der Induktion von Inflammation gekennzeichnet (Kerr, 1995).

1.2.2. Signalwege der Apoptose

Proapoptotische Signalwege besitzen weitreichende Konsequenzen für das Schicksal der Einzelzellen und das betroffene Gewebe und sind daher mehrfach abgesichert und gegenreguliert. Abhängig vom proapoptotischen Reiz, der auf eine Zelle einwirkt, können unterschiedliche Signalwege aktiviert werden, die im Wesentlichen in zwei verschiedene Apoptosewege münden. Bei den Signalwegen der Apoptose unterscheidet man zwischen dem

extrinsischen Signalweg, der über Todesrezeptoren wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) oder CD95 (Cluster of Differentiation 95) verläuft und dem intrinsischen Signalweg, hauptsächlich induziert durch p53, bei dem Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Fulda und Debatin, 2006; Tait und Green, 2010). Der extrinsische und intrinsische Signalweg sind über das Bcl-2-Protein Bid (BH3-interacting domain death agonist) miteinander verbunden und können sich so gegenseitig beeinflussen (Youle und Strasser, 2008).

Beide Signalwege enden schließlich mit der Aktivierung von Proteasen, die ihrerseits eine Vielzahl von Todessubstraten spalten, was schließlich zum Absterben der Zelle führt (Fischer et al, 2003; Riedl und Shi, 2004) (Abb. 4).

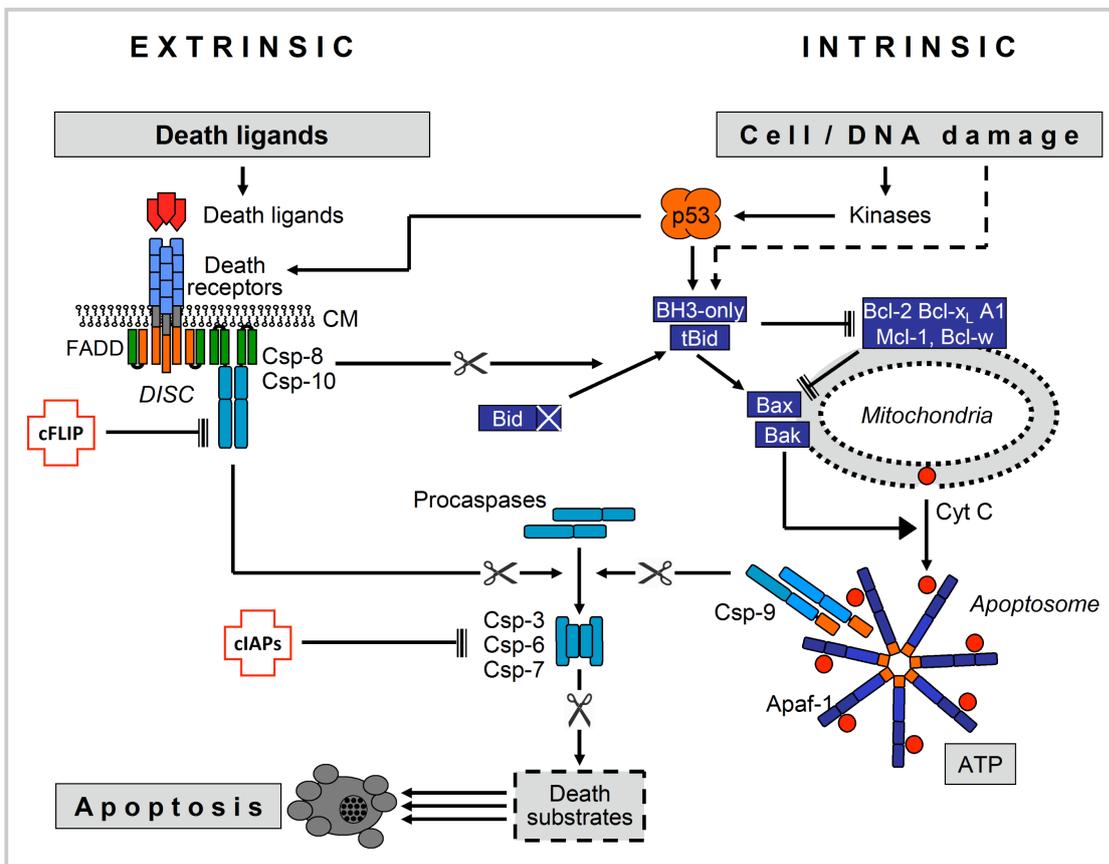


Abb. 4: Hauptsignalwege der Apoptose nach Eberle et al, 2008.

1.2.3. Der extrinsische (Todesrezeptor-kontrollierte) Apoptosesignalweg

Der extrinsische Apoptosesignalweg wird durch die Bindung von Todesliganden wie CD95L oder TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) an Todesrezeptoren an der Zelloberfläche induziert. Dabei wird jeder Todesrezeptor von seinem spezifischen Todesliganden gebunden. Das Apoptosesignal wird anschließend intrazellulär über eine sogenannte Todesdomäne auf Signalmoleküle übermittelt. Als erster Todesrezeptor wurde

CD95 identifiziert. Todesrezeptoren zählen zu einer Gruppe von Transmembranproteinen, die eine Unterfamilie innerhalb der TNF- α -Rezeptorfamilie bilden (Daniel et al, 2001). Durch die Bindung des CD95-Liganden (CD95L) an den CD95-Rezeptor kommt es zu einer Oligomerisierung der Rezeptoren und zu der Bildung des DISC-Signalkomplexes (Death Inducing Signaling Complex), wobei die Initiatorcaspasen 8 und 10 aktiviert werden (Krammer et al, 2007). Dies geschieht autokatalytisch durch die intrazelluläre Assoziation von Pro-Caspase 8 über ein Adapterprotein FADD (Fas-Associated Death Domain protein) mit CD95. Die aktivierte Caspase 8 kann entweder direkt zur Aktivierung der Effektorcaspase 3 führen (Typ I-Zellen, z. B. Lymphozyten) oder das Signal wird durch die Spaltung von Bid zu t-Bid an der Mitochondrienmembran amplifiziert (Typ II-Zellen, z. B. Melanozyten) (Li et al, 1998; Luo et al, 1998). Hierbei kann es zu einer Blockierung des extrinsischen Signalweges kommen. Dabei konkurriert das Protein FLIP (FLICE-Inhibitory Protein) unterhalb von CD95 mit der Initiatorcaspase 8 um Bindungsstellen am DISC und verhindert so die Aktivierung der Pro-Caspase 8 (Lamkanfi et al, 2007). Andere Proteine, wie die IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), können die Apoptose auch dann noch blockieren, wenn bereits die Ebene der Effektorcaspasen erreicht ist, indem diese selbst inaktiviert werden (Deveraux et al, 1999).

1.2.4. Der intrinsische (mitochondriale) Apoptosesignalweg

Bei dem intrinsischen Apoptosesignalweg sind die Mitochondrien von zentraler Bedeutung. Die Mitochondrien spielen also nicht nur für die Zelle als Energielieferant eine wichtige Rolle, sondern auch beim programmierten Zelltod. Der intrinsische Signalweg wird durch intrazelluläre Signale, wie Zell- oder DNA-Schäden, Behandlung mit Chemotherapeutika oder durch Interaktion mit dem Todesrezeptor-regulierten (extrinsischen) Signalweg aktiviert (Tait und Green, 2010). Dabei kommt es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation - MOMP) und zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$). Die Permeabilität der Mitochondrien und damit die Aktivierung des intrinsischen mitochondrialen Apoptosesignalweges werden durch die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert (Green und Kroemer, 2004). Im Verlauf der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran wird Cytochrom c in das Cytosol freigesetzt, das seinerseits an den monomeren apoptoseaktivierenden Faktor Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) bindet, der daraufhin oligomerisiert und zusammen mit der Caspase 9 zur Bildung des Apoptosoms führt. Im Zuge der Aktivierung der Initiatorcaspase 9 kommt es zur Aktivierung von Effektorcaspasen, wie Caspase 3, 6 und 7 (Riedl und Shi, 2004; Chipuk und Green, 2008). Die

Freisetzung von Cytochrom c gilt aufgrund der dafür notwendigen Porenbildung als irreversibler Schritt (Tait und Green, 2010).

Weitere proapoptotische Faktoren, die aus den Mitochondrien freigesetzt werden, wie Smac (Second Mitochondrial Activator of Caspases), beschleunigen die Caspase-abhängige Apoptose, indem sie die Aktivität der IAPs, physiologische Caspaseinhibitoren, blockieren. Andere Faktoren, wie Endonuklease G oder AIF (apoptosis inducing factor) katalysieren Caspase-unabhängig Apoptosevorgänge, indem sie in den Nucleus translozieren und dort die chromosomale DNA fragmentieren (Joza et al, 2001; Widlak und Garrard, 2005).

1.3. Caspasen in der Apoptose

Bei den Caspasen handelt es sich um eine Gruppe von Proteasen, die einen zentralen Bestandteil der Apoptoseregulation darstellen. Die Gruppe der Caspasen umfasst zur Zeit über 14 Mitglieder, die für verschiedene Signalwege von entscheidender Bedeutung sind. Caspasen sind Cystein-abhängige Aspartat-spaltende Proteasen, die als inaktive Zymogene synthetisiert werden und aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, sowie einer N-terminalen Prodomäne bestehen. Die Aktivierung der Caspasen erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen. Dabei wird zuerst die Prodomäne abgetrennt und anschließend die große Untereinheit von der kleinen abgespalten. Aktive Caspasen bilden jeweils ein Heterotetramer aus zwei identisch großen Untereinheiten von ca. 20 kDa und zwei identisch kleinen Untereinheiten von ca. 10 kDa (Riedl und Shi, 2004). Beim Menschen sind zur Zeit zwölf verschiedene Caspasen bekannt, die nach ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt werden (Tab. 1). Die erste Gruppe bilden die Effektorcaspasen, die zweite Gruppe die Initiatorcaspasen und die dritte Gruppe ist an Entzündungsprozessen beteiligt (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004).

Caspase 14 wird mit der Enddifferenzierung von Keratinozyten in Verbindung gebracht und besitzt damit eine Sonderstellung (Eckhart et al, 2000).

Tabelle 1: Funktion der Caspasen in humanen Zellen (Taylor et al, 2008).

Caspase	2, 8, 9, 10	3, 6, 7	1, 4, 5, 13	14
Funktion	Apoptose	Apoptose	Infammation	Keratinozyten-Differenzierung
	Initiatorcaspasen	Effektorcaspasen		

Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen 2, 8, 9 und 10. Sie besitzen eine große Pro-Domäne, die Aminosäuresequenzen für die Selbstassoziation und für die Bindung an aktivierende Adaptoren beinhalten (Stennicke und Salvesen, 2000) (Abb. 5). Die Pro-Caspase 9 bildet mit Apaf-1 und Cytochrom c das Apoptosom, Pro-Caspase 8 bindet mit FADD und CD95 am DISC und Pro-Caspase 2, die nach genotoxischem Stress durch p53 aktiviert werden kann, ist an die Adaptorproteine PIDD (p53 induced protein with death domain) und RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3homologous protein with Death Domain) gebunden (Tinel und Tschopp, 2004).

Zu den Effektorcaspasen gehören die Caspasen 3, 6 und 7. Sie besitzen eine kurze Pro-Domäne, die durch aktivierte Initiatorcaspasen abgespalten werden kann. Diese Abspaltung führt schließlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen. Nach der Spaltung kontrollieren die Effektorcaspasen eine Vielzahl von Todessubstraten, die die Apoptose initiieren (Degterev und Yuan, 2008) (Abb. 5). Ein gut beschriebenes Todessubstrat ist PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1). Bei dem Todessubstrat PARP handelt es sich um ein nukleäres Protein, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist und direkt über Caspase 3 gespalten und aktiviert werden kann (Vermeulen et al, 2005).

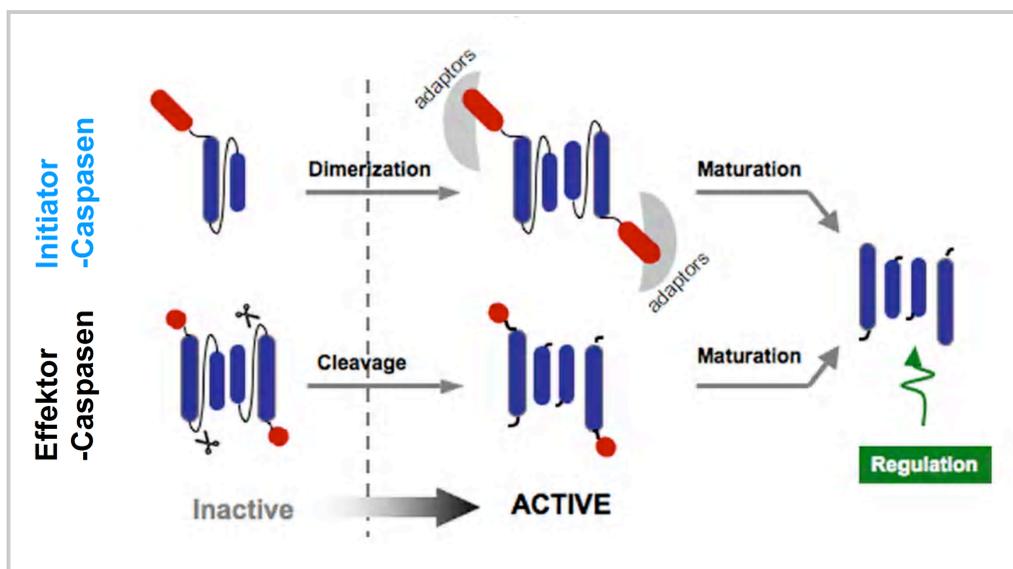


Abb. 5: Prozessierung von Initiator- und Effektorcaspasen (Pop und Salvesen, 2009).

Physiologische Inhibitoren der Caspasen können verschiedene Proteine sein, die die Aktivität der Caspasen durch Bindung an spezifische Peptid-Sequenzen hemmen. Von diesen IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) sind zur Zeit acht humane Mitglieder beschrieben: XIAP, NIAP, C-IAP1, C-IAP2, hILP-2, Survivin, Livin und BRUCE. Das gemeinsame Merkmal der IAPs ist die BIR-Domäne (Baculovirus IAP Repeat), mit der sie direkt an die aktiven Stellen der Caspasen binden und so deren enzymatische Aktivität inhibieren können (Wright und

Duckett, 2005). Die Mitglieder der IAP-Proteinfamilie werden mit verschiedenen Tumoren mit Chemoresistenz, Progression sowie einer verschlechterten Prognose assoziiert (LaCasse et al, 2008), was zu der Entwicklung von sogenannten Smac-Mimetika führte. Bei Smac-Mimetika handelt sich um Peptide, die dem physiologischen IAP-Inhibitor Smac nachempfunden sind. Der mögliche therapeutische Nutzen dieser Peptide wird zur Zeit in verschiedenen klinischen Studien evaluiert (Wright und Duckett, 2005; Jost et al, 2009; Gyrd-Hansen und Meier, 2010).

1.4. Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Regulation der Apoptose beruht auf der Wechselwirkung zwischen den pro- und antiapoptotischen Signalwegen und stellt eine Grundvoraussetzung für die Zell- und Gewebshomöostase dar (Eberle et al, 2007). Die Signalwege sind daher besonders abgesichert und reguliert. Die intrinsischen proapoptischen Signalwege greifen auf der Ebene der Mitochondrien an und werden zum Beispiel durch zelluläre Schäden oder verschiedene Chemotherapeutika aktiviert. Charakteristisch ist die Freisetzung von mitochondrialen Proteinen wie Cytochrom c, Smac und AIF ins Cytosol (Chipuk et al, 2010). Dieser Schritt wird in entscheidender Weise durch die Familie der Bcl-2-Proteine (B-cell lymphoma 2) reguliert. Die Apoptose-regulierende Genfamilie der Bcl-2-Proteine wurde nach ihrem ersten Mitglied Bcl-2 benannt (Tsujimoto et al, 1984). Nach der Erstbeschreibung von Bcl-2 konnten eine Reihe von Proteinen auf Grund von strukturell ähnlichen Bereichen, den sogenannten BH-Domänen (Bcl-2 Homology), sowie auf Grund ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert und klassifiziert werden (Chao und Korsmeyer, 1998). Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier konservierte BH-Domänen (BH1-BH4), über die eine Protein-Protein-Interaktion stattfinden kann (Chipuk et al, 2010). Die Familie der Bcl-2-Proteine untergliedert sich in antiapoptotische Bcl-2-Proteine, wie Bcl-2, Bcl-x_L (B cell lymphoma long form), Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) und in die Gruppe der proapoptotischen Multidomänen-Proteine, wie Bax und Bak, sowie in die große Gruppe der BH3-only Proteine, wie z. B. Bim, PUMA, Nbk, Bid, Bad, Noxa. Antiapoptotische Bcl-2-Proteine besitzen typischerweise die BH-Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4. Die proapoptotischen Multidomänen-Proteine Bax und Bak besitzen die BH1-, BH2- und BH3-Domänen, während die BH3-only Proteine nur die BH3-Domäne besitzen (Abb. 6).

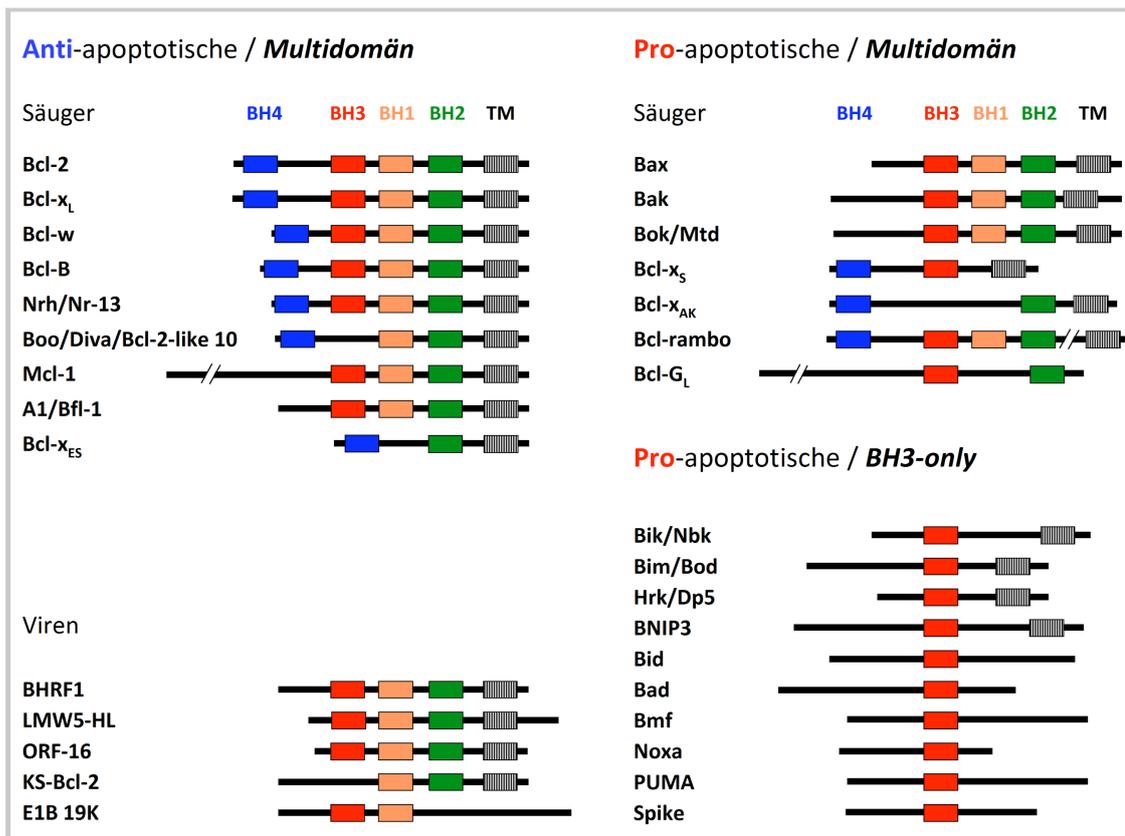


Abb. 6: Schematische Darstellung von anti- und proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie. Dargestellt sind die BH-Domänen (BH1-4) sowie die Transmembrandomäne (TM) (Eberle und Hossini, 2008).

Eine Interaktion von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen erfolgt über die Bindung der exponierten BH3-Domäne der proapoptotischen Bcl-2-Proteine an eine als hydrophobe Tasche bezeichnete Struktur, die sich aus einer Reihe von BH-Domänen (BH1-3) der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine formt, wobei die BH4-Domäne zu einer Stabilisierung dieser Wechselwirkung beitragen kann (Eberle und Hossini, 2008).

Die Bcl-2-Proteine befinden sich in räumlicher Nähe zur äußeren Mitochondrienmembran. Die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine tragen dabei zu einer Stabilisierung der Mitochondrienmembran bei, während die proapoptotischen Bcl-2-Proteine zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation – MOMP) und zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials beitragen (Kim et al, 2006). Die proapoptotischen Bcl-2-Proteine wie Bax und Bak bilden dabei durch Oligomerisierung und allosterische Konformationsänderungen Poren in der äußeren Mitochondrienmembran. Dabei unterliegt die Oligomerisierung von Bax oder Bak - durch die Interaktion (Heterodimerisierung) mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-x_L, Bcl-2 oder Mcl-1 - einer negativen Kontrolle (Green und Kroemer, 2004). Neben den Proteinen der Bcl-2-Familie können noch andere Proteine in die Regulation

der mitochondrialen Apoptose eingreifen. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die verschiedenen VDAC(Voltage-Dependent Anion Channel)-Isoformen. Es existieren insgesamt drei verschiedene Isoformen von dem Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC1, VDAC2 und VDAC3) mit jeweils unterschiedlichen Funktionen. Während VDAC1 und VDAC3 den Austausch von Metaboliten durch die mitochondriale Membran regulieren (Kroemer et al, 2007), gilt VDAC2 als Inhibitor des proapoptotischen Multidomänen-Bcl-2-Proteins Bak. VDAC2 wird damit eine antiapoptotische Funktion zugeschrieben, die der Aktivität der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1) ähnelt (Cheng et al, 2003). Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen, wie Cytochrom c, AIF (apoptosis inducing factor), Endonuklease G oder Smac (second mitochondrial activator of caspases) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Cytosol wird also in entscheidender Weise durch die Familie der Bcl-2-Proteine (B-Cell Lymphoma 2) reguliert (Chipuk und Green, 2008). Demzufolge ist der intrinsische, mitochondriale Apoptoseweg auch für Therapiestrategien sowie für die Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Signale von großer Bedeutung (Kelly und Strasser, 2011) (Abb. 7).

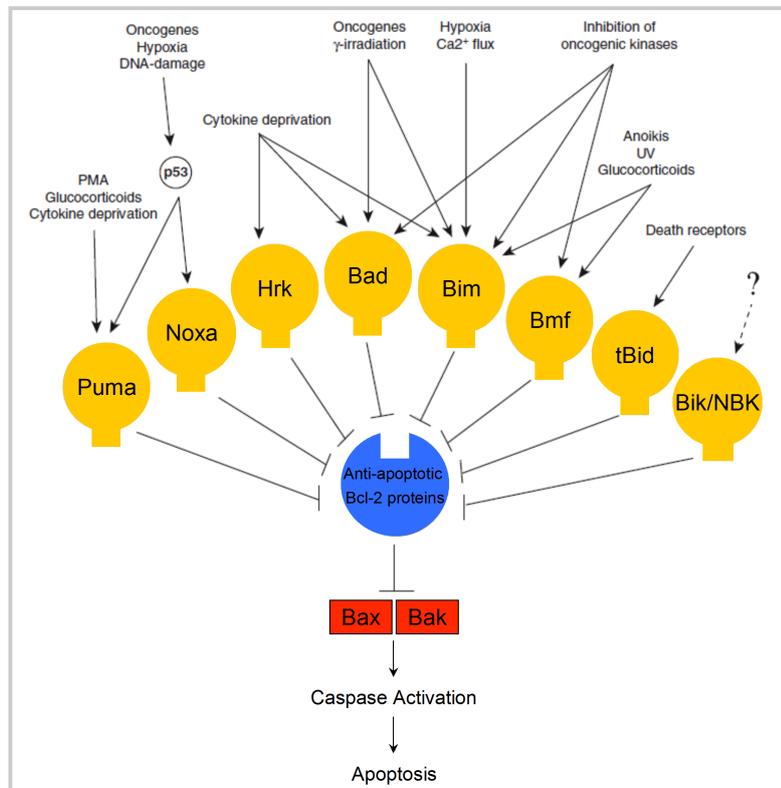


Abb. 7: Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch pro- und antiapoptotische Bcl-2-Proteine (verändert nach Kelly und Strasser, 2011).

1.4.1. Die BH3-only Proteine

Im Gegensatz zu den proapoptotischen Multidomänenproteinen, wie Bax und Bak, besitzen die proapoptotischen BH3-only Proteine (Bim, PUMA, Nbk, Bid, Bad, Noxa, Bmf, Hrk, BNIP3 und Spike) ausschließlich die BH3-Domäne. Die genauen Apoptose induzierenden Mechanismen der bisher identifizierten BH3-only Proteine sind noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass BH3-only Proteine selektiv auf einen bestimmten apoptotischen Reiz hin exprimiert bzw. aktiviert werden (Han et al, 2001). Die BH3-only Proteine Noxa und Puma werden nach DNA-Schäden und p53-Aktivierung transaktiviert. Beispiele für post-translationale Regulation von BH-only Proteinen sind z. B. die proteolytische Aktivierung von Bid nach Todesligand-Bindung durch Caspase 8 und die aktivierende Dephosphorylierung von Bad (Zha et al, 1996). Unabhängig von dem Weg ihrer Aktivierung verstärken BH3-only Proteine das proapoptotische Signal und leiten es an die Multidomänen-Bcl-2-Proteine weiter.

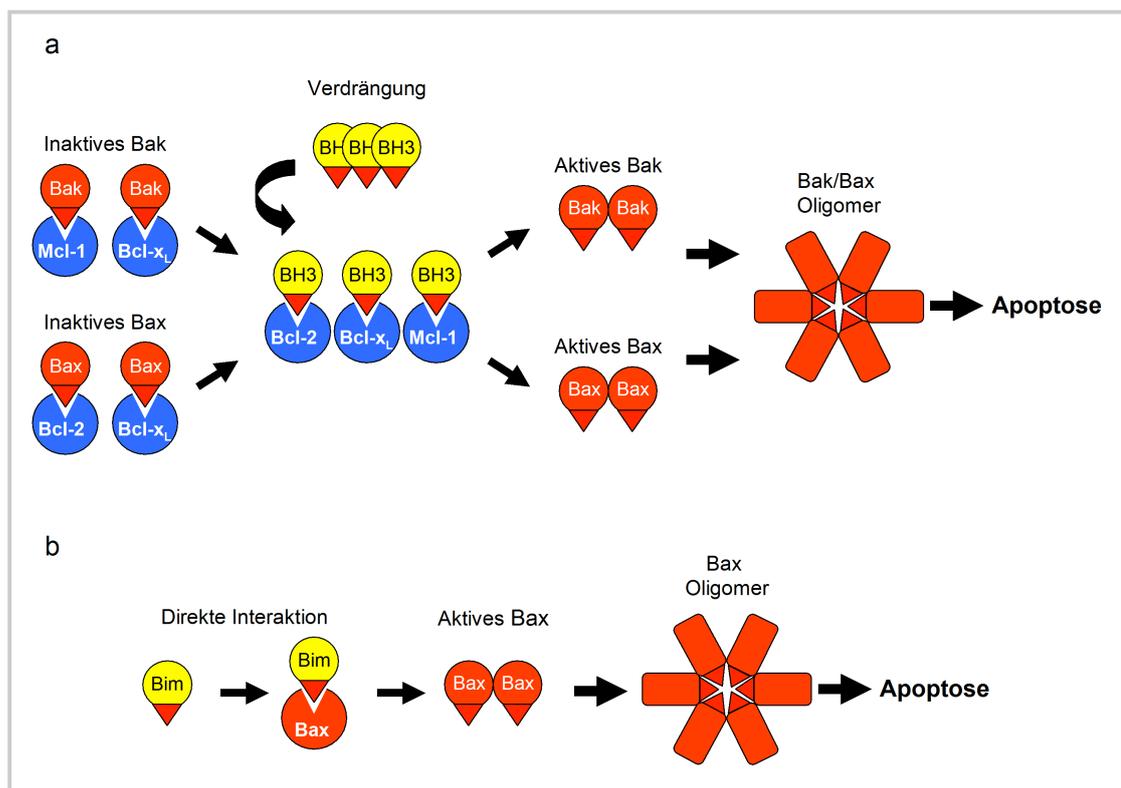


Abb. 8: Modelle zur Aktivierung von Bax und Bak. (a) Modell der indirekten Aktivierung, (b) Modell der direkten Aktivierung (verändert nach Adams und Cory, 2007).

Aufgrund ihrer Fähigkeit pro- und antiapoptotische Multidomänenproteine zu binden, werden BH3-only Proteine entweder als Aktivierer oder als Sensivierer unterschieden. Sensitivierende BH3-only Proteine können ausschließlich anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_L oder Mcl-1 an der äußeren Mitochondrienmembran binden und besetzen damit

potentielle Bindungsstellen für proapoptotische Multidomänen-Proteine, wie Bax oder Bak (Abb. 8). Bid und Bad können an Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w binden; Noxa bindet an Mcl-1 und A1 und Nbk an Bcl-x_L, Bcl-w, A1 und schwach an Bcl-2 (gestrichelt), während Bim und Puma an alle antiapoptotischen Proteine binden können (Adams und Cory, 2007) (Abb. 9). Diese Bindungen führen zu einer Inaktivierung der antiapoptotischen Wirkung und damit indirekt zu einer Aktivierung von Bax oder Bak und damit zur Apoptoseinduktion (Chipuk und Green, 2008) (Abb. 8). Darüber hinaus wird für die BH3-only Proteine ein direkter Einfluss auf die Oligomerisierung von Bax diskutiert. Dabei kommt es - unabhängig von der Bindung an die antiapoptotischen Proteine (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 und Mcl-1) - zu einer direkten Interaktion mit Bax, die schließlich zu einer Aktivierung von Bax führt (Abb. 8). Die direkte Interaktion wurde bisher für Bim und Puma beschrieben (Adams und Cory, 2007).

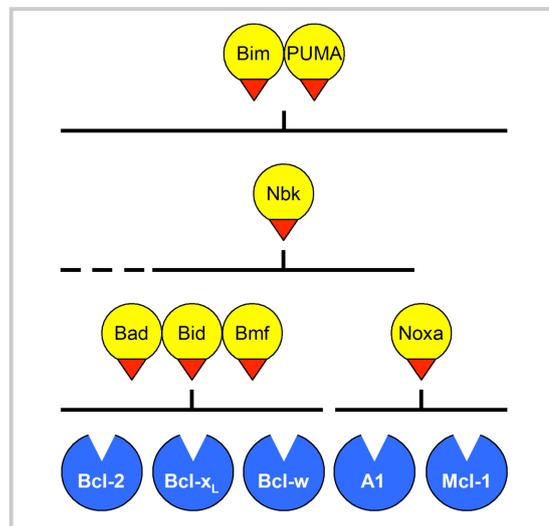


Abb. 9: Bindungseigenschaften der BH3-only Proteine (verändert nach Adams und Cory, 2007). Dargestellt sind die BH-3 only Proteine (gelb) mit den jeweiligen Bindungen zu den antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern (blau).

1.4.2. Die BH3-only Proteine Bim und Nbk

Bim ist ein BH3-only Protein und gehört zu der Familie der proapoptotischen Bcl-2-Proteine. Insgesamt leiten sich von dem *bim*-Gen bis zu zehn verschiedene Splicevarianten ab, von denen die drei wichtigsten die Spliceprodukte Bim_{EL}, Bim_L und Bim_S sind (O'Connor et al, 1998; Akgul et al, 2004). Von den drei Isoformen gilt die Bim_S-Form als besonders wirksam. Bim transloziert im Zuge der Aktivierung an die Mitochondrien, wo es mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagiert und sowohl eine Bax- als auch Bak-abhängige Apoptose induziert (Cheng et al, 2001; Adams und Cory, 2007; Chipuk und Green, 2008).

Mitglieder der MAP(Mitogen-Activated Protein)-Kinase-Familie wie JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und ERK (Extracellular-signal Regulated Kinasen) zeigen im Zuge der

Phosphorylierung des BH3-only Proteins Bim einen gegenläufigen Effekt. Im Verlauf der Aktivierung des Ras/RAF/ERK-Signalweges kommt es zu einer Phosphorylierung des humanen Bim_{EL} bei (Ser-59/69/77), das die Ubiquitinierung von Bim_{EL} und damit den anschließenden Abbau durch das Proteasom ermöglicht. Auf diese Weise fördert die Aktivierung des Ras/RAF/ERK-Signalweges das Zellüberleben (Ley et al, 2005). Im Gegensatz dazu scheint die Phosphorylierung der Threonin 112 durch JNK eine Steigerung des proapoptotischen Potentials von Bim_{EL} zu bedeuten (Lei und Davis, 2003). Des Weiteren wurde in Mausmodellen gezeigt, dass die Inaktivierung von nur einem Bim-Allel die Entstehung von Leukämien außerordentlich beschleunigt (Egle et al, 2004). Demzufolge verbinden neuere Studien Bim mit der Tumorgenese von verschiedenen Krebsarten.

Nbk ist ebenfalls ein BH3-only Protein und wird nach DNA-Schäden sowohl p53-abhängig (Mathai et al, 2002) als auch p53-unabhängig (Paquet et al, 2004) verstärkt exprimiert. Nbk wird unter physiologischen Bedingungen vor allem in epithelialen und hämatopoetischen Zellen exprimiert, was auf eine gewebespezifische Apoptoseaktivität des Proteins hinweist (Daniel et al, 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der proapoptotische Effekt von Nbk über eine indirekte Aktivierung von Bax vermittelt wird. Nbk bindet dabei nicht direkt an Bax, sondern hauptsächlich an das antiapoptotische Protein Bcl-x_L und vermittelt so eine indirekte Aktivierung von Bax. Die Apoptoseinduktion durch Nbk ist dabei ausschließlich von Bax abhängig (Gillissen et al, 2007). Durch die Überexpression von exogenem Nbk konnte auch in anderen Geweben Apoptose induziert werden. Eine dominante Funktion konnte für Nbk zusammen mit dem BH3-only Protein Bim in der Apoptosekontrolle der murinen Hodenentwicklung gezeigt werden. Während die Entwicklung sowohl bei Nbk- als auch bei Bim-Knockout-Mäusen normal verläuft, weisen Doppelknockout-Mäuse mit einer kombinierten Nbk- und Bim-Defizienz verkleinerte Hoden, eine stark reduzierte Anzahl von Spermatozyten sowie eine Infertilität auf (Coults et al, 2004). Des Weiteren führte die exogene Nbk-Überexpression zu einer Reduktion des Tumorwachstums von Melanomen in xenotransplantierten Nacktmäusen (Oppermann et al, 2005).

1.4.3. Apoptoseregulation durch Bcl-x

Vom *bcl-x*-Gen leiten sich durch alternative Prozessierung der mRNA (alternatives Splicing) mehrere Proteine mit unterschiedlicher Funktion ab. Das Gen besteht aus drei Exons, wobei der kodierende Bereich in Exon 2 und Exon 3 liegt, während Exon 1 einen nicht kodierenden Bereich darstellt, der von Exon 2 durch ein 283 Basenpaar langes Intron getrennt ist (Grillot et al, 1997). Aus dem Primärtranskript können zwei Spliceprodukte mit unterschiedlicher Funktion gebildet werden, die als Bcl-x_L (long form; antiapoptotisch) und als Bcl-x_S (short; proapoptotisch) beschrieben sind (Boise et al, 1993). Dabei kommen Bcl-x_L antiapoptotische und Bcl-x_S proapoptotische Funktionen zu. Als antiapoptotische Bcl-2-Proteine besitzt Bcl-x_L typischerweise die BH-Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4, während Bcl-x_S die BH-Domänen BH1 und BH2 verloren hat (Abb. 10).

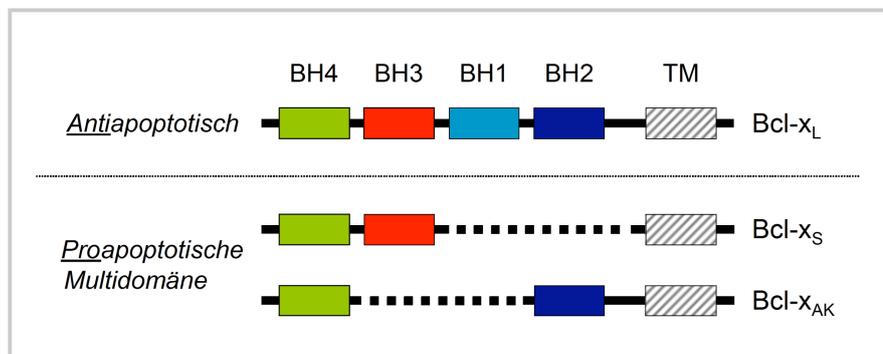


Abb. 10: Schematische Darstellung der Struktur von anti- und proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-x-Proteinfamilie (Eberle et al, 2008).

Es handelt sich also um ein ungewöhnliches proapoptotisches Multidomänen-Bcl-2-Protein mit den BH-Domänen BH3 und BH4. Durch eine Serie von Mutationen in den BH1- und BH2-Domänen von Bcl-x_L konnte gezeigt werden, dass diese Domänen für die Heterodimerisierung mit Bax benötigt werden und für die antiapoptotische Funktion von Bcl-x_L wichtig sind (Gavathiotis et al, 2008). Bcl-x_L ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, wo es durch Bindung an Cytochrom c dessen Freisetzung in das Cytosol und damit die Aktivierung von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) inhibiert. Somit verhindert es auch letztendlich die Aktivierung der Caspase 9 und der nachgeschalteten Caspasen (Willimott et al, 2011). Die Bcl-x_S-Expression wurde bisher vor allem in Geweben mit hohem Zellumsatz gefunden, wie zum Beispiel bei unreifen Thymozyten, während die Bcl-x_L-Expression dagegen hauptsächlich in langlebigen, postmitotischen Zellen - wie Gehirnzellen - nachgewiesen wurde (Boise et al, 1993; GonzalezGarcia et al, 1995). Darüber hinaus gelang unserer Arbeitsgruppe die Klonierung und Identifizierung eines neuen *bcl-x*-Spliceprodukts Bcl-x_{AK} (AK, alternative killer). Das Protein Bcl-x_{AK} zeichnet sich durch eine bisher

einzigartige Protein-Domänenstruktur aus. Im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen fehlt Bcl-x_{AK} eine funktionsfähige BH3-Domäne (Abb. 10). Bisherige Modelle zur Erklärung der proapoptotischen Aktivität von Bcl-2-Proteinen basieren im Wesentlichen auf dem Vorhandensein dieser BH3-Domäne. Da Bcl-x_{AK} aber zweifelsfrei sein proapoptotisches Potenzial in Melanomzellen nach Überexpression unter Beweis gestellt hat (Hossini et al., 2006), kann von einem neuen proapoptotischen Wirkungsmechanismus dieses Proteins ausgegangen werden.

1.5. Fragestellung

Das Verständnis der Apoptoseregulation in Tumorzellen ist bei aggressiven und therapieresistenten Tumoren wie dem malignen Melanom von besonderem Interesse. Das Melanom stellt aufgrund seiner hohen Mortalität eine sehr wichtige Tumorentität dar. Derzeit gibt es keine wirksame Therapie beim metastasierten malignen Melanom, daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze von hoher medizinischer Bedeutung. Beim Melanom stehen die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie im besonderen Fokus und stellen somit vielversprechende therapeutische Ansätze dar.

Da die Mechanismen der Apoptoseinduktion von Bcl-_{x_{AK}}, Bcl-_{x_S} und Bim_L in Melanomzellen noch unzureichend bekannt bzw. völlig unklar sind, sollten die Signalwege der Bcl-_{x_{AK}}-, Bcl-_{x_S}-, und Bim_L-induzierten Apoptose untersucht werden. Bcl-_{x_{AK}} und Bcl-_{x_S} werden zu der Gruppe der proapoptotischen Multidomänen-Bcl-2-Proteine gezählt. Typische Vertreter dieser Gruppe sind die proapoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak. Bcl-_{x_{AK}} zeichnet sich durch eine bisher einzigartige Protein-Domänenstruktur aus. Im Kontrast zu allen anderen bisher beschriebenen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen fehlt Bcl-_{x_{AK}} eine funktionsfähige BH3-Domäne. Im Gegensatz dazu umfasst Bcl-_{x_S} die Domänen BH3 und BH4, während die Domänen BH1 und BH2 fehlen. Im Vergleich zu Bcl-_{x_{AK}} und Bcl-_{x_S} ist Bim_L als Vertreter der BH3-only Proteine charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Bcl-_{x_{AK}}-, Bcl-_{x_S}- und Bim_L-Überexpression in einer repräsentativen Auswahl von Melanomzelllinien hinsichtlich der Effizienz der Apoptoseinduktion, Zeitkinetik, Zytotoxizität sowie Zellproliferation. Zur Klärung der Mechanismen soll die Caspasenkaskade, der mitochondriale Apoptosesignalweg und schließlich die Bindung an andere Bcl-2-Proteine mittels Interaktionsstudien untersucht werden. Für die Beurteilung der Effizienz der Apoptoseinduktion und die Identifizierung der involvierten Signalwege wurden adenovirale Vektoren verwendet, die die Expression von Bcl-_{x_{AK}}, Bcl-_{x_S} und Bim_L unter Tet-OFF-Bedingungen ermöglichen.

Das Projekt soll zum besseren Verständnis der proapoptotischen Effizienz von Bcl-_{x_{AK}}, Bcl-_{x_S} und Bim_L in Melanomzellen beitragen, um so mögliche Angriffspunkte des Melanoms definieren zu können. Schließlich ist das Ziel dieser Arbeit, eine Grundlage zur möglichen therapeutischen Nutzung von Bcl-2-Proteinen beim Melanom zu legen. Diese könnte sich auf proapoptotische BH3-Mimetika stützen, wie sie als klinisch einsetzbare kleine Moleküle in den letzten Jahren zur Apoptoseinduktion in Tumorzellen entwickelt wurden.

2. Ergebnisse

2.1. Untersuchung der Apoptoseinduktion auf der Basis eines neuen proapoptotischen Bcl-2-Proteins, Bcl-x_{AK}

2.1.1. Verspätete, aber effiziente Apoptoseinduktion durch Bcl-x_{AK}

Für die Untersuchung der Effizienz und des Mechanismus der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptose wurde Bcl-x_{AK} in einen adenoviralen Vektor unter Kontrolle eines durch Tetracyclin regulierbaren Promotors (Tet-OFF) in die adenovirale E1-Region kloniert. Der Tetracyclin/Doxycyclin reprimierbare Transaktivator tTA befindet sich in der adenoviralen E3-Region (Abb. 11a). Das verwendete Konstrukt ermöglichte eine regulierbare Expression von Bcl-x_{AK}, welche auf dem Tet-OFF-System beruht. Die Bcl-x_{AK}-Transkription wurde in Anwesenheit von Doxycyclin unterdrückt und in Abwesenheit von Doxycyclin aktiviert (Abb. 11a). In den folgenden Abschnitten der Arbeit wird die Anwesenheit von Doxycyclin in den Versuchsbedingungen als OFF-Bedingung und die Abwesenheit von Doxycyclin, wenn die Transkription von Bcl-x_{AK} erfolgt, als ON-Bedingung bezeichnet. Die induzierbare Proteinexpression von Bcl-x_{AK} nach adenoviraler Expression und Induktion wurde in den Melanomzelllinien SK-Mel-13, A-375 und Mel-2a gezeigt (Abb. 11b). Eine Quantifizierung der apoptotischen, hypodiploiden Zellen (Sub-G1-Zellpopulationen) erfolgte mittels einer durchflusszytometrischen Analyse von Propidiumjodid (PI) gefärbten Zellkernen (Nicoletti-Assay). Eine signifikante Induktion der Apoptose durch Bcl-x_{AK}, bestimmt durch das Zählen der hypodiploiden Sub-G1-Zellen, wurde in den Melanomzelllinien SK-Mel-13, A-375 und Mel-2a nach Transduktion und Promotoraktivierung sichtbar (Abb. 11d, Beispiele sind unter 11c gezeigt, linkes Element). Eine zeitkinetische Analyse zeigte eine verspätete Induktion der Apoptose in drei Melanomzelllinien, welche sich 48 h nach Transduktion auf 12% - 23% und nach 72 h auf 17% - 37% steigern ließ (Abb. 11d).

Im Vergleich dazu induzieren andere proapoptotische Bcl-2-Proteine die Apoptose bereits nach 24 h, wie hier für das BH3-only Protein Bik/Nbk gezeigt werden konnte (Abb. 11g). Hierbei besitzt das adenovirale Konstrukt AdV-Nbk denselben adenoviralen Hintergrund wie Bcl-x_{AK}. Die Induktion der Apoptose durch Bcl-x_{AK} trat demnach verspätet auf, da die adenoviral vermittelte Überexpression bereits 6 h nach Transduktion sichtbar wurde (Abb. 11h). Parallel zu der DNA-Fragmentierung konnten klare Effekte der Apoptose festgestellt werden, wie eine reduzierte Zellzahl oder abgerundete und abgelöste Zellen (Abb. 11c, mittleres Element).

Typische Merkmale der Apoptose sind die Chromatinkondensation und die nukleäre Fragmentierung bzw. Schrumpfung. Diese konnten durch die Färbung mit Bisbenzimid, einem Farbstoff, der in die chromosomale DNA von Zellen interkaliert und diese anfärbt, dargestellt werden (Abb. 11c, rechtes Element). Die Bisbenzimid-Färbung ergab 48 h nach Transduktion mit Bcl-x_{AK} einen Anstieg der apoptotischen Zellen von 4% (OFF) auf 33% (ON). Die Zytotoxizität wurde durch die Bestimmung der LDH-Freisetzung in das Cytoplasma parallel zu der Apoptoseuntersuchung photometrisch bestimmt. Generell konnte nur eine geringe Zytotoxizität durch Bcl-x_{AK} nachgewiesen werden, die zu späteren Zeitpunkten etwas anstieg, was als sekundäres Ereignis zu werten ist (Abb. 11e).

Die Bestimmung der Zellproliferation mittels WST-1-Untersuchung ergab einen starken Abfall der Zellproliferation (40 - 60%) in den Melanomzelllinien SK-Mel-13, A-375 und Mel-2a (Abb. 11f). Auch die Zellviabilität, die durch eine Calcein-Färbung bestimmt wurde, war unter ON-Bedingungen vermindert. In Mel-2a betrug sie nach 72 h unter ON-Bedingungen ca. 38%, verglichen zu 6% unter OFF-Bedingungen (Abb. 11i, 11j). Auf diese Art und Weise vermittelt Bcl-x_{AK} zwar eine verspätete, aber effiziente Apoptoseinduktion in Melanomzellen.

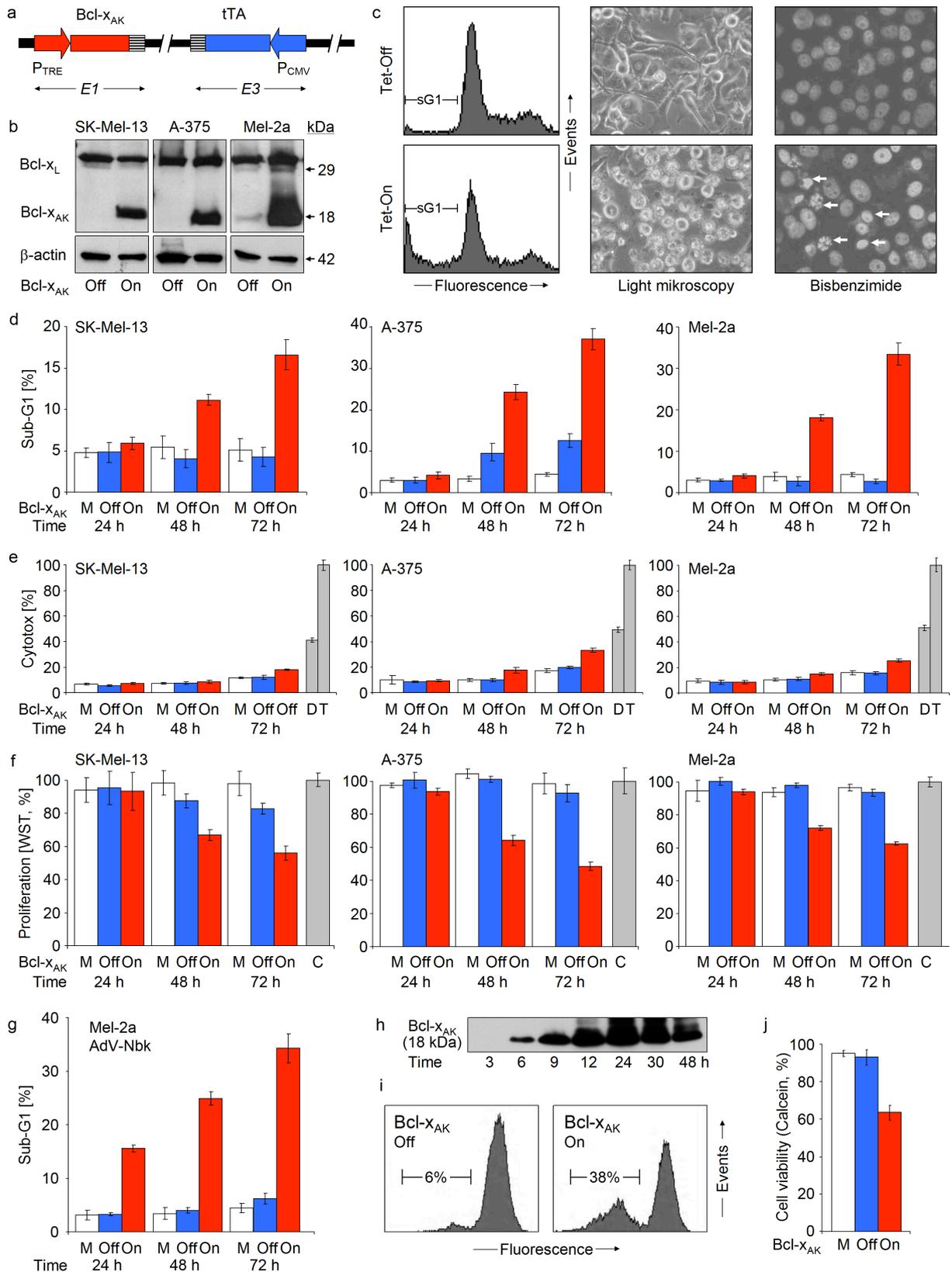


Abb. 11: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 11: **Effiziente Zelltod-Induktion durch Bcl-x_{AK}**. (a) Aufbau des nicht replikationskompetenten adenoviralen Konstrukts, AdV-AK. Die adenovirale E1-Region wurde durch die Bcl-x_{AK} cDNA, die unter der Kontrolle eines Tetracyclin-zugänglichen Promotors (P_{TRE}) steht, ausgetauscht. In die E3-Region von AdV-AK war der Tetracyclin-kontrollierte Transkriptivator (tTA) unter der Kontrolle eines CMV Promotors (P_{CMV}) integriert. Das tTA vermittelt die Tet-OFF-Regulation. Die gestreiften Boxen kennzeichnen die poly(A) Regionen. (b) Die Bcl-x_{AK}-Expression wurde mittels Western Blot Analyse überprüft und ist für die Melanomzelllinien SK-Mel-13, A-375 und Mel-2a nach Transduktion mit AdV-AK (MOI = 50) gezeigt. Die Zellen hatten entweder Doxycyclin erhalten (OFF-Bedingungen) oder wurden ohne gehalten (ON-Bedingungen). Die Analyse für β -Aktin zeigte eine gleichmäßige Protein-Ladung (40 μ g/Bahn). (c) Links, Beispiele einer Zellzyklusanalyse nach PI-Färbung zeigen die apoptotischen Zellen (sub-G1-Fraktion) für Mel-2a 48 h nach Transduktion. Mitte, abgelöste und abgerundete Zellen zeigen Apoptose für Mel-2a 48 h nach Transduktion mit AdV-AK unter OFF- und ON-Bedingungen an. Rechts, mit einer Bisbenzimid-Färbung (DAPI) wurden Chromatinkondensation und nukleäre Fragmentierung in Mel-2a (48 h) nach AdV-AK Transduktion (MOI = 50) dargestellt. (d-f) Zeitkinetische Untersuchungen der Apoptoseinduktion (d, Durchflusszytometrie nach PI-Färbung), der Zytotoxizität (e, LDH-Freisetzung) und der Zellproliferation (f, WST-1 Untersuchung) sind für SK-Mel-13, A-375 und Mel-2a Zellen zu 24 h, 48 h und 72 h nach Transduktion mit AdV-AK (50 MOI, +Dox = OFF, -Dox = ON) gezeigt. Als Positivkontrolle für die induzierte Zytotoxizität wurden die Zelllinien mit Triton X-100 (T = 100%) komplett lysiert oder mit Doxorubicin (D, 500 nM, 72 h) behandelt. Für die Darstellung der relativen Zellvitalität wurden die AdV-AK transduzierten Zellen auf die unbehandelten Kontrollen (C = 100%) normalisiert. (g) Für den Vergleich ist die Apoptoseinduktion (sub-G1) in Mel-2a Zellen mit AdV-Nbk zu 24 h, 48 h und 72 h (MOI = 50) gezeigt. AdV-Nbk wurde nach dem gleichen Prinzip wie AdV-AK konstruiert. Für die Induktion wurde Doxycyclin weggelassen (ON). (h) Eine Zeitkinetik-Analyse der Bcl-x_{AK}-Expression (3 - 48 h) nach AdV-AK Transduktion und Promotorinduktion ist für Mel-2a durch eine Western Blot Analyse bestimmt worden. (i) Die Überlebensrate von Zellen wurde mit einer Calcein-Färbung in Mel-2a Zellen 48 h nach Bcl-x_{AK}-Induktion bestimmt. Eine Verlagerung nach links zeigt Calcein-negative (= nicht lebensfähige) Zellen an. (j) Quantifizierung des Calcein-Experimentes. (d, e, f, g, j) Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment, das aus Dreifachwerten bestand, sind gezeigt. Ein Luciferase-kodierendes Adenovirus (Ad5-CMV-Luc) wurde als Kontrolle für die adenovirale Transduktion (Mock-Kontrolle = M) mit der gleichen MOI (MOI = 50) eingesetzt. Alle Experimente wurden mindestens zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

2.1.2. Aktivierung der Caspasen und der Mitochondrien durch AdV-AK

Ziel war es die Caspasenkaskade in Mel-2a mittels Western Blot Analyse sowohl für die Initiatorcaspasen 8 und 9 als auch für die Haupteffektorcaspase 3 zu untersuchen. Unter adenoviral vermittelter Expression von Bcl-x_{AK} und starker Apoptoseinduktion wurde eine signifikante Prozessierung der Caspasen 48 h nach Transduktion sichtbar (Abb. 12a). Um die besondere Rolle der Caspasen in der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptoseinduktion zu unterstreichen, wurde ein Pancaspasen-Inhibitor (zVAD-fmk) eingesetzt, der an ein allgemeines, funktionelles Motiv aller Caspasen bindet. Durch den Einsatz von zVAD-fmk (10 μ M) konnte die Bcl-x_{AK}-induzierte Apoptose annähernd komplett blockiert werden (Abb. 12b). Der Effekt auf den mitochondrialen proapoptotischen Signalweg wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen mitochondrialen Membranpotential($\Delta\psi$ m)-abhängigen Farbstoffen untersucht. Beide, JC-1 und TMRM⁺, zeigten das gleiche Ergebnis, nämlich eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi$ m nach Bcl-x_{AK}-Expression. Interessanterweise trat der Verlust von $\Delta\psi$ m schon 24 h nach AdV-AK-Transduktion auf, also bevor sich die Apoptose manifestierte (Abb. 12c). Dies zeigte, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi$ m ein frühes Ereignis in der Bcl-x_{AK}-induzierten Apoptose ist. Das Freiwerden von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species – ROS) wird als ein zusätzlicher Schritt in der Apoptoseregulation angesehen. Ansteigende ROS-Level wurden mittels Durchflusszytometrie nach H₂DCFDA-Färbung in Mel-2a 24 h nach Transduktion ermittelt und liefen parallel zu der Apoptoseinduktion (Abb. 13a).

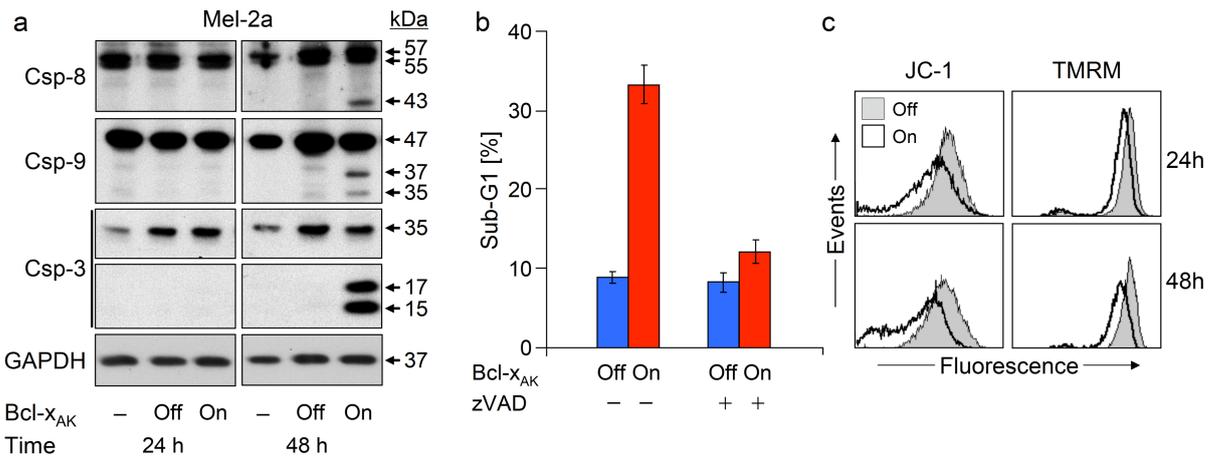


Abb. 12: **Aktivierung der Caspasen und Mitochondrien.** (a) Spaltung der Caspase 3, 8 und 9 ist für Mel-2a zu 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-AK (MOI = 50) gezeigt. Die Expression von Bcl-x_{AK} wurde in der Abwesenheit von Doxycyclin (ON) angeschaltet oder in der Anwesenheit von Doxycyclin (OFF) abgeschaltet. Die Analyse für GAPDH zeigte eine gleichmäßige Protein-Ladung (20 µg/Bahn). Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse. (b) Inhibition der Apoptose durch Vorinkubation mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk (1h, 10 µM). SK-Mel-13 Zellen wurden mit AdV-AK (MOI = 100, 48 h) transduziert. Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment (eins von zwei), das aus Dreifachwerten bestand, sind gezeigt. (c) Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) ist für Mel-2a 48 h nach Transduktion mit AdV-AK gezeigt und wurde mittels Durchflusszytometrie nach JC-1 oder TMRM+ Färbung bestimmt. Zellen mit Doxycyclin (OFF, grau) wurden mit Zellen verglichen, die ohne Doxycyclin (ON, offener Graph) kultiviert wurden. Das Experiment wurde dreimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Die Neutralisation von ROS durch N-Acetylcystein (NAC) (Abb. 13a) resultierte in einer zweifachen Abnahme der Bcl-x_{AK}-induzierten Apoptose (Abb. 13b). Trotz der eindeutigen Hinweise auf eine klare Involvement des mitochondrialen Signalweges blieben die Level der Bcl-2-Proteine nach Transduktion mit Bcl-x_{AK} stabil. Dies wurde mittels Western Blot Analyse nach 24 h und 48 h für Bcl-2, Mcl-1, Bax, Puma und Noxa gezeigt (Abb. 13c). Ähnlich verhielt es sich mit p53 und Survivin, die keine signifikanten Veränderungen der Expression zeigten (Abb. 13c).

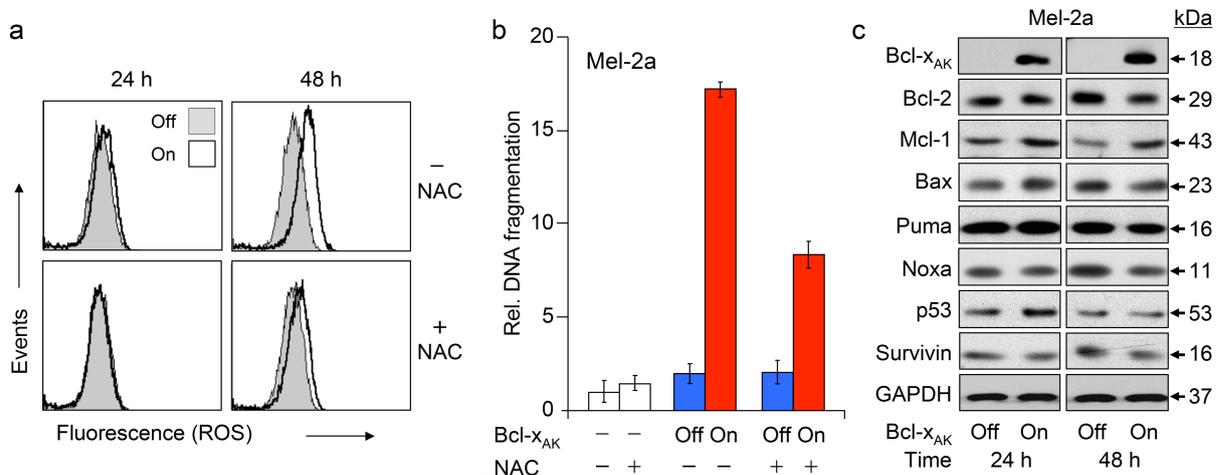


Abb. 13: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 13: **Neutralisation von ROS durch N-Acetylcystein** (a) Die ROS Level wurden in Mel-2a zu 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-AK unter ON- und OFF-Bedingungen (Duchflusszytometrie nach H₂DCFDA-Färbung) bestimmt. Die Kulturen wurden für 1 h mit 200 µM NAC vorbehandelt und anschließend transduziert. (b) Die relative DNA-Fragmentierung (Apoptose) wurde 48 h nach Kultivierung mit oder ohne NAC bestimmt. Nicht transduzierte Zellen (-/+ NAC) sind als zusätzliche Kontrollen gezeigt (offene Balken). Alle Werte sind auf die unbehandelte Kontrolle bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment (zwei unabhängige Experimente), das aus Dreifachwerten bestand, sind gezeigt. (c) Die Expressionslevel der Bcl-2-Proteine p53 und Survivin wurden mittels Western Blot Analyse in Mel-2a Zellen 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-AK (ON- und OFF-Bedingungen) analysiert. Eine gleichmäßige Protein-Ladung (20 µg/Bahn) wurde mit GAPDH bestätigt.

2.1.3. Abhängigkeit von Bax und Bak

Um die Bax/Bak-Abhängigkeit der Bcl-x_{AK}-induzierten Apoptose im Zusammenhang mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg untersuchen zu können, wurden HCT116 Kolonkarzinomzellen (Bax⁺/Bak⁺) und Subzelllinien mit einem Bax-Knockout oder Bak-Knockdown als auch Doppelknockdown-Zellen Bax⁻/Bak⁻ eingesetzt (Abb. 14a).

AdV-AK (50 MOI, 48 h) zeigte eine starke Apoptoseinduktion in den HCT116 Wildtypzellen, während der Einzelknockout für Bax bzw. der Knockdown für Bak zu einer signifikanten Verminderung der Apoptose führten. Dies zeigte, dass beide Proteine an der Apoptoseinduktion beteiligt waren. Dementsprechend wurde die Bcl-x_{AK}-induzierte Apoptose in den Bax⁻/Bak⁻ -Doppelknockdown-Zellen komplett aufgehoben (Abb. 14b).

In einem komplementären Versuchsansatz wurde eine humane Prostatakarzinomzelllinie (DU145) verwendet, welche aufgrund einer Mutation im Leserahmen des Bax-Gens defizient für Bax ist und nur eine moderate Aktivität von Bak aufweist.

Es standen neben den parentalen Zellen (DU145 Bax⁻/EGFP-Bak⁻) verschiedene stabile Transfektanten wie die DU145 Bax⁻/EGFP-Bak⁺ und die DU145 EGFP-Bax⁺/EGFP-Bak⁻ zur Verfügung (Abb. 14c). Die parentalen Zellen reagierten eindeutig nicht auf AdV-AK, was möglicherweise auf ein nicht funktionsfähiges endogenes Bak hinweist. Allerdings führte die Rekonstitution von Bax oder Bak zu einer nachhaltigen Verstärkung der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptose, was sich in beiden Fällen in über 50% apoptischen Zellen niederschlägt. Dies zeigte nochmals, dass Bcl-x_{AK} sowohl durch Bax als auch durch Bak Apoptose induzieren kann (Abb. 14d).

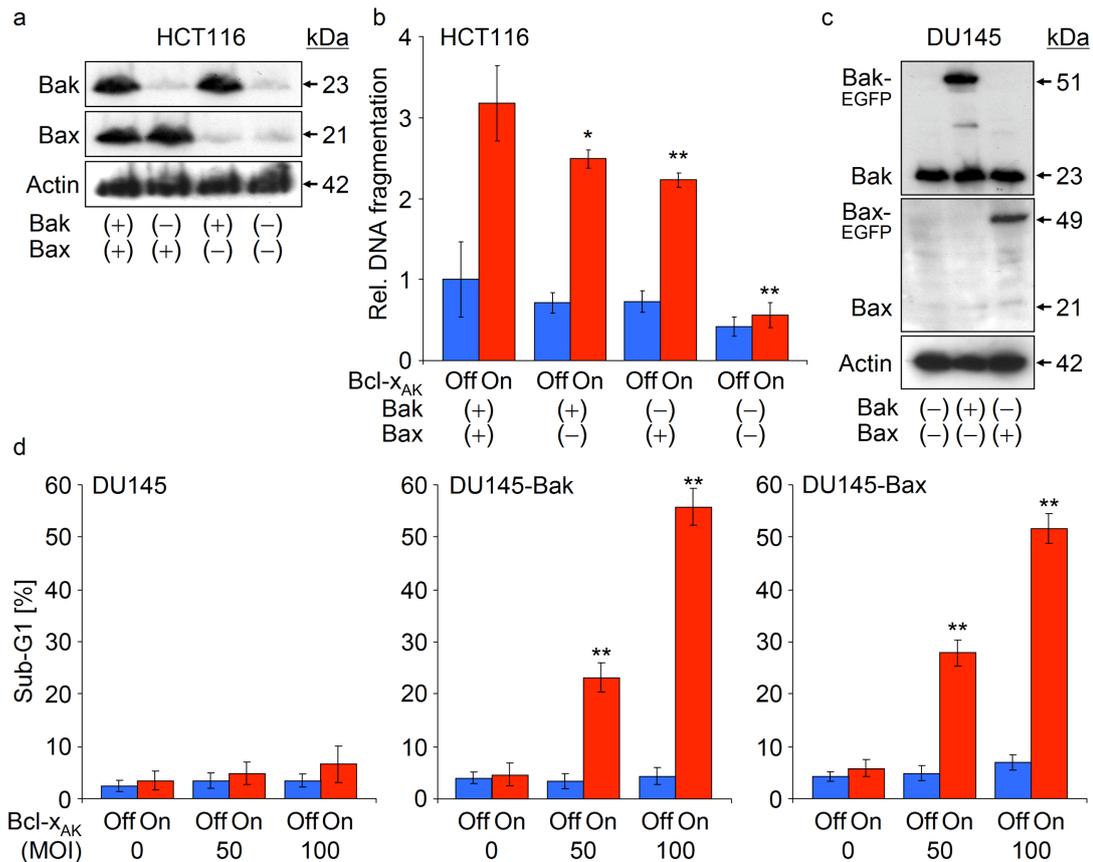


Abb. 14: **Bax/Bak-Abhängigkeit der Bcl-x_{AK}-induzierten Apoptose** (a, c) Die Expression von Bax und Bak ist durch eine Western Blot Analyse in Subklonen von HCT116 und DU145 gezeigt. Eine gleichmäßige Protein-Ladung (20 µg/Bahn) wurde nach Inkubation mit β-Aktin bestätigt. Proteinextrakte aus zwei unabhängigen Serien lieferten vergleichbare Expressionen. (b) HCT116 Parentalzellen (Bax⁺/Bak⁺) als auch HCT116 Subklone (Bax⁻/Bak⁺), (Bax⁺/Bak⁻) und (Bax⁻/Bak⁻) wurden mit AdV-AK (MOI = 50) transduziert und unter OFF- oder ON- Bedingungen kultiviert. Werte der relativen DNA-Fragmentierung (Apoptose ELISA) wurden auf die Parentalzellen normalisiert (gleich 1 gesetzt), die unter OFF-Bedingungen gehalten wurden. (d) DU145 Parentalzellen (Bax⁻/EGFP-Bak⁻) als auch DU145 Subklone (Bax⁻/EGFP-Bak⁺) und (EGFP-Bax⁺/EGFP-Bak⁻) wurden mit AdV-AK (MOI = 50, 100) transduziert und unter OFF- oder ON-Bedingungen kultiviert. Der Anteil apoptotischer Zellen (sub-G1-Population) ist gezeigt und wurde mittels Durchflusszytometrie 48 h nach Transduktion bestimmt. (b, d) Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment, das aus Dreifachwerten bestand, sind gezeigt (zwei unabhängige Experimente). Die statistische Signifikanz wurde mittels Student-t-Verteilung berechnet und bei einem p-Wert von < 0,05 mit [*] und bei p < 0,005 mit [**] gekennzeichnet.

Die DU145 Zellen, die stabil EGFP-Bax bzw. EGFP-Bak exprimieren, ermöglichen zusätzlich den mikroskopischen Nachweis der Oligomerisierung (Clusterbildung) von Bax bzw. Bak, die - wie berichtet - im Zusammenhang mit der proapoptotischen Funktion von Bax und Bak steht (Youle und Karbowski, 2005). In Übereinstimmung mit der Funktion von Bax und Bak resultierte die Expression von Bcl-x_{AK} für EGFP-Bax und EGFP-Bak 48 h nach Transduktion in der sichtbaren Bildung von Clustern. Die Induktion der Cluster durch Bcl-x_{AK} wurde mit dem Effekt von Doxorubizin (2 µM, 24 h) verglichen, welches als Positivkontrolle diente (Abb. 15a). Die Evaluation zeigte Cluster für Bax und Bak in 20% - 30% der Zellen, was mit der Apoptoseinduktion unter diesen Bedingungen vergleichbar war (Abb. 15b).

Im Verlauf der Bax- und Bak-Aktivierung führen Konformationsänderungen zu einer Freilegung des N-terminalen Bereichs. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit N-terminal-spezifischen Antikörpern (Bax-NT, Bak-NT) zeigten als Reaktion auf die Bcl-x_{AK}-Expression eine Aktivierung von Bax und Bak in 30% der Mel-2a Zellen (Abb. 15c, 15d).

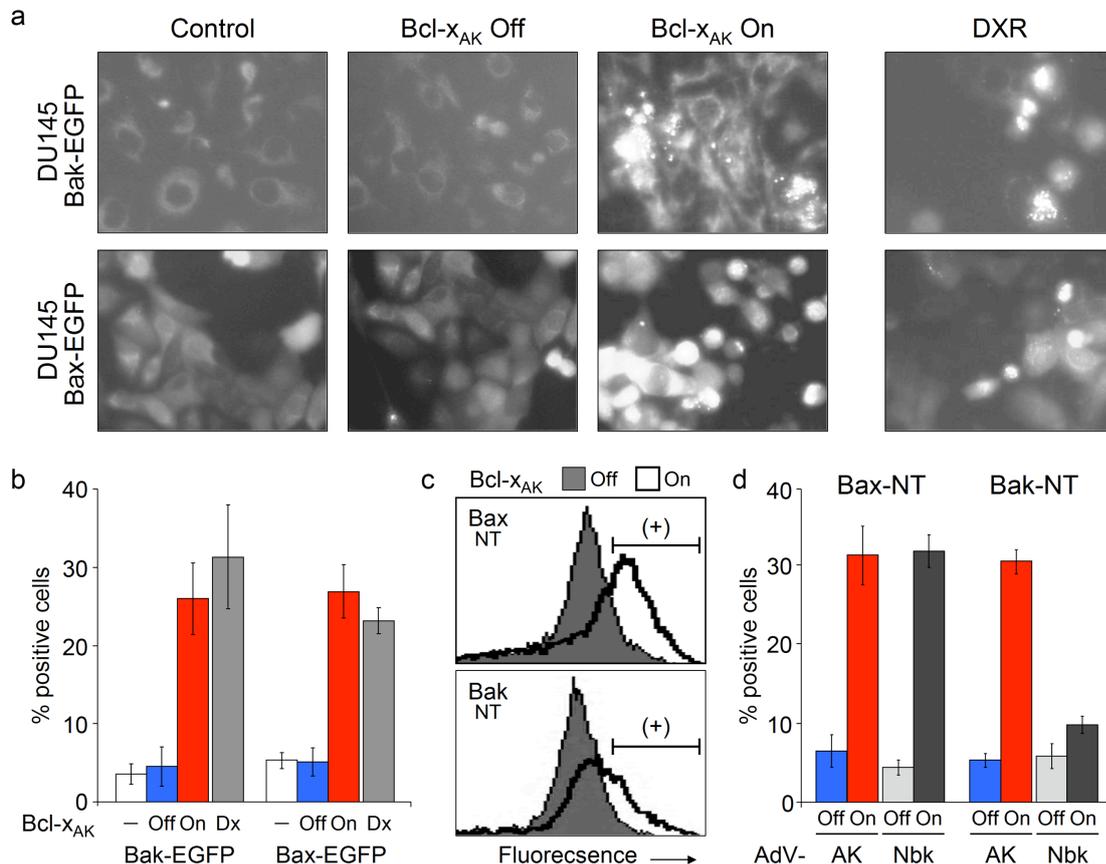


Abb. 15: **Bax- und Bak-Aktivierung nach Bcl-x_{AK}-Überexpression.** (a) Für die Untersuchung des Bax- und Bak-Clustering wurden stabil transfizierte DU145 Zellen mit EGFP-Bax oder EGFP-Bak mit AdV-AK transduziert und unter OFF- und ON-Bedingungen für 48 h kultiviert. Doxorubizin behandelte Zellen (2 μ M, 24 h) wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Beispielbilder der Fluoreszenzmikroskopie sind 48 h nach Transduktion und Promotorinduktion dargestellt. (b) Gezeigt ist die quantitative Evaluation des Bax- und Bak-Clustering (Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment, das aus Dreifachwerten bestand). Ein zweites Experiment lieferte vergleichbare Ergebnisse. (c) Die Bax- und Bak-Aktivierung nach Bcl-x_{AK}-Expression wurde 48 h nach AdV-AK-Transduktion (50 MOI) mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit einem konformationsspezifischen Antikörper gegen die N-Termini von Bax und Bak (Bax/Bak NT) in Mel-2a bestimmt. (d) Die Balkengrafik zeigt die positiv gezählten Zellen für aktiviertes Bax bzw. Bak an. Die quantitative Auswertung eines repräsentativen Experimentes (ein Experiment von zweien), das aus Dreifachwerten bestand, ist gezeigt. Die Transduktion mit AdV-Nbk (50 MOI) ist zum Vergleich gezeigt.

2.1.4. Blockierung der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptose durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine

Die mit dem Bcl-2-Expressionsplasmid stabil transfizierten A-375 Melanomzellen (A375-Bcl-2) wurden eingesetzt, um die Rolle des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins in der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptose zu untersuchen. Diese Zellen waren komplett gegen den proapoptotischen Effekt von Bcl-x_{AK} geschützt, während Mock-transfizierte Zellen (A375-Mock) über 30% apoptotische Zellen 48 h nach Transduktion mit AdV-AK hervorbrachten (Abb. 16a). Ein ähnliches Resultat wurde durch die Überexpression des antiapoptotischen Bcl-

x_L -Proteins erzielt. Die transiente Transfektion mit dem Bcl- x_{AK} -Expressionsplasmid führte nach 48 h zu einer signifikanten Verstärkung der Apoptose in SK-Mel-13 Melanomzellen, während die Kotransfektion mit einem Bcl- x_L -Expressionsplasmid die Bcl- x_{AK} -induzierte Apoptose annähernd komplett blockierte (Abb. 16b). Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ wurde 48 h nach Transduktion mit AdV-AK in A-375 Zellen sichtbar und konnte durch die Bcl-2-Überexpression komplett verhindert werden (Abb. 16c).

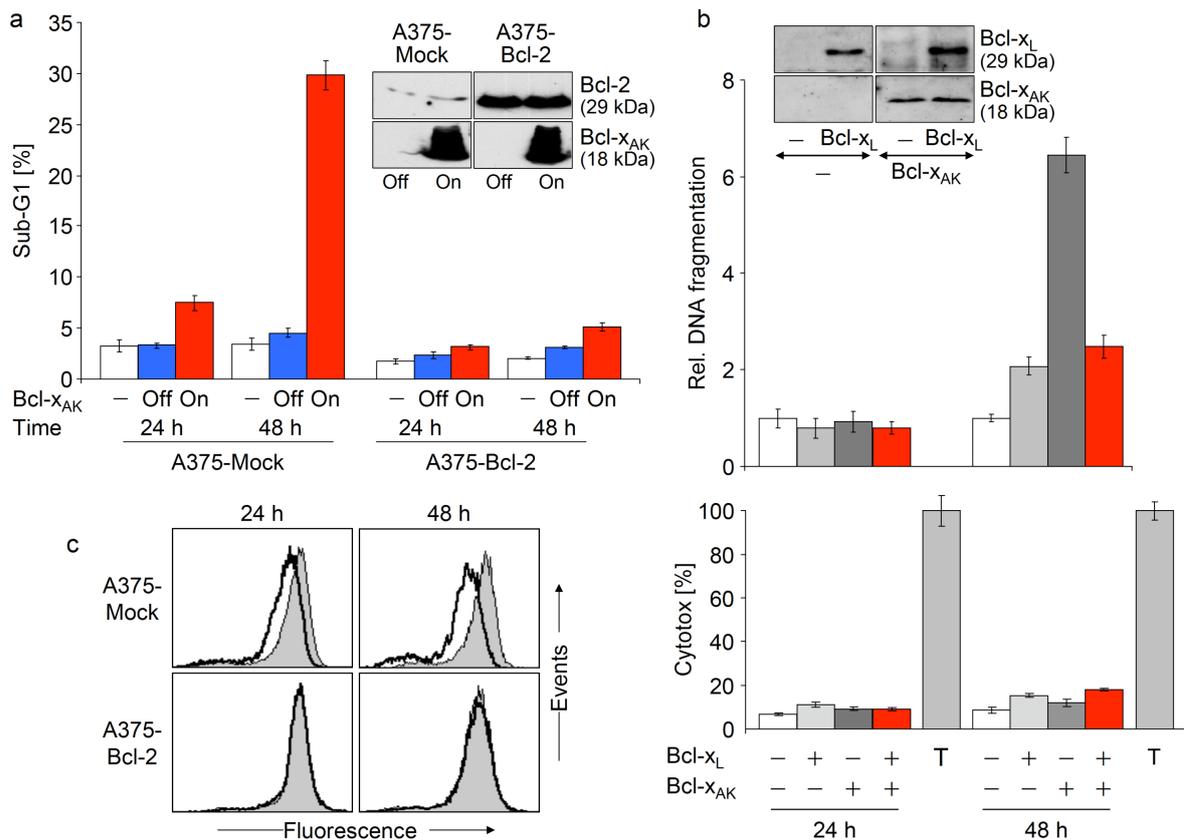


Abb. 16: **Bcl-2 und Bcl- x_L blockieren den proapoptischen Effekt von Bcl- x_{AK} .** (a) Subklone von A-375 Zellen, die stabil mit pIRES-Bcl-2 (A375-Bcl-2) oder mock-transfiziert (A375-Mock) wurden, wurden mit AdV-AK transduziert und unter OFF- oder ON-Bedingungen gehalten. Nicht-transduzierte Zellen (-) wurden als zusätzliche Kontrolle benutzt. Die Anzahl von apoptotischen Zellen (sub-G1-Zellpopulation) wurde mittels Durchflusszytometrie nach PI-Färbung bestimmt. Die Überexpression von Bcl-2 und Bcl- x_{AK} wurde durch Western Blot Analyse bestimmt und ist durch den eingefügten Blot gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment, das aus Dreifachwerten bestand, sind gezeigt (jeweils zwei unabhängige Experimente). (b) SK-Mel-13 Melanomzellen wurden entweder transient mit Bcl- x_L oder Bcl- x_{AK} allein oder mit der Kombination von beiden transfiziert (jeweils 2,5 μ g Plasmid-DNA). Die Werte der relativen DNA-Fragmentierung, 24 h und 48 h nach Transfektion bestimmt, wurden bezogen und normalisiert auf die Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (weiße Balken). Mittelwerte und Standardabweichungen von einem repräsentativen Experiment, das aus Dreifachwerten bestand sind gezeigt (jeweils zwei unabhängige Experimente). Die Überexpression von Bcl- x_L und Bcl- x_{AK} wurde durch Western Blot Analyse bestimmt und ist durch den eingefügten Blot gezeigt. (c) Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) wurde nach 24 h und 48 h mittels Durchflusszytometrie nach TMRM⁺ Färbung in A375-Mock und in A375-Bcl-2 bestimmt. Nach Transduktion mit AdV-AK wurden induzierte mit nicht induzierten Bedingungen verglichen (ON/OFF). Das Experiment wurde dreimal wiederholt und lieferte jeweils vergleichbare Ergebnisse.

2.1.5. Keine Blockierung der mitochondrialen Translokation von Bcl-x_{AK} durch Bcl-2

Kennzeichen der mitochondrialen Apoptosesignalwege sind die Translokation von Bax und das Freiwerden von mitochondrialen Faktoren. Ein signifikantes Freiwerden von Cytochrom c zeigte sich in Mel-2a und A-375 48 h nach Transduktion mit AdV-AK (Abb. 17a). Die Analyse für β -Aktin zeigte eine gleichmäßige Proteinbeladung der cytosolischen Extrakte. Die Lokalisation von Bcl-x_{AK} erscheint hierbei als ein wichtiger Schritt. Bei dem Vergleich von 24 h mit 48 h zeigte sich in allen drei Zelllinien nach 48 h eine signifikante Abnahme von Bcl-x_{AK} im Cytosol um den Faktor 2 - 3 (Abb. 17a). Der direkte Vergleich der mitochondrialen Extrakte in Mel-2a von 24 h und 48 h zeigte 24 h nach Transduktion mit AdV-AK keine Lokalisation von Bcl-x_{AK} an den Mitochondrien und nur eine schwache Bande in zwei A-375-Klonen. Die mitochondriale Lokalisation von Bcl-x_{AK} selbst stieg jedoch 48 h nach Transduktion stark an. Die gleichzeitige Abnahme von Bcl-x_{AK} im Cytosol und der parallel dazu starke Anstieg in den Mitochondrien (48 h) bestätigen nochmals die Translokation von Bcl-x_{AK} und deuten an, dass dies der kritische Schritt für die Apoptoseinduktion ist (Abb. 17b). Hierbei ist wichtig, dass die mitochondriale Translokation von Bcl-x_{AK} nicht durch die Bcl-2-Überexpression verhindert wurde, aber das Freiwerden von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Bax-Translokation komplett blockiert wurden (Abb. 17a, 17b).

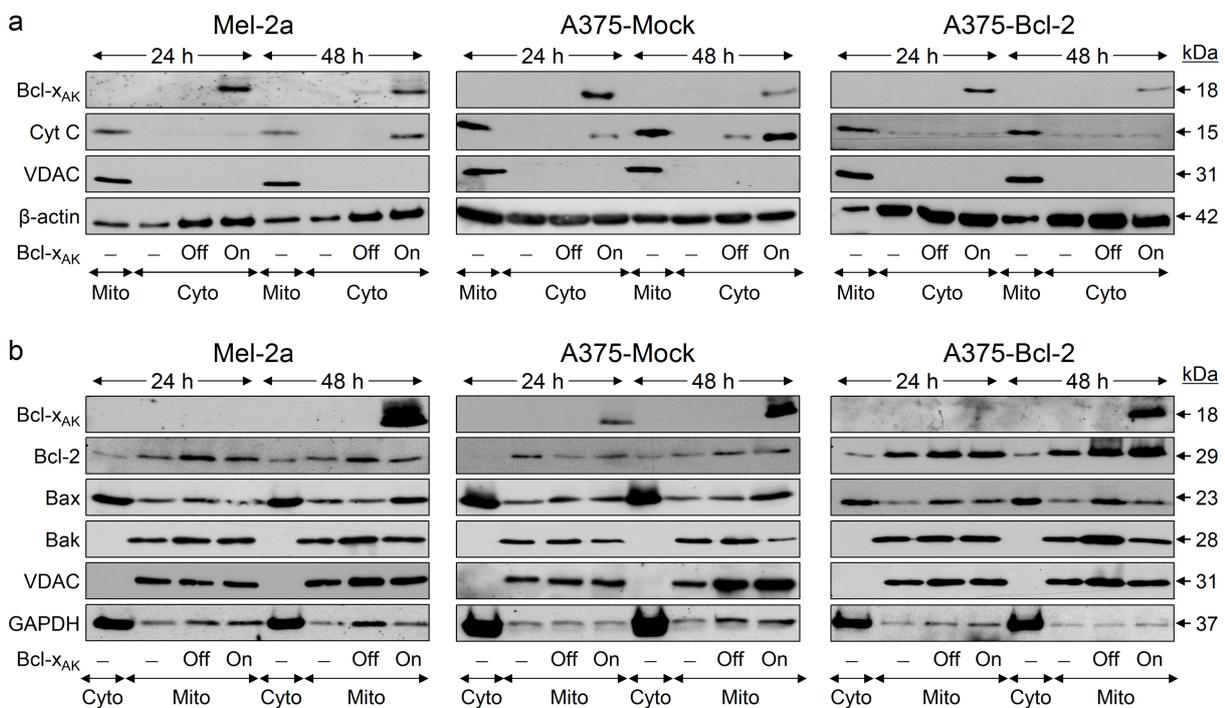


Abb. 17: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abb. 17: **Bcl-2 blockiert die Bcl-x_{AK} vermittelte Translokation von Bax und das Freiwerden von Cytochrom c.** Mel-2a, A375-Mock und A375-Bcl-2 Zellen wurden mit AdV-AK (MOI = 50) transduziert und unter OFF- und ON- Bedingungen gehalten. Zu 24 h und 48 h wurden cytosolische Fraktionen (Cyto) und mitochondriale Fraktionen (Mito) isoliert und mittels Western Blot analysiert. Nicht-transfizierte Zellen (-) sind als Kontrolle gezeigt. (a) Cytosolische Extrakte wurden auf die Expression von Bcl-x_{AK} und die Abgabe von Cytochrom c analysiert. Mitochondriale Extrakte dienten als Positivkontrolle. Mit Hilfe des mitochondrialen Proteins VDAC (VDAC1/2/3) konnten Kontaminationen des Cytosols mit Mitochondrien ausgeschlossen werden. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (b) Mitochondriale Extrakte wurden auf die Translokation von Bcl-2-Proteinen analysiert. Hier dienten die cytosolischen Extrakte als Kontrolle. Eine gleiche Proteinbeladung wurde mit VDAC bestätigt. Der Reinheitsgrad der mitochondrialen Extrakte wurde mittels GAPDH geprüft. 5 % der totalen mitochondrialen Fraktion und 2 % der totalen cytosolischen Fraktion wurden auf das Gel geladen. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte jeweils vergleichbare Ergebnisse.

2.1.6. Keine Interaktionen von Bcl-x_{AK} mit anderen Proteinen der Bcl-2-Familie

Für die Untersuchung, ob Bcl-x_{AK} vielleicht direkt mit anderen Bcl-2-Proteinen interagieren kann, wurden SK-Mel-13 Melanomzellen mit myc-getagtem Bcl-x_{AK}, Bcl-x_L oder Bax transient transfiziert. Für die Untersuchung der Bindung an Bcl-2, Bax, Bad, Noxa und Puma wurden Immunpräzipitationen mit anti-Myc-Mikrobeads durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Mock transfizierte Zellen wurden als Kontrolle für unspezifische Bindungen an die Mikrobeads eingesetzt, die durch den Einsatz von Antikörpern bei der anschließenden Western Blot Analyse eventuell auftreten. Die myc-getagten Proteine wurden effizient immunpräzipitiert, wie in der Pelletfraktion (P) nach Inkubation mit dem Myc-Antikörper zu sehen ist (Abb. 18a, Elemente 1-3). Die Bindungsstudie zeigte eine charakteristische Bindung von Bcl-2 an myc-Bax, eine Bindung von Bax an myc-Bcl-x_L und myc-Bax als auch eine Bindung von Bad an myc-Bcl-x_L. Dies diente der Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Methode. Dennoch ergab sich keine direkte Interaktion von Bcl-x_{AK} mit den fünf repräsentativen Vertretern der Bcl-2-Familie (Abb. 18a). Dies deutet an, dass Bcl-x_{AK} die Aktivierung von Bax und Bak mittels bisher noch undefinierter Schritte vollzieht. In diesem Signalweg wirken Bcl-x_{AK} und die antiapoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie unabhängig voneinander auf Bax und Bak (Abb. 18b).

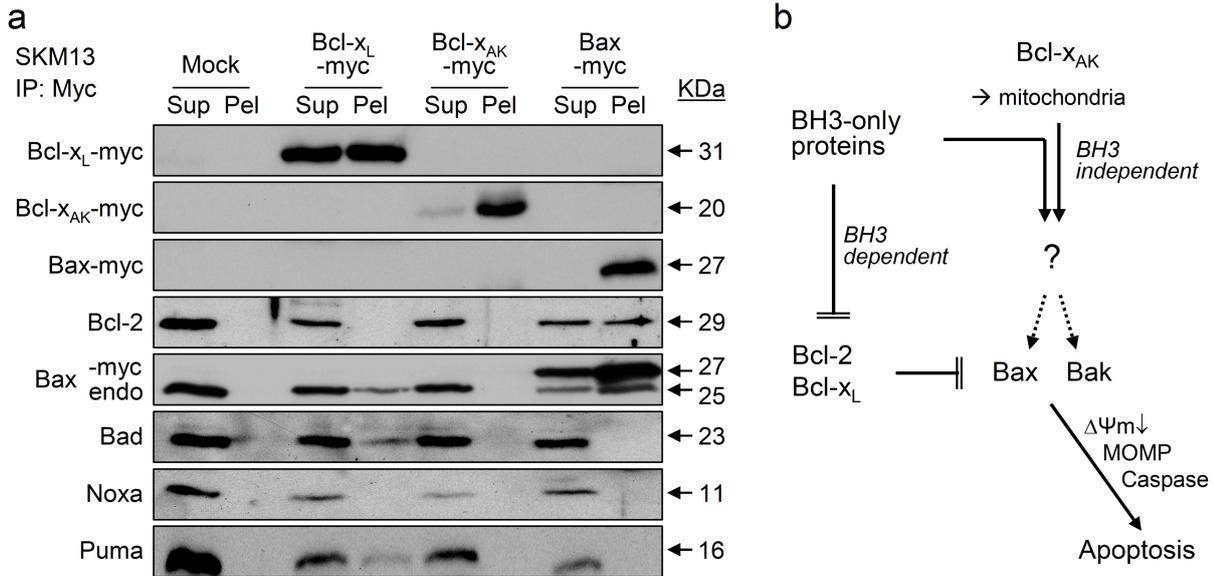


Abb. 18: **Koimmunpräzipitationsanalyse von Bcl-x_{AK}**. (a) SK-Mel-13 Melanomzellen wurden mit jeweils 5 µg von einem pcDNA3 Plasmid transient transfiziert, welches für Bcl-x_L, Bcl-x_{AK}, Bax oder einem Leer-Vektor (Mock) kodiert ist. Zelllysate wurden mit „Microbeads“, die an anti-Myc-Antikörper gekoppelt sind, präzipitiert. Die Immunpräzipitation wurde mittels Western Blot analysiert. Der nicht gebundene Überstand (Supernatant, S) wurde mit der immunpräzipitierten Pelletfraktion (Pellet, P) verglichen. Antikörper für die Immundetektion: anti-Myc, Bcl-2, Bax, Bad, Noxa und Puma. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte jeweils vergleichbare Ergebnisse. (b) Vorgeschlagenes Modell für die Apoptoseinduktion durch Bcl-x_{AK}. Es basiert auf der mitochondrialen Translokation von Bcl-x_{AK} und der Aktivierung von Bax/Bak. Bcl-2/Bcl-x_L verhindern die Bax/Bak-Aktivierung, aber nicht die Translokation von Bcl-x_{AK} selbst. BH3-only Proteine können durch die Inaktivierung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine einen BH3-abhängigen Signalweg vermitteln und zusätzlich können sie einen BH3-unabhängigen Signalweg analog zu Bcl-x_{AK} vermitteln (siehe Diskussion).

2.2. Untersuchung der Apoptoseinduktion auf der Basis des proapoptotischen Bcl-2-Proteins, Bcl-x_S

2.2.1. Effiziente Apoptoseinduktion durch AdV-XS

Um die Effizienz und den Mechanismus der Bcl-x_S vermittelten Apoptose in Melanomzellen zu untersuchen, wurde, wie schon für Bcl-x_{AK} beschrieben, Bcl-x_S unter der Kontrolle eines durch Tetracyclin kontrollierten Promotors (Tet-OFF) in einen adenoviralen Vektor kloniert. Die Expressionskassette für den durch Tetracyclin/Doxycyclin regulierbaren Transaktivator tTA ist wiederum in der adenoviralen E3-Region lokalisiert (Abb. 19a). Die Bcl-x_S-Transkription wird in Anwesenheit von Doxycyclin unterdrückt (OFF-Bedingungen) und in Abwesenheit von Doxycyclin (ON-Bedingungen) aktiviert. Das verwendete AdV-XS-Konstrukt vermittelte eine hohe Expression von Bcl-x_S in den Melanomzellen A-375, Mel-HO und Mel-2a (Abb. 19b). Die Überexpression von Bcl-x_S resultierte in einer starken Induktion der Apoptose in den Melanomzelllinien A-375, Mel-HO und Mel-2a, welche sich in der Reduzierung der Zellzahl, der abgerundeten und abgelösten Zellen zeigte (Abb. 19c). Die apoptotischen Zellen mit fragmentierter DNA wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abb. 19 d).

Eine zeitkinetische Analyse zeigte eine frühe Induktion der Apoptose bereits 24 h nach der Transduktion, welche zeitabhängig auf bis zu 30% - 45% nach 72 h anstieg (Abb. 19e). Demgegenüber blieb die Zytotoxizität zum frühen Zeitpunkt auf einem geringen Level und stieg zu 72 h nur leicht an (Abb. 19f). Die Zytotoxizität wurde durch die LDH-Freisetzung in das Cytoplasma parallel zu der Apoptoseuntersuchung photometrisch bestimmt. Vergleichend dazu wurde die Apoptoseinduktion in Folge der Bcl-x_S-Expression in Mel-2a 48 h nach Transduktion durch eine AnnexinV/PI-Färbung (26%, Abb. 19h) und AnnexinV-Einfachfärbung (35%, Abb. 19i) bestimmt. Im Zuge der Apoptoseinduktion ergab die Bestimmung der Zellproliferation mittels WST-1-Untersuchung bei 72 h einen starken Abfall der Zellproliferation von > 50% in den Melanomzelllinien A-375, Mel-HO und Mel-2a (Abb. 19g). Darüber hinaus ergab die Bestimmung der Zellviabilität durch eine Calcein-Färbung 48 h nach Transduktion mit AdV-XS eine Verminderung der Viabilität der Mel-2a Melanomzellen um 43% unter ON-Bedingungen (Abb. 19j).

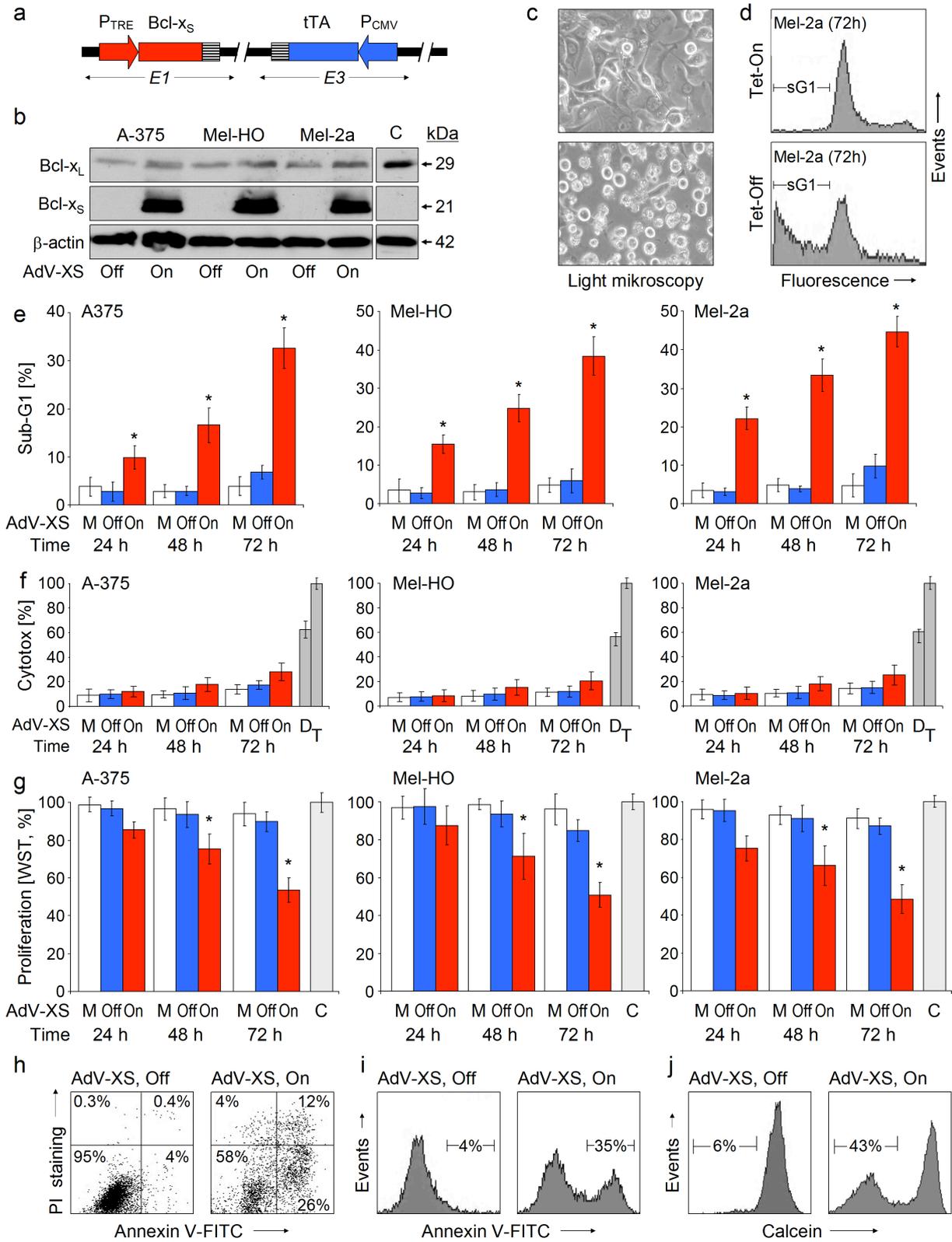


Abb. 19: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 19: **Apoptoseinduktion durch eine kontrollierte und starke Expression von Bcl-x_S.** (a) Gezeigt ist die Struktur von AdV-XS. Die Bcl-x_S cDNA, die unter der Kontrolle eines Tetracyclin-kontrollierten Promotors (P_{TRE}) steht, wurde in die adenovirale E1-Region subkloniert. Die E3-Region wurde wiederum durch einen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (tTA), der unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (P_{CMV}) steht, ausgetauscht. Die tTA vermittelt hierbei die Tet-OFF-Regulation, während die gestreiften Boxen die poly(A) Regionen kennzeichnen. (b) Western Blot Analysen der induzierbaren Bcl-x_S-Expression in A-375, Mel-HO und Mel-2a 48 h nach Transduktion mit AdV-XS (MOI = 50). Die Zellen hatten entweder Doxycyclin erhalten (OFF-Bedingungen) oder wurden ohne kultiviert (ON-Bedingung). Die Analyse für β -Aktin zeigte eine gleichmäßige Protein-Ladung (40 μ g/Bahn). Bcl-x_L-transfizierte SK-Mel-13 Zellen (SKM13-Bcl-x_L, c) sind als Kontrolle für die Bcl-x_L-Expression gezeigt. (c) Abgelöste und abgerundete Zellen weisen auf eine Apoptoseinduktion für Mel-2a 48 h nach Transduktion mit AdV-XS unter OFF- und ON-Bedingungen hin. (d) Beispiele einer Zellzyklusanalyse nach PI-Färbung zeigen die apoptotischen Zellen in sub-G1 für Mel-2a 72 h nach Transduktion. (e-g) Zeitkinetische Untersuchungen der Apoptoseinduktion (e, Durchflusszytometrie nach PI-Färbung), der Zytotoxizität (f, LDH-Freisetzung) und der Zellzahl (g, WST-1 Untersuchung) sind für A-375, Mel-HO und Mel-2a Zellen zu 24 h, 48 h und 72 h nach Transduktion mit AdV-XS (50 MOI, +Dox = OFF, -Dox = ON) gezeigt. Als Positivkontrolle für die induzierte Zytotoxizität wurden die Zelllinien mit Triton X-100 (T = 100%) komplett lysiert oder mit Doxorubizin (D, 500 nM, 72 h) behandelt. Für die Darstellung der relativen Zellvitalität wurden die AdV-XS transduzierten Zellen auf die unbehandelten Kontrollen (C = 100%) normalisiert. Ein Luciferase-kodierendes Adenovirus (Ad5-CMV-Luc) wurde als Kontrolle für die adenovirale Transduktion (Mock-Kontrolle = M) mit der gleichen MOI (MOI = 50) eingesetzt. (h-j) 48 h nach Bcl-x_S-Induktion in Mel-2a wurden die apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie durch eine AnnexinV/PI (h) Doppelfärbung oder durch eine AnnexinV Einfachfärbung (i) bestimmt. (j) Die Zahl der lebensfähigen Zellen wurde mittels Calceinfärbung bestimmt. (i) Eine Verlagerung nach rechts zeigten die AnnexinV-positiven Zellen und (j) eine Verlagerung nach links die Calcein negativen nicht lebensfähigen Zellen an. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten aus zwei Experimenten, das jeweils aus Dreifachwerten bestand, sind gezeigt. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) ist durch Sterne angegeben.

2.2.2. Aktivierung der Caspasen und Mitochondrien durch hohe Bcl-x_S-Expression

Die Aktivierung der Caspasenkaskade durch Bcl-x_S wurde mittels Western Blot Analyse in Mel-2a Zellen sowohl für die Initiatorcaspase 8 und 9 als auch für die Haupteffektorcaspase 3 untersucht. Eine leichte Caspasenprozessierung erschien schon nach 24 h, welche nach 48 h verstärkt wurde (Abb. 20a). Die Involvierung des mitochondrialen Apoptose-signalweges wurde mittels eines mitochondrialen Membranpotential($\Delta\psi$ m)-abhängigen Farbstoffes TMRM⁺ bestimmt. Es zeigte sich eine Abnahme von $\Delta\psi$ m bei 43% der Mel-2a Zellen nach 24 h und von bis zu 65% nach 48 h (Abb. 20b). Die Tatsache, dass ein höherer Prozentsatz der Zellen mit dem Verlust von $\Delta\psi$ m reagierte als mit dem Auftreten von fragmentierter DNA (Abb. 19e), weist darauf hin, dass die mitochondriale Antwort ein initialer Schritt in der Bcl-x_S vermittelten Apoptose ist.

Weitere Untersuchungen zu der Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch Bcl-x_S zeigten nach 48 h in Mel-2a ein signifikantes Freiwerden von Cytochrom c, Smac und AIF aus den Mitochondrien. Hierfür wurden die cytosolischen Extrakte mittels Western Blot analysiert (Abb. 20c). Des Weiteren zeigten die mitochondrialen Extrakte, dass Bcl-x_S nach 48 h fast ausschließlich an den Mitochondrien lokalisiert war, während sowohl Bak als auch moderate Level von Bax kontinuierlich an den Mitochondrien präsent waren (Abb. 20d). Bcl-x_S induzierte keine weitere Bax-Translokation (Abb. 20d) und auch keine veränderte Expression von weiteren Bcl-2-Proteinen, welches mittels Western Blot Analyse für Bcl-2, Mcl-1, Bax, Puma und Noxa überprüft wurde (Abb. 20e).

Letztlich wurde keine signifikante Induktion des LC3-II (autophagosome-associated protein light chain 3, 17 kDa) in Melanomzellen nach 24 h gesehen. Dies weist darauf hin, dass die Autophagie in der initialen Phase des Bcl-x_S vermittelten Zelltods nicht involviert ist (Abb. 20f).

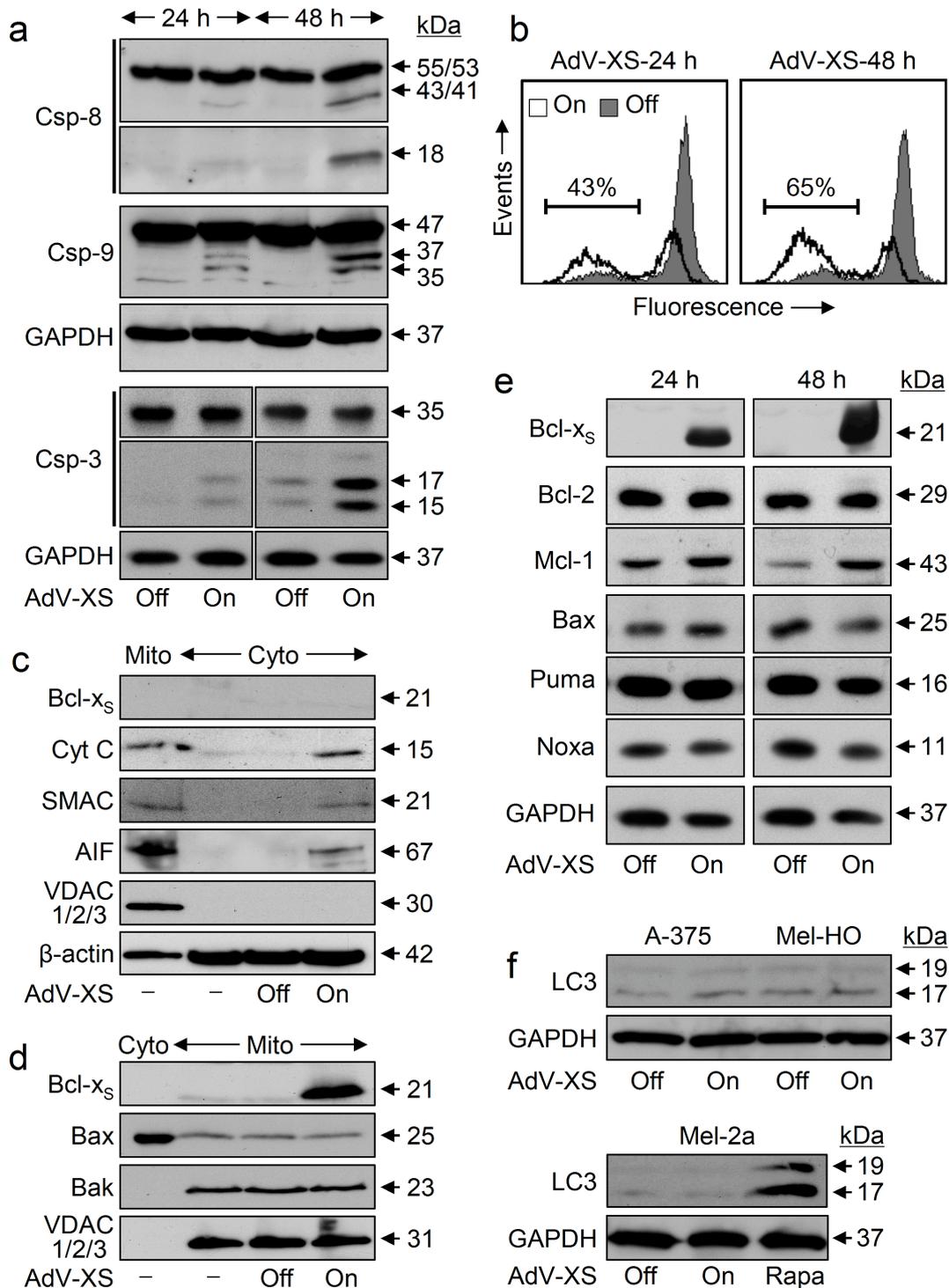


Abb. 20: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 20: **Aktivierung der Caspasen und Mitochondrien.** (a) Spaltung der Caspase 8, 9 und 3 bei Mel-2a Zellen 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-XS (MOI = 50). Die Expression von Bcl-x_S wurde in der Abwesenheit von Doxycyclin (ON) angeschaltet oder in der Anwesenheit von Doxycyclin (OFF) abgeschaltet. Die Analyse für GAPDH zeigte eine gleichmäßige Protein-Ladung (20 µg/Bahn). Die Experimente wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse. (b) Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) ist für Mel-2a 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-XS gezeigt. $\Delta\psi_m$ wurde mittels Durchflusszytometrie nach TMRM⁺ Färbung bestimmt. Zellen mit Doxycyclin (OFF, grau) wurden mit Zellen verglichen, die ohne Doxycyclin (ON, offener Graph) kultiviert wurden. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse. (c, d) Von Mel-2a Zellen wurden 48 h nach Transduktion mit AdV-XS (MOI = 50) cytosolische Fraktionen (Cyto) und mitochondriale Fraktionen (Mito) isoliert und mittels Western Blot analysiert. Nicht-transfizierte Zellen (-) sind als Kontrolle gezeigt. (c) Cytosolische Extrakte demonstrieren das Freiwerden von mitochondrialen Faktoren (Cytochrom c, AIF und Smac). Mitochondriale Extrakte dienen als Kontrolle für die mitochondrialen Proteine und β -Aktin diente als Ladekontrolle. Ein Antikörper für das mitochondriale Protein VDAC (VDAC1/2/3) wurde benutzt, um Kontaminationen des Cytosols mit Mitochondrien auszuschließen. (d) Die mitochondrialen Extrakte zeigen die mitochondriale Translokation von Bcl-x_S, während cytosolische Extrakte als Kontrolle dienen. Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde mit VDAC bestätigt. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte jeweils vergleichbare Ergebnisse. (e) Die Expressionslevel der Bcl-2-Proteine p53 und Survivin wurden mittels Western Blot in Mel-2a Zellen 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-XS (ON- und OFF-Bedingungen) analysiert. Eine gleichmäßige Proteinladung (20 µg/Bahn) wurde mit GAPDH bestätigt. (f) Die Expression von LC3 wurde mittels Western Blot Analyse in A-375, Mel-HO und Mel-2a 48 h nach Transduktion mit AdV-XS (MOI = 50) bestimmt. Rapamycin-behandelte Mel-2a Zellen (10 µM, 24 h) dienen als Positivkontrolle.

2.2.3. Bcl-x_S ist abhängig von pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen

Die im Vorfeld berichtete Bcl-x_S-Abhängigkeit von Bak (Lindenboim et al, 2005) wurde auch für AdV-XS in verschiedenen HCT116 Kolonkarzinomzellklonen mit einem Bax-Knockout, einem Bak-Knockdown oder einem Doppelknockdown für Bax und Bak überprüft (Abb. 21a). Während der Bax-Knockout nur einen geringen Effekt auf die Bcl-x_S vermittelte Apoptose hatte, verhinderte der Bak-Knockdown annähernd komplett die Apoptoseinduktion durch Bcl-x_S 24 h nach Transduktion (Abb. 21b). Darüber hinaus wurde die Funktion von drei unterschiedlichen antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern (Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1) für die Bcl-x_S-induzierte Apoptose untersucht. Für Bcl-2 wurden mit einem Bcl-2 Expressionplasmid stabil transfizierte Subklone von A-375 (A375-Bcl-2) mit Mock-transfizierten Zellen verglichen (A375-Mock, Abb. 21c). Für Bcl-x_L wurden A-375 Zellen transient mit Bcl-x_L transfiziert (Abb. 21d) und Mcl-1 wurde durch den Einsatz von siRNA in A375-Mock und A375-Bcl-2 herunterreguliert (Abb. 22a). Während Bcl-2 als ein präferenzzieller Inhibitor von Bax beschrieben ist, inhibiert Mcl-1 präferenzziell Bak. Bcl-x_L kann sowohl Bax als auch Bak inhibieren (Chipuk et al, 2010; Kazi et al, 2011). Die Bcl-2-Überexpression verminderte den proapoptotischen Effekt von AdV-XS um 50% und blockierte nahezu komplett die Bik/Nbk-induzierte Apoptose, welches - wie Bcl-x_S - in den gleichen adenoviralen Hindergrund subkloniert wurde (Abb. 21e). Allerdings wurde die Bcl-x_S-induzierte Apoptose durch die Bcl-x_L-Überexpression komplett aufgehoben (Abb. 21f).

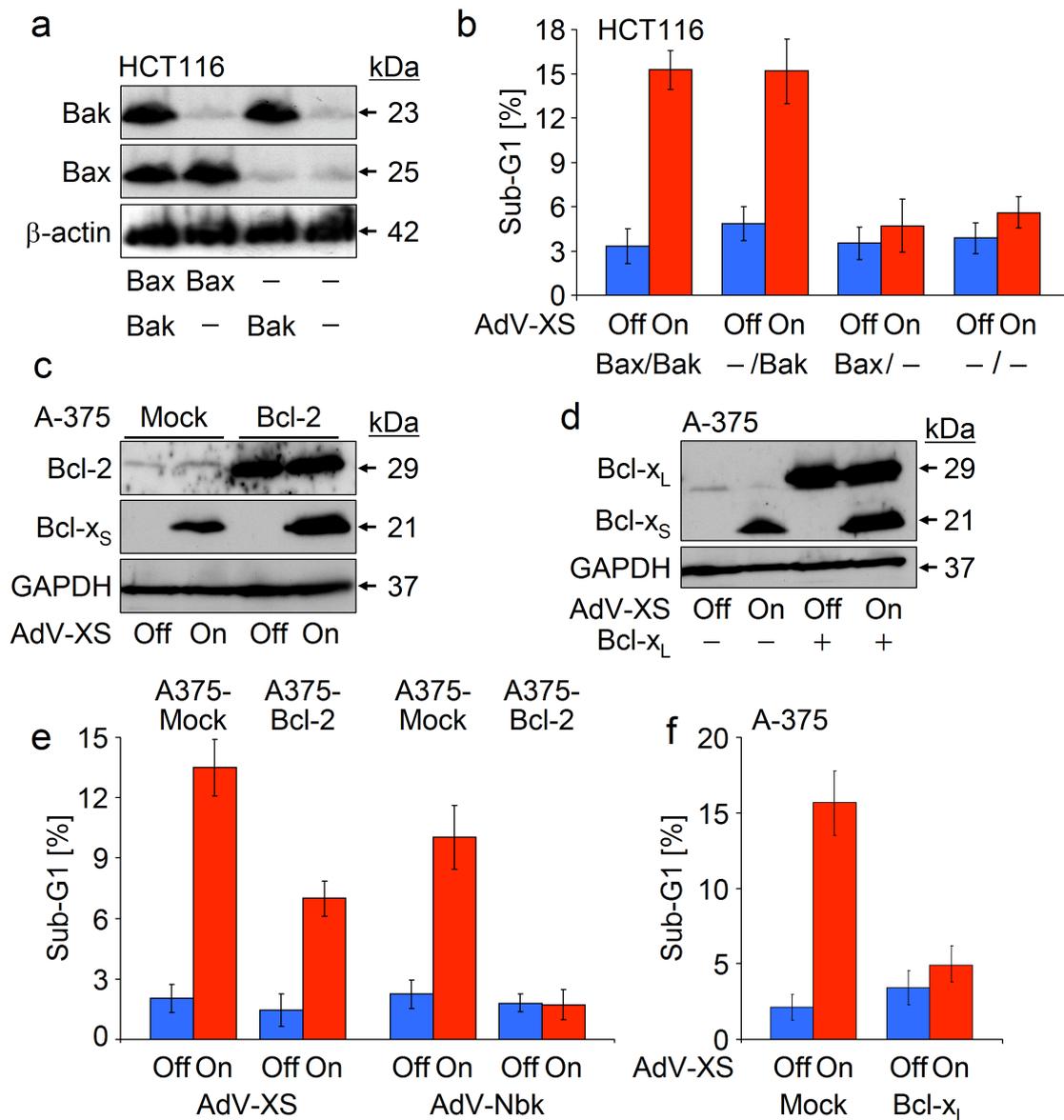


Abb. 21: **Abhängigkeit von Bak und Inhibition durch antiapoptotische Bcl-2-Proteine.** (a) Die Expression von Bax und Bak ist sowohl in HCT116 Parentalzellen (Bax⁺/Bak⁺) als auch in Subklonen Bax⁻/Bak⁺, Bax⁺/Bak⁻ und Bax⁻/Bak⁻ gezeigt. Gleichmäßige Protein-Ladung (20 µg/Bahn) wurde nach Inkubation mit β-Aktin bestätigt. (b) Zellen der HCT116 Subklone wurden mit AdV-XS (MOI = 50) transduziert und unter OFF- oder ON-Bedingungen kultiviert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellpopulation (sub-G1) wurde nach 24 h bestimmt. (c, d) Die Expressionslevel von Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-x_S wurden mittels Western Blot in A375-Mock, A375-Bcl-2 und A-375 Parentalzellen, die transient mit Bcl-x_L transfiziert wurden, bestimmt. Die Proteine wurden 64 h nach Transfektion und 48 h nach Transduktion mit AdV-XS (50 MOI) bzw. Kultivierung unter OFF- oder ON-Bedingungen isoliert. Eine gleichmäßige Protein-Ladung (20 µg/Bahn) wurde mittels GAPDH bestätigt. (e) Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellpopulation (Sub-G1) wurde in A-375 Subklonen, die stabil transfiziert mit Bcl-2 (A375-Bcl-2) oder Mock-transfiziert sind (A375-Mock), 48 h nach Transduktion mit AdV-XS und bestimmt. (f) Der Prozentsatz der apoptotischen Zellpopulation wurde in A-375 nach transienter Transfektion mit dem Bcl-x_L-Expressionsplasmid 48 h nach Transduktion mit AdV-XS und Kultivierung unter OFF- oder ON-Bedingungen bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten aus zwei Experimenten, die jeweils aus Dreifachwerten bestanden, sind gezeigt.

Des Weiteren kam es durch den Mcl-1 Knockdown in A375-Mock und in A375-Bcl-2 Zellen zu einer weiteren Verstärkung der Bcl-x_S-induzierten Apoptose. Als Kontrolle dienten hier Zellen, die mit Scramble siRNA-transfiziert waren (Abb. 22c, 22b). Demnach hatten alle drei

antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder (Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1) einen protektiven Einfluss auf die Bcl-x_S vermittelte Apoptose. Dies bestätigte den bereits vorliegenden Befund, dass die Bcl-x_S-induzierte Apoptose via Bak vermittelt wird.

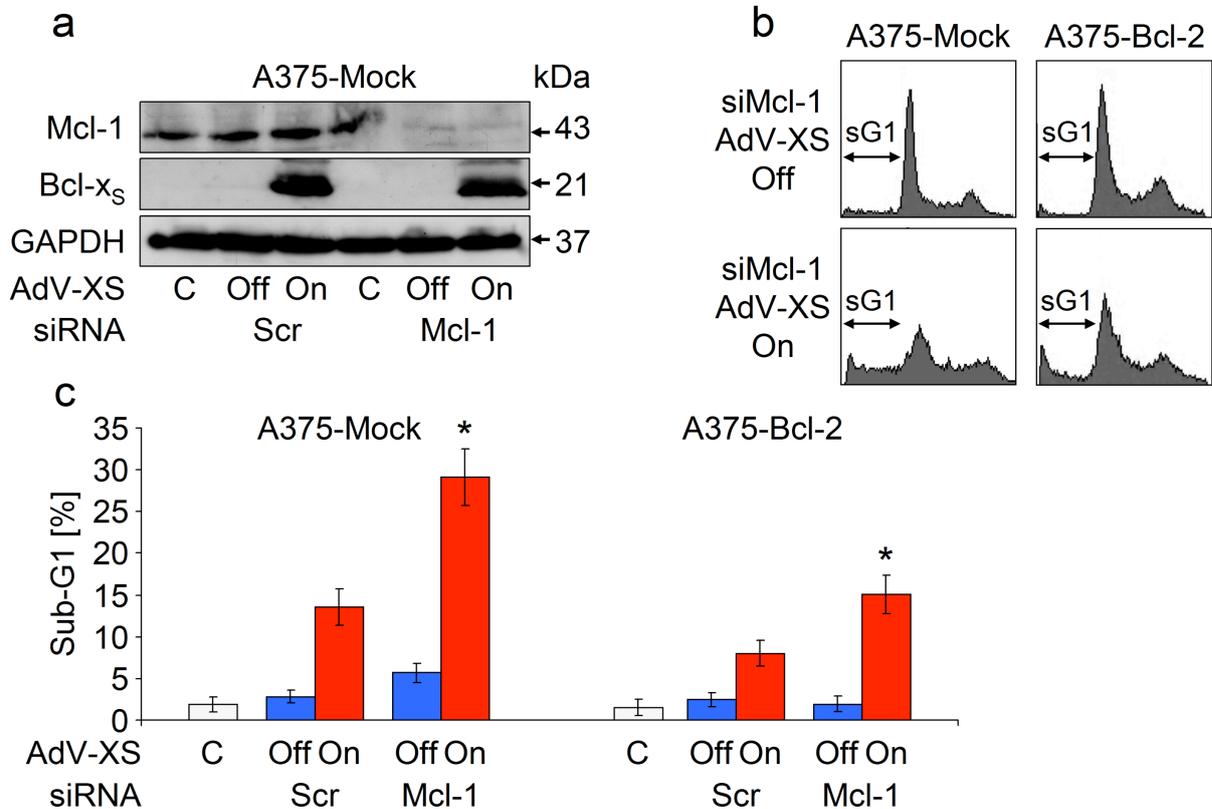


Abb. 22: Verstärkung der Bcl-x_S vermittelten Apoptose durch einen Mcl-1 Knockdown. (a) Die Expression von Mcl-1 und Bcl-x_S ist in A-375 Zellen 64 h nach siRNA-Transfektion gegen Mcl-1 und 48 h nach Transduktion mit AdV-XS gezeigt. Die Zellen wurden unter OFF- oder ON-Bedingungen kultiviert. Scramble siRNA-transfizierte, nicht-transduzierte Zellen als auch nicht-transfizierte Zellen sind als Kontrolle (Kontrolle = C) gezeigt. (b) Repräsentative Histogramme zeigen die sub-G1-Zellpopulationen (apoptotische Zellen) 48 h nach Transduktion mit AdV-XS. (c) Quantifizierung der Apoptose in A375-Bcl-2 und A375-Mock Zellen nach siRNA-Transfektion (Mcl-1 oder scramble) 48 h nach Transduktion mit AdV-XS. Die Zellen wuchsen unter ON- und OFF-Bedingungen. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten aus zwei Experimenten, die jeweils aus Dreifachwerten bestanden, sind gezeigt. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) ist durch Sterne angegeben.

Die Bax- und Bak-Aktivierung führt zu Konformationsänderungen und damit zu einer Freilegung eines N-terminalen Bereichs. Die maßgebliche Rolle von Bak wurde letztendlich mittels eines N-Terminal-spezifischen Antikörpers gegen Bak und Bax (Bak-NT, Bak-NT) überprüft. Eine eindeutige Aktivierung von Bak durch Bcl-x_S zeigte sich nach 24 h (30% der Zellen), während Bax nur schwach und auch nur zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich 48 h nach Transduktion aktiviert wurde (Abb. 23a). Im Vergleich dazu zeigte Bik/Nbk in Übereinstimmung mit der Apoptoseinduktion via Bax ein umgekehrtes Bild, nämlich eine frühe Aktivierung von Bax mit einer schwachen Aktivierung von Bak nach 48 h (Abb. 23b). Die Abhängigkeit der Bcl-x_S-induzierten Apoptose von Bak in Melanomzellen wurde

letztendlich durch einen siRNA vermittelten Bak-Knockdown überprüft (Abb. 23c). Dieser führte zu einer kompletten Aufhebung der Bcl-x_S-induzierten Apoptose nach 24 h, während nach 48 h nur eine schwache Apoptoseinduktion (Abb. 23d) in Verbindung mit einer schwachen Bax-Aktivierung zu sehen war.

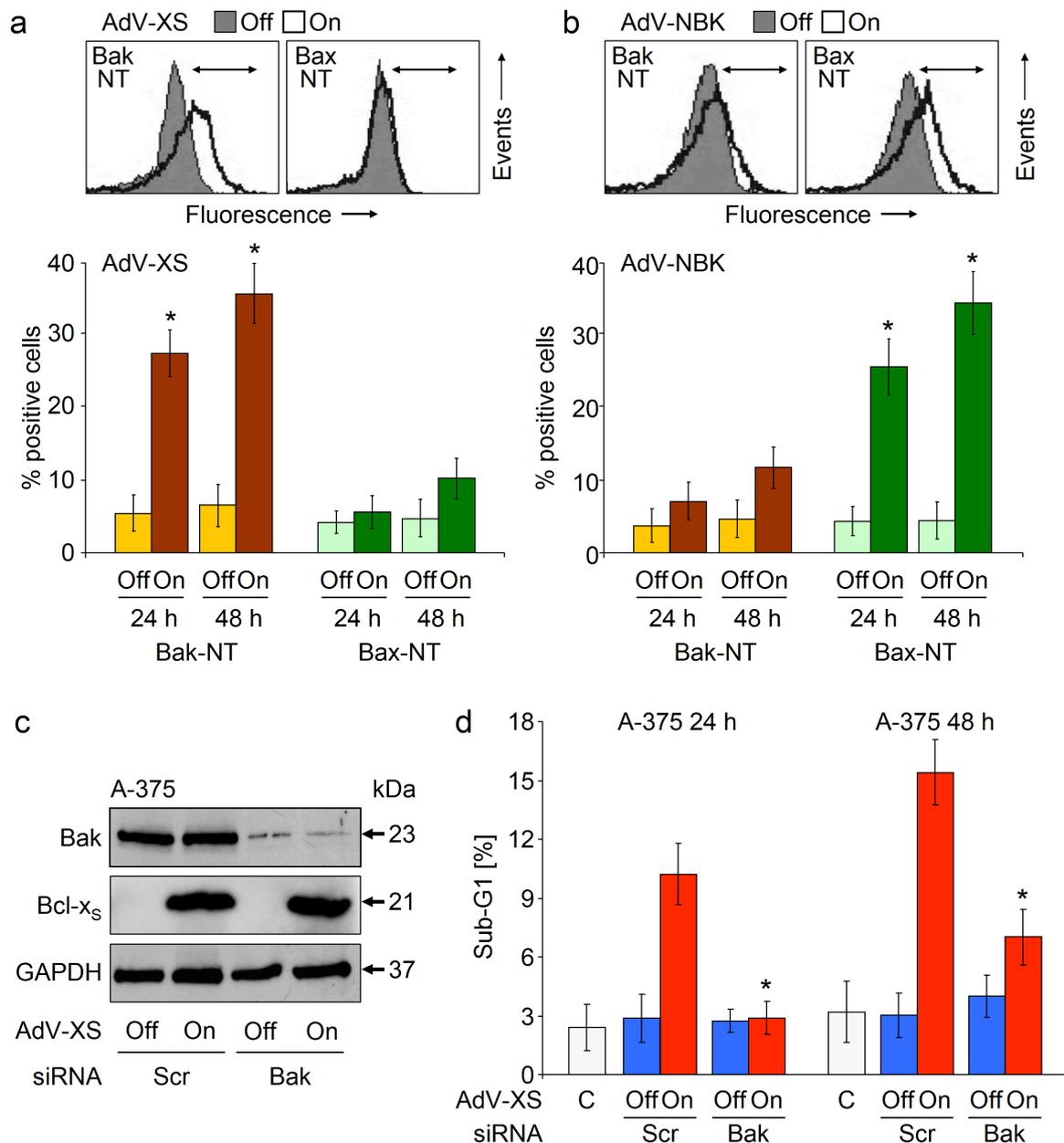


Abb. 23: **Aktivierung von Bak durch Bcl-x_S**. (a) Die Aktivierung von Bax und Bak wurde mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit konformationsspezifischen Antikörpern (Bax-NT, Bak-NT) in Mel-2a 24 h und 48 h nach Transduktion mit 50 MOI von AdV-XS (a) und AdV-NBK (b) bestimmt. Die oberen Felder zeigen die Populationen mit dem entsprechenden aktivierten Bax und Bak. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten sind gezeigt. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) ist durch Sterne angegeben. (c) Die Expression von Bak und Bcl-x_S ist in A-375 Zellen 64 h nach Transfektion mit anti-Bak siRNA oder Scramble siRNA (Scr) und 48 h nach Transduktion mit AdV-XS gezeigt. Die Zellen wurden unter OFF- oder ON-Bedingungen kultiviert. (d) Die Apoptoseinduktion wurde durch die Quantifizierung der Sub-G1-Zellen in A-375 nach AdV-XS-Transduktion und anti-Bak siRNA-Behandlung bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten sind gezeigt. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) ist durch Sterne angegeben.

2.2.4. Keine Interaktion von Bcl-x_S mit anderen Bcl-2-Proteinen

Mittels Immunpräzipitationsanalysen wurde in Melanomzellen nach Interaktionen mit anderen Bcl-2-Familienmitgliedern für Bcl-x_S gesucht. Dafür wurden A-375 Zellen transient mit Myc-getagtem Bcl-x_S-, Bcl-x_L- oder Bax-Expressionsplasmiden transfiziert. Die daraufhin überexprimierten Myc-getagkten Proteine wurden anschließend mittels anti-Myc-Microbeads immunpräzipitiert. Die Überexpression von Bcl-x_S, Bcl-x_L und Bax wurde in der (S)-Fraktion (Supernatant) demonstriert und die effiziente Immunpräzipitation mittels Bcl-x- und Bax-spezifischen Antikörpern mit der Pelletfraktion (P) kontrolliert (Abb. 24a). Dabei konnte keine Interaktion zwischen Bcl-x_S und den Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie Bcl-2, Mcl-1, Bax, Bad oder Noxa festgestellt werden, welches sich durch leere Pelletfraktionen (P) zeigte. Als Kontrolle für die Interaktionen der Bcl-2-Proteine konnte sowohl die bereits bekannte Bindung von Bcl-x_L an Bax und Bad als auch eine Bindung des Myc-getagkten Bax an Bcl-2 und endogenem Bax gezeigt werden (Abb. 24a).

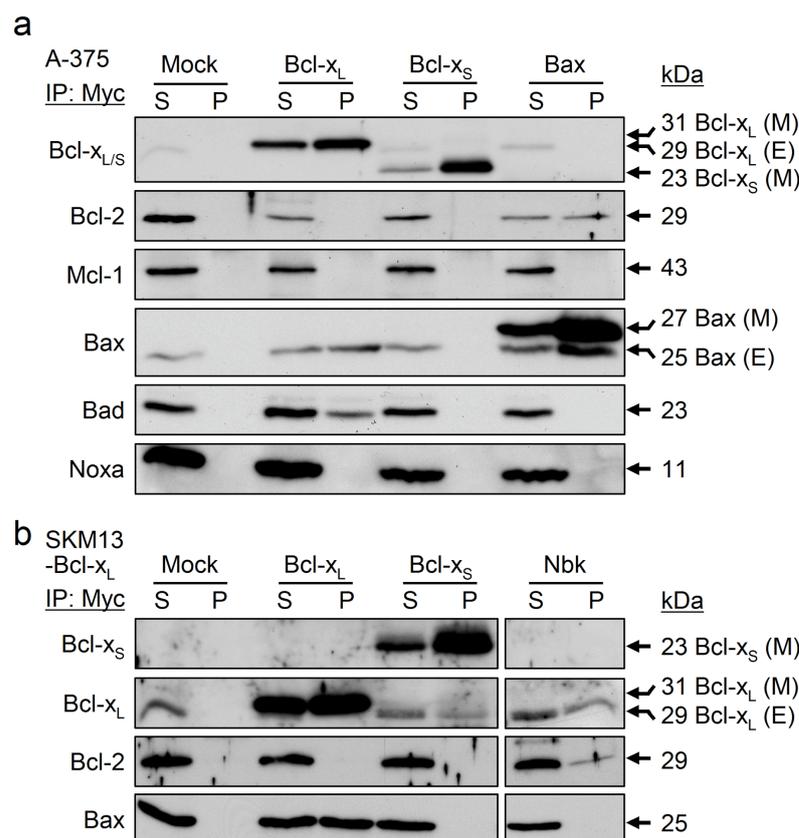


Abb. 24: **Immunpräzipitationsanalysen mit Myc-getagkten Bcl-2 Proteinen.** (a) A-375 Zellen wurden mit Myc-getagtem Bcl-x_L, Bcl-x_S oder Bax transient transfiziert. Die Immunpräzipitation mit den anti-Myc-Antikörpern wurde für Bcl-2-Proteine mittels Western Blot analysiert. Die Mock-Kontrollen wurden mit pcDNA3 transfiziert. Myc-getaggte Proteine mit einem höheren Molekulargewicht (M) wurden von den endogen exprimierten Proteinen (E) unterschieden. Der Überstand, der nicht an die Säule bindet (S), wurde verglichen mit der immunpräzipitierten Pelletfraktion (P). (b) Ein zweites Experiment wurde mit SK-Mel-13 Zellen durchgeführt. Diese sind stabil transfiziert mit einem Bcl-x_L-Überexpressionsplasmid (SKM13-Bcl-x_L). Für weitere Kontrollen wurden die Zellen mit Myc-Nbk transfiziert. Die Experimente (a, b) wurden zweimal wiederholt und lieferten vergleichbare Ergebnisse.

Des Weiteren wurde die spezifische Bindung von Bcl-x_L an Bax und Bak durch die Substitution von Triton X-100 durch den CHAPS-Zellysepuffer (nicht-denaturierend) überprüft. Es zeigte sich auch unter CHAPS-Bedingungen keine Interaktion zwischen Bcl-x_S und Bak oder Bax (Abb. 25). In Folge der schwachen Basalexpression von Bcl-x_L in Melanomzellen wurde für die Untersuchung der Rolle von Bcl-x_L ein SK-Mel-13 Zellklon, der stabil mit einem Bcl-x_L-Expressionplasmid transfiziert wurde, benutzt. Als zusätzliche Kontrolle wurden diese Zellen mit Myc-getagtem Bcl-x_L, Bcl-x_S und Bik/Nbk transient transfiziert. Unter den Bedingungen der Bcl-x_L-Überexpression zeigte sich, dass Bcl-x_S eine schwache Interaktion mit Bcl-x_L einging, während nach wie vor keine Interaktion mit Bcl-2 und Bax zu detektieren war. Die Interaktionen von Bik/Nbk mit Bcl-x_L und Bcl-2 als auch Bax mit Bcl-x_L waren darstellbar und dienten als Kontrollen (Abb. 24b). Demzufolge konnten keine signifikanten Interaktionen von Bcl-x_S mit anderen Bcl-2-Familienmitgliedern detektiert werden, die die Bcl-x_S vermittelte Apoptose in Melanomzellen erklären können.

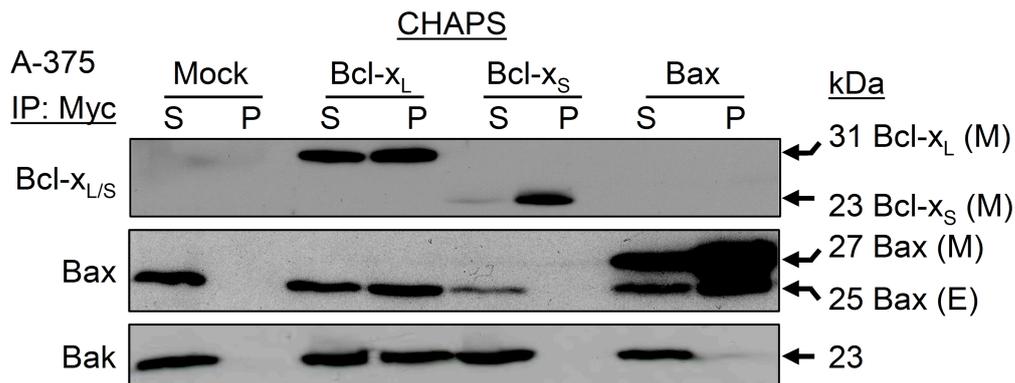


Abb. 25: **Immunpräzipitationsanalyse unter CHAPS-Pufferbedingungen.** Die Bindung von Bax und Bak wurde in A-375 Zellen analysiert, die ohne Triton-X100 lysiert wurden und stattdessen mit einem CHAPS-Puffer lysiert wurden. Das Experiment wurde zweimal wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

2.2.5. Trennung der Interaktion von VDAC2 mit Bak durch Bcl-x_S

Als wir die Interaktionen für Bcl-x_S mit anderen Proteinen untersuchten, konnten wir eine bemerkenswerte Interaktion mit VDAC2 (Voltage-Dependent Anion Channel 2, Abb. 26a) identifizieren. Um im Folgenden noch zusätzlich zwischen der VDAC1- und VDAC2-Bindung zu unterscheiden, wurde ein VDAC2-spezifischer Antikörper mit einem Antikörper verglichen, der alle drei VDAC-Isoformen (VDAC1/2/3) detektierte. Nach entsprechender transienter Transfektion und Immunpräzipitation von Myc-getagtem Bcl-x_L und Bcl-x_S zeigte sich, dass der nicht-selektive Antikörper VDAC-Proteine (30 kDa) detektierte, die sowohl mit Bcl-x_L als auch mit Bcl-x_S interagierten, während der VDAC2 spezifische Antikörper ein 30 kDa Protein detektierte, das exklusiv mit Bcl-x_S interagierte (Abb. 26a).

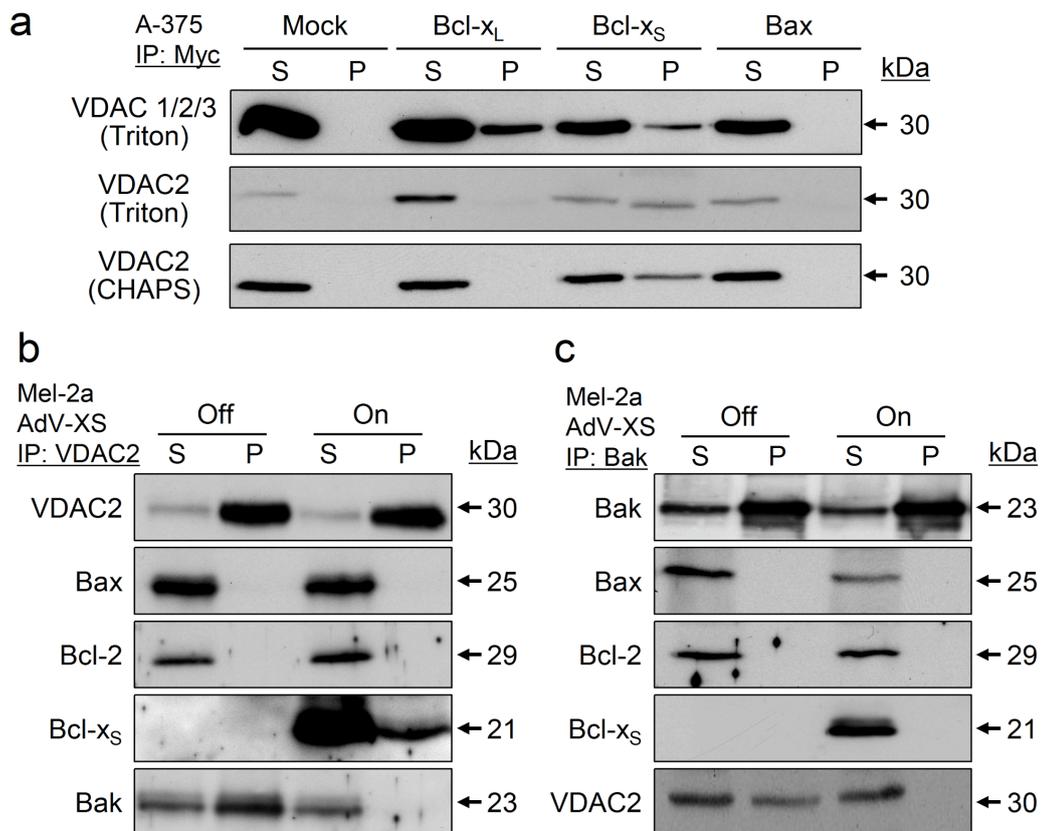


Abb. 26: **Bcl-x_S stört die Interaktion zwischen VDAC-Bak.** (a) Immunpräzipitationen mit anti-Myc-Antikörpern wurden in A-375 Zellen nach Transfektion mit Myc-getaggtten Kopien von Bcl-x_L, Bcl-x_S oder Bax generiert. Kontrollen wurden Mock-transfiziert (pcDNA3). Koimmunpräzipitation von einem der drei VDAC-Proteine mit Bcl-x_L oder Bcl-x_S wurde im Western Blot mit einem nicht-spezifischen Antikörper (VDAC 1/2/3) und mit einem selektiven Antikörper für VDAC2 überprüft. Die Lyse der Zellen wurde sowohl mit Triton X-100 als auch CHAPS-haltigem Lysepuffer durchgeführt. Interaktionen sind in der immunpräzipitierten Pelletfraktion (P) zu sehen. (b) Mel-2a Zellen wurden transduziert mit AdV-XS und unter OFF- oder ON-Bedingungen kultiviert. Lysate wurden mit einem anti-VDAC2-Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe in der P-Fraktion wurden mittels Western Blot auf die Bindung von Bcl-x_S mit endogenem VDAC2 und mit Bax, Bcl-2 und Bak analysiert. Es wurden der Überstand (S) und die immunpräzipitierte Pelletfraktion (P) verglichen. (c) Ein reziprokes Experiment basierte auf der Immunpräzipitation mit einem anti-Bak-Antikörper. Für alle Immunpräzipitationen wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt, die vergleichbare Ergebnisse lieferten.

Dieser Befund weist stark darauf hin, dass VDAC1, wie schon publiziert, mit Bcl-x_L interagiert (Vander Heiden et al, 2001; De Stefani et al, 2012) und VDAC2 selektiv mit Bcl-x_S interagiert. Um die Interaktion zwischen Bcl-x_S und VDAC2 zu bestätigen, kam ein Plasmid für die Überexpression eines Myc-getaggtten VDAC2 zum Einsatz. Die spezifische Präzipitation des Myc-getaggtten VDAC2 wurde durch die Immunpräzipitation mit einem anti-Myc-Antikörper sichergestellt. Auch unter diesen streng definierten Bedingungen zeigte die Analyse der Koimmunpräzipitation eine spezifische Interaktion zwischen Bcl-x_S und VDAC2 (Abb. 27a). Die Bedeutung dieser Interaktion in der Regulation der Apoptose wurde in Mel-2a mittels Immunpräzipitation von endogenem VDAC2 und Bak getestet. Nach der Immunpräzipitation von VDAC2 wurde die Interaktion von VDAC2 mit Bak unter Bcl-x_S-OFF-Bedingungen klar

sichtbar. Auch nach Induktion von Bcl-x_S konnte die Interaktion zwischen VDAC2 und Bcl-x_S reproduziert werden (Abb. 26b). Die Tatsache, dass die Interaktion von Bcl-x_S mit VDAC2 in einer kompletten Auflösung des VDAC2-Bak-Komplexes resultierte und zu einem Freiwerden von Bak führte, steht in einem hohen mechanistischen Zusammenhang (Abb. 26b). Eine Bestätigung dieser Interaktion zeigte sich nach Immunpräzipitation von Bak in einem reziproken Ansatz. Die Interaktion von Bak und VDAC2 wurde hier erneut unter Bcl-x_S-OFF-Bedingungen sichtbar, während keine Interaktion zwischen Bak und Bcl-x_S nachgewiesen werden konnte. Erneut führte die Bcl-x_S-Überexpression zu einer Auflösung des VDAC2-Bak-Komplexes (Abb. 26c). Die Regulation wurde auch nach VDAC2 (Myc-getaggt) Überexpression untersucht. Es konnte wiederum gezeigt werden, dass beide, Bak und Bcl-x_S, an VDAC2 binden. In Folge der starken Expression von VDAC2 konnte keine komplette Verdrängung von Bak aus dem VDAC2-Bak-Komplex beobachtet werden (Abb. 27a). Das Verdrängen von Bak aus dem VDAC2-Bak-Komplex nach Bcl-x_S-Überexpression wurde nochmals in A-375 Melanomzellen nach Scramble siRNA-Transfektion beobachtet (Abb. 27b, linkes Feld). Die Interaktion von Bcl-x_S mit VDAC2 scheint unabhängig von der Bak-Expression selbst zu sein, da diese auch unter Bak-Knockdown-Bedingungen beobachtet wurde (Abb. 27b, rechtes Feld).

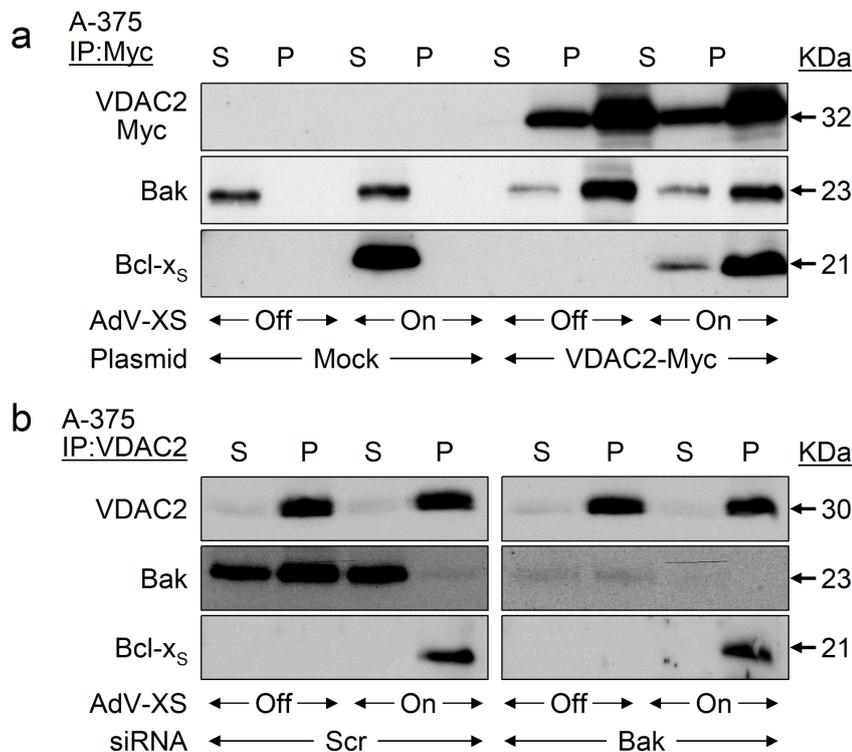


Abb. 27: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 27: **Bindung von Bcl-x_S an VDAC2 nach VDAC2-Myc-Überexpression und Bak-Knockdown.** (a) Eine Immunpräzipitationsanalyse wurde nach Transfektion mit einem Myc-getaggten VDAC2 Plasmid (pcDNA3-VDAC2-Myc) durchgeführt. Kontrollen wurden Mock-transfiziert (pcDNA3). Selektive VDAC2-Immunpräzipitationen wurden mit einem anti-Myc-Antikörper durchgeführt. (b) VDAC2-Immunpräzipitate wurden in A-375 Zellen nach siRNA vermitteltem Bak-Knockdown oder Sramble siRNA-Behandlung (Scr) generiert. Darstellung der Bcl-x_S-Bindung an VDAC2 (a, b). Für alle Immunpräzipitationen wurden jeweils zwei unabhängige Experimente durchgeführt, die vergleichbare Ergebnisse lieferten.

2.2.6. Blockierung der Bcl-x_S-induzierten Apoptose durch VDAC2

Die dominante Rolle von VDAC2 für Bcl-x_S zeigte sich darin, dass die Bcl-x_S vermittelte Apoptose in A-375 Melanomzellen durch die VDAC2-Überexpression nach 24 h und 48 h stark reduziert wurde (Abb. 28a). Im Vergleich dazu wurde die Bik/Nbk-induzierte Apoptose kaum durch die VDAC2-Überexpression beeinflusst, was den selektiven Effekt von VDAC2 auf Bak unterstreicht (Abb. 28a). In Übereinstimmung damit zeigte ein reziproker Ansatz, bei dem VDAC2 mittels siRNA herunterreguliert wurde, eine signifikante Induktion der Apoptose von bis zu 15% ohne Bcl-x_S-Überexpression (Abb. 28b). Der proapoptotische Effekt von Bcl-x_S wurde nach VDAC2-Herunterregulation etwas reduziert, welches die Bcl-x_S-Abhängigkeit von VDAC2 unterstützte. Die restliche proapoptotische Aktivität - trotz der VDAC2-Herunterregulation - könnte mit der zusätzlichen Bcl-x_S-Aktivität, wie zum Beispiel der Inaktivierung von Bcl-x_L, zusammenhängen (Abb. 28b).

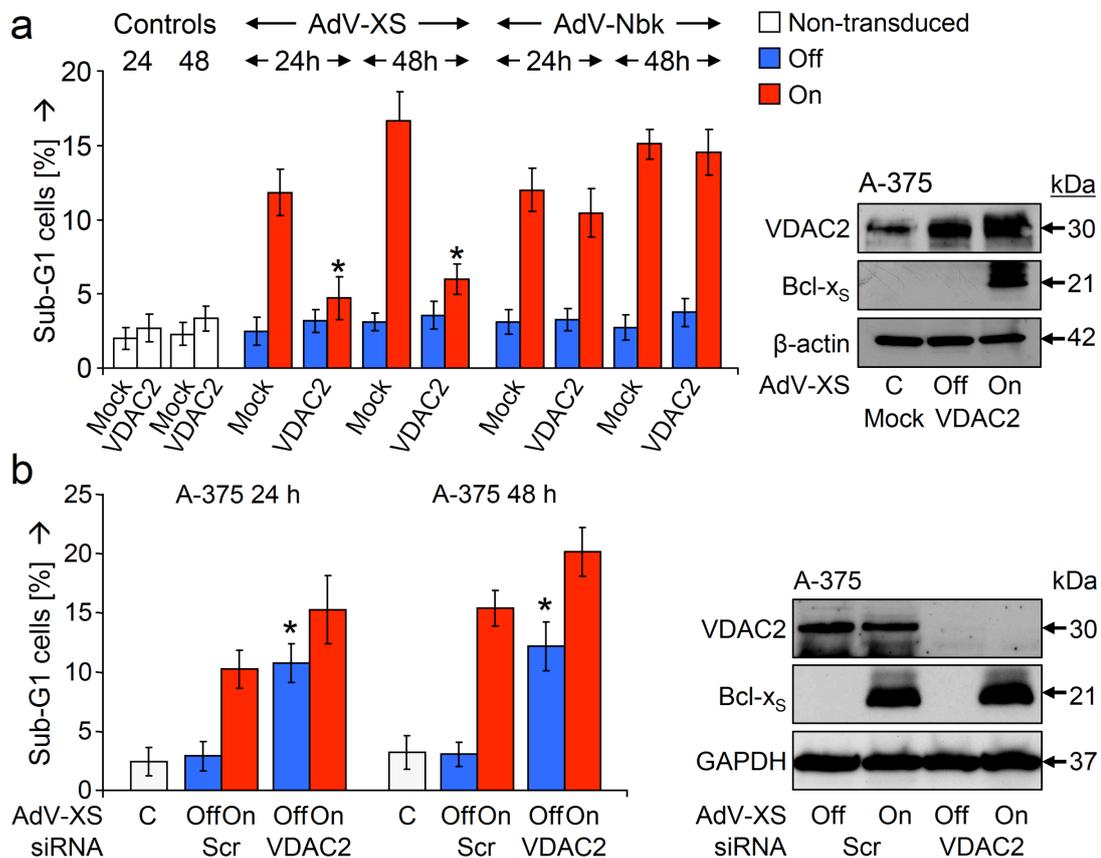


Abb. 28: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 28: **Darstellung der Bcl-x_S-Apoptose nach VDAC2-Überexpression und VDAC2-Knockdown.** (a) Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellpopulation (sub-G1) wurde in A-375 nach transients Transfektion mit einem VDAC2-Expressionsplasmid (pCMV-Sport6-VDAC2) und nach Transduktion mit AdV-XS (MOI = 50) bestimmt. Die Zellen wuchsen unter ON- und OFF-Bedingungen für 24 h und 48 h. Die Transduktion startete 16 h nach transients Transfektion. Die Überexpression von VDAC2 und Bcl-x_S wurde 48 h nach Transduktion mittels Western Blot bestimmt. (b) Die Apoptoseinduktion (sub-G1-Zellen) ist in A-375 nach siRNA vermitteltem VDAC2-Knockdown als auch 24 h und 48 h nach Bcl-x_S-Induktion gezeigt. Die Transduktion startete 16 h nach transients Transfektion. Die Expression von VDAC2 und Bcl-x_S ist 48 h nach Transduktion gezeigt. Scramble siRNA-transfizierte Zellen (Scr) sind als Kontrolle gezeigt. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs individuellen Werten sind gezeigt. Die statistische Signifikanz ($p < 0.05$) ist durch Sterne angegeben.

Insgesamt klären die Daten den proapoptischen Mechanismus von Bcl-x_S auf, der selektiv über den Bak-Pfad agiert und auf der Trennung des VDAC2-Bak-Komplexes durch Bcl-x_S basiert. Demzufolge löst das Freiwerden von Bak den mitochondrialen Apoptosesignalweg in Melanomzellen aus. Das untenstehende Modell schlägt bei diesem Ansatz eine dominante antiapoptische Funktion von Bcl-x_L und Mcl-1 vor, während Bcl-2 über einen anderen Arm agiert (Abb. 29).

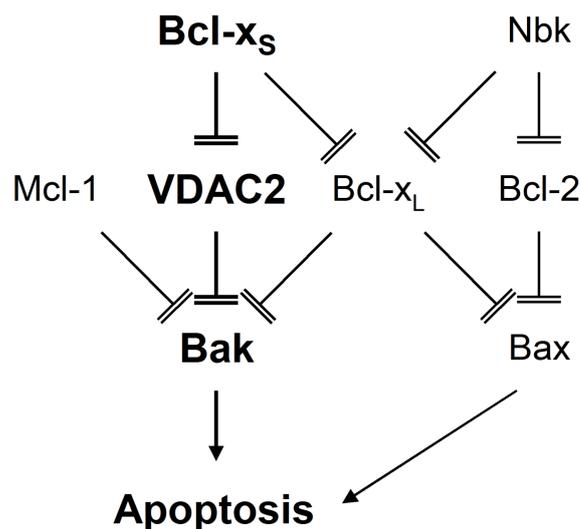


Abb. 29: **Modell für die Bcl-x_S-induzierte Apoptose.** Das vorgeschlagene Modell zeigt, dass Bcl-x_S Bak durch die Neutralisation des antiapoptischen VDAC2-Proteins aktiviert. Die Bcl-x_S-induzierte Apoptose ist durch Bcl-x_L und Mcl-1 negativ kontrolliert, während Bcl-2 Bax kontrolliert.

2.3. Untersuchung der Apoptoseinduktion auf der Basis des proapoptotischen Bcl-2-Proteins, Bim_L

2.3.1. Die komplette Aufhebung der Zellproliferation in Melanomzellen durch Bim_L-Reexpression

Um die Rolle von Bim_L in der Apoptoseregulation in Melanomzellen zu untersuchen, wurde die Expression von Bim_L in kultivierten Melanomzellen mittels Western Blot Analyse untersucht. Eine signifikante Expression von Bim_{EL} (24 kDa), Bim_L (21 kDa) und Bim_S wurde in der kutanen T-Zell-Lymphom-Zelllinie HuT-78 gesehen, die als Positivkontrolle diente. Auch Primärkulturen von humanen Melanozyten (NHM) zeigten eine schwache Expression vom Bim_{EL}, während die Expression in einer Reihe von vier verschiedenen Melanomzelllinien (Mel-2a, Mel-HO, A-375, SK-Mel-13) und zwei Primärkulturen (M-186, M-221) von Melanomhautmetastasen nur sehr schwach bzw. verloren war (Abb. 30a).

Für die Bim-Reexpression wurde ein adenoviraler Vektor (AdV-BimL) mit einer Myc-getaggten Bim_L cDNA, die unter der Kontrolle eines Tet-OFF-Promotors steht, verwendet. Dieser Vektor wurde nach dem gleichen Prinzip wie AdV-AK, AdV-XS und AdV-Nbk konstruiert (Abb. 30b). AdV-BimL vermittelt ohne Doxycyclin (ON-Bedingungen) eine hohe Expression von Bim_L in Melanomzellen, während die Zugabe von Doxycyclin die Expression aufhebt (OFF-Bedingungen, Abb. 30c). Nach der Bim_L-Expression wurden charakteristische morphologische Veränderungen, wie abgerundete und abgelöste Zellen, sichtbar (Abb. 30d).

Die Zellproliferation, bestimmt durch die WST-1-Untersuchung, nahm mit der Zeit stark ab und erreichte nach 72 h in Mel-2a einen Wert, der im Vergleich zu den Zellen, die unter OFF-Bedingungen kultiviert wurden, unter 10% lag (Abb. 30e). Die Echtzeit-Zellanalyse (Real-Time Cell Analysis – RT-CA) zeigte ein komplettes Ablösen der Mel-HO und A-375 Zellen 48 h nach Transduktion und Induktion der Bim_L-Expression (Abb. 30f). Diese Untersuchung zeigte, dass Bim_L in Melanomzellen eine außergewöhnlich hohe Effizienz besitzt.

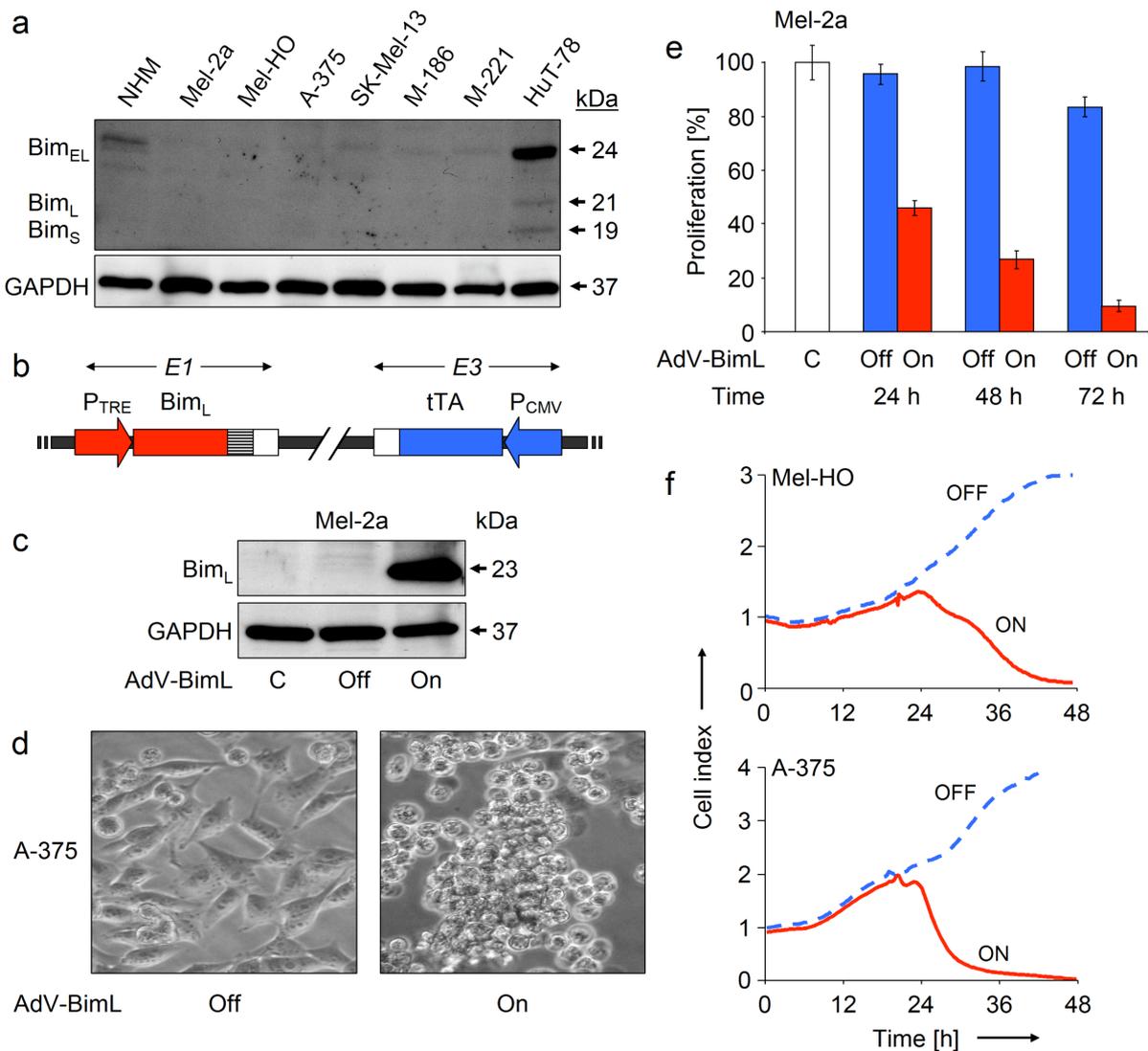


Abb. 30: **Komplette Aufhebung der Melanomzellproliferation durch die Reexpression von Bim_L.** (a) Expression der Bim-Isoformen (EL, L, S) in Melanomzellen (Western Blot Analyse). Kontrollen: Normale humane Melanozyten (NHM), HuT-78. (b) Gezeigt ist die Struktur von AdV-BimL. Die Bim_L cDNA, die unter der Kontrolle eines Tetracyclin-kontrollierten Promotors (P_{TRE}) steht, wurde in die adenovirale E1-Region subkloniert. Die E3-Region wiederum wurde durch einen Tetracyclin-kontrollierten Transkriptor (tTA), der unter der Kontrolle eines CMV-Promotors (P_{CMV}) steht, ausgetauscht. Der tTA vermittelt hierbei die Tet-OFF-Regulation, während die gestreiften Boxen die poly(A) Regionen kennzeichnen. (c) Induzierbare Expression von Bim_L (Western Blot) in Mel-2a 24 h nach AdV-BimL-Transduktion (MOI = 50). Die Zellen hatten entweder Doxycyclin erhalten (OFF-Kondition) oder wurden ohne gehalten (ON-Kondition). (d) Morphologische Veränderungen von A-375 Zellen 24 h nach Transduktion mit AdV-BimL (MOI = 50) unter OFF- und ON-Bedingungen. (e) Zellproliferation (WST-1-Untersuchung) in Mel-2a - ausgedrückt in Prozent - bezogen auf die nicht behandelte Kontrolle (Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachwerten). (f) Zellproliferation in Echtzeit von Mel-HO und A-375 (xCELLigence). Der Zellindex ist ein Maß für die Zelladhäsion; AdV-BimL-Transduktion (50 MOI) bei t=0. (e, f) Jeweils zwei unabhängige Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

2.3.2. Effiziente Apoptoseinduktion durch den mitochondrialen Signalweg

Bim_L induziert, wie anhand der zeitkinetischen Analyse zu sehen ist, effizient Apoptose (Abb. 31a). Die Apoptose wurde mittels Zellzyklusanalyse bestimmt, welche einen dramatischen Anstieg von Zellen mit fragmentierter DNA (sub-G1) anzeigte (Abb. 31a, 31b, 31d). Die Apoptose begann nach 8 h und steigerte sich mit der Zeit auf 60-80% apoptotischer Zellen (72

h) in Mel-2a, Mel-HO und A-375 (Abb. 31b). Die Bim_L-induzierte Apoptose zeichnet sich als schneller und effizienter Aktivierungssignalweg aus. Diese induzierte Apoptose war bereits nach 24 h mit einer ausgeprägten Prozessierung der Haupteffektorcaspase 3 (15, 17 kDa Spaltprodukte) assoziiert (Abb. 31c). Eine signifikante Prozessierung der Initiatorcaspase 9 wurde durch den Verlust der 47 kDa großen Proform und durch das Erscheinen der Spaltprodukte (35, 37 kDa) bestimmt. Die Aktivierung der Caspase 9 zeigte klar die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges (Abb. 31c).

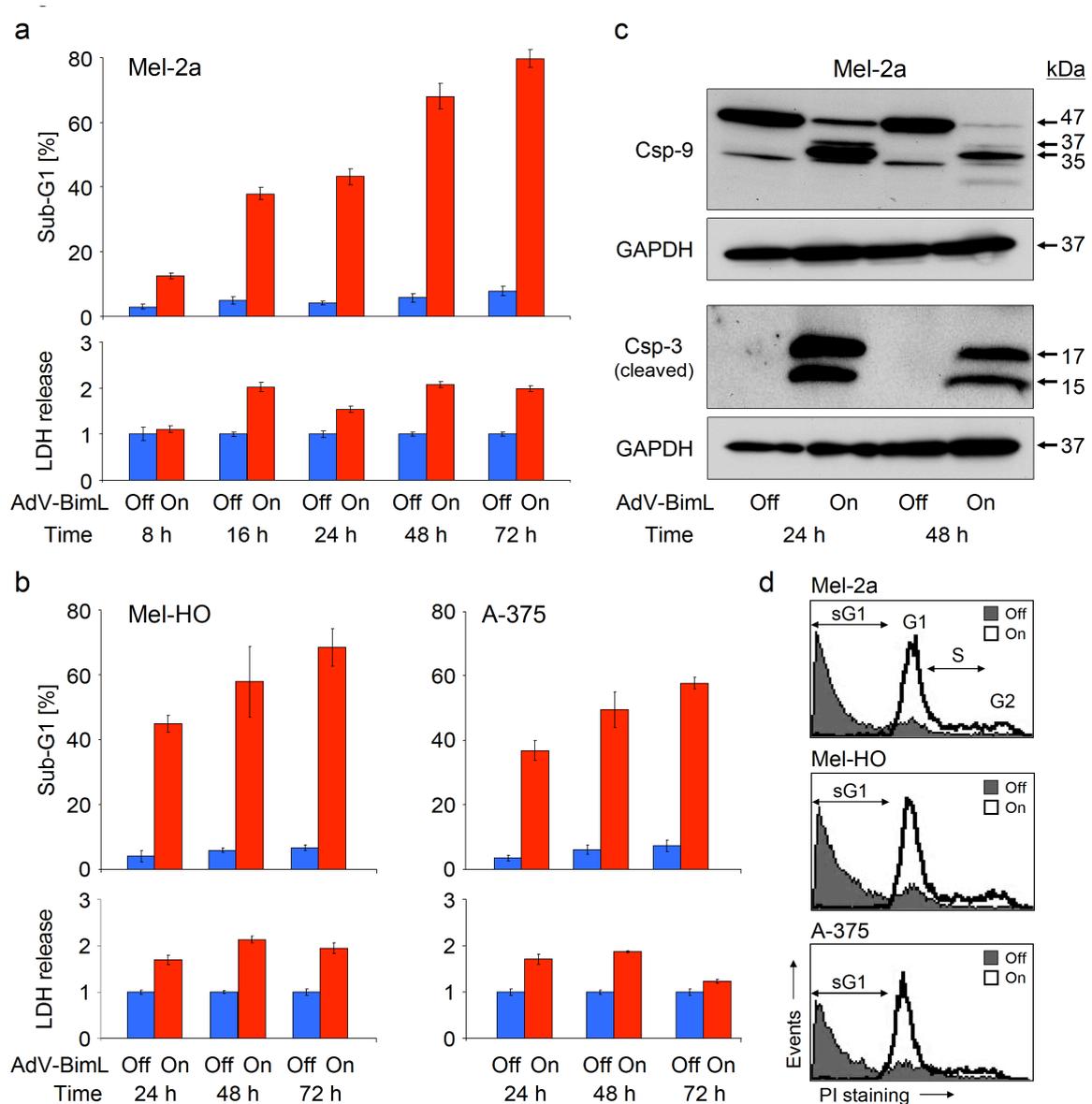


Abb. 31: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 31: **Effiziente Apoptoseinduktion durch AdV-BimL.** (a, b) Zeitabhängige Apoptose (sub-G1-Zellen) und Zytotoxizität (LDH-Freisetzung aus den Zellen) wurden in Mel-2a 8, 16, 24, 48 und 72 h nach AdV-BimL-Transduktion (50 MOI, OFF-/ON-Bedingungen) bestimmt. Die Zytotoxizitätswerte wurden auf die Werte der transduzierten Zellen unter OFF-Bedingungen normalisiert. Vergleichbare Analysen wurden für Mel-HO und A-375 nach 24, 48 und 72 h durchgeführt. (c) Die Caspase 9 und Caspase 3 Prozessierung ist in Mel-2a 24 h und 48 h nach Transduktion (50 MOI) gezeigt. GAPDH dient als Ladekontrolle. (d) Beispiele der Apoptoseinduktion in Mel-2a sind nach 72 h als Overlay gezeigt (OFF-/ON-Bedingungen). Zellzyklusphasen sind angezeigt (sub-G1, G1, S and G2). Zwei unabhängige Experimente lieferten jeweils vergleichbare Ergebnisse.

Die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges wurde durch den dramatischen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ sichtbar, welches bereits nach 8 h in Mel-2a auftrat und sich für Mel-HO und Mel-2a Zellen auf $> 90\%$ 24 h nach der Transduktion steigerte. Für Mel-2a, MelHO und A-375 zeigte sich ein kompletter Verlust von $\Delta\psi_m$ 48 h nach Transduktion mit AdV-BimL. Parallel dazu verlief die Apoptose etwas verspätet (Abb. 32a). Der starke und frühe Verlust von $\Delta\psi_m$ deutet darauf hin, dass die mitochondriale Antwort als ein frühes Ereignis in der Bim_L vermittelten Apoptose zu sehen ist. Besonders deutlich war die starke Abgabe von proapoptotischen Faktoren (Cytochrom c, AIF und Smac) bereits 8 h nach Transduktion, welches durch die Analyse der cytosolischen Extrakte mittels Western Blot Analyse bestimmt wurde (Abb. 32b).

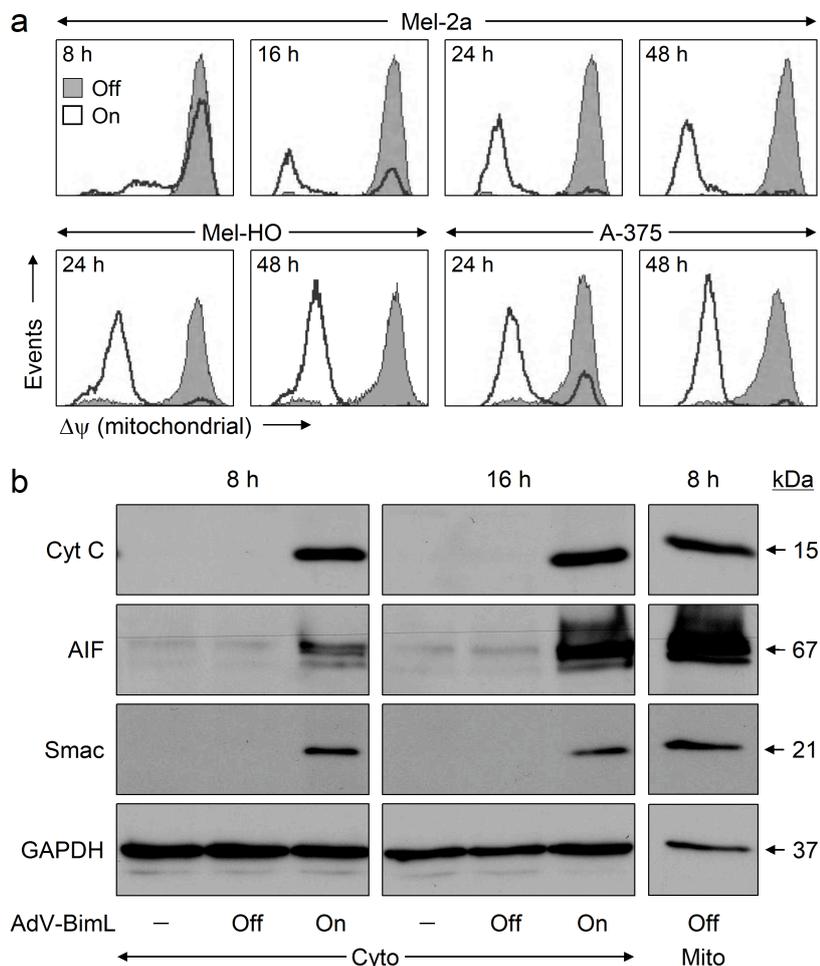


Abb. 32: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 32: **Mitochondriale Aktivierung durch Bim_L**. (a) Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) ist sowohl für Mel-2a zwischen 8 h und 48 h gezeigt als auch für Mel-HO und A-375 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-BimL (50 MOI). Overlays der ON-Bedingungen (offene Graphen) und OFF-Bedingungen (grau) sind gezeigt. (b) Cytosolische Fraktionen (Cyto) wurden von Mel-2a zu 8 h und 16 h nach Transduktion angefertigt. Zellen unter ON- und OFF-Bedingungen als auch nicht transduzierte Zellen (-) sind gezeigt. Eine mitochondriale Fraktion (Mito, nicht-transduziert, 8 h) dient als Kontrolle für die mitochondriale Proteinexpression und GAPDH diente als Ladekontrolle. (a, b) Jedes der zwei durchgeführten Experimente lieferte vergleichbare Ergebnisse.

2.3.3. Aktivierung von Bax und Bak

Die Induktion der Apoptose durch Bim_L via Bax oder Bak wurde auch für AdV-BimL in HCT116 Kolonkarzinomzellklonen überprüft, die entweder einen Bax-Knockout, Bak-Knockdown oder einen Doppelknockdown für Bax und Bak hatten (Abb. 33a). Die HCT116 Parentalzellen (Bax⁺/Bak⁺) waren ähnlich ansprechbar auf AdV-BimL wie die Melanomzellen und reagierten mit bis zu 60% apoptotischer Zellen nach 48 h. Sowohl unter Bax-Knockout- als auch unter Bak-Knockdown-Bedingungen kam es zu einer effizienten Apoptosinduktion (35% - 40%), was zeigte, dass Bim_L in der Lage war, beide Signalwege zu aktivieren. Nur in den Bax⁻/Bak⁻-Doppelknockdown-Zellen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose (15%). Dies zeigte, dass die Bim_L induzierte Apoptose abhängig vom mitochondrialen proapoptotischen Signalweg ist (Abb. 33a).

Die mitochondrialen Level der Bcl-2-Proteine hätten durch die Bim_L-Apoptoseinduktion verändert sein können. Dies war für Bcl-2, Mcl-1 oder Bak, welche sehr deutlich an den Mitochondrien lokalisiert waren, nicht der Fall (Abb. 33b).

Die basalen mitochondrialen Level von Bax waren unter OFF-Bedingungen sehr schwach und verstärkten sich signifikant 8 h nach Bim_L-Induktion, was auf eine Aktivierung von Bax hindeutete (Abb. 33b). Das bedeutet, dass Bim_L in der Lage war, die einzelnen Defizienzen zu überwinden und so die Apoptose entweder mit Bax oder Bak induzieren konnte.

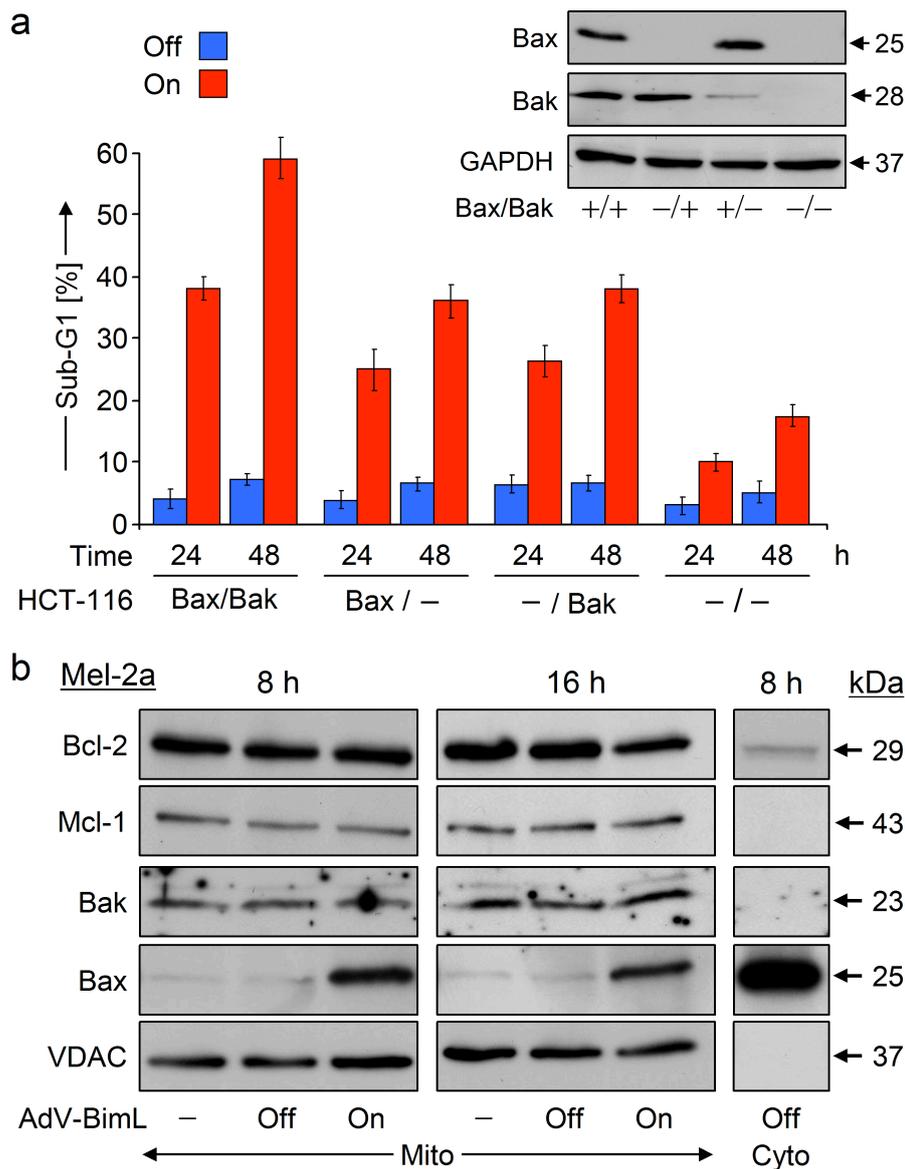


Abb. 33: **Bim_L aktiviert Bax und Bak.** (a) Die Apoptoseinduktion durch AdV-BimL wurde nach 24 h und 48 h in parentalen HCT116 Zellen (Bax+/Bak+), Bak-Knockdown, Bax-Knockout und Doppelknockdown-Zellen (OFF-/ON-Bedingungen) bestimmt. Die Bax- und Bak-Expression ist als eingefügte Abbildung gezeigt (Western Blot, GAPDH diente als Ladekontrolle). (b) Mitochondriale Extrakte (Mito) wurden von Mel-2a Zellen 8 h und 16 h nach Transduktion angefertigt. Die mitochondriale Lokalisation von Bcl-2, Mcl-1, Bak und Bax wurde unter OFF- und ON-Bedingungen mittels Western Blot Analyse und im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (-) untersucht. Die cytosolische Fraktion (Cyto, OFF, 8 h) zeigt zur Kontrolle auch die cytosolische Lokalisation der Proteine; VDAC diente als mitochondriale Ladekontrolle und war in den cytosolischen Extrakten negativ. Jedes der zwei durchgeführten Experimente lieferte vergleichbare Ergebnisse.

2.3.4. Überwindung der durch antiapoptotisches Bcl-2 vermittelten Resistenz in Melanomzellen durch Bim_L

Eine hohe Aktivität der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine ist für Melanomzellen charakteristisch. Darüber hinaus war eine Bcl-2-Überexpression in A375-Bcl-2 in der Lage, sowohl die Todesliganden vermittelte als auch die ROS (Reaktive Sauerstoffradikale)

vermittelte Apoptose im Vergleich zu Mock-transfizierten Zellen (A375-Mock) komplett zu blockieren (Raisova et al, 2001; Kurbanov et al, 2005; Franke et al, 2010).

Bim_L induzierte in den A375-Mock Zellen 48 h nach Transduktion effizient Apoptose von bis zu 45%. Im Vergleich dazu wurde durch die Überexpression des BH3-only Proteins Bik/Nbk (AdV-NBK) ebenfalls eine, wenn auch signifikant schwächere Apoptose, induziert (Abb. 34a). Ein prinzipieller Unterschied wurde in A375-Bcl-2 deutlich. Während die AdV-NBK-induzierte Apoptose komplett durch die hohe Bcl-2-Expression blockiert wurde, hatte dies nahezu keinen Effekt auf die Bim_L-induzierte Apoptose (40% nach 48 h; Abb. 34b, 34c). Die Expression von Bcl-2 und Bim_L wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt (Abb. 34d). Wie in den A-375 Parentalzellen (Abb. 32a) und A375-Mock Zellen führte Bim_L auch in den A375-Bcl-2 Zellen zu einem signifikanten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ (Abb. 34e). Daraus folgt, dass eine starke Bcl-2-Überexpression nicht in der Lage war, die Bim_L vermittelte Apoptose zu blockieren.

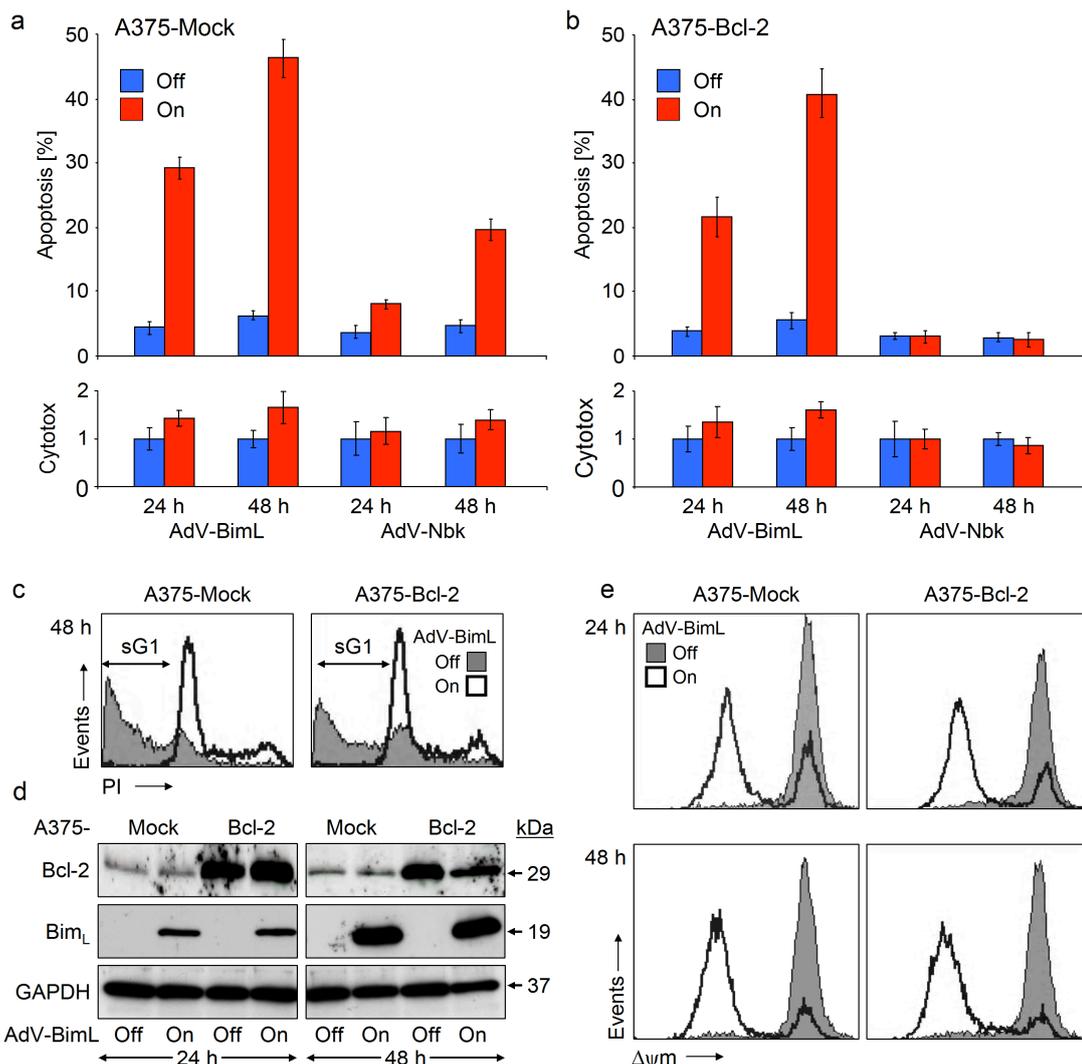


Abb. 34: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abb. 34: **Bim_L überwindet die antiapoptotische Aktivität von Bcl-2.** (a, b) A-375 Zellklone, welche Mock-transfiziert (a, A375-Mock) oder stabil mit einem Bcl-2-Überexpressionskonstrukt transfiziert waren (b, A375-Bcl-2), wurden mit AdV-BimL und AdV-Nbk (OFF-/ON-Bedingungen) transduziert. Die Induktion der Apoptose (sub-G1-Zellen) wurde nach 24 h und 48 h bestimmt. Die Diagramme für die Zytotoxizität (LDH-Freisetzung) sind unterhalb der Apoptosedigramme dargestellt. (c) Beispiele für die Apoptoseinduktion sind für A-375-Mock und A375-Bcl-2 (48 h nach AdV-BimL Transduktion) gezeigt. (d) Expression von Bcl-2 und Bim_L in A-375-Mock und A375-Bcl-2 24 h und 48 h nach Transduktion (Western Blot Analyse). (e) Verlust von $\Delta\psi_m$ in A-375-Mock und A375-Bcl-2 24 h und 48 h nach Transduktion mit AdV-BimL (Durchflusszytometrie; OFF-/ON-Bedingungen). (a-e) Zwei unabhängige Experimente mit jeweils Dreifachwerten lieferten vergleichbare Ergebnisse.

2.3.5. Bindung von Bim_L an alle antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie in Melanomzellen

Um zu verstehen, auf welche Weise Bim_L seine effiziente Apoptoseinduktion vermittelt, wurde die Interaktion von Bim_L mit verschiedenen Bcl-2-Proteinen in transduzierten Melanomzellen nach Immunpräzipitation von transduziertem Bim_L untersucht. Eine nahezu komplette Präzipitation von Bim_L durch die anti-Myc-Antikörper wurde in der Pelletfraktion (P) unter ON-Bedingungen sichtbar. Dementsprechend war in der S-Fraktion weder unter OFF- noch unter ON-Bedingungen Bim_L detektierbar (Abb. 35). Es konnte keine Interaktion von Bim_L mit Bax oder Bak 16 h nach Transduktion detektiert werden. Jedoch zeigte sich aber eine klare Interaktion mit allen vier repräsentativen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-x_L und Bcl-w), die als deutliche Signale unter ON-Bedingungen in der P-Fraktion sichtbar wurden (Abb. 35). Dies legt nahe, dass der hohen Effizienz von Bim_L in Melanomzellen eine gleichzeitige Inhibition aller antiapoptotischen Bcl-2-Proteine zugrunde liegt.

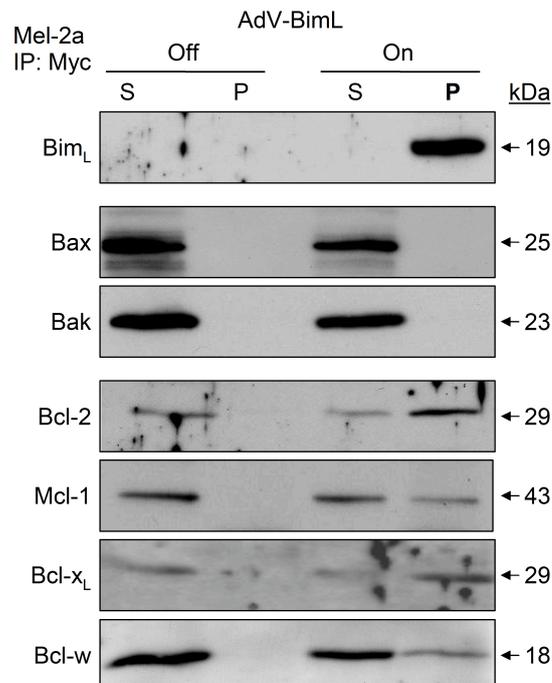


Abb. 35: **Bindung von Bim_L an alle antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie.** Myc-getaggetes Bim_L wurde 16 h nach AdV-BimL-Transduktion unter OFF- und ON-Bedingungen mit einem anti-Myc-Antikörper immunpräzipitiert. Die koimmunpräzipitierten Proteine der Bcl-2-Familie wurden mittels Western Blot analysiert. Der Überstand (nicht gebunden, S) wurde mit der Pelletfraktion (gebunden, P) verglichen. Zwei unabhängige Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

3. Diskussion

3.1. Apoptoseinduktion auf der Basis von Bcl-x_{AK}

3.1.1. Alternative Splicevarianten und Ähnlichkeiten von Bcl-x_{AK} mit anderen atypischen Domänenstrukturen

Pro- und antiapoptotische Bcl-2-Proteine sind entscheidend an der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalweges beteiligt (Tait und Green, 2010). Ihre ohnehin schon hohe Anzahl wird durch differentielles Splicing weiter erhöht, was zu einer zusätzlichen Komplexität beiträgt. Für das *bim*-Gen allein wurden bisher bis zu zehn verschiedene Spliceprodukte beschrieben, wie zum Beispiel Bim_S, Bim_L und Bim_{EL}. Des Weiteren sind acht verschiedene Spliceprodukte für das *Bax*-Gen mit unterschiedlichen Domänenstrukturen bekannt, von denen Bax- α das am besten charakterisierte ist (Akgul et al, 2004; Ewings et al, 2007). Ein weiteres Beispiel stellt das *bcl-x*-Gen dar, welches in bis zu vier bekannten Isoformen mit unterschiedlichen Aktivitäten exprimiert wird. Neben Bcl-x_L (long) wurde auch Bcl-x_{ES} (extra short) als antiapoptotisch beschrieben (Schmitt et al, 2004; Moore et al, 2010). Im Vergleich dazu wurden Bcl-x_S (short) und Bcl-x_{AK} (atypical killer) als proapoptotisch beschrieben (Boise et al, 1993; Hossini et al, 2006). Der Wechsel von Bcl-x_L zu Bcl-x_S wurde in Verbindung mit einem ATM/CHK2/p53-abhängigen Signalweg als Reaktion auf genotoxischen Stress beschrieben (Shkreta et al, 2010). Der Signalweg, der die Expression von Bcl-x_{AK} auslöst, ist bis jetzt noch nicht bekannt. Die Bcl-2-Proteine sind je nach Domänenstruktur in drei unterschiedliche Subfamilien eingeteilt, wie die Gruppe der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine (BH 1-4), die Gruppe der proapoptotischen Bax/Bak-Proteine (BH 1-3) und die Gruppe der proapoptotischen BH3-only Proteine (Chipuk et al, 2010). Hierbei gelten die *bcl-x* Spliceprodukte aufgrund ihrer Sequenzen als einzigartig. Demzufolge umfasst Bcl-x_S die Domänen BH3 und BH4 (Akgul et al, 2004), während Bcl-x_{AK} nur die BH2- und BH4-Domänen besitzt (Hossini et al, 2006). Ungeachtet dessen gilt die BH3-Domäne für die proapoptotische Funktion als unabkömmlich. Obwohl Bcl-x_{AK} keine BH3-Domäne besitzt, wurde es basierend auf seiner moderaten Apoptoseinduktion nach einer Plasmidtransfektion in Melanomzellen als proapoptotisch eingestuft (Hossini et al, 2006). Für die weiteren Untersuchungen des Bcl-x_{AK} vermittelten Signalweges haben wir einen adenoviralen Vektor konstruiert, welcher eine hohe und konditionale Expression unter der Kontrolle eines Tet-OFF-Promotors vermittelte. Mit diesem effizienten Expressionssystem

zeigte Bcl-x_{AK} eine starke Induktion der Apoptose in bis zu 40% der Melanom- und 50% der Nicht-Melanomzellen. Die Effizienz war vergleichbar mit der von anderen proapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern, wie hier für das BH3-only Protein Bik/Nbk gezeigt.

3.1.2. Mitochondrial abhängige Apoptoseinduktion durch Bcl-x_{AK}

Darüber hinaus wurde unter diesen Bedingungen eine signifikante Induktion der Caspasen deutlich sichtbar. Dies steht im Gegensatz zu früheren Befunden, die unter moderaten Apoptoseinduktionsbedingungen entstanden (Hossini et al, 2006). Demzufolge scheint die Caspasenaktivierung durch Bcl-x_{AK} von seinem Expressionlevel in Melanomzellen abhängig zu sein. Die Initiatorcaspasen vom extrinsischen als auch intrinsischen Signalweg (Caspase 8, und 9) wurden prozessiert. Darüber hinaus ist es für Bcl-x_{AK} denkbar, dass die Caspase 8 Downstream der Caspase 3 in einem beschriebenen Verstärkungs-Loop (Slee et al, 2000) aktiviert wird. Die Bcl-2-Proteine sind vorzugsweise in die Kontrolle des mitochondrialen Apoptosesignalweges involviert, der sowohl durch die Überexpression von BH3-only Proteinen als auch durch die Überexpression von Bax oder Bak induziert werden kann (Gillissen et al, 2007; Zhai et al, 2008; Merino et al, 2009; Chipuk et al, 2010). Auch Bcl-x_{AK} resultierte in einem signifikanten Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Abgabe von Cytochrom c, welches klare Parallelen mit anderen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen aufzeigte. Obwohl auch Bax/Bak-unabhängige Mechanismen diskutiert wurden (Kim et al, 2004), steht die mitochondriale Aktivierung hauptsächlich mit der Funktion von Bax/Bak in Verbindung (Chipuk et al, 2010). Des Weiteren zeigten sich in der starken Abhängigkeit der induzierten Apoptose von Bax oder Bak weitere Parallelen zwischen den typischen charakteristischen Eigenschaften der proapoptotischen Bcl-2-Proteine und Bcl-x_{AK}. Beide, Bax und Bak, weisen ähnliche Strukturen und Funktionsweisen auf (Chipuk und Green, 2008). Für einige Bcl-2-Proteine ist eine Präferenz für die Aktivierung von Bax oder Bak beschrieben. Für Bik/Nbk und Bid ist eine Präferenz für Bax (Gillissen et al, 2007; Chipuk et al, 2010) und für Bcl-x_S eine Präferenz für die Bak-induzierte Apoptose beschrieben (Lindenboim et al, 2005). Für Bcl-x_{AK} hingegen konnte die Bak-Expression den Verlust von Bax kompensieren und umgekehrt, während die Apoptose in den Bax/Bak-Doppelknockdown-Zellen aufgehoben wurde. Dies könnte darauf hinweisen, dass Bcl-x_{AK} via Lokalisation an die Mitochondrien generelle Veränderungen an der mitochondrialen Membran verursacht und weniger selektiv über das eine oder andere Protein die Apoptoseinduktion vermittelt.

3.1.3. Keine Hemmung der mitochondrialen Lokalisation von Bcl-x_{AK} durch Bcl-2

Interessanterweise waren alle Melanomzellen ansprechbar auf Bcl-x_{AK}, was sich darin widerspiegelte, dass die gesamte Zellpopulation eine Reduzierung von $\Delta\psi_m$, eine Erhöhung von ROS und eine Aktivierung von Bax und Bak zeigte. Allerdings könnte ein bestimmter Schwellenwert die volle Apoptosinduktion in der Mehrzahl der Zellen verhindern. Dies könnte in Verbindung mit der Aktivität der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine stehen, die die Aktivierung von Bax und Bak blockieren. Demzufolge verhindert die Überexpression von Bcl-2 die induzierte Apoptose in Melanomzellen durch Bik/Nbk in embryonischen Mausfibroblasten (Cheng et al, 2001). Diese antiapoptotische Aktivität wurde als abhängig von der BH3-Domäne und der BH3 vermittelten Heterodimerisierung beschrieben. Nichtsdestotrotz war der proapoptotische Effekt von Bcl-x_{AK} komplett durch Bcl-2 und Bcl-x_L inhibierbar. Dies ist jedoch weniger von der direkten Inhibition von Bcl-x_{AK} abhängig, sondern vielmehr von der Inhibition von Bax und Bak durch die antiapoptotischen Bcl-2-Proteine. Folglich konnte Bcl-2 die mitochondriale Translokation von Bcl-x_{AK} nicht vermeiden. Für Bcl-x_{AK} war die zeitverzögerte Induktion der Apoptose nach 48 h im Vergleich zu anderen Bcl-2-Proteinen charakteristisch, die wie Bik/Nbk und Bcl-x_S die Apoptose schon nach 24 h induzieren (Hossini et al, 2003; Oppermann et al, 2005). Generell gilt, dass proapoptotische Signale, die gegenseitige Regulation der Bcl-2-Proteine, das Freisetzen von Cytochrom c und die Caspasenaktivierung schnelle zelluläre Ereignisse sind (Kim et al, 2009). Die Verzögerung der Bcl-x_{AK} vermittelten Apoptose im Vergleich zu anderen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen weist auf einen indirekten Mechanismus hin, der einen zeitabhängigen Schritt umfasst. Es konnte keine Beziehung zu der Expression anderer Bcl-2-Proteine hergestellt werden. Stattdessen scheint die mitochondriale Translokation von Bcl-x_{AK} selbst ein kritischer Schritt zu sein. Während Bcl-x_{AK} nach 24 h im Cytosol lokalisiert war, wurde während der Apoptoseinduktion nach 48 h eine Translokation an die Mitochondrien beobachtet. Auch von anderen proapoptotischen Bcl-2-Proteinen ist bekannt, dass sie, um ihre proapoptotische Wirkung zu entfalten, an die Mitochondrien translozieren, wie für Bid und Bax gezeigt wurde (Billen et al, 2008; Tait und Green, 2010). Demzufolge scheint die Bcl-x_{AK} vermittelte Apoptose sehr eng mit seiner Präsenz an den Mitochondrien verbunden zu sein. Schlussendlich resultiert die Translokation von Bcl-x_{AK} in einer Aktivierung von Bax und Bak.

3.1.4. Wirkungsmechanismus von Bcl-x_{AK}

Ein interessanter Befund war, dass der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\psi_m$ der Translokation von Bcl-x_{AK} und MOMP vorausging. Das Verhältnis zwischen $\Delta\psi_m$ und MOMP wird nach wie vor diskutiert; ein Effekt könnte dem anderen vorausgehen oder sie könnten unabhängig voneinander auftreten (Green und Kroemer, 2004; Chipuk et al, 2006). Der Verlust des $\Delta\psi_m$ könnte auch ein Ergebnis der Abkopplung der mitochondrialen Elektronentransportkette sein, was zu einer Oligomerisierung von Bax und Bak führt (Mikhailov et al, 2003). Die mitochondriale Dynamik (Fission, Fusion) scheint ein weiterer wichtiger Faktor zu sein, welcher durch die Bcl-x_{AK}-Überexpression beeinflusst werden könnte. Der Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Dynamik, MOMP und Cytochrom c Freisetzung scheint dabei abhängig von der Bax-Aktivierung zu sein (Martinou und Youle, 2011). Wie bereits vorgeschlagen, führt die Bildung von großen Bax/Bak-Clustern, die ihrerseits an die mitochondrialen Abschnürungsseiten translozieren, zu einer Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (Youle und Karbowski, 2005). Da das Clustering von Bax und Bak eindeutig durch Bcl-x_{AK} induziert wurde, könnte man demzufolge eine weitere Verbindung zu der mitochondrialen Fission (Spaltung) und Fusion (Verschmelzung) erwarten. Für die BH3-only Proteine wurden drei mögliche Mechanismen vorgeschlagen, die ihre proapoptotische Aktivität erklären. In dem Neutralisations/Dislokations-Modell binden BH3-only Proteine an die antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder und führen so zu einem Freisetzen von Bax und Bak (Tait und Green, 2010). Dieser Mechanismus basiert darauf, dass die BH3-Domäne der BH3-only Proteine an die hydrophobe Tasche der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine bindet (Muchmore et al, 1996). Das zweite Modell hingegen basiert auf einer möglichen direkten Interaktion mit Bax, die dann zu einer Aktivierung von Bax führt. Dies wurde sowohl für Bid und Bim als auch für Puma gezeigt und ist ebenfalls abhängig von der BH3-Domäne (Kim et al, 2006; Kim et al, 2009; Du et al, 2010). Auf diese Weise konnte eine, wenn auch schwache Bindung, von Bim_S an Bax gezeigt werden, die durch den Austausch der BH3-Domäne aufgehoben wurde (Merino et al, 2009). Des Weiteren waren auch Peptide mit der BH3-Domäne von Bid, Bim und Puma in der Lage die direkte Interaktion mit Bax einzugehen (Du et al, 2010). In Folge der fehlenden BH3-Domäne bei Bcl-x_{AK} sind beide Wege der Apoptoseinduktion nicht auf Bcl-x_{AK} anwendbar.

Ein kürzlich beschriebener dritter Weg der Apoptoseinduktion basiert auf einem generellen Umgestalten der äußeren mitochondrialen Membran, wie es nach Einlagerung der BH3-only Proteine gezeigt wurde. Dieses Einlagern resultiert dann in einer mitochondrialen Translokation und Aktivierung von Bax (Lomonosova und Chinnadurai, 2008). Hierbei ist von

Interesse, dass diese proapoptotische Aktivität unabhängig von der BH3-Domäne erschien. Für das BH3-only Protein BNIP3 wurde gezeigt, dass die Transmembrandomäne (TM) essentiell für seine proapoptotische Aktivität war und BH3-Mutationen keinen großen Effekt auf die Apoptoseinduktion hatten (Vande et al, 2000). Auch für Bim_S wurde wiederum gezeigt, dass Deletionen oder Punktmutationen zwar die Interaktion mit Bcl-2 und Bax verhinderten, aber so gut wie keinen Effekt auf die Apoptoseinduktion hatten. Bim_S-Mutanten waren immer noch in der Lage an die Mitochondrien zu lokalisieren, was darauf hinweist, dass dies der kritische Schritt war. Demzufolge verlor Bim_S seine proapoptotische Aktivität, als die TM deletiert wurde (Weber et al, 2007). Eine ähnliche Deletionsanalyse könnte für Bcl-x_{AK} besonders für die Lokalisation der proapoptotischen Domäne hilfreich sein, da hier eine überlappende Funktion mit der BH3-Domäne ausgeschlossen werden kann. Spekulationen über proapoptotische Signalwege, unabhängig von der BH3-Domäne, werden durch Bcl-x_{AK} weiter unterstützt. Die gegenwärtige Arbeit zeigt klar, dass diese neuen Signalwege auf der einen Seite unabhängig von der BH3-Domäne sind und auf der anderen Seite wiederum abhängig von anderen Bcl-2-Proteinen.

3.2. Apoptoseinduktion auf der Basis von Bcl-x_S

3.2.1. Apoptoseregulation durch Bcl-2-Proteine

Die Superfamilie der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine ist entscheidend in die Apoptoseinduktion durch den mitochondrialen Signalweg involviert (Chipuk et al, 2010). Die Anzahl der Bcl-2-Proteine und die damit verbundene Komplexität der Regulation werden durch das differentielle Splicing zusätzlich erhöht. Die *bcl-x*-Gen-Spliceprodukte umfassen das antiapoptotische Bcl-x_L (BH 1-4) (Moore et al, 2010), das proapoptotische Bcl-x_{AK}, welches keine BH3-Domäne besitzt (Plötz et al, 2012) und das proapoptotische Bcl-x_S mit seiner einzigartigen Domänenstruktur. Bcl-x_S selbst umfasst die Domänen BH3, BH4 und eine Transmembrandomäne (Boise et al, 1993). Eine Apoptoseinduktion wurde in HeLa Zellen nach einem verstärkten Splicing von Bcl-x_S gesehen (Revil et al, 2009). In lymphatischen Leukämiezellen kommt es im Zuge einer medikamentös induzierten Apoptose zu einer Hochregulation von Bcl-x_S (Willimott et al, 2011). Für das Melanom wurde kürzlich eine Apoptoseinduktion *in vitro* und ein reduziertes Tumorwachstum in Mäusen nach Bcl-x_S-Transfektion gezeigt (Hossini et al, 2003). Demzufolge könnte das Targeting von Bcl-x_S in Krebszellen als ein zusätzlicher therapeutischer Ansatz dienen.

3.2.2. Effiziente Apoptoseinduktion durch Bcl-x_S

Für die Beurteilung der Effizienz und das Aufklären der involvierten Signalwege haben wir einen adenoviralen Vektor verwendet, der die Expression von Bcl-x_S unter Tet-OFF-Bedingungen ermöglicht. Unter diesen Bedingungen zeigte Bcl-x_S sowohl eine signifikante und effiziente Apoptoseinduktion von bis zu 45% in Melanomzellen als auch eine Aktivierung der Caspasen des extrinsischen und intrinsischen Signalweges. Die extrinsische Initiatorcaspase 8 könnte im Zuge der Aktivierung der Caspase 3 nachgeschaltet aktiviert worden sein (Slee et al, 2000), was für die proapoptotischen Bcl-2-Proteine zuzutreffen scheint. Während das Zellüberleben und die Zellproliferation stark beeinflusst wurden, gab es keine Hinweise für eine frühe Beteiligung der Zytotoxizität oder der Autophagie. Dies zeigt ganz eindeutig, dass die Apoptoseinduktion durch Bcl-x_S der primäre Effekt ist. Über die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignaleweges durch Bcl-2-Proteine wurde bereits häufig berichtet (Oppermann et al, 2005; Kim et al, 2006). Auch Bcl-x_S induziert charakteristische Schritte des mitochondrialen Apoptosesignaleweges, wie der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und das Freiwerden von Cytochrom c, AIF und Smac zeigt, was bedeutet, dass Bcl-x_S ähnlich wie andere proapoptotische Bcl-2-Proteine wirkt.

Sowohl für embryonische Mausfibroblasten als auch für Prostatakarzinomzellen wurde bereits eine Abhängigkeit der Bcl-x_S-induzierten Apoptose von dem proapoptotischen multidomänen Bak-Protein beschrieben (Lindenboim et al, 2005; Wang C. und Youle, 2011). Dies konnte auch durch einen Bak-Knockdown in Kolonkarzinomzellen und durch die Verwendung von Bax/Bak-aktivierungsspezifischen Antikörpern in Melanomzellen bestätigt werden. Im Vergleich dazu vermitteln viele BH3-only Proteine präferentiell Apoptose via Bax wie Bik/Nbk und das prozessierte tBid oder sie aktivieren beide Signalwege, wie es für Bim beschrieben wurde (Gillissen et al, 2003; Chipuk et al, 2010). Die Variabilität könnte an der Interaktion dieses Proteins mit verschiedenen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen liegen. Demzufolge inhibiert Bcl-2 präferentiell Bax, Mcl-1 präferentiell Bak und Bcl-x_L bindet und inhibiert sowohl Bax als auch Bak (Chen et al, 2005). Des Weiteren hebt die Bcl-2-Überexpression die Bax-induzierte Apoptose in embryonischen Mausfibroblasten (Willis et al, 2007) und Melanomzellen auf (Raisova et al, 2001). Im Prinzip zeigten alle antiapoptotischen Proteine, die hier getestet wurden (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1), eine suppressive Funktion, was durch Überexpressions- und siRNA-Ansätze gezeigt wurde. Dennoch war die komplette Aufhebung der Bcl-x_S-induzierten Apoptose durch Bcl-x_L und die nur teilweise inhibierte Apoptose durch Bcl-2 in Übereinstimmung mit der präferentiellen Apoptoseinduktion via Bak.

3.2.3. Wirkungsmechanismus von Bcl-x_S

Die Abhängigkeit der Bcl-x_S-induzierten Apoptose von Bak und weniger von Bax erfordert eine besondere Erklärung, für die der Mechanismus der direkten Interaktion in Betracht kommt. Die direkte Aktivierung von Bax wurde bereits für einige BH3-only Proteine, wie für Bim und tBid beschrieben (Willis et al, 2007; Chipuk et al, 2010). Eine direkte Interaktion von Bcl-x_S mit Bak wurde jedoch in Melanomzellen nicht gesehen, was durch einen reziproken Immunpräzipitationsversuch gezeigt wurde und einen indirekten Mechanismus nahe legt. Dieser könnte auf der Interaktion von Bcl-x_S mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen basieren, welche die Bak-Aktivierung kontrollieren. Trotz der speziellen Rolle von Mcl-1 wurde keine direkte Interaktion mit Bcl-x_S nachgewiesen. Eine Interaktion wurde hingegen mit Bcl-x_L gesehen, welche auch schon früher beschrieben wurde (Lindenboim et al, 2001). Bcl-x_L war allerdings nur schwach in den meisten Melanomzelllinien exprimiert (Hossini et al, 2003) und verhindert die Bak-induzierte Apoptose wahrscheinlich nur unter Überexpressionsbedingungen.

Andere Proteine, die bei der Regulation der Bcl-2-Proteine mitwirken könnten, sind VDAC1 und VDAC2. Diese beiden Proteine vermitteln entgegengesetzte Funktionen der Apoptoseregulation. Demzufolge wird durch VDAC1 die mitochondriale Kanalformation gefördert (Shimizu et al, 1999), welche durch die Bindung von Bcl-x_L inhibiert wird (Vander Heiden et al, 2001; De Stefani et al, 2012). Im Gegensatz dazu kommt VDAC2 eine antiapoptotische Funktion zu, die durch die Bindung an die Dimerisationstasche von Bak vermittelt wird und damit Bak in einem monomeren inaktiven Konformationszustand hält (Kim et al, 2006). Demzufolge sind VDAC2-defiziente Zellen besonders anfällig für Todesstimuli (Cheng et al, 2003; Baines et al, 2007). Eine Interaktion zwischen VDAC2 und Bak wurde auch in Melanomzellen gesehen. Im Speziellen konnten wir eine spezifische Interaktion von Bcl-x_S mit VDAC2 in Melanomzellen demonstrieren. Dies wurde durch den Gebrauch von verschiedenen Antikörpern und der Überexpression eines Myc-getaggen VDAC2-Proteins überprüft. Des Weiteren wurden reziproke Immunpräzipitationsversuche durchgeführt, um den Mechanismus von Bcl-x_S genauer zu beleuchten. Diese zeigten, dass eine Interaktion von Bcl-x_S mit VDAC2 zu einem Freiwerden von Bak führte. Eine Spaltung des VDAC2-Bak-Komplexes wurde auch für andere BH3-only Proteine in embryonischen Mausfibroblasten beschrieben (Cheng et al, 2003; Kim et al, 2006). Trotz alledem aktivieren diese BH3-only Proteine auch den Bax-Signalweg, was die Unterscheidung zwischen diesen beiden Signalwegen erschwert. Das Freisetzen von Bak aus dem VDAC2-Bak-Komplex und die damit verbundene Aktivierung von Bak, scheint ein elementarer Mechanismus für die

Apoptoseregulation zu sein. Seine Wirksamkeit wurde hier durch die VDAC2-Überexpression demonstriert, welche in der Lage war, die Bcl-x_S vermittelte Apoptose komplett zu verhindern. Auf der anderen Seite führte der VDAC2-Knockdown selbst zu einer Verstärkung der Apoptose und der zusätzliche proapoptotische Effekt von Bcl-x_S wurde reduziert. Des Weiteren wurde die selektive Inhibition des Bak-Signalweges durch VDAC2 offensichtlich, nachdem die Überexpression von VDAC2 selbst keinen Effekt auf die Bik/Nbk-induzierte Apoptose zeigte.

3.3. Apoptoseinduktion auf der Basis von Bim_L

3.3.1. Apoptosedefizienz als charakteristisches Merkmal des malignen Melanoms

Die Apoptosedefizienz ist ein charakteristisches Merkmal des Melanoms, verbunden mit einer starken Malignität und Chemoresistenz (Soengas und Lowe, 2003; Eberle et al, 2007). Die Apoptosedefizienz in Tumorzellen könnte mit einem Expressionsverlust von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen, wie zum Beispiel dem Verlust von Bid in kutanen T-Zell-Lymphomen korrelieren (Braun et al, 2007). Eine Expression der Bim-Isoformen wurde in hämatopoetischen-, epithelialen-, neuronalen- und Stammzellen gefunden, während die Expression in Burkitt-Lymphomen, Zervix-, Kolon-, Nierenkarzinomen und Wilms-Tumoren häufig unterdrückt ist (O'Reilly et al, 2000; Zantl et al, 2007; Pinon et al, 2008). Immunhistochemisch konnte ermittelt werden, dass eine reduzierte Bim-Expression mit der Tumorprogression vom dysplastischen Nävi zu Melanommetastasen korrelierte (Dai et al, 2008). Allerdings konnte die immunhistochemische Untersuchung nicht zwischen den verschiedenen Bim-Isoformen unterscheiden. Wir konnten unter in vitro Bedingungen nachweisen, dass die Expression der Bim-Isoformen in einer ganzen Reihe von verschiedenen Melanom-Zelllinien sehr schwach war bzw. fast vollständig fehlte. Für die Untersuchung der durch Bim_L-Reexpression entstehenden Effekte und der Untersuchung der involvierten Signalwege wurde erneut ein adenoviraler Vektor eingesetzt, der eine hohe Expression von Bim_L unter Tet-ON-Bedingungen vermittelt. Es zeigte sich eine außergewöhnlich hohe proapoptotische Aktivität von Bim_L in Melanomzellen, demonstriert durch eine Apoptoseinduktion von bis zu 60% - 80% und einer kompletten Aufhebung der Melanomzellen-Proliferation. Diese Befunde vermitteln einen ersten Eindruck von dem hohen proapoptotischen Potential, welches Bim_L in Krebszellen besitzt und bisher noch nicht entsprechend genutzt wurde (Akiyama et al, 2009).

3.3.2. Überwindung der Bcl-2 vermittelten Resistenz im Melanom durch Bim_L

Hinsichtlich des Mechanismus der Bim_L-induzierten Apoptose kam es vorwiegend zu einer Aktivierung des instinsischen Signalweges, bedingt durch eine Caspase 9 Prozessierung, einem Verlust des $\Delta\psi_m$ in > 90% der Zellen und zu einem sehr deutlichen Freiwerden von proapoptotischen mitochondrialen Faktoren. Der mitochondriale Apoptosesignalweg wurde in Melanomzellen auch schon durch die Überexpression von proapoptotischen Bcl-2-Proteinen, wie Bcl-x_S, Bik/Nbk und Bcl-x_{AK}, aktiviert (Hossini et al, 2003; Oppermann et al, 2005; Plötz et al, 2012). Bim_L erschien im Vergleich dazu deutlich effektiver. Die mitochondriale Apoptose dürfte durch Bax oder Bak induziert sein. Während Bik/Nbk oder Bid präferentiell die Apoptose via Bax vermitteln, ziehen andere proapoptotische Bcl-2-Proteine, wie Bcl-x_S und Noxa, präferentiell den Bak-Signalweg vor (Gillissen et al, 2003; Lindenboim et al, 2005; Adams und Cory, 2007). Bim_L hingegen triggert beide Signalwege (Llambi und Green, 2011), was hier wiederum mit Hilfe des Kolonkarzinomzellmodells bestätigt werden konnte. Demzufolge konnten einzelne Knockdowns gegen Bax oder Bak die Bim_L-induzierte Apoptose nicht verhindern. Der Verlust von Bax oder Bak in Metastasen des Melanoms korreliert mit einer abnehmenden Überlebensrate (Fecker et al, 2006), weshalb das simultane Targeting beider Signalwege als ein klarer Vorteil erscheint. Auf diese Weise könnte die jeweilige Defizienz für Bax oder Bak überwunden werden. Die Apoptosedefizienz in Melanomzellen wurde im Speziellen mit einer hohen Aktivität von antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen verbunden (Jansen et al, 2000; Eberle et al, 2007). Diese wird zuallererst und vor allem durch Bcl-2 selbst vermittelt, welches auch in Abstammungslinien der Melanozyten stark exprimiert wird und durch den für Melanozyten spezifischen Transkriptionsfaktor MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) reguliert wird (Mcgill et al, 2002). Demzufolge vermittelt exogen überexprimiertes Bcl-2 in Melanomzellen eine Apoptoseresistenz gegen verschiedene proapoptotische Stimuli, wie zum Beispiel gegen Todesliganden und der ROS vermittelten Apoptose (Raisova et al, 2000; Kurbanov et al, 2005; Franke et al, 2010).

Die Rolle von Bcl-2 als Onkogen im Melanom wurde als Grundlage für die therapeutische Antisense-Bcl-2-Strategie genommen (Jansen et al, 2000). Wir zeigten, dass die Apoptosedefizienz, basierend auf einer hohen Bcl-2-Expression in Melanomzellen, durch Bim_L überwunden werden kann. Im Gegensatz dazu wurde die Apoptoseinduktion durch andere BH3-only Proteine (Bik/Nbk) komplett blockiert. Dieser Unterschied zwischen den BH3-only Proteinen könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Nbk-induzierte Apoptose von Bax

abhängig ist, welches durch Bcl-2 neutralisiert wird (Gillissen et al, 2003), während für Bim_L der Bak-Signalweg nach wie vor offen bleibt.

3.3.3. Wirkmechanismus von Bim_L

Neben Bcl-2 können auch andere Bcl-2-Proteine einen starken Einfluss auf die Apoptoseresistenz ausüben, was das unzureichende Ergebnis der Antisense-Bcl-2-Therapie erklären könnte (Bedikian et al, 2006). Demzufolge wurde von einer verstärkten Expression von Bcl-x_L und Mcl-1 im Zuge der Melanomprogression berichtet (Zhuang et al, 2007). Eine wichtige Funktion von Mcl-1 wurde kürzlich für Melanomzellen vorgeschlagen, welche aus Knockdownstudien geschlussfolgert wurde. Darüber hinaus wurde auch von einer Expression des antiapoptotischen Bcl-w-Proteins berichtet (Senft et al, 2012). Während Bcl-2 präferentiell mit Bax interferiert, inhibiert Mcl-1 präferentiell Bak; dagegen können Bcl-x_L und Bcl-w sowohl mit Bax als auch Bak interagieren (Yan et al, 2000; Willis et al, 2005). Die hohe proapoptotische Effizienz von Bim_L könnte durch seine spezielle Charakteristik erklärt werden. Demzufolge wurde in Mausfibroblasten-Zellmodellen eine Interaktion von Bim_L mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen gezeigt (Chen et al, 2005). Allerdings sind bisher noch keine Daten für die Bindungsaktivität von Bim in humanen Krebszellen verfügbar. Wir konnten die Interaktion von Bim_L mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen, nämlich mit Bcl-x_L, Bcl-2, Bcl-w und Mcl-1 in Melanomzellen klar bestätigen, welches eine substantielle Basis für die Erklärung seiner hohen proapoptotischen Effizienz darstellt. Antiapoptotische Bcl-2-Proteine sind ein spezifisches Target der therapeutischen Ansätze für das Melanom. Apoptose konnte durch einen Antisens-Bcl-2-Ansatz und einer Knockdownstrategie gegen Mcl-1 induziert werden (Jansen et al, 2000; Senft et al, 2012). In Folge des wechselseitigen Austausches der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine könnte der Knockdown einzelner antiapoptotischer Proteine ein insuffizienter Ansatz sein. Eine verstärkte endogene Expression proapoptotischer Bcl-2-Proteine oder eine exogene Überexpression erscheint als wirkliche Alternative und Bim_L ist hierbei ein aussichtsreicher Kandidat. Bedingt dadurch, dass Bim_L mit allen antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen interagiert, könnte es das antiapoptotische Potential in Tumorzellen komplett aufheben. Die entscheidende Frage bleibt, wie man die Bim_L-Expression erhöhen kann. Gentherapien könnten ein perspektivischer Ansatz sein und auch adenovirale Vektoren mit einer selektiven Replikation für Melanomzellen wurden bereits beschrieben (Fecker et al, 2011). Andere therapeutische Strategien basieren auf BH3-Mimetika, welche die Anwesenheit von BH3-Domänenstrukturen imitieren und damit die antiapoptotische Aktivität herunterregulieren. Demzufolge ist das ABT-737 bereits Gegenstand klinischer Studien für

Leukämien (Billard, 2012). Allerdings wurde ABT-737 als Mimetikum auf der Basis des BH3-only Proteins Bad entwickelt (Xiao et al, 2008), welches Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w bindet und inhibiert, nicht aber mit Mcl-1 interagiert (Adams und Cory, 2007). Bedingt durch die vorgeschlagene entscheidende Rolle von Mcl-1 (Senft et al, 2012) könnten Mimetika auf der Basis von Bim_L für eine Anwendung im Melanom besser geeignet sein.

3.4. Fazit

Spekulationen über proapoptotische Signalwege, unabhängig von der BH3-Domäne, werden durch Bcl-x_{AK} weiter unterstützt. Die gegenwärtige Arbeit zeigt klar, dass diese neuen Signalwege auf der einen Seite unabhängig von der BH3-Domäne sind und auf der anderen Seite wiederum abhängig von anderen Bcl-2-Proteinen. Abschließend kann geschlussfolgert werden, dass hier eine neue Funktion der Bcl-2-Proteine beschrieben wurde, wie am Beispiel von Bcl-x_{AK} gezeigt, das eine effektive Induktion der Apoptose in Melanomzellen, Kolon- und Prostatakarzinomzellen vermittelt. Bcl-2-Proteine sind entscheidend an der Vermittlung der Apoptoresistenz in Krebszellen beteiligt, wie es speziell für das Melanom gezeigt werden konnte (Eberle et al, 2007). Daher sind neue Signalwege für die Regulation der Bcl-2-Proteine und der mitochondrialen Apoptose für die Krebstherapien von besonderem Interesse. Neue Erkenntnisse könnten also für das Targeting von bisher therapieresistenten Tumoren, wie dem Melanom, genutzt werden.

Des Weiteren ist der Verlust von Bax ein häufiges Ereignis bei Krebs, während die Bak-Expression gewöhnlich erhalten bleibt (Meijerink et al, 1998). Speziell für das Melanom ist die Bcl-2-Überexpression besonders charakteristisch, da sie die komplette Bax-induzierte Apoptose blockieren kann (Jansen et al, 2000; Raisova et al, 2001). Für das Überwinden der Apoptosedefizienz und somit der Therapieresistenz von Tumoren, wie dem Melanom, könnte ein effizientes Targeting von Bak eine geeignete Strategie sein. Wie hier für Melanomzellen gezeigt werden konnte, ist Bcl-x_S für das Verständnis der Effizienz und der Wirkungsweise des Bak vermittelten Signalweges von besonderer Wichtigkeit. Der Signalweg der Bcl-x_S-induzierten Apoptose basiert auf der Interaktion mit VDAC2, was zu einem Freiwerden und damit einer Aktivierung von Bak führt. Das verbesserte Verständnis für die Rolle von VDAC2 bei der Regulation der Bcl-2-Proteine könnte eine Basis für die Entwicklung von gerichteten Therapien liefern, welche zusätzlich zu den Bax vermittelten Strategien eingesetzt werden könnten. Von besonderem Interesse wird die detaillierte Charakterisierung der Domäne von Bcl-x_S sein, welche die Bindung an VDAC2 vermittelt. Diese muss nicht zwangsläufig mit der

BH3-Domäne identisch sein, welche speziell für die Interaktion mit anderen Bcl-2-Proteinen verantwortlich ist.

Infolge der jüngsten klinischen Studien ist ein Durchbruch bei der Melanomtherapie mit der Einführung von Small Molecules-Inhibitoren gegen das mutierte B-Raf (Vemurafenib) zu erwarten (Sosman et al, 2012). Hierbei existiert eine gut beschriebene Brücke zwischen der B-Raf-Inhibition und der Bim-Expression. Die Bim-Phosphorylierung durch ERK bei Serin-59/69/77 fördert eine proteasomale Degradation (Pinon et al, 2008). Demzufolge zeigten Studien, dass die Bim-Phosphorylierung durch die Inhibition des B-Raf-Signalweges herunterreguliert wird, was eine Stabilisierung von Bim zur Folge hatte (Ewings et al, 2007; Hendrickson et al, 2008). Eine Hochregulation von allen drei Bim-Isoformen nach B-Raf-Inhibition wurde in Melanomzelllinien bereits gezeigt (Jiang et al, 2010). In Folge des hier beschriebenen hohen proapoptotischen Potentials von Bim_L könnte die Effizienz des B-Raf-Inhibitors möglicherweise, zumindest teilweise, durch die Hochregulation von Bim_L erklärt werden. Zusammenfassend repräsentiert sich das proapoptotische Bcl-2-Protein Bim als ein hoch wirksames Target für Melanomzellen. Therapeutische Strategien sollten gegebenenfalls darauf getestet werden, ob sie in der Lage sind, diesen wichtigen proapoptotischen Faktor hoch zu regulieren. Demzufolge könnte die Identifikation neuer proapoptotischer Domänen am Ende für die Entwicklung und den Einsatz von „Small Molecules“, analog zu den BH3-Mimetika, von besonderer Wichtigkeit sein.

4. Material & Methoden

4.1. Material

4.1.1. Material für die Zellkultur

4.1.1.1. Nährlösungen

Zellkulturlösungen

- FCS - Fetal Calf Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin 10.000 µg/ml/10.000 µg/ml (Biochrom)
- PBS - Phosphate Buffered Saline w/o Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom)
- Trypsin / EDTA 0,05 / 0.02% (w/v) in PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺ (Biochrom)
- Geneticin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland): 50 mg/ml gelöst in PBS und steril filtriert
- Hygromycin (Boehringer, Mannheim, Deutschland): 50 mg/ml Lösung

Nährmedien

- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glucose 4,5 g/l (Gibco)
- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glucose 1 g/l, L-Glutamin, Pyruvat (Gibco)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium (Biochrom)

In 500 ml Medium wurden 50 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin gegeben. In das DMEM für die Klone wurden zusätzlich 2 ml Geneticin (50mg/ml) und 0,5 ml Hygromycin (50 mg/ml) gegeben. In das RPMI-Medium wurden zusätzlich 1,5 ml L-Glutamin gegeben.

4.1.1.2. Eukaryotische Zellen

Humane Melanomzelllinien:

Aus Primärtumoren: A-375 (Giard et al, 1973), Mel-HO (Holzmann et al, 1988).

Aus Metastasen: Mel-2A (Bruggen et al, 1981), SK-Mel-13 (Carey et al, 1976).

Sub-Klone von A-375 und SK-Mel-13 Melanomzelllinien sind aus einer stabilen Transfektion mit einem pIRES-Bcl-2-Plasmid (A375-Bcl-2), pIRES-Leer-Plasmid (A375-Mock) und einem pTRE-Bcl-x_L-Plasmid (SKM13-Bcl-x_L) hervorgegangen. Sowohl das pIRES-Plasmid als auch das pTRE-1-Plasmid stammen von Clontech (Palo Alto, California, USA). Die beschriebenen Sub-Klone lagen vor Beginn dieser Doktorarbeit bereits im Labor vor (Raisova et al, 2001;

Hossini et al, 2003). Darüber hinaus wurden die embryonalen Nierenzelllinien HEK293 zur Adenovirusamplifikation eingesetzt.

Humane Kolonkarzinom-Zelllinien:

HCT116 (ATCC, Rockville, MD, USA) parentale Zellen exprimieren Bax und Bak. Isogene Sublinien haben entweder einen Bax-Knockout oder einen Bak-Knockdown als auch einen Bax-/Bak--Doppelknockdown. Die beschriebenen HCT116 Sublinien lagen vor Beginn dieser Doktorarbeit bereits im Labor vor.

Humane Prostatakarzinom-Zelllinien:

Parentale DU145 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) Zellen sind defizient für Bax und besitzen nur eine moderate Expression von Bak. In Subzelllinien wurde das EGFP-getaggte Bax oder Bak wiederhergestellt (DU145-EGFP-Bax und DU145-EGFP-Bak). Die beschriebenen DU145 Sublinien lagen vor Beginn dieser Doktorarbeit bereits im Labor vor.

4.1.2. Adenovirale Konstrukte von Bcl-x_{AK}, Bcl-x_S, Bim_L und Bik/Nbk

Die vollständige cDNA von Bcl-x_{AK} (Hossini et al, 2006) wurde, wie bereits beschrieben (Gillissen et al, 2003), in einen Ad5 adenoviralen Vektor pAd5-tTA subkloniert und anschließend in einen TRE(Tetracycline-Responsive Element)-enthaltenden pHVAd2-Shuttle-Vektor eingefügt. Die so entstandene TRE-Bcl-x_{AK}-Expressionskassette wurde durch homologe Rekombination in ein pAd5-tTA(tetracycline-kontrollierter Transaktivator)-Plasmid eingefügt, wodurch die E1-Region durch die pAdV-AK DNA ersetzt wurde. Anschließend wurden HEK293 Zellen mit diesem Konstrukt transfiziert, die dann mit diesem Konstrukt Adenoviren produzierten. Die Expression von Bcl-x_{AK} wurde nach Transduktion mit AdV-AK durch die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) unterdrückt (OFF-Bedingungen), während das Weglassen von Doxycyclin zu einer Aktivierung des Promotors führte und damit zu einer Expression von Bcl-x_{AK} (ON-Bedingungen). Die Konstruktion von AdV-XS, AdV-Bim_L und AdV-Nbk erfolgte in der gleichen Weise wie für AdV-AK beschrieben. Die adenoviralen Konstrukte wurden unter anderem von A. M. Hossini im Labor von B. Gillissen konstruiert und lagen dem Labor vor Beginn meiner Doktorarbeit bereits vor.

4.1.3. Proteinanalytik

Proteinmarker:

Prestained SDS-Page Standard, Broad Range (BioRad, München, Deutschland)

Proteinbestimmung:

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Bonn, Deutschland)

Coomassie-Färbelösung, (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Standardpuffer für die Proteinextraktion (10 ml):

100 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5), 480 µl NaCl (3 M), 500 µl SDS (10%), 50 µl Nonidet P-40, 36 µl Aprotinin, 100 µl Leupeptin, 100 µl Pepstatin, 100 µl PMSF (100 mM), 20 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0), 8,5 ml Aqua Bidest

Protease-Inhibitoren:

Pepstatin 0,5 mg/ml in Aqua Bidest (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Leupeptin 10 µg/ml in Aqua Bidest (Sigma)

Aprotinin 10% in Aqua Bidest (Sigma)

PMSF 100 mM in DMSO (Sigma)

Protein-Probenpuffer (4x) 10 ml:

2,5 ml Tris-HCl (1 M, pH 6,8), 0,2 g SDS, 4 ml Glycerin, 2 ml β-Mercaptoethanol, 4 mg Bromphenolblau, 1,5 ml Aqua Bidest

Sammelgelpuffer (pH 6,8) 500 ml:

19,7 g Tris-Base, 1,0 g SDS ad 500 ml Aqua Bidest

Trenngelpuffer (pH 8,8) 500 ml:

38,5 g Tris-Base, 9,3 g Tris-HCl, 1,0 g SDS; Auffüllen mit Aqua Bidest auf 500 ml

Sammelgel, 5 ml	5%
30% Acryl-/Bisacrylamid	0,84 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua Bidest	1,6 ml

10% APS	100 µl			
TEMED	10 µl			
Trenngel, 10 ml	7,5%	10%	12%	15%
30% Acryl-/Bisacrylamid	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
Trenngelpuffer	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
Aqua Bidest	2,5 ml	1,7 ml	1,0 ml	-
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Laufpuffer nach Laemmli (5-fach, 2 l):

30,4 g Tris-Base, 144 g Glycin, 10 g SDS; Auffüllen mit Aqua Bidest auf 2 l

Transferpuffer (1-fach, 2 l):

11,64 Tris-Base, 4,36 g Glycin, 3,7 g SDS, 400 ml Methanol; Auffüllen mit Aqua Bidest auf 2 l

PBS-Tween (0,05%):

9,55 g PBS Dulbecco, 0,5 ml Tween; Auffüllen mit Aqua Bidest auf 1 l

Milchpulver (5%):

5 g Blotting Grade Non-Fat Dry Milk Fatfree (Biorad); Auffüllen mit Aqua Bidest mit PBS-Tween auf 100 ml

ECL-Lösung:

Lösung A: Natriumsalz von Luminol (50 mg, Sigma) gelöst in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6

Lösung B: p-Hydroxycoumarinsäure (11 mg, Sigma) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva)

Verwendete primäre Antikörper:

Antigen	Spezies	Verdünnung	Firma
AIF	Ziege	1:200	Santa Cruz
Cytochrom C	Maus	1:1000	BD
Smac	Maus	1:500	Santa Cruz
VDAC1/2/3	Maus	1:1000	Calbiochem

VDAC2	Ziege	1:500	Santa Cruz
Bad	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Noxa	Kaninchen	1:500	Pro Sci
Puma	Kaninchen	1:1000	Epitomics
Bak	Kaninchen	1:500	Dako
Bax	Kaninchen	1:400	Santa Cruz
Bcl-2	Maus	1:400	Santa Cruz
Bcl-x	Kaninchen	1:200	Santa Cruz
Mcl-1	Maus	1:200	Santa Cruz
LC3	Kaninchen	1:500	Novus Biologicals
Pro-Caspase-3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Caspase-3-Spalt	Maus	1:1000	Cell Signaling
Caspase-8	Maus	1:1000	Cell Signaling
Caspase-9	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling
Survivin	Maus	1:500	Santa Cruz
p53	Maus	1:500	Santa Cruz
c-Myc	Maus	1:500	Calbiochem
β -Aktin	Maus	1:5000	Sigma
GAPDH	Maus	1:1000	Santa Cruz

Verwendete sekundäre Antikörper:

Meerrettich-Peroxidase (Hrp)-markierte Ziege anti-Maus IgG-, Ziege anti-Kaninchen IgG- und Kaninchen anti-Ziege IgG-Antikörper (Dako Cytomation, Hamburg, 1:5000).

4.1.4. Nachweis der Apoptose und Nekrose

- Cell Death Detection Kit (DNA-Fragmentation, Roche, Mannheim, Deutschland)
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH release, Roche)
- Propidiumjodid, Sigma-Aldrich, 100 μ l Triton X-100 (10%), 100 μ l NaCl (10%), 20 μ l PI (10 mg/ml), 200 μ l RNase A (10 mg/ml); Auffüllen mit PBS auf 10 ml
- Bisbenzimid, Sigma, Deutschland, 1 μ g/ml in PBS, Bisbenzimid-Fixierungslösung, 4 g Formaldehyd auf 100 ml PBS, Bisbenzimid-Permeabilisierungslösung, 0,2% Triton X-100 und mit PBS auf 100 ml auffüllen

4.1.5. Herstellung der Zellfraktionierungslysate

- Mitochondria / Cytosol Fractionation Kit (Biovision)

4.1.6. Nachweis des Membranpotentials und ROS (Reactive Oxygen Species)

- JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolyl carbocyanine iodide; Sigma-Aldrich)
- TMRM (Tetramethyl rhodamine methyl ester perchlorate; Sigma-Aldrich)
- H2DCFDA (2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetate; Molecular Probes, USA)

4.1.7. Transfektion

Transfektionsmittel:

DMRIE-C Reagent (Invitrogen) 2 mg/ml

TurboFect (Fermentas, Leon-Rot, Deutschland)

4.1.7.1. Plasmide

Die verwendeten Expressionsplasmide mit der vollständigen cDNA-Sequenz der Bcl-2-Proteine Bax, Nbk, Bcl-x_S und Bcl-x_L sind mit einem 3' myc-tag versehen und basieren auf dem pcDNA3-Plasmid (pcDNA3-Bcl-x_{AK}-myc, -Bcl-x_S-myc, -Bcl-x_L-myc, -Nbk-myc, -Bax-myc und -VDAC2-myc). Die verwendeten Plasmide lagen vor Beginn dieser Doktorarbeit bereits im Labor vor bzw. wurden von B. Gillissen im Labor von Peter T. Daniel hergestellt. Das Plasmid für die Expression der vollständigen humanen cDNA von VDAC2 basiert auf einem pCMV-Sport6-Plasmid und wurde bei BioScience (Berlin, Deutschland; clone IRATp970E111D) gekauft.

4.1.7.2. siRNA-Sequenzen

Ein siRNA-Ansatz wurde mit der Sequenz GCA AGA GGA UUA UGG CUA A gegen Mcl-1 und gegen eine Kontrollsequenz (Scrambel) GCA GGA GCU AUG CUA CCA U durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) gekauft. Zusätzliche siRNA-Pools gegen Bak und VDAC2 stammen von Santa Cruz (Bak, sc-29786 und VDAC, sc-42357). Die annealte, doppelsträngige und entsalzte siRNA wurde mit einem Transfektionsreagenz von TurboFect (Fermentas, Leon-Rot, Deutschland) transfiziert.

4.1.8. Caspaseinhibitor

zVAD-fmk (Z-Val-Ala-Asp-fmk; Calbiochemie, Deutschland)

4.1.9. Antioxidantien

N-Acetylcystein (NAC, Fluka, German) 50 mM gelöst in EtOH 98%

Vitamin E, Fluka, Deutschland, 50 mM gelöst in EtOH 98%

4.1.10. Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid (37, 5:1)	Biorad
APS	Biorad
Bromphenolblau	Biorad
BSA	Roche
Caesiumchlorid	Bethesda
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol	J.T. Baker
Formaldehyd J.T.	Baker
Glycerol	Sigma
Glycin	Serva
Harnstoff	Merck
Isopropanol	J.T. Baker
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J.T. Baker
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Non Fat Dry Milk	Biorad
Nonidet P40 Igepal	Fluka
PBS	Biochrom
PEG 8000	Sigma
Ponceau S	Sigma
RNase A	Sigma
SDS	Merck

Sucrose	Merck
TEMED	Biorad
Tween-20	Sigma
Triton-X-100	Merck
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Salzsäure	Merck
4.1.11. Sonstiges Material	
Cap Tubes (10ml und 50 ml)	Falcon
Cordless Tube Topper	Beckmann
Filmkassetten	Kodak
Filterpapier 3 mm	Whatman
Gewebekulturflaschen	Falcon
Gewebekulturschalen	B. Dickinson
Glas-Homogenisator (Douncer)	Biorad
Heparin-Spritzen	B. Dickinson
Hyperfilm ECL	Amersham
Kryoröhrchen	Falcon
μ Columns	Miltenyi
μMACS Epitope Tag Protein Isolation Kit	Miltenyi
μMACS Protein A/G Microbeads	Miltenyi
μ MACS Separator	Miltenyi
Mikrofilter (0,2 μm)	Braun
Millipore Steriflip	Millipore
NAP25 Sephadex-Säule	GE Healthcare
Nitrozellulose-Membran (Protran BA 83)	S.&Schuell
Petrischalen	Falcon
Plasmid Maxi Präparation	Qiagen
Quick Seal Zentrifugenröhrchen	Bechkmann
Röntgenfilme	Fuji
Sterilfilter	Milipore
UV-Küvetten	Brand
6-well Zellkultur-Platten	Falcon

24-well Zellkultur-Platten	Nunc
96-well Zellkultur-Platten	Nunc
Zellschaber	Costar
Zentrifugenröhrchen Typ 3119	Geyer
4.1.12. Geräte	
Autoklav	Webeco
Bidest-Gerät Destamat	Heraeus
Brutschrank	GFL
Durchflusszytometer FACS Calibur	B. Dickinson
Elektrophoreseapparaturen	Pharma. Biotech
ELISA-Photometer	Dynatech
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Heizblock	Tech
Mikroskop	Olympus
Mikrowelle	Bosch
pH-Meter mit Ingold-Elektrode 405	Knick
Photometer	Biometra
Pipettierhilfe	Hirschmann
Real-Time Zell Analysis, RTCA	Roche
Schüttler	Köttermann
Ultraschall-Homogenisator (Typ MS-73)	Sonoplus
Vortex	Holbein
Wasserbad	Braun
Zentrifugen:	
Avanti J-E	B. Coulter
Avanti J-25	B. Coulter
Optima TLX Ultrazentrifuge	B. Coulter
Tischzentrifuge Biofuge	Heraeus

Rotoren:

JA-18	Beckmann
JA-25.50	Beckmann
TLA120.2	Beckmann

4.2. Methoden

4.2.1. Zellbiologische Methoden

4.2.1.1. Zellkultur – Kultivierung

Die humanen Melanom-, Kolonkarzinom- und Prostatakarzinom-Zelllinien wurden in DMEM-1965- bzw. RPMI-1640-Medium mit 10% FCS in Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent auf dem Boden der Kulturflaschen. Das Zellmedium wurde etwa jeden dritten Tag erneuert, wobei die Zellen vor jedem Mediumswechsel mit sterilem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gespült wurden, um tote Zellen und saure Stoffwechselprodukte zu entfernen. Um die Zellen zu passagieren, wurden diese mit PBS gewaschen und mit ca. 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden wurden sie mit einem Medium von der Kulturflasche abgespült und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das FCS im Medium inaktiviert die proteolytischen Eigenschaften des Trypsins. Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden je nach Proliferationsrate mit entsprechender Zellzahl für die Versuche ausgesät oder weiter kultiviert.

4.2.1.2. Lagerung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen, trypsiniert und in 10% FCS-haltigem Medium 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in ein Medium mit 25% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das DMSO in der Lösung verhindert die Bildung von Eiskristallen in den Zellen. Anschließend wurden die Röhrchen über Nacht bei -70°C eingefroren. Die endgültige Lagerung der Zellen fand bei -140°C statt.

4.2.2. Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie erlaubt es, eine große Zahl einzelner Zellen zu untersuchen. Dabei können zunächst die Größe sowie die Granularität der Zellen ermittelt werden. Die Zellen werden mittels Überdruck durch eine Messkammer gedrückt und beim Eintreten in diese mit einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auflösen. Die Zellen passieren so vereinzelt den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488 nm. Dabei ergibt sich aus der Vorwärtsstreuung (FSC) des Lasers die Größe der Zelle sowie aus dem im rechten Winkel gestreuten Laserlicht, der sogenannten Seitwärtsstreuung (SSC), die Granularität. Über drei weitere Messkanäle (FL1: $\lambda = 530$ nm, FL2: $\lambda = 585$ nm, FL3: $\lambda = 650$ nm) kann gleichzeitig zu diesen beiden Parametern Licht verschiedener Wellenlängen detektiert werden (Abb. 36).

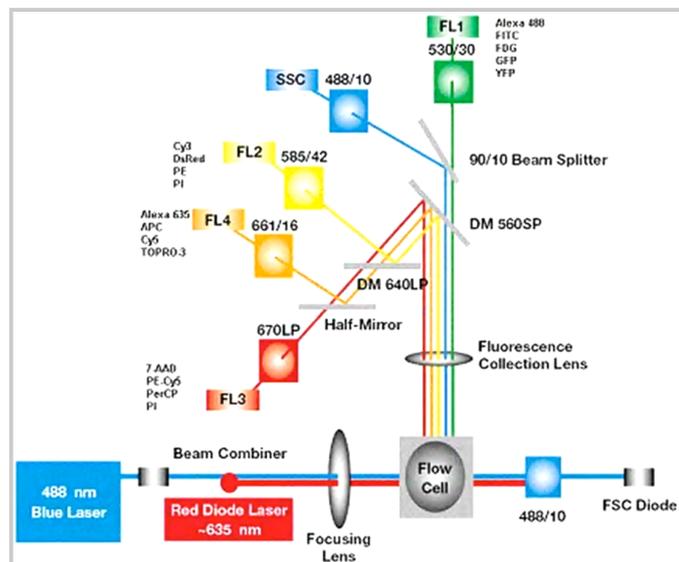


Abb. 36: Optischer Aufbau eines FACSCalibur Durchflusszytometers (Becton-Dickinson FACSCalibur; <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/index.jsp>).

Mit diesem Verfahren können Strukturen auf der Zelloberfläche oder nach Permeabilisierung der Zellen auch im Zellinneren nachgewiesen werden. Die hier vorgestellten durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Bioscience) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Bioscience).

4.2.3. Nachweismethoden – Apoptose

Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose stellt die Fragmentierung der DNA dar. Hierfür stehen verschiedene Nachweismethoden zur Verfügung. Zum einen der direkte Nachweis von freien DNA-Enden mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bzw. die

Quantifizierung der apoptotischen Sub-G1-Zellpopulationen mittels durchflusszytometrischer Analyse von Propidiumjodid (PI) gefärbten Zellkernen (Nicoletti-Assay).

4.2.3.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis der DNA-Fragmentierung erfolgte mittels „Cell Death Detection ELISA“ (Roche). Hierbei werden Mono- und Oligonucleosomen nachgewiesen, diese bilden sich infolge der Fragmentierung der DNA in apoptotischen Zellen (Abb. 37).

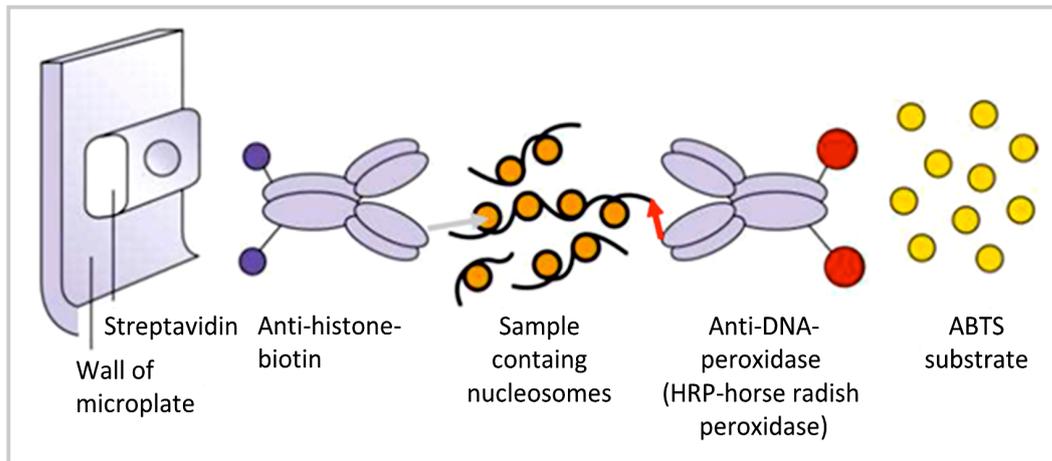


Abb: 37: Cell Death Detection ELISA. Der Test wird in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte durchgeführt. Es bildet sich ein Komplex aus Anti-Histon-Biotin-Antikörpern und Anti-DNA-Peroxidase-Antikörpern mit den Nucleosomen des Zelllysates. Die Detektion erfolgt über das ABTS-Substrat (Abbildung aus dem Datenblatt).

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst trypsiniert und durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde für den Nekrosenachweis abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate erneut für 10 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Für den Nachweis der DNA-Fragmentierung wurden 20 µl der Lysate in eine mit Streptavidin beschichtete 96-Well-Platte (mitgeliefert) pipettiert und mit 80 µl Reagenzgemisch, bestehend aus biotinyliertem Anti-Histon-Antikörpern und Peroxidase-konjugiertem anti-DNA-Antikörpern, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit je 300 µl/Well mit Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurden in jedes Loch der Mikrotiterplatte 100 µl einer Peroxidase-Substratlösung, die ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline Sulfonate)) enthält, gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung der gebundenen, Peroxidase-markierten Antikörper-DNA-Komplexe mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

4.2.3.2. Propidiumjodid- und Annexin-V/PI-Färbung

Die Quantifizierung des Anteils an apoptotischen, hypodiploiden Zellen (Sub-G1-Zellfraktion) in Prozent erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wird der DNA-Gehalt von Zellen mittels PI-Färbung nachgewiesen (Riccardi und Nicoletti, 2006).

Dafür wurden die Zellen zunächst trypsiniert und mittels Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen und in einer PI-Färbelösung, bestehend aus PI (40 µg/ml, Santa Cruz), Natriumcitrat (0,1%, Sigma), Triton X-100 (0,1%, Serva), für 1 h inkubiert. Der DNA-Gehalt der Kerne wurde unter Verwendung des Fluoreszenzdetektors FL-3 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest Software. Das Erscheinen von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche ist ein frühes Ereignis der Apoptose und wurde mit einem AnnexinV-FITC gekoppeltem Antikörper (BD Pharmingen Biosciences, Heidelberg, Deutschland; #556419) durchflusszytometrisch detektiert. Parallel zu der Inkubation mit dem annexinV-FITC Antikörper erfolgte eine Gegenfärbung mittels Propidiumjodid (PI).

4.2.4. Nachweis der Zytotoxizität

Die Bestätigung der Zytotoxizität erfolgte mittels Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand mit dem Cytotoxicity Detection Kit (LDH; Roche Diagnostics). Die Untersuchung wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es wurden 20 µl des zellfreien Überstandes abgenommen und mit den Reagenzien des Assays für 30 min im Dunkeln unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000).

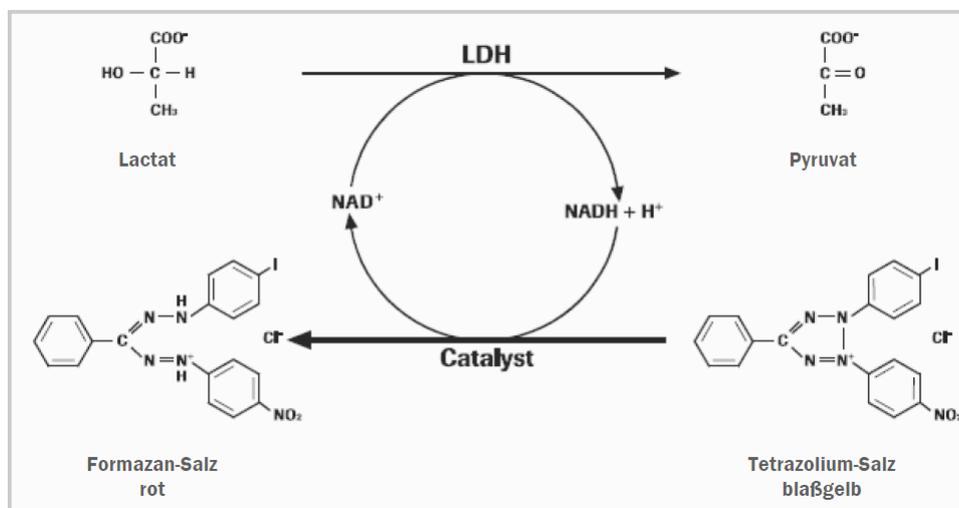


Abb. 38: Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abb. 38: Prinzip des LDH-Aktivitätsnachweises. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Nachfolgend wird H^+/H auf das Tetrazolium-Salz (gelb) übertragen, wodurch das photometrisch quantifizierbare Formazan-Salz (rot) entsteht (Abbildung siehe Datenblatt).

4.2.5. Wachstumskurven

Zur Erstellung von Wachstumskurven wird die Zelldichte kontinuierlich über eine Echt-Zeit-Zell-Analyse (real-time cell analysis, RTCA, xCELLigence, Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) gemessen. Die Messtechnik basiert auf Mikroelektroden, die in den Böden der Wells (96-Well) einer speziellen E-Plate integriert sind. Der Widerstand der Zellen in einem Well steht in direktem Verhältnis zur Zelldichte und damit dem Zellwachstum (Proliferation). Pro Well wurden 10.000 Zellen ausgesät und nach 24 h behandelt. Die Messung wurde über einen Zeitraum von etwa 60 h in Messintervallen von 15 Minuten durchgeführt.

4.2.6. Bisbenzimid-Färbung

Für die Darstellung der Apoptose auf Einzelzellniveau verwendet man zur Zellkernanfärbung den Farbstoff Bisbenzimid (Hoechst-33342). Bisbenzimid interkaliert in die DNA und zeigt angefärbt die Chromatinkondensation. Apoptotische Zellkerne erscheinen nach Bisbenzimid-Färbung stärker angefärbt und von geringerer Größe als gesunde Zellkerne.

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden 48 h nach Behandlung trypsiniert und mit PBS auf die Zellzahl 50.000/100 μl eingestellt. Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge wurden 50.000 Zellen auf einen Objektträger gebracht. Nach Lufttrocknung wurden die Zellen in 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung für 30 min bei 4°C fixiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Bisbenzimid-Färbelösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und dann in einem Mounting-Medium eingebettet. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden mindestens 100-200 Zellen pro Ansatz gezählt. Die apoptotischen Zellen wurden als Prozentangabe von der Gesamtzellzahl angegeben.

4.2.7. Proteinanalytik (Western Blot Analyse)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können denaturierte Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Durch einen Molekulargewichtsstandard kann die Größe der Proteine bestimmt

werden. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der sie dann indirekt nachgewiesen werden können. Dies erfolgt durch eine spezifische Bindung von primären Antikörpern, die ihrerseits durch sekundäre Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper gebunden werden. Mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase, die das ECL-Reagenz (enhanced chemilumineszenz) umsetzen kann, kommt es zur Emittierung von Lumineszenzlicht, das den Nachweis von Antigenen auf Röntgenfilmen ermöglicht.

4.2.7.1. Herstellung von Proteinextrakten mit einem Standard-Lysepuffer

Insgesamt wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml für die Herstellung von Proteinextrakten verwendet. Details des verwendeten Protokolls für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten sowie die Durchführung der Western Blot Analyse wurden beschrieben (Eberle et al, 2003).

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden Zellpellets in einem kalten Standard-Lysepuffer resuspendiert und 5 s mit einem Ultraschall-Homogenisator behandelt, um so die freigesetzte DNA zu scheren. Anschließend wurden die Proteinextrakte für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode (Abb. 39).

4.2.7.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Aminogruppen von Proteinen in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ reagiert dann mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelatkomplex, dessen Absorption in einem ELISA-Reader gemessen werden kann. Die zu bestimmenden Proteinextrakte sowie die Eichlösung wurden in Triplikaten in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Für die Bestimmung wurden die Proteinextrakte mit einem Reaktionspuffer, der sich aus Lösung A und Lösung B zusammensetzt, inkubiert. Als Kalibrierlösung dient eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Plate-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten BSA-Konzentrationen konnte die Proteinmenge der Lysate bestimmt werden.

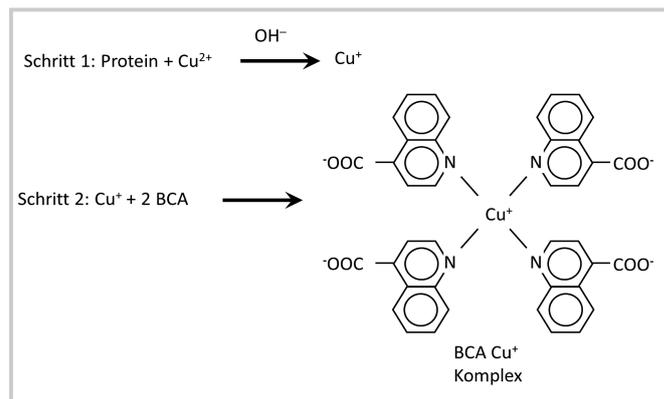


Abb. 39: BCA-Nachweismethoden – Prinzip (verändert nach Thermo Fischer Scientific Datenblatt).

4.2.7.3. Elektrophorese-Protokoll

Das für die SDS-PAGE notwendige Sammel- (5%) und Trenngel (12%) wurde mit Hilfe des Elektrophoresesystems (BioRad) vor der Elektrophorese hergestellt (King und Laemmli, 1971). Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol oder destilliertem Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die Überschichtung (Isopropanol) abgegossen und mit Filterpapier nachgetrocknet. Das Sammelgel wurde darüber geschichtet und ein Gelkamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Gelkämme wurden nach vollständiger Polymerisation entfernt, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer (1-fach) bedeckt. Die Proteinextrakte wurden mit Protein-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 80-160 V durchgeführt.

4.2.7.4. Proteintransfer

Der Blot, bestehend aus Nitrozellulosemembran und Trenngel, wurde in einer Wet-Blot-Kammer zusammengebaut, sodass das Gel zur Kathode hin ausgerichtet ist und die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt. An den Außenseiten wurden je zwei Filterpapiere und je ein Schwamm gelegt, um eine gleichmäßige Befeuchtung zu gewährleisten. Der Proteintransfer wurde bei 100 mA für 90 min auf Eis durchgeführt. Zum Nachweis des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (Sigma) angefärbt. Diese Färbung ist reversibel und konnte mit PBS-Tween wieder vollständig entfärbt werden. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver (gelöst in PBS-Tween) inkubiert, um so die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

4.2.7.5. Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

Die ECL-Lösung, bestehend aus 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl H₂O₂ (Sigma), wurde kurz vor Gebrauch gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben (Angaben für eine Membran). Nach 2 min Inkubation wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt und die Röntgenfilme in einer Dunkelkammer aufgelegt.

4.2.8. Herstellung von Zellfraktionierungslysaten

Zur Bestimmung der Cytochrom c Freisetzung sowie der mitochondrialen Translokation von Bax wurden die Mitochondrien und das Cytosol mit Hilfe eines Mitochondrien-Fraktionierungs-Kits (Alexis) isoliert. Hierfür wurden $1-5 \times 10^7$ Zellen eingesetzt und mit PBS gewaschen und bei 800 g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Cytosol-Extraktionspuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in einem 1 ml Glas-Homogenisator homogenisiert, bis circa 75% der Zellen aufgebrochen waren. Um die Zelltrümmer zu entfernen, wurden die homogenisierten Zellen mit 800 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Isolierung der Mitochondrien wurde der Überstand dann mit 10.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand enthielt die cytosolische Fraktion (Cyto), während das Pellet, die mitochondriale Fraktion (Mito) enthielt. Die jeweiligen Fraktionen wurden bei -20°C gelagert.

4.2.9. Inhibition der Caspasen

Es wurden 200.000 Zellen pro Well in jeweils einer 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 h für 1 h mit einem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk (10 µM) vorinkubiert und anschließend mit den Adenoviren transduziert. Der Inhibitor bindet selektiv an die aktiven Proteasen und verhindert damit deren Aktivität. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst und mit Medium auf die jeweilige Endkonzentration eingestellt.

4.2.10. Transfektion

Für die transiente Transfektion wurden 2×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit serumfreien Opti-MEM Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gewaschen und anschließend mit Opti-MEM Medium plus Plasmid-DNA (2,5 oder 5 µg/ml) und 0,1% DMRIE-C (Life Technologies) für 4 h transfiziert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml DMEM-Medium kultiviert. Die annealten, doppelsträngigen und entsalzten siRNAs wurden mit einem

Transfektionsreagenz von TurboFect (Fermentas, Deutschland) nach dem Protokoll der Firma transfiziert. Die Zellen wurden dafür in 24-Well-Platten kultiviert.

4.2.11. Immunpräzipitation

Für die Myc-tag basierende Immunpräzipitation wurden Melanomzellen (10^6) mit Expressionsplasmiden für Myc-getaggte Bcl-2-Proteine transient transfiziert. 24 h bzw. 48 h nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-Bcl-x_{AK}-myc, -Bcl-x_S-myc, -Bcl-x_L-myc, -Nbk-myc und -Bax-myc wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lysepuffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert. Bei ausgewählten Experimenten wurde das Triton X-100 durch 1% CHAPS ausgetauscht (Abb. 25). Die Immunpräzipitation der Myc-getagkten Proteine erfolgte mit dem μ MACS c-myc-tagged Protein Isolations Kit. Das Protokoll wurde, wie von der Firma vorgegeben, durchgeführt (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland). Für die Immunpräzipitation wurden „Microbeads“ benutzt, die an einen Anti-myc-Antikörper gekoppelt sind. Diese „Microbeads“ wurden zu den Lysaten gegeben, um die myc-getagkten Proteine zu binden. Der „Protein-Bead“-Komplex wurde dann über eine magnetische Säule isoliert. Vor dem Eluieren wurde die Säule insgesamt viermal mit dem Waschpuffer 1 (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) und einmal mit dem Waschpuffer 2 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Elutionspuffer (50 mM DTT, 1% SDS, 1 mM EDTA, 0.005% bromphenol blue, 10% Glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8), der zuvor auf 95°C erhitzt wurde. Für die Immunpräzipitation von VDAC2 und Bak wurde das „Protein A/G Micro Bead Kit“ (Miltenyi Biotec) verwendet. Dafür wurden 2-4 μ g eines spezifischen Antikörpers gegen VDAC2 und Bak zusammen mit „G Protein-Covered Microbeads“ zu den Lysaten gegeben. Die Präzipitation, das Waschen und das Eluieren erfolgten, wie bereits oben für das „ μ MACS c-myc-tagged Protein Isolations Kit“, beschrieben. Die Untersuchung der Immunpräzipitation erfolgte mittels Western Blot Analyse.

4.2.12. Nachweismethode des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$)

Der Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) erfolgte mittels der beiden kationischen Farbstoffe JC-1 und TMRM⁺. JC-1 ist ein lipophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich in gesunden Zellen im stark negativ geladenen Inneren der Mitochondrien anreichert und dort rot fluoreszierende Aggregate bildet. Bei einer Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials durch Permeabilisierung der Mitochondrienmembran in apoptotischen Zellen kann der Farbstoff in den Mitochondrien keine Aggregate formen.

Stattdessen bleibt er als grün fluoreszierendes Monomer im Zellplasma zurück. Der Nachweis mit dem ebenfalls kationischen Farbstoff TMRM⁺ basiert auf der Akkumulation in den negativ geladenen Mitochondrien auf Grund der positiven Ladungen des Farbstoffes. Daher zeigt eine verminderte TMRM⁺-Fluoreszenz eine Störung in der Ladungstrennung der Mitochondrien an. Bei diesem Experiment wurden die Zellen zunächst trypsiniert und zweimal mit PBS gewaschen und dann in 200 µl JC-1 bzw. TMRM⁺-Lösung (1 µM) resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und umgehend im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software.

4.2.13. Nachweismethode der reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species – ROS)

Der Nachweis von intrazellulärem ROS erfolgte durch den Farbstoff H₂DCFDA [2-7-dichlorodihydrofluoresceindiacetate] (Invitrogen). Die Zellen wurden trypsiniert, dann mit PBS gewaschen und mit H₂DCFDA (50 µM) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und umgehend im Durchflusszytometer vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software.

4.2.14. Nachweis der Zellproliferation und Zellviabilität

Der Nachweis der Zellviabilität erfolgte mittels WST-1 (Cell Proliferation Assay, Roche), welcher die Aktivität von mitochondrialen Enzymen nachweist. In 96-Well-Platten wurden 10.000 Zellen in 100 µl Medium ausgesät und mit 10 µl WST-1-Reagenz pro Loch inkubiert. Die Umsetzung des Reagenz wurde per ELISA-Reader bei der Wellenlänge 450nm/690nm bestimmt. Die Zellviabilität (Lebensfähigkeit) der Zellen wurde - bezogen auf die unbehandelte Kontrolle - in Prozent angegeben. Des Weiteren wurde die Zellviabilität auf Einzelzellebene mittels des Calcein-AM-Farbstoffes dargestellt. Das membranpermeable, nicht fluoreszierende Calcein-AM wird im Inneren der lebensfähigen Zellen durch Esterase zum membranimpermeablen grün fluoreszierenden Calcein gespalten. Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden 10⁵ Zellen in einem serumfreien Wachstumsmedium mit dem Calcein-AM-Farbstoff für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mittels Durchflusszytometer gemessen. Hierbei wurden die Calcein-gefärbten Zellen (Viabilität) mit ungefärbten (toten) Zellen verglichen.

4.2.15. Untersuchung der Bax/Bak-Aktivierung

Für die Bestimmung der Bax- und Bak-Cluster wurden DU145 Zellen benutzt, die stabil mit einem EGFP-Bax- oder EGFP-Bak-Konstrukt (Gillissen et al, 2007) transfiziert wurden. Die Cluster von Bax/Bak zeigen einen aktivierten Zustand von Bax und Bak an. Die Zellen wurden in 6-Well-Schalen ausgesät (2×10^5 /Well) und mit AdV-AK (MOI = 50) transduziert und für 48 h mit oder ohne Doxycyclin kultiviert. Die Bax- und Bak-Cluster wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen (Olympus BX50, Hamburg, Deutschland). Für die semi-quantitative Bestimmung wurden mindestens 500 Zellen pro Bedingung bewertet.

Für die Analyse der Bax/Bak-Konformationsänderung per Durchflusszytometer wurden spezifische Erstantikörper eingesetzt, die den N-Terminalen Bereich nachweisen (Bax-NT, Upstate Biotechnology, New York, USA, #06-499; Bak-NT, Merck, Darmstadt, Deutschland, #AM04). Dieser Bereich steht in Verbindung mit der Aktivierung von Bax/Bak. Die Melanomzellen (10^5) wurden dafür trypsiniert und für 30 min mit 0,5% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen in Saponinpuffer (1% FCS, 0.1% Saponin in PBS) resuspendiert und für 1 h bei 4°C im Dunkeln mit dem Bax-NT (1:100) oder Bak-NT (1:10) inkubiert. Als Zweitantikörper wurden ein goat anti-rabbit IgG (H+L)-FITC (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) und ein goat anti-mouse IgG (H+L)-FITC (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) benutzt. Nachdem die Zellen gewaschen und resuspendiert wurden, konnten sie unmittelbar danach mittels Durchflusszytometer gemessen werden.

4.2.16. Plasmidpräparation in großem Maßstab (Maxipräparation)

Die Maxipräparation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Qiagen-Protokoll-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Diese Methode diente nicht nur der Isolierung von größeren DNA-Mengen, sondern auch von hochreiner DNA, die für die Klonierung sowie für die Transfektion von Zellen verwendet wurde. Dabei wurden 150 ml LB-Medium im Erlenmeyerkolben (mit Ampicillin 100 µg/ml versetzt) mit einer einzigen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd (250 RPM) inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 5000 RPM zentrifugiert. Die Plasmidisolierung wurde entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Zentrifuge Avanti J-25 (Beckman).

4.2.17. Adenovirus-Präparation

Für die Adenovirus-Präparation wurden Virus-Lysate von 20 großen Flaschen hergestellt und die Lysate wurden in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit Nonidet-P40 (Endkonzentration: 0,5%) versetzt, gut durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die virushaltige Suspension wurde anschließend für 10 min bei 4°C mit $20.000 \times g$ (JA-25 Rotor, Beckman) abzentrifugiert und der virushaltige Überstand in einen neuen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Es wurden dann 0,5 Vol PEG/NaCl-Puffer zu dem Überstand hinzugefügt und die Viruspartikel durch eine Übernacht-Inkubation bei 4°C präzipitiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C mit $20.000 \times g$ (JA-25 Rotor, Beckman). Das virushaltige Präzipitat wurde anschließend in 4 ml TBS resuspendiert und bei 3.000 RPM für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

4.2.17.1. Adenovirus-Reinigung durch Ultrazentrifugation

Zu der virushaltigen Suspension wurde soviel Caesiumchlorid (CsCl, Sigma) gegeben, dass eine Dichte von 1,34 g/ml erreicht wurde. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4°C wurde anschließend bei Raumtemperatur für 10 min bei 3000 RPM zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde in zwei Beckman-Ultrazentrifugen-Röhrchen (2 ml/Tube) überführt. Die Röhrchen wurden mittels eines Tube-Topper-Heaters (Beckman, USA) versiegelt. Es erfolgte eine Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge für 3 h bei 20°C mit 90.000 RPM (TLA-120 Rotor, Beckman). Die viralen Partikel bildeten dann einen blau schimmernden Ring, der mit einer sterilen Spritze abgezogen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Schließlich erfolgte eine Reinigung über eine Sephadex-Säule (GE Healthcare).

4.2.17.2. Entfernung des CsCl-Salzes

Die Entfernung des CsCl-Salzes aus der gereinigten virushaltigen Fraktion erfolgte über Gelfiltrations-Chromatographie auf NAP25 Sephadex-Säulen (GE Healthcare). Nachdem die Säule mit 25 ml TBS äquilibriert wurde, erfolgte die Zugabe der Virusprobe direkt auf die Säule, die nach dem Durchlaufen mit 2,5 ml TBS aufgefüllt wurde. Die Säule wurde mit weiteren 6 ml TBS gewaschen und das Eluat in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in 14-16 Fraktionen á 0,5 ml aufgefangen. Je 10 µl jeder Fraktion wurden mit 90 µl TBS gemischt und die Absorbtion bei 260 nm im UV-Spektrometer (Biometra) gemessen. Die Fraktionen mit den hohen Konzentrationen wurden vereinigt. Das hoch aufgereinigte Virus wurde zur Stabilisierung mit Bovines Serum Albumin (Endkonzentration von 1,0 mg/ml) versetzt und in 50 µl bis 200 µl Aliquots aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.2.17.3. Quantifizierung rekombinanter Adenoviren: Titer-Bestimmung (PFU)

Dazu wurden 10 µl der gereinigten Virus-Lösung in 90 µl TBS verdünnt und die optische Dichte (OD) bei 260 nm im UV-Spektrometer gemessen. Die Partikelzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (in Partikel/}\mu\text{l)} = \text{OD} \times 10 \times 10^9$$

4.2.17.4. Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration

Diese Methode diente der Bestimmung der infektiösen Viruspartikel. Dazu wurden 10 µl einer Virus-Probe in 990 µl DMEM Medium (mit 2% FKS) aufgenommen (10^{-2} Verdünnung). Die 10^{-2} Verdünnungslösung wurde weiter bis 10^{-9} dekadisch verdünnt. Nachdem das Kulturmedium abgesaugt wurde, wurden anschließend 900 µl der jeweiligen Verdünnungen auf die HEK293 Zellen gegeben und für 1 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde eine autoklavierte 5%ige Low-Melting-Agarose-Lösung in der Mikrowelle (Bosch, Deutschland) zum Schmelzen gebracht und auf 42°C im Wasserbad temperiert. Daraus wurde durch vierfache Verdünnung mit einem auf 37°C temperierten Medium ein 1,25%iges Agarosemedium hergestellt und bei 42°C im Wasserbad bereitgestellt. Von den Infektionsplatten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit jeweils 3 ml des Agarosemediums überschichtet. Nach Verfestigung des Agarosemediums wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C weiter kultiviert. Innerhalb von 10-21 Tagen bildeten sich virale Plaques. Die Plaques wurden gezählt und der Titer wie folgt berechnet:

$$\text{Virus-Titer (PFU/ml)} = (N \times F) / V$$

V: Volumen der zur Infektion verwendeten Virus-Suspension

N: Anzahl der gebildeten Plaques

F: Verdünnungsfaktor (entspricht der Verdünnungsstufe)

4.2.18. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Messwerte wurden Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen und die dazugehörigen Standardabweichungen angegeben. Mittelwerte, Standardabweichungen und Student-t-Verteilung wurden mit dem Programm Microsoft Excel berechnet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe der Student-t-Verteilung bestimmt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert < 0,05 [*] bewertet und als hoch signifikant, Werte mit einem der p-Wert < 0,01 [**].

Literaturverzeichnis

- Adams JM, Cory S (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**: 1324-1337.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW (2004). Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2189-2199.
- Akiyama T, Dass CR, Choong PFM (2009). Bim-targeted cancer therapy: A link between drug action and underlying molecular changes. *Molecular Cancer Therapeutics* **8**: 3173-3180.
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**: 550-555.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG *et al.* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology* **19**: 3635-3648.
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U *et al.* (2006). Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: The oblimersen melanoma study group. *Journal of Clinical Oncology* **24**: 4738-4745.
- Billard C (2012). Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* Epub ahead of print: doi: 10.1038/leu.2012.88.
- Billen LP, Shamas-Din A, Andrews DW (2008). Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* **27** Suppl 1: S93-104.
- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA *et al.* (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597-608.
- Braun FK, Fecker LF, Schwarz C, Walden P, Assaf C, Durkop H *et al.* (2007). Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* **127**: 2425-2437.

- Breslow A (1978). Measurements of Tumor Thickness. *Human Pathology* **9**: 238-239.
- Bruggen J, Fogh J, Sorg C (1981). Tumor Production in the Nude-Mouse, Fibrinolytic-Activity and Cross-Reactivity with Anti-Melanoma Sera of Various Human-Tumor Cell-Lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **102**: 141-152.
- Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ (1976). Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 3278-3282.
- Chao DT, Korsmeyer SJ (1998). BCL-2 FAMILY: Regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* **16**: 395-419.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG *et al.* (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**: 393-403.
- Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**: 513-517.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T *et al.* (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**: 705-711.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation* **13**: 1396-1402.
- Chipuk JE, Green DR (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **18**: 157-164.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**: 299-310.
- Clark WH (1991). Tumor Progression and the Nature of Cancer. *British Journal of Cancer* **64**: 631-644.
- Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Vanhorn M (1984). A Study of Tumor Progression - the Precursor Lesions of Superficial Spreading and Nodular Melanoma. *Human Pathology* **15**: 1147-1165.

- Coultas L, Bouillet P, Stanley EG, Brodnicki TC, Adams JM, Strasser A (2004). Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bik/Blk/Nbk is expressed in hemopoietic and endothelial cells but is redundant for their programmed death. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 1570-1581.
- Dai DL, Wang YM, Liu M, Martinka M, Li G (2008). Bim expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Journal of Investigative Dermatology* **128**: 403-407.
- Daniel PT, Pun KT, Ritschel S, Sturm I, Holler J, Dorken B *et al.* (1999). Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* **94**: 1100-1107.
- Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* **15**: 1022-1032.
- De Stefani D, Bononi A, Romagnoli A, Messina A, De Pinto V, Pinton P *et al.* (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca(2+) signals to mitochondria. *Cell Death and Differentiation* **19**: 267-273.
- Degterev A, Yuan J (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 378-390.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo Journal* **18**: 5242-5251.
- Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, Kuwana T (2010). BH3-domains other than Bim and Bid can directly activate BAX/BAK. *J Biol Chem*
- Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Kurbanov BM, Fechner H (2008). Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma. *Exp Dermatol* **17**: 1-11.
- Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Wieder T, Daniel PT, Orfanos CE *et al.* (2003). CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* **22**: 9131-9141.

- Eberle J, Hossini AM (2008). Expression and function of bcl-2 proteins in melanoma. *Curr Genomics* **9**: 409-419.
- Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U, Fecker LF (2007). Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* **10**: 218-234.
- Eckhart L, Ban J, Fischer H, Tschachler E (2000). Caspase-14: Analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**: 655-659.
- Egle A, Harris AW, Bath ML, O'Reilly L, Cory S (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* **103**: 2276-2283.
- Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991). Mechanisms and Functions of Cell-Death. *Annual Review of Cell Biology* **7**: 663-698.
- Ewings KE, Wiggins CM, Cook SJ (2007). Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle* **6**: 2236-2240.
- Fecker LF, Geilen CC, Tchernev G, Trefzer U, Assaf C, Kurbanov BM *et al.* (2006). Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas is associated with poor prognosis. *Journal of Investigative Dermatology* **126**: 1366-1371.
- Fecker LF, Ruckert S, Kurbanov BM, Schmude M, Stockfleth E, Fechner H *et al.* (2011). Efficient Melanoma Cell Killing and Reduced Melanoma Growth in Mice by a Selective Replicating Adenovirus Armed with Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *Human Gene Therapy* **22**: 405-417.
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100.
- Franke JC, Plötz M, Prokop A, Geilen CC, Schmalz HG, Eberle J (2010). New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochem Pharmacol* **79**: 575-586.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemical Journal* **384**: 201-232.
- Fulda S, Debatin KM (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811.

- Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 447-464.
- Garbe C, Leiter U (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* **27**: 3-9.
- Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG *et al.* (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* **455**: 1076-1081.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H *et al.* (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-1423.
- Gillissen B, Essmann F, Graupner V, Starck L, Radetzki S, Dorken B *et al.* (2003). Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* **22**: 3580-3590.
- Gillissen B, Essmann F, Hemmati PG, Richter A, Richter A, Oztop I *et al.* (2007). Mcl-1 determines the Bax dependency of Nbk/Bik-induced apoptosis. *J Cell Biol* **179**: 701-715.
- GonzalezGarcia M, Garcia I, Ding LY, Oshea S, Boise LH, Thompson CB *et al.* (1995). Bcl-X Is Expressed in Embryonic and Postnatal Neural Tissues and Functions to Prevent Neuronal Cell-Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4304-4308.
- Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629.
- Grillot DAM, GonzalezGarcia M, Ekhterae D, Duan L, Inohara N, Ohta S *et al.* (1997). Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *Journal of Immunology* **158**: 4750-4757.
- Gyrd-Hansen M, Meier P (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* **10**: 561-574.

- Han JW, Flemington C, Houghton AB, Gu ZM, Zambetti GP, Lutz RJ *et al.* (2001). Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 11318-11323.
- Harada H, Grant S (2003). Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* **7**: 117-138.
- Hendrickson AW, Meng XW, Kaufmann SH (2008). Anticancer therapy: boosting the bang of Bim. *Journal of Clinical Investigation* **118**: 3582-3584.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Holzmann B, Lehmann JM, Zieglerheitbrock HWL, Funke I, Riethmuller G (1988). Glycoprotein P3.58, Associated with Tumor Progression in Malignant-Melanoma, Is A Novel Leukocyte Activation Antigen. *International Journal of Cancer* **41**: 542-547.
- Hossini AM, Eberle J, Fecker LF, Orfanos CE, Geilen CC (2003). Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts. *FEBS Lett* **553**: 250-256.
- Hossini AM, Geilen CC, Fecker LF, Daniel PT, Eberle J (2006). A novel Bcl-x splice product, Bcl-xAK, triggers apoptosis in human melanoma cells without BH3 domain. *Oncogene* **25**: 2160-2169.
- Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T *et al.* (2000). Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* **356**: 1728-1733.
- Jiang CC, Lai F, Tay KH, Croft A, Rizos H, Becker TM *et al.* (2010). Apoptosis of human melanoma cells induced by inhibition of B-RAF(V600E) involves preferential splicing of bim(S). *Cell Death & Disease* **1**
- Jost PJ, Grabow S, Gray D, McKenzie MD, Nachbur U, Huang DC *et al.* (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**: 1035-1039.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**: 549-554.

- Kazi A, Sun J, Doi K, Sung SS, Takahashi Y, Yin H *et al.* (2011). The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. *J Biol Chem* **286**: 9382-9392.
- Keilholz U, Gore ME (2002). Biochemotherapy for advanced melanoma. *Seminars in Oncology* **29**: 456-461.
- Kelly PN, Strasser A (2011). The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1414-1424.
- Kerr JF (1995). Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol* **5**: 55-57.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* **26**: 239-&.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ *et al.* (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* **8**: 1348-1358.
- Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP *et al.* (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **36**: 487-499.
- Kim TH, Zhao Y, Ding WX, Shin JN, He X, Seo YW *et al.* (2004). Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell* **15**: 3061-3072.
- King J, Laemmli UK (1971). Polypeptides of Tail Fibres of Bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology* **62**: 465-&.
- Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN (2007). Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* **7**: 532-542.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99-163.

- Kurbanov BM, Geilen CC, Fecker LF, Orfanos CE, Eberle J (2005). Efficient TRAIL-R1/DR4-mediated apoptosis in melanoma cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Journal of Investigative Dermatology* **125**: 1010-1019.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation* **14**: 44-55.
- Lei K, Davis RJ (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2432-2437.
- Leist M, Jaattela M (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 589-598.
- Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death and Differentiation* **12**: 1008-1014.
- Li HL, Zhu H, Xu CJ, Yuan JY (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501.
- Lindenboim L, Borner C, Stein R (2001). Bcl-x(S) can form homodimers and heterodimers and its apoptotic activity requires localization of Bcl-x(S) to the mitochondria and its BH3 and loop domains. *Cell Death Differ* **8**: 933-942.
- Lindenboim L, Kringel S, Braun T, Borner C, Stein R (2005). Bak but not Bax is essential for Bcl-xS-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **12**: 713-723.
- Llambi F, Green DR (2011). Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Current Opinion in Genetics & Development* **21**: 12-20.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**: 2405-2419.
- Lomonosova E, Chinnadurai G (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S2-19.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang XD (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490.

- Martinou JC, Youle RJ (2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell* **21**: 92-101.
- Mathai JP, Germain M, Marcellus RC, Shore GC (2002). Induction and endoplasmic reticulum location of BIK/NBK in response to apoptotic signaling by E1A and p53. *Oncogene* **21**: 2534-2544.
- Mcgill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du JY, Motyckova G, Nishimura EK *et al.* (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**: 707-718.
- Meijerink JP, E.J.Mensink, K.Wang, T.W.Sedlak, A.W.Slötjes, T.de Witte *et al.* (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **15**: 2991-7.
- Merino D, Giam M, Hughes PD, Siggs OM, Heger K, O'Reilly LA *et al.* (2009). The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *J Cell Biol* **186**: 355-362.
- Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P (2003). Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria - Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 5367-5376.
- Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA (2010). An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* **142**: 625-636.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS *et al.* (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335-341.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S *et al.* (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo Journal* **17**: 384-395.
- O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, Lindeman GJ, Print C, Bath ML *et al.* (2000). The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. *American Journal of Pathology* **157**: 449-461.

- Oppermann M, Geilen CC, Fecker LF, Gillissen B, Daniel PT, Eberle J (2005). Caspase-independent induction of apoptosis in human melanoma cells by the proapoptotic Bcl-2-related protein Nbk / Bik. *Oncogene* **24**: 7369-7380.
- Paquet C, Schmitt E, Beauchemin M, Bertrand R (2004). Activation of multidomain and BH3-only pro-apoptotic Bcl-2 family members in p53-defective cells. *Apoptosis* **9**: 815-831.
- Pinon JD, Labi V, Egle A, Villunger A (2008). Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* **27**: S41-S52.
- Plötz M, Hossini A.M., Daniel P.T., Stockfleth E., Eberle J. (2012). Mutual Regulation of Bcl-2 Proteins Independent of the BH3 Domain as Shown by the BH3-Lacking Protein Bcl-x_{AK}. *PLoS One* **7**: e34549.
- Pop C, Salvesen GS (2009). Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* **284**: 21777-21781.
- Raisova M, Bektas M, Wieder T, Daniel P, Eberle J, Orfanos CE *et al.* (2000). Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *Febs Letters* **473**: 27-32.
- Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I *et al.* (2001). The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* **117**: 333-340.
- Reed JC (2004). Apoptosis mechanisms: implications for cancer drug discovery. *Oncology (Williston Park)* **18**: 11-20.
- Revil T, Pelletier J, Toutant J, Cloutier A, Chabot B (2009). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Represses the Production of Pro-apoptotic Bcl-x(S) Splice Isoform. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 21458-21467.
- Riccardi C, Nicoletti I (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* **1**: 1458-1461.
- Riedl SJ, Shi Y (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 897-907.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R (2004). Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation. *Oncogene* **23**: 3915-3931.

- Senft D, Berking C, Graf SA, Kammerbauer C, Ruzicka T, Besch R (2012). Selective induction of cell death in melanoma cell lines through targeting of Mcl-1 and A1. *PLoS One* **7**: e30821.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487.
- Shkreta L, Michelle L, Toutant J, Tremblay ML, Chabot B (2010). The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J Biol Chem*
- Slee EA, Keogh SA, Martin SJ (2000). Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release. *Cell Death Differ* **7**: 556-565.
- Soengas MS, Lowe SW (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* **22**: 3138-3151.
- Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS *et al.* (2012). Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine* **366**: 707-714.
- Stennicke HR, Salvesen GS (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**: 299-306.
- Tait SW, Green DR (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 621-632.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 231-241.
- Tinel A, Tschopp J (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**: 843-846.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984). Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B-Cells with the T(14-18) Chromosome-Translocation. *Science* **226**: 1097-1099.

- Vande VC, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S *et al.* (2000). BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* **20**: 5454-5468.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 700-714.
- Vander Heiden MG, Li XX, Gottlieb E, Hill RB, Thompson CB, Colombini M (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **276**: 19414-19419.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* **84**: 627-639.
- Wang C., Youle RJ (2011). Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene*: -1.
- Weber A, Paschen SA, Heger K, Wilfling F, Frankenberg T, Bauerschmitt H *et al.* (2007). BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Cell Biol* **177**: 625-636.
- Widlak P, Garrard WT (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry* **94**: 1078-1087.
- Willimott S, Merriam T, Wagner SD (2011). Apoptosis induces Bcl-X(S) and cleaved Bcl-X(L) in chronic lymphocytic leukaemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **405**: 480-485.
- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI *et al.* (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**: 1294-1305.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE *et al.* (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**: 856-859.
- Wright CW, Duckett CS (2005). Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J Clin Invest* **115**: 2673-2678.

- Xiao CC, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang BC, Wang J *et al.* (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature Immunology* **9**: 405-414.
- Yan W, Samson M, Jegou B, Toppari J (2000). Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis. *Molecular Endocrinology* **14**: 682-699.
- Youle RJ, Karbowski M (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 657-663.
- Youle RJ, Strasser A (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 47-59.
- Zantl N, Weirich G, Zall H, Seiffert BM, Fischer SF, Kirschnek S *et al.* (2007). Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene* **26**: 7038-7048.
- Zha JP, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BGL-X(L). *Cell* **87**: 619-628.
- Zhai D, Jin C, Huang Z, Satterthwait AC, Reed JC (2008). Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1. *J Biol Chem* **283**: 9580-9586.
- Zhuang LQ, Lee CS, Scolyer RA, McCarthy SW, Zhang XD, Thompson JF *et al.* (2007). Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Modern Pathology* **20**: 416-426.

Abkürzungsverzeichnis

A1	Bcl-2 related protein A1
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] Diammoniumsalz
AdV	Adenoviraler Vektor
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ALM	Akrolentiginöses Melanom
Amp	Ampicillin
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammonium Persulfat
ATM/CHK2	Ataxia-Telangiectasia-Mutated/Checkpoint-2 protein Kinases
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2 Antagonist of Cell Death
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchoninacid
Bcl-2	B Cell Lymphoma/Leukemia-2
Bcl-x _{AK}	Bcl-x (Alternative Killer)
Bcl-x _L	Bcl-x (long form)
Bcl-x _S	Bcl-x (short form)
Bcl-w	Bcl-2-like Protein 2
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3-Interacting Domain Death Agonist
Bik/Nbk	Bcl-2-interAktig killer/Nbk/Bik natural born killer
Bim _{EL}	Bcl-2 interacting mediator of cell death (extra long)
Bim _L	Bcl-2 interacting mediator of cell death (long)
Bim _S	Bcl-2 interacting mediator of cell death (short)
BIR	Baculovirus IAP Repeat
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BNIP3	Bcl-2/ Bcl2 Adenovirus E1B 19 kda-Interacting Protein 3
Bok	Bcl-2 related ovarian killer

BSA	Bovine Serum Albumine
Caspase	Cysteiny-l-aspartate specific protease
CD95	Cluster of Differentiation 95
CD95L/FasL	CD95/Fas Ligand
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-Propansulfonat
CMV	Cytomegalovirus
CsCl	Caesium Chloride
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMRIE-C	1,2-Dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium-bromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doxy	Doxycyclin (Tetrazyclin Derivat)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinases
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis
FADD	Fas-Associated Death Domain Protein
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FLIP	FLICE-Inhibitory Protein
GAPDH	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase

h	Stunde
H2-DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetate
Hrk	Harakiri
Hrp	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase)
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IFN-alpha	Interferon-alpha
IL-2	Interleukin-2
JC-1	5,5',6,6'tetrachloro1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl carbocyaniniodide
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	Kilo Dalton
LC3	Autophagosome-associated protein Light Chain 3
LDH	Laktat-Dehydrogenase-Enzym
LMM	Lentigo Malignes Melanom
MAP	Mitogen-Activated Protein
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia Sequence 1
min	Minute
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation
mRNA	messenger RNA
NAC	N-Acetylcystein
NaCi	Natriumcitrat
NHM	Normale Humane Melanozyten
NMM	Noduläres Malignes Melanom
Noxa	Angelehnt an das griechische Wort „schädlich“
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxyethoxyethanol
OD	Optische Dichte

p	Plasmid
(P)	Pelletfraktion
p53	p35 – baculovirus encoded inhibitor
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaques Forming Units (Plauebildende Einheiten)
PI	Propidiumjodid
PIDD	p53 Induced Protein with Death Domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RGP	Radial Growth Phase
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (Reactive Oxygen Species)
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTCA	Echtzeit-Zellanalyse (Real-Time Cell Analysis)
(S)	Supernatant
Scr	Scramble
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serine
siRNA	small interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
Spike	Small protein with inherent killing effect
SSM	Superficiell Spreitendes Melanom
TAE	Tris-Acetat
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N, N',N'-tetramethylethylenediamin

Tet	Tetracyclin
TM	Transmembrandomäne
TMRM	Tetramethyl rhodamine methyl ester perchlorate
TNF- α	Tumour necrosis factor- α
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRE	Tetracycline-Responsive Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	tetracycline-kontrollierter Transaktivator
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VGP	Vertical Growth Phase
WST-1	Water Soluble Tetrazolium
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein
z-VAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluormethylketon

Publikationsliste

1. **Michael Plötz**, Bernhard Gillissen, Sandra-Annika Quast, Peter T. Daniel and Jürgen Eberle. The BH3-only protein BimL overrides Bcl-2-mediated apoptosis resistance in melanoma cells (J Invest Dermatol. 2012, Under Review).
2. **Michael Plötz**, Amir M Hossini., Bernhard Gillissen., Peter T Daniel, Jürgen Eberle Bcl-x_S disrupts VDAC-Bak interaction and triggers apoptosis in human melanoma cells (Cell Death Differ. 2012 Jun 15. doi: 10.1038/cdd.2012.71.).
3. **Michael Plötz**, Amir M Hossini., Bernhard Gillissen., Peter T Daniel., Eggert Stockfleth, Jürgen Eberle. Mutual regulation of Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain as shown by the BH3-lacking protein Bcl-x_{AK} (PLoS One. 2012;7(4):e34549. Epub 2012 Apr 10).
4. Nadya Al-Yacoub, Lothar F. Fecker, Markus Möbs, **Michael Plötz**, Frank K. Braun, Wolfram Sterry and Jürgen Eberle. Apoptosis induction by SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells is related to downregulation of c-FLIP and enhanced TRAIL signalling (J Invest Dermatol. 2012 May 3. doi: 10.1038/jid.2012.125).
5. Frank K. Braun, Nadya Al-Yacoub, **Michael Plötz**, Markus Möbs, Wolfram Sterry and Jürgen Eberle. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cells and enhances sensitivity for TRAIL by c-FLIP downregulation (J Invest Dermatol. 2012 Feb;132(2):429-39. doi: 10.1038/jid.2011.316. Epub 2011 Oct 20).
6. Anja Berger, Sandra-Annika Quast, **Michael Plötz**, Martin Hein, Manfred Kunz, Peter Langer and Jürgen Eberle. Sensitization of melanoma cells for death ligand-induced apoptosis by an indirubin derivative – enhancement of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways (Biochem Pharmacol. 2011 Jan 1;81(1):71-81. Epub 2010 Sep 19).
7. Jeannine C. Franke, **Michael Plötz**, Aram Prokop, Christoph C. Geilen, Hans-Günther Schmalz and Jürgen Eberle. New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue (Biochem Pharmacol. 2010 Feb 15;79(4):575-86. Epub).
8. Sandra Jäkel, Ulrike Kuckelkorn, Gudrun Szalay, **Michael Plötz**, Kathrin Textoris-Taube, Elisa Opitz, Karin Klingel, Stefan Stevanovic, Reinhard Kandolf, Katja Kotsch, Karl Stangl, Peter M. Kloetzel and Antje Voigt. Differential interferon responses enhance viral epitope generation by myocardial immunoproteasomes in murine enterovirus myocarditis (Am J Pathol. 2009 Aug;175(2):510-8. Epub 2009 Jul 9).

Kongressbeiträge

Jahr	Kongress
2012	20th ECDO Euroconference on Apoptosis “From Death to Eternity”, 2012 Rom, Italien
	Deutscher Krebskongress, 2012 in Berlin
2011	19th ECDO Euroconference on Apoptosis “Metabolism, Epigenetics and Cell Death”, 2011, Stockholm, Schweden
2010	Swiss Apoptosis Meeting, 2010 in Bern
	Deutscher Krebskongress, 2010 in Berlin
2009	17th ECDO, Euroconference on Apoptosis, Destruction, Degradation and Death, 2009 Paris, Frankreich

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michael Plötz, geb. am 07.01.1978 in Berlin, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war, sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren im Fach Biologie des Fachbereichs für Biologie, Chemie und Pharmazie der Freien Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 28.06.2012

Michael Plötz

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Privat-Dozent Dr. J. Eberle bedanken, der mir das überaus interessante Dissertationsthema zur Verfügung gestellt hat und für seine Anleitung und stete Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen immer zur Verfügung stand. Des Weiteren möchte ich mich auch für die kontinuierliche Unterstützung des Projektes, die stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragende Betreuung bedanken, die wesentlich zur Vervollkommnung dieser Arbeit beitrugen.

Bei Herrn Professor Mutzel bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Lothar F. Fecker danke ich ganz besonders für sein technisches Wissen und seine praktische Hilfestellung im Laboralltag.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernhard Gillissen sowohl für seine technische Unterstützung als auch für die fachlichen Diskussionen bedanken.

Außerdem danke ich Dr. Amir M. Hossini, Dr. Giorgios Kokolakis, Frank Braun, Stefanie Rückert, Conny Schwarz, Annika Quast, Anja Berger und allen, die nicht persönlich genannt sind, für die nette Atmosphäre und Hilfe im Labor.

Meinen Eltern, Bärbel und Günther Plötz, und meiner Oma Sigrid Plötz bin ich sehr dankbar für die Unterstützung und das Vertrauen in mich, das auf besondere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Meinen Schwiegerfreunden Karin und Gerd Nibbrig danke ich, dass sie mir so schnell das Gefühl gaben, Teil ihrer Familie zu sein.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Freundin Maike Nibbrig ganz besonders bedanken, die mich insbesondere emotional unterstützt hat und immer an mich geglaubt hat und in mich und mein Können vertraut hat.