

---

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>01</b>
1.1. Das maligne Melanom.....	01
1.2. Apoptose.....	03
1.3. Die Funktionen der Caspasen in der Apoptose.....	06
1.4. Signalwege der Apoptose.....	09
1.5. Die Proteine der Bcl-2-Familie.....	14
1.6. Caspasen-unabhängiger Zelltod.....	19
1.7. Lysosomen und Cathepsine in der Apoptose.....	21
1.8. Fragestellung der Arbeit.....	23
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Material</b>	
<b>2.1.1. Material für Nukleinsäuretechniken.....</b>	<b>25</b>
2.1.1.1. Vektoren und Plasmide.....	25
2.1.1.2. Enzyme.....	25
2.1.1.3. Transformation.....	25
2.1.1.4. Kits zur Nukleinsäureextraktion.....	25
<b>2.1.2. Material für zellbiologische Techniken.....</b>	<b>26</b>
2.1.2.1. Eukaryotische Zellen und Nährlösungen.....	26
2.1.2.2. Transfektion.....	27
2.1.2.3. DNA-Antisense.....	27
2.1.2.4. RNA-Interferenz.....	27
2.1.2.5. Caspase- und Cathepsininhibitoren.....	28
<b>2.1.3. Material für RNA- und Proteinanalytik.....</b>	<b>28</b>
2.1.3.1. Northern-Blot.....	28
2.1.3.2. SDS-PAGE.....	29
2.1.3.3. Western-Blot.....	30
<b>2.1.4. Material für Nachweise von Apoptose und Nekrose.....</b>	<b>31</b>
2.1.4.1. Apoptosestimulanzien.....	31
2.1.4.2. Kits zur Detektion von Apoptose und Nekrose.....	31
2.1.4.3. DNA-Färbungen (Bisbenzimid, TUNEL).....	31
<b>2.1.5. Sonstige Materialien.....</b>	<b>32</b>
2.1.5.1 Weitere Lösungen und Puffer.....	32
2.1.5.2. Chemikalien und Radiochemikalien.....	32
2.1.5.3. Sonstige Materialien.....	33
2.1.5.4. Geräte.....	34

**2.2. Methoden**

<b>2.2.1. Nukleinsäuretechniken</b> .....	35
2.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	35
2.2.1.2. Agarosegelelektrophorese.....	35
2.2.1.3. Restriktion.....	35
2.2.1.4. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.1.5. Ligation.....	36
2.2.1.6. Transformation.....	36
2.2.1.7. Plasmid-Präparation.....	36
<b>2.2.2. Zellbiologische Techniken</b> .....	37
2.2.2.1. Passage und Lagerung eukaryotischer Zellen.....	37
2.2.2.2. Wachstumskurven.....	37
2.2.2.3. Transfektion.....	38
2.2.2.4. Konstruktion stabiler Zellklone mit Hilfe des Tet-On-Expressionssystems.....	38
2.2.2.5. DNA-Antisense.....	40
2.2.2.6. RNA-Interferenz.....	40
2.2.2.7. Inhibition von Caspasen und Cathepsinen.....	41
2.2.2.8. Herstellung einer gereinigten Mitochondrien- und Zytosolfraktion.....	41
2.2.2.9. Aufreinigung eines Lysosomen-freien zytosolischen Extraktes.....	41
2.2.2.10. Acridin-Orange-Färbung.....	42
<b>2.2.3. RNA- und Proteinanalytische Methoden</b> .....	42
2.2.3.1. Northern-Blot.....	42
2.2.3.2. Herstellung von Proteinlysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
2.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	44
2.2.3.4. Western-Blot.....	45
2.2.3.5. Nachweis von Caspasenspaltprodukten.....	46
2.2.3.6. Nachweis von PARP-Spaltprodukten.....	46
<b>2.2.4. Nachweise für Apoptose und Nekrose</b> .....	46
2.2.4.1. DNA-Fragmentierungs-ELISA.....	46
2.2.4.2. Nekrose-ELISA.....	47
2.2.4.3. Caspase-3-Aktivitäts-ELISA.....	48
2.2.4.4. DNA-Leiter.....	48
2.2.4.5. Zellzyklusanalyse.....	49
2.2.4.6. Bisbenzimid-Färbung.....	49
2.2.4.7. TUNEL-Färbung.....	50
<b>2.2.5. Tierexperimente</b> .....	50
<b>2.2.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse</b> .....	51

---

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Expression der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Nbk und Bax in humanen Melanomzellen.....</b>	<b>52</b>
3.1.1. Basale Expression von Nbk und Bax in normalen humanen Melanozyten und humanen Melanomzelllinien.....	52
3.1.2. Die Verringerung der Bax-Expression durch DNA-Antisense und RNA-Interferenz reduziert die Apoptosesensitivität von Melanomzellen.....	55
3.1.3. Transiente Überexpression von Nbk und Bax induziert Apoptose in Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien.....	57
3.1.4. Stabile Überexpression von Nbk und Bax induziert Apoptose in Tetracyclin-regulierbaren Melanomzellen.....	59
3.1.5. Die Expression pro-apoptotischer Gene hemmt die Proliferation in Melanomzellen.....	60
3.1.6. Nbk und Bax sensitivieren Melanomzellen für pro-apoptotische Stimuli.....	61
3.1.7. Nbk und Bax verlangsamen das Melanomwachstum <i>in vivo</i> .....	63
<b>3.2. Verstärkung der Doxycyclin-regulierten Expression der pro-apoptotischen Proteine Nbk und CD95-Ligand in humanen Melanomzellen.....</b>	<b>65</b>
3.2.1. Zeitabhängige Regulation der Doxycyclin-abhängigen Proteinexpression und Apoptoseinduktion bei SKM13-Nbk und SKM13-CD95L.....	65
3.2.2. DMSO verstärkt die Doxycyclin-induzierte Expression von Nbk und CD95L in stabil-transfizierten Melanomzellen.....	66
3.2.3. DMSO verstärkt die Doxycyclin-regulierbare Proteinexpression nach transienter Transfektion von Nbk in die Melanomzelllinien SK-Mel-13 und Bro.....	68
<b>3.3. Der Mechanismus der Nbk-induzierten Apoptose im Vergleich zur CD95L-induzierten Apoptose in humanen Melanomzellen.....</b>	<b>69</b>
3.3.1. Nbk induziert Chromatinkondensation und Zellkernverdichtung in Melanomzellen.....	69
3.3.2. Nbk-Expression führt zu DNA-Einzelstrangbrüchen.....	70
3.3.3. DNA-Leiter und hypodiploide Zellkerne nach Nbk-Induktion.....	71
3.3.4. Geringe Spaltung der Todessubstrate DFF45 und PARP im Zuge der Nbk-induzierten Apoptose.....	72
3.3.5. Keine Aktivierung von Caspasen in der durch Nbk induzierten Apoptose in Melanomzellen.....	74
3.3.6. Keine Freisetzung der pro-apoptotischen mitochondrialen Faktoren Cytochrom C und AIF im Verlauf der Nbk-induzierten Apoptose.....	76
3.3.7. Keine Hemmung der Nbk-induzierten Apoptose durch selektive Caspaseinhibitoren..	77
3.3.8. Die Pancaspaseninhibitoren zVAD-fmk und QVD-OPh hemmen Apoptose nach Nbk-Induktion weniger effektiv als nach CD95L-Induktion.....	79

---

<b>3.4. Die Rolle der Cathepsine in der Nbk- und der CD95L-induzierten Apoptose.....</b>	<b>81</b>
3.4.1. Selektive Cathepsininhibitoren verringern die Apoptose nach Nbk-Induktion.....	81
3.4.2. Der Inhibitor zFA-fmk hemmt die durch Nbk und die durch CD95L induzierte Apoptose durch Blockierung der Aktivität von Cathepsin B und L.....	82
3.4.3. Der Inhibitor zFA-fmk blockiert die durch CD95L induzierte Apoptose ohne die Spaltung von Caspase-3 und Caspase-8 zu hemmen.....	83
3.4.4. Nbk und CD95L induzieren eine Anhebung des lysosomalen pH-Wertes.....	84
3.4.5. Doxorubicin-induzierte Apoptose aktiviert Caspase-3 in SKM13-Nbk-Zellen und ist nur schwach inhibierbar durch zFA-fmk.....	86
3.4.6. Die Freisetzung der Cathepsine aus den Lysosomen erfolgt früh nach Nbk-Expression, jedoch erst spät nach CD95L-Induktion.....	87
3.4.7. Die Verstärkung der Nbk-Expression mit Hilfe von DMSO führt schließlich auch zur Spaltung von Caspasen.....	89
3.4.8. Die DMSO-verstärkte Nbk-Expression führt zur Verstärkung der Cathepsinfreisetzung.....	91
3.4.9. Der Inhibitor zFA-fmk hemmt die Nbk-induzierte Apoptose und verändert das Spaltprodukt von Caspase-3 nach DMSO-Verstärkung.....	92
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>94</b>
4.1. Apoptoseinduktion durch Bax und Nbk in Melanomzellen.....	94
4.2. Die durch Nbk induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Caspasen.....	97
4.3. Die Rolle der Cathepsine in der Nbk- und der CD95L-induzierten Apoptose.....	100
4.4. Die Bedeutung alternativer Signalwege in der Apoptose.....	107
4.5. Apoptoseinduktion durch Bcl-2-Proteine als therapeutischer Ansatz.....	108
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>111</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>128</b>
6.1. Zusammenfassung.....	128
6.2. Summary.....	130
<b>7. Anhang.....</b>	<b>132</b>
7.1. Publikationen.....	132
7.2. Curriculum Vitae.....	133