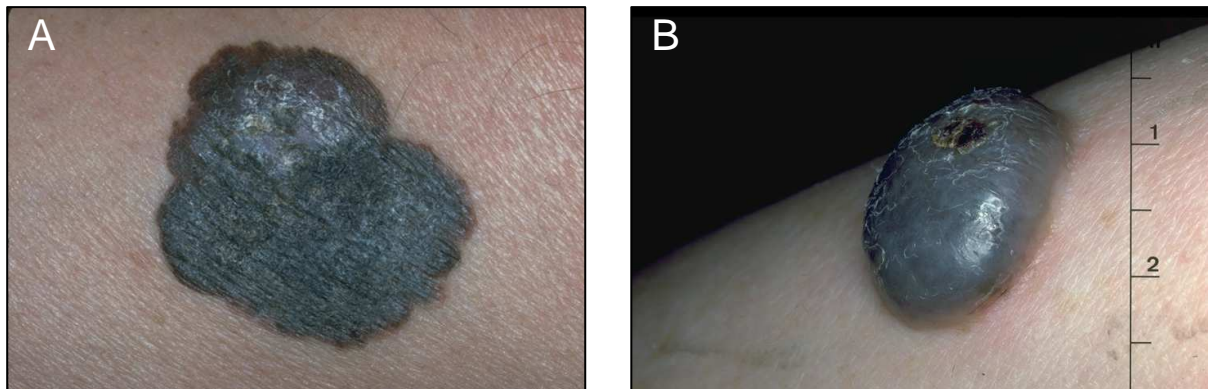


1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein invasiver, maligner Tumor, der von den Pigment-bildenden Zellen der Haut (Melanozyten oder Nävuszellen), seltener der Schleimhaut, der Aderhaut des Auges oder den Hirnhäuten ausgehen kann. Maligne Melanome können sich spontan auf vorher völlig normaler Haut oder aus einem vorbestehenden Nävuszellnävus (Leberfleck, Muttermal) entwickeln. Ausgangspunkt des Wachstums der Tumorzellen ist in den meisten Fällen das Stratum basale der Epidermis (unterste Schicht der Oberhaut). Je nach Ausbreitungsbestreben und Lokalisation der malignen Tumorzellen unterscheidet man die Manifestationsformen des malignen Melanoms. Superfiziell spreitendes Melanom und noduläres Melanom sind die Typen des malignen Melanoms mit dem häufigsten Vorkommen (Abb. 1). Das Lentigo-maligna-Melanom, akrolentiginöses Melanom sowie die nicht klassifizierbaren Melanome werden mit wesentlich geringerer Häufigkeit diagnostiziert.

**Abb. 1: Das superfiziell spreitende Melanom und das noduläre Melanom stellen die Hauptmanifestationsarten des malignen Melanoms dar**

(A) Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) bildet mit ca. 65% der Fälle die häufigste Form des malignen Melanoms. Das SSM wächst vor allem in horizontaler Richtung und weist relativ gute Heilungschancen auf wenn es in einem frühen Stadium erkannt wird. (B) Mit ca. 20% der Fälle stellt das noduläre Melanom (NM) die zweithäufigste Ausprägungsart des malignen Melanoms dar. Das Wachstum des NM verläuft sowohl horizontal als auch vertikal und weist deshalb eine typische knotige Ausprägung auf. Aufgrund früher Metastasierung weist das NM eine schlechte Prognose auf.

Unabhängig ihres Typs werden maligne Melanome nach den Maßstäben der American Joint Committee on Cancer (AJCC) von 2002 klinisch in vier Stadien (I, II, III, IV) unterteilt. Die Stadien richten sich nach der Gesamttumordicke (Stadium I: Tumor ≤ 1 mm, Stadium II: Tumor > 1 mm), sowie nach dem damit assoziierten Auftreten von Metastasen (Stadium III: Regionale Lymphknoten-Metastasen, Stadium IV: Systemische Metastasen). Mit eingetretener Disseminierung der malignen Erkrankung sinkt die Überlebenserwartung der betroffenen Patienten drastisch. Die 10-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt von 85% in Stadium I auf 6 % in Stadium IV (Thompson *et al*, 2005) und resultiert in eine

Mortalitätsrate, die höher liegt als bei allen anderen Hauttumoren zusammen (Garbe und Blum, 2001).

Die Häufigkeit des malignen Melanoms hat in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen. Sie unterliegt dabei starken geographischen Schwankungen. Die weltweit höchste Inzidenz findet sich in Australien mit bis zu 70 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr. In Mitteleuropa beträgt die Inzidenzrate ca. 12 Fälle je 100.000 Einwohner pro Jahr. In Deutschland hat sich die Häufigkeit des malignen Melanoms im Verlauf der letzten 15 Jahre verdoppelt. Als besonderer Risikofaktor gilt dabei, neben einer genetischen Prädisposition, die durch ein verändertes Freizeitverhalten bedingte intensive UV-Exposition der Haut und die damit einhergehende UV-induzierte Mutagenese.

Therapie des malignen Melanoms

Die Therapie der Wahl beim primären malignen Melanom ist die frühzeitige chirurgische Exzision. Mit einem weiten Sicherheitsabstand in Abhängigkeit von der Eindringtiefe und der anatomischen Lokalisation wird der Tumor entfernt. Ein großes therapeutisches Problem stellen Patienten dar, die keiner chirurgischen Therapie zugänglich sind. Mit fortschreitendem Krankheitsstadium des Melanoms sind die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt, weil herkömmliche Therapien wie die Strahlen- oder Chemotherapie aufgrund resistenter Melanomzellen nur unzureichende Ansprechraten erzielen (Orfanos und Garbe, 2001). So weist das am häufigsten angewandte Zytostatikum Dacarbazin (DTIC) nur eine 16%-ige Ansprechrate in der Behandlung des malignen Melanoms auf (Atallah und Flaherty, 2005). Eine komplette Remission ist dementsprechend selten zu erreichen und die Entwicklung neuer Therapieansätze unbedingt notwendig.

Besonderes Potential zur Behandlung des malignen Melanoms verspricht die gezielte Induktion von Apoptose, des so genannten programmierten Zelltodes, direkt in den Tumorzellen. Bei maligner Transformation, Tumorprogression und Metastasierung konnten in den letzten Jahren Veränderungen im Ablauf Apoptose-regulierender Signalkaskaden entdeckt werden. Diese Veränderungen können nicht nur zu einem unkontrollierten Wachstum von malignen Zellpopulationen führen, sondern auch die körpereigenen Immunreaktionen gegen den Tumor verhindern. Darüber hinaus induziert die Mehrzahl der gängigen Chemotherapeutika (DTIC, Doxorubicin, Etoposid, Cisplatin usw.) intrazelluläre Apoptosekaskaden, die den Tod der Krebszellen einleiten sollen. Chemotherapieresistente Zellen weisen häufig eine Apoptosedefizienz auf, die bedeutend zur Therapieresistenz beiträgt (Johnstone *et al*, 2002).

Die Aufklärung apoptotischer Signalwege schafft somit eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien und für die Verbesserung bestehender Ansätze. Speziell beim malignen Melanom bieten sich pro- und anti-apoptotische Signalkaskaden als

potentielle Ziele therapeutischer Ansätze an, da sowohl in Melanozyten als auch in Melanomzellen eine Vielzahl der Apoptosesignalproteine exprimiert werden und die Zellen prinzipiell auch für Apoptosesignale zugänglich sind (Sheridan *et al*, 1981; Pisha *et al*, 1995; Hahne *et al*, 1996; Hussein *et al*, 2003a). Mit Hilfe der Überexpression pro-apoptotischer Gene könnten Strategien entwickelt werden, die die Resistenzentwicklungen gegen Chemotherapeutika umgehen und die Wirkungsweise der Zytostatika synergistisch verstärken.

1.2. Apoptose

Der Begriff Apoptose (*aus dem Griechischen: das Abfallen, der Niedergang*) bezeichnet einen physiologischen Prozess zur Eliminierung von Zellen, der genetisch kodiert ist und deshalb auch den Namen „programmierter Zelltod“ trägt (Lockshin und Williams, 1965; Kerr *et al*, 1972). Für das Überleben eines multizellulären Organismus ist der Zelltod nicht mehr benötigter oder gefährlicher Zellen von so essentieller Bedeutung wie Proliferation und Differenzierung. Am Beispiel des Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte bereits 1977 gezeigt werden, dass im Verlauf seiner Entwicklung exakt 131 seiner 1090 Zellen apoptotisch eliminiert werden (Sulston und Horvitz, 1977). In einem viel größeren Organismus wie z.B. dem Menschen, müssen entsprechend mehr Zellen beseitigt werden. Tatsächlich werden täglich Millionen von überflüssigen, infizierten, transformierten oder verletzten Zellen zum Wohle des gesamten Organismus eliminiert. Apoptose wird deshalb auch als altruistischer Zelltod bezeichnet, der sich klar von der pathologischen Form des Zelltodes, der Nekrose, unterscheidet (Nicotera und Melino, 2004).

In einem gesunden Organismus ist eine Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose unentbehrlich. Bei einer Störung dieses fein regulierten Systems können sich schwerwiegende Folgen für den Gesamtorganismus ergeben. So spielt eine Fehlregulation zugunsten verstärkter Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson) eine wichtige Rolle (Canu und Calissano, 2003; Petit *et al*, 2005). Auch bei HIV-Infektion ist die Balance zugunsten des pro-apoptotischen Signalweges verändert: An der Immunabwehr beteiligte T-Lymphozyten werden durch Apoptose eliminiert und die Immunantwort damit unterdrückt (Gougeon, 2003). Werden im Gegensatz dazu zu wenig Lymphozyten während ihrer Entwicklung eliminiert, so kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen (Mahoney und Rosen, 2005). Eine Suppression von Apoptose spielt vor allem aber bei der malignen Transformation von Zellen eine entscheidende Rolle (Vermeulen *et al*, 2005). Durch inaktivierende Mutationen pro-apoptotischer Gene oder durch Überexpression anti-apoptotischer Faktoren entstehen transformierte Zellen, die unkontrolliert proliferieren und resistent gegenüber intrinsischen (p53) und extrinsischen (Immunsystem) Apoptosestimuli sind. Eine solche Apoptosedefizienz

kann dann von grundlegender Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika, oder immuntherapeutischen Ansätzen sein (Igney und Krammer, 2002).

Apoptose im Vergleich zur Nekrose

Beim eukaryotischen Zelltod lassen sich prinzipiell apoptotische und nekrotische Vorgänge unterscheiden. Im Gegensatz zum aktiven, programmatischen „Selbstmord“ apoptotischer Zellen, wird Nekrose als Unfalltod der Zelle betrachtet. Obwohl unter pathologischen Bedingungen Apoptose und Nekrose koexistieren und ineinander übergehen können, lässt sich doch anhand charakteristischer morphologischer und biochemischer Merkmale zwischen beiden Prozessen unterscheiden. Nach mechanischer Verletzung, Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie), sowie Bakterieninfektion der Zelle kann es zum nekrotischen Zelltod kommen. Durch eine beschädigte Plasmamembran strömt Wasser osmotisch in die Zelle ein und bringt diese zum Platzen, wodurch Bestandteile des Zytosols in den Extrazellularraum gelangen. Pro-inflammatorische, zelluläre Faktoren provozieren Entzündungsreaktionen wonach das betroffene Gewebe oftmals vernarbt (Fink und Cookson, 2005).

Im Gegensatz dazu bleibt die Membranintegrität bei apoptotischen Zellen erhalten, so dass keine Entzündungsreaktion stattfinden kann (Abb. 2). Im Verlauf der Apoptose schnüren sich exozytotisch Membranvesikel von der Plasmamembran ab, die Fragmente der Zelle enthalten. Diese so genannten apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) stellen ein wichtiges morphologisches Charakteristikum der Apoptose dar und erlauben es Nachbarzellen bzw. Makrophagen die Überreste der sterbenden Zelle aufzunehmen und zu verwerten, ohne dass zytosolische Bestandteile in den extrazellulären Raum austreten können (Nishikawa und Sasaki, 1996; Casey *et al.*, 2004).

Durch die Exposition bestimmter Signalmoleküle markieren sich apoptotische Zellen zudem für die Phagozytose durch Immunzellen. Das Aminophospholipid Phosphatidylserin befindet sich unter physiologischen Bedingungen überwiegend in der zytosolischen Seite der Plasmamembran, während Phospholipide mit Cholin-Kopfgruppen primär in der Außenseite lokalisiert sind. Diese Asymmetrie wird durch Aktivität einer Translokase aufrechterhalten, die Aminophospholipide in die Plasmamembraninnenseite transportiert (Daleke, 2003). In der Apoptose wird diese Translokase inhibiert und gleichzeitig die Aktivität einer Lipid-Scramblase („Flipase“) induziert, die Phospholipide zwischen beiden Seiten der Membran austauscht. Innerhalb kürzester Zeit kommt es deshalb zur Translokation von Phosphatidylserin in die Außenseite der Plasmamembran, wo es von Makrophagen, die einen entsprechenden Rezeptor aufweisen, erkannt wird. Auf diese Weise werden apoptotische Zellen bzw. apoptotische Körperchen für die Phagozytose markiert (Botto, 2004).

Im Nukleus apoptotischer Zellen kondensiert das Chromatin und der Kern schrumpft. Endonukleasen spalten die chromosomale DNA zwischen den Nukleosomen, so dass Spaltprodukte mit einer Größe von ca. 180 bp (ein Nukleosom) oder Vielfachen davon auftreten. Diese charakteristische DNA-Fragmentierung kann elektrophoretisch im Agarosegel als so genannte DNA-Leiter sichtbar gemacht werden und gilt als entscheidendes Kriterium der Apoptose (Ellis *et al.*, 1991). Der DNA-Fragmentierung geht eine Kaskade von intrazellulären Prozessen voraus. Durch die Aktivität Apoptose-spezifischer Proteasen werden charakteristische Proteine, so genannte Todessubstrate, gespalten. Der gesamte Vorgang der Apoptose verläuft aktiv und energieabhängig.

Apoptose ist ein regulierter, biochemischer Prozess und kann durch das Auftreten pro-apoptotischer bzw. durch den Verlust anti-apoptotischer Signale initiiert werden. Das intrazelluläre Gleichgewicht zwischen aktivierten pro- und anti-apoptotischen Signalen entscheidet letztendlich über das weitere Schicksal der Zelle. Eine ausgewogene Balance dieser beiden antagonistischen Signalwege garantiert die biologische Homöostase und die physiologischen Funktionsabläufe in den Geweben multizellulärer Organismen (Jacobson *et al.*, 1997).

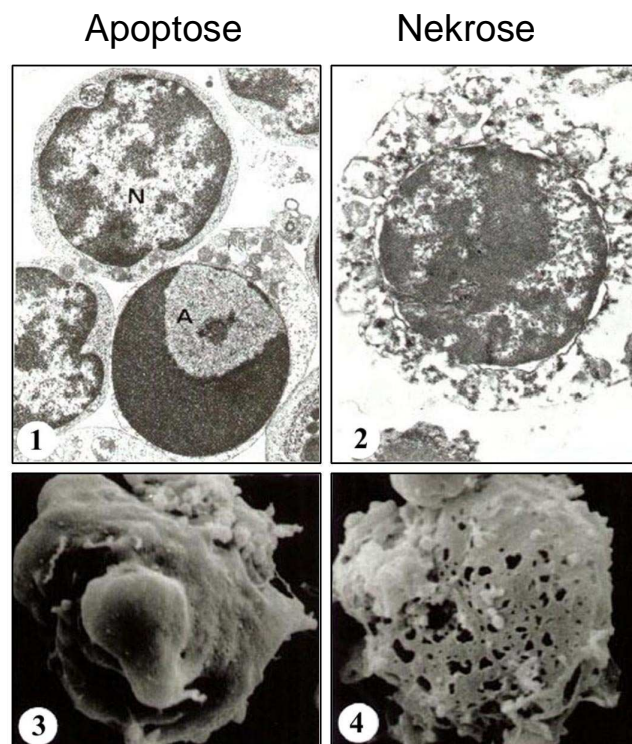


Abb. 2: Morphologische Unterschiede zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen

Aufnahmen mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop. (1) Die 8000-fache Vergrößerung zeigt Chromatinkondensation im Kern der apoptotischen Zelle (A), während die Morphologie von Plasmamembran und Organellen der einer normalen Zelle (N) gleicht. (2) Die 10000-fache Vergrößerung einer nekrotischen Zelle zeigt eine zerstörte Plasmamembran und beschädigte Organellen, während die Morphologie des Zellkerns der einer gesunden Zelle gleicht.

Aufnahmen mit dem Scan-Elektronen-Mikroskop, 5000-fache Vergrößerung: (3) An der Plasmamembran einer apoptotischen Zelle werden Membranvesikel (apoptotische Körperchen) abgeschnürt, während die Membranintegrität gewährleistet bleibt. (4) Die Plasmamembran einer nekrotischen Zelle ist deutlich perforiert und damit durchlässig für zytosolische Faktoren geworden. Abb. nach Facieri *et al.*, 1994.

1.3. Die Funktionen der Caspasen in der Apoptose

Schematisch lässt sich die Apoptose in eine Initiationsphase und eine Exekutionsphase unterteilen. Beide Phasen sind nach der Aktivierung spezifischer **Cystein-abhängiger Aspartat-spaltender Proteasen** (Caspasen) benannt. Die humane Caspasenfamilie umfasst elf Mitglieder, die aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Hauptgruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe ist in die Exekution, die zweite Gruppe in die Initiation der Apoptose involviert. Die Mitglieder der dritten Gruppe sind für die posttranslationale Prozessierung von Zytokinen bei Entzündungsprozessen verantwortlich (Fuentes-Prior und Salvesen, 2004). Caspase-11, -12, -13 und -14 sind keiner dieser Gruppen zuzuordnen. Während Caspase-14 mit der Enddifferenzierung von Keratinozyten in Korrelation gebracht wird (Eckhart *et al*, 2000), konnte die Rolle von Caspase-12 in humanen Zellen noch nicht abschließend geklärt werden. In murinen Zellen ist Caspase-12 für die Induktion der Apoptose am Endoplasmatischen Retikulum (ER) von großer Bedeutung, in humanen Zellen wird jedoch vor allem eine mutierte, inaktive Form des Enzyms exprimiert (Ho und Hawkins, 2005). Die Expression von Caspase-11 ist ebenfalls auf murine Zellen beschränkt, während es sich bei Caspase-13 um ein Enzym handelt, das in Rinderzellen vorkommt, jedoch nicht beim Menschen (Koenig *et al*, 2001; Degterev *et al*, 2003). Die phylogenetischen Beziehungen der humanen Caspasen sind in Abb. 3 dargestellt.

Die apoptotisch relevanten Caspasen werden in Initiator- und Effektor-Caspasen unterschieden (Shi, 2002). Die Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) weisen im Gegensatz zu den Effektoren eine längere Pro-Domäne auf, die Aminosäuresequenzen für die Selbstassoziation und für die Bindung an aktivierende Adaptoren beinhalten. Zusammen mit diesen Adaptoren bilden Initiator-Caspasen oftmals Proteinkomplexe aus (Stennicke und Salvesen, 2000). So ist Pro-Caspase-9 an das Adaptorprotein Apaf-1 assoziiert und bildet zusammen mit Cytochrom C stromabwärts der Mitochondrien das Apoptosom (Rodriguez und Lazebnik, 1999). Unterhalb der Todesrezeptoren bindet Pro-Caspase-8 im DISC (death-inducing signaling complex) an das Adaptorprotein FADD (Lavrik *et al*, 2003) und Pro-Caspase-2, die nach genotoxischem Stress über den p53-Weg aktiviert werden kann, ist an die Adaptorproteine PIDD (p53-induced protein with death domain) und RAIDD (RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) im PIDDosom-Komplex assoziiert (Tinel und Tschopp, 2004).

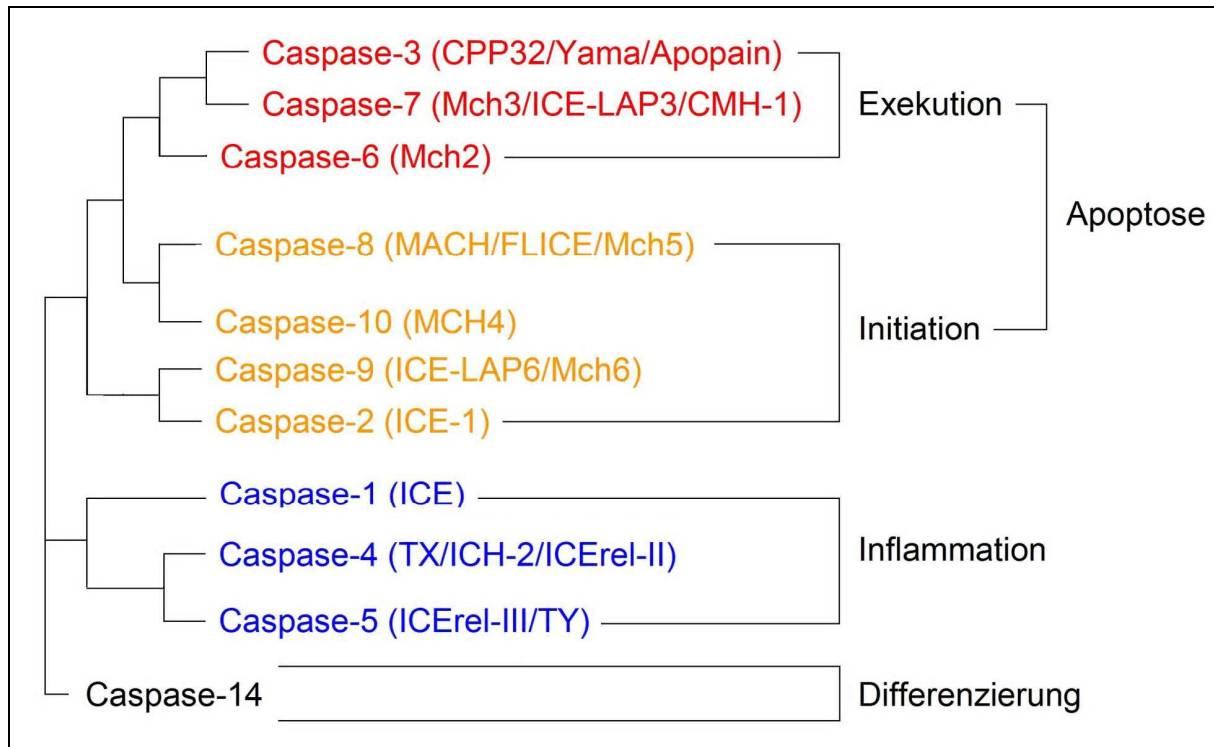


Abb. 3: Dendrogramm humaner Caspasen

Aufgrund ihrer Substratspezifität lassen sich die humanen Caspasen in drei Untergruppen einteilen. Effektor-Caspasen, die in der Exekutionsphase der Apoptose aktiv sind (rot), Initiator-Caspasen der Initiationsphase der Apoptose (orange) und Caspasen der Entzündungsreaktion (blau). Caspase-14 hat eine Bedeutung bei der Differenzierung von Keratinozyten und ist deshalb nicht weiter klassifizierbar. Nicht dargestellt ist Caspase-12, da diese Protease mutationsbedingt keine Aktivität aufweist. Alternative Bezeichnungen der Caspasen sind in Klammern angegeben. Abb. modifiziert nach Adams, 2003.

Aktivierung von Caspasen

Aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität werden Caspasen als inaktive Zymogene synthetisiert. Diese besitzen jeweils eine große und eine kleine Untereinheit, die durch eine Linker-Domäne verbunden sind, sowie eine aminoterminal Pro-Domäne. Die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen erfolgt entweder autokatalytisch oder durch andere Proteasen. In zwei aufeinander folgenden Spaltungen an Aspartatresten wird zuerst die Pro-Domäne abgetrennt und anschließend die große von der kleinen Untereinheit durch Spaltung der Linker-Domäne gelöst. Zwei dieser Caspasenmonomere bilden ein aktives Dimer. Aktive Caspasen bilden also jeweils ein Heterotetramer aus zwei identischen, großen Untereinheiten (ca. 20 kDa) und zwei identischen, kleinen Untereinheiten (ca. 10 kDa).

Neueren Studien zufolge ist bei den Initiator-Caspasen die autokatalytische Spaltung in der Linker-Domäne nicht der kritische Schritt für die Aktivierung, sondern vielmehr die Dimerisierung der monomeren Enzyme in den Adaptorproteinkomplexen. Im so genannten „induced proximity“ Modell konnte für Caspase-8 gezeigt werden, dass nach induzierter Oligomerisierung die Aktivierung des Enzyms durch Autokatalyse erfolgte (Salvesen 1998).

Die Spaltung der Initiator-Caspase wurde in der Weiterentwicklung dieses Modells, das die Aktivierung durch Nähe („proximity-induced dimerisation“) beschreibt, noch weiter abgewertet (Shi Y 2001). So weist die prozessierte Form von Caspase-9 nach experimenteller Isolierung keine höhere enzymatische Aktivität auf als die zymogene Form, während sowohl gespaltene als auch ungespaltene Caspase-9 im Apoptosomkomplex, also in Gegenwart von Apaf-1 und anderer Caspase-9, bis zu 2000-fach aktiver ist (Rodriguez 1999, Srinivasula 2001). Die eigentliche Aktivität der Initiator-Caspasen erfolgt demnach durch die Dimerisierung, während der Vorgang der autokatalytischen Spaltung eher zur Stabilisierung des aktiven Dimers beiträgt (Boatright KM 2003). Im Gegensatz dazu kommen die Effektor-Caspasen, Caspase-3, -6, und -7, schon als latente Dimere im Zytosol vor und werden durch Spaltung (Abspaltung der Pro-Domäne und Aufspaltung der Linker-Domäne) über Initiator-Caspasen aktiviert (Chai J Wu Q 2001). Da Initiator- und Effektor-Caspasen nacheinander aktiviert werden, spricht man von einer Caspasenkaskade, die die Apoptose schrittweise realisiert.

Caspasensubstrate in der Apoptose

Die Substrate der Effektor-Caspasen sind Proteine, die in gesunden Zellen der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dienen, z.B. Strukturproteine, Reparaturenzyme oder Inhibitoren pro-apoptotischer Faktoren. Die Spaltung und Inaktivierung dieser Caspasensubstrate, die auch als Todessubstrate bezeichnet werden (Fischer *et al*, 2003), sind ein wichtiges Kennzeichen apoptotischer Zellen.

Die Prozessierung des nukleären Strukturproteins Lamin A durch Caspase-6 beschädigt die Kernmembran und begünstigt so die Chromatinkondensation in apoptotischen Zellen (Orth *et al*, 1996). Ein wichtiges Todessubstrat ist das Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Protein (PARP), das als DNA-Reparaturenzym nicht nur Einfluss auf die DNA-Synthese hat, sondern auch mit der apoptotischen DNA-Fragmentierung direkt antagonisieren würde und dementsprechend über Caspase-3 degradiert wird (An und Knox, 1996). Im Gegensatz dazu wird die Endonuklease CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) durch Caspase-3 indirekt aktiviert. Als Todessubstrat gilt ihr Inhibitor ICAD (Inhibitor of CAD), der durch Caspase-3 aufgespalten wird. Nach der Degradierung von ICAD wird CAD freigesetzt und führt nach der Translokation in den Zellkern zu der charakteristischen Fragmentierung der chromosomalen DNA (Enari *et al*, 1998). Durch die Degeneration zellulärer Strukturen und die Aktivierung von Endonukleasen werden die finalen Schritte der Apoptosekaskade durch die Effektor-Caspasen eingeleitet und ausgeführt.

Endogene Caspaseninhibition durch IAPs (Inhibitors of Apoptosis)

Auch nach Aktivierung der Effektor-Caspasen ist der Apoptoseweg für Zellen noch nicht unwiderruflich eingeleitet, da eine Familie von Proteinen die Aktivität der Caspasen inhibieren kann. Die Proteine dieser Familie werden als IAPs (Inhibitor of Apoptosis) bezeichnet und sind die einzig bekannten, physiologischen Caspaseninhibitoren (Richter und Duckett, 2000). Das gemeinsame Merkmal der acht bisher identifizierten IAP-Proteine (XIAP, hILP-2, c-IAP1, c-IAP2, Livin, NAIP, Survivin und BRUCE) ist die BIR-Domäne (Baculovirus IAP Repeat), ein konserviertes Sequenzmotiv mit dem sie direkt an die aktiven Domänen der Caspasen binden und deren enzymatische Aktivität inhibieren können (Wright und Duckett, 2005). Der dynamische Prozess der Apoptose mit seinen hierarchischen Signalkaskaden ist also auch in der späten Exekutionsphase noch durch die Zelle regulierbar. Die Expression der anti-apoptotischen IAPs ist in vielen Tumorzelllinien hochreguliert und begünstigt Apoptosedefizienz und Chemotherapieresistenz. Für Melanomzellen wurde eine verstärkte Expression der IAPs Livin im Vergleich mit normalen humanen Melanozyten beschrieben (Vucic *et al*, 2000).

1.4. Signalwege der Apoptose

Abhängig vom initialen, pro-apoptotischen Reiz, der auf eine Zelle einwirkt, können verschiedene Signalwege aktiviert werden, die zum großen Teil in zwei distinkten Apoptosekaskaden integriert werden. Im Allgemeinen wird deswegen bei Apoptose zwischen dem extrinsischen Signalweg, initiiert über Todesrezeptoren wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) und CD95 (Fas/APO-1), und dem intrinsischen Signalweg, hauptsächlich induziert durch p53, unterschieden. Letztendlich resultiert die Initiation des extrinsischen oder des intrinsischen Signalweges der Apoptose in die Aktivierung spezifischer Proteasen und der Proteolyse so genannter Todessubstrate. Dieses wiederum führt zum Tod der Zelle mit den bereits beschriebenen biochemischen und morphologischen Charakteristika.

Der Todesrezeptor-Weg (extrinsischer Signalweg)

Todesrezeptoren sind eine Gruppe von Transmembranproteinen, die eine Unterfamilie innerhalb der TNF α -Rezeptorfamilie bilden. Sie werden von spezifischen Todesliganden gebunden und vermitteln das Apoptosesignal intrazellulär über eine Todesdomäne auf Signalmoleküle (Daniel *et al*, 2001). Decoy-Rezeptoren, die sehr nah mit den Todesrezeptoren verwandt sind, besitzen diese Todesdomäne nicht. Damit fehlt ihnen die Möglichkeit das Todessignal in die Zelle weiterzuleiten und sie wirken anti-apoptotisch. Die CD95-vermittelte Apoptose ist, neben Granzyme B, der dominierende Mechanismus für die Apoptoseinduktion in der Immunantwort und für die Regulation von Entwicklung und Reifung

der Immunzellen (Krammer, 2000). Nach Bindung des CD95-Liganden (CD95L) erfolgt die Oligomerisierung der Rezeptoren und die Bildung des DISC (death-inducing signaling complex), der auch Initiator-Caspasen (Pro-Caspase-8 bzw. -10) enthält (Muzio *et al*, 1996). Intrazellulär assoziiert Pro-Caspase-8 über das Adaptorprotein FADD (Fas-associated death domain protein) mit CD95 und wird dadurch autokatalytisch aktiviert. In so genannten Typ-I-Zellen reicht die Aktivität der gespaltenen Caspase-8 aus, um direkt Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) zu aktivieren (Abb. 4). Damit wird die Exekutionsphase des Apoptoseweges initiiert, die über Spaltung und Inaktivierung spezifischer Todessubstrate letztendlich zum Tod der Zelle führt.

Der Signalweg der Apoptose in Typ-I-Zellen, zu denen z.B. Lymphozyten gehören, ist direkt und damit sehr schnell. In Typ-II-Zellen, z.B. Melanozyten, muss das Apoptosesignal zuerst über die Caspase-8-abhängige Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid an die Mitochondrienmembran transduziert und dort amplifiziert werden, bevor Effektor-Caspasen involviert werden können (Li *et al*, 1998; Luo *et al*, 1998).

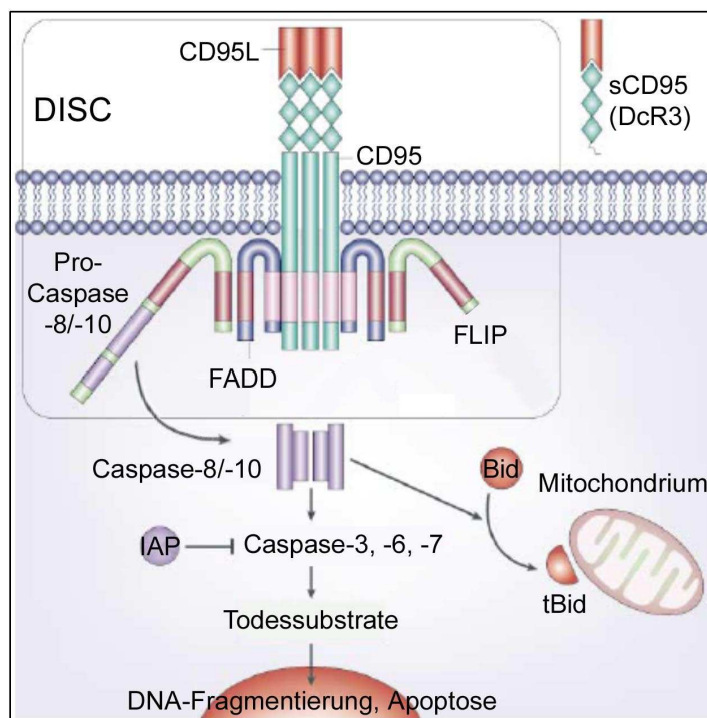


Abb. 4: Der Todesrezeptor-kontrollierte Apoptoseweg

Durch die Bindung des CD95-Liganden (CD95L) an den Rezeptor (CD95) wird die Bildung des DISC (death-inducing signaling complex) induziert. Eine Initiator-Caspase (8/10) assoziiert mit dem Adaptor FADD (Fas-associated death domain protein) und wird aktiviert. Die aktive Initiator-Caspase kann nun direkt eine Effektor-Caspase (3/6/7) aktivieren oder das Apoptosesignal über die Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid an die Mitochondrien leiten. Nach der Spaltung von Todessubstraten stirbt die Zelle, jedoch kann der Signalweg auf mehreren Ebenen unterbrochen werden. Der Decoy-Rezeptor (sCD95) verhindert die Aktivierung von CD95. FLIP (FLICE-inhibitory protein) blockiert die Rekrutierung von Caspase-8 an die DISC-Bindungsstellen. IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) können Effektor-Caspasen blockieren. Abb. modifiziert nach Igney und Krammer, 2002.

Das Vorhandensein von Todesliganden muss jedoch nicht zwangsläufig zu Apoptose führen. Der Todesrezeptor-kontrollierte Signalweg kann auf verschiedenen Ebenen unterbrochen werden. Die Bindung von CD95L an seinen Rezeptor wird durch den Decoy-Rezeptor sCD95/DcR3 kompetitiv verhindert und damit die Initiierung des Signalweges unterbunden (Ohshima *et al*, 2000). Unterhalb von CD95 konkurriert das Protein FLIP (FLICE-inhibitory protein) mit der Initiator-Caspase-8 um Bindungsstellen am DISC und verhindert auf diese

Weise die Aktivierung der Pro-Caspase (Kataoka, 2005). Sogar auf der Ebene der Effektor-Caspasen können IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) den Signalweg noch stoppen (Yang und Li, 2000). In Melanomzellen ist CD95 deutlich exprimiert, CD95L hingegen nicht (Chappell *et al*, 1999; Eberle *et al*, 2003). Ergebnisse, nach denen Melanomzellen über eine erhöhte Expression von CD95L im so genannten „Fas-Counterattack“ Tumor-infiltrierende Lymphozyten abwehren können (Hahne *et al*, 1996), konnten nicht bestätigt werden.

Der Transkriptionsfaktor p53

Der intrinsische Signalweg kann über verschiedene Apoptosestimuli wie den Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Interaktion mit dem Todesrezeptor-regulierten Signalweg aktiviert werden (Green und Kroemer, 2004). Hauptsächlich wird der mitochondriale Signalweg jedoch durch den Transkriptionsfaktor p53 eingeleitet, der nach zellulärem Stress, wie DNA-Schäden, Hypoxie oder durch mitogene Onkogene (wie das adenovirale E1A Protein) aktiviert wird. Als Tumorsuppressor kann aktiviertes p53 den Zellzyklus stoppen, z.B. durch Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p21^{Cip1}, oder die Apoptose induzieren (Philipp-Staheli *et al*, 2004). Die pro-apoptotische Aktivität von p53 kann sowohl über eine Transaktivierung pro-apoptotischer Proteine des mitochondrialen Signalapparates erfolgen, z.B. die Bcl-2-Proteine Bax, Bak, Puma, Noxa, Nbk/Bik oder Caspase-9 und Apaf-1, als auch durch direkte aktivierende Interaktionen von p53 mit Bax und Bak (Moll *et al*, 2005). Durch diese Interventionen erhalten Zellen die Zeit, die entstandene Schäden zu beheben bzw. sich über Apoptose selbst zu eliminieren (Lozano und Zambetti, 2005). Die hohe Frequenz der inaktivierenden p53-Mutationen in humanen Tumoren weist auf die zentrale Rolle dieses Proteins in der Tumorgenese hin. Beim malignen Melanom treten Mutationen von p53 jedoch relativ selten auf (bei 1-5% der primären Melanome und bei 11-25% der Melanom-Metastasen), trotzdem ist der p53-regulierte Apoptoseweg inaktiv (Hussein *et al*, 2003b).

Zahlreiche Proteine regulieren positiv oder negativ die Aktivität von p53. Der wichtigste Inhibitor ist die Ubiquitin-Ligase Mdm2, die durch Ubiquitinierung von p53 zu dessen proteolytischer Degradierung beiträgt (Iwakuma und Lozano, 2003). Dementsprechend stabilisieren die Kinasen ATM und Chk2 p53, indem sie das Protein phosphorylieren und damit vor Degradierung schützen (Lavin und Shiloh, 1997; Bartek und Lukas, 2003). Ein weiterer wichtiger Positiv-Regulator von p53 in humanen Zellen ist p14^{ARF}, der zusammen mit p16^{INK4a} (Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen) vom INK4a-Genlokus kodiert wird. Diese beiden Proteine sind wie p53 Tumorsuppressoren, die eine unkontrollierte Proliferation von Tumorzellen verhindern können. Die inaktivierende Mutation von INK4a, die die zweithäufigste Mutationen in humanen Tumorzellen darstellt und sich in ca. 50% der primären Melanome findet, wird als ein möglicher Grund für die Inaktivität des p53-Weges in Melanomzellen betrachtet (Sharpless *et al*, 2003).

Der mitochondriale Weg (intrinsischer Signalweg)

Mitochondrien haben, neben ihren Funktionen als Energielieferanten der Zelle, essentielle regulatorische Aufgaben im intrinsischen Apoptoseweg und stellen die zentrale Kontrolleinheit dieses Signalweges dar. An ihrer äußeren Membran entscheidet sich, ob das Apoptosesignal inhibiert oder amplifiziert wird. Die Bcl-2-Proteine katalysieren diesen entscheidenden Prozess und induzieren, sofern die Aktivität der pro-apoptischen Bcl-2-Proteine dominiert, Veränderungen an der äußeren mitochondrialen Membran, die daraufhin permeabel wird (Daniel *et al*, 2003).

Wie es zum Verlust der Membranintegrität kommt, ist noch immer unklar. Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Bcl-2-Proteinen und den Kanal-bildenden Helices bakterieller Toxine (Muchmore *et al*, 1996) entwickelte sich die Theorie, dass pro-apoptische Bcl-2-Proteine, wie z.B. Bax und Bak, Poren in der äußeren mitochondrialen Membran bilden können. Tatsächlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Bax Kanäle in Liposomen und auch in Zellmembranen ausbilden kann. Ein Effekt, der wiederum durch Bcl-2-Aktivität verhindert wird (Antonsson *et al*, 1997). Eine transmembrane Insertion von Bax in die Mitochondrienmembran konnte jedoch *in situ* bisher nicht nachgewiesen werden.

Eine zweite Theorie besagt, dass Bax oder Bax-ähnliche Proteine, durch Anlagerung an ein in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiertes Kanal-Protein, zur Öffnung der so genannten PTP (permeability transition pore) führen (Danial und Korsmeyer, 2004). Die PTP ist ein intramembraner Kanal zwischen der inneren mitochondrialen Matrix und dem Zytosol, der unter physiologischen Bedingungen bei der schnellen Regulation des Ca^{2+} -Ionen-Flusses Verwendung findet. Durch Interaktion zwischen den Kanalproteinen VDAC (voltage dependent anion channel) in der äußeren Membran und ANT (adenine nucleotide transporter) in der inneren Membran, sowie dem gelösten Matrixprotein Cyclophilin-D, bildet sich normalerweise transient die PTP (Crompton, 1999). Durch die Bax-Bindung an VDAC entsteht möglicherweise eine stabile Pore, durch die Wasser in die mitochondriale Matrix osmotisch einströmt. Aufgrund der daraus resultierenden Volumenzunahme der Matrix dehnt sich die innere Mitochondrienmembran aus, bis die äußere Membran, die über eine geringere Oberfläche verfügt, aufreißt und Intermembranfaktoren ins Zytosol freigesetzt werden (Green, 2003).

Veränderungen an der äußeren Mitochondrienmembran, die durch Bcl-2-Proteine katalysiert werden, führen also zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung pro-apoptischer Intermembranfaktoren in das Zytosol. Als Schlüsselereignis wird die Freisetzung von Cytochrom C betrachtet, das im Zytosol die Bildung des so genannten Apoptosoms induziert. Während mitochondriales Cytochrom C zur Energiegewinnung in die Elektronentransportkette involviert ist, bindet zytosolisches Cytochrom C an Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), der daraufhin oligomerisiert

und über Rekrutierung von Pro-Caspase-9 zur Bildung des Apoptosoms führt (Hao *et al*, 2005). Pro-Caspase-9 wird nun aktiviert und induziert die Prozessierung von Effektor-Caspasen, wie Caspase-3 und -7. Mit Aktivierung der Effektor-Caspasen wird die Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet, mit den bereits beschriebenen biochemischen und morphologischen Auswirkungen auf die Zelle.

Weitere pro-apoptotische Faktoren, die aus den Mitochondrien freigesetzt werden, wie Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) und omi/HtrA2, beschleunigen die Caspasen-abhängige Apoptose, indem sie die Aktivität der IAPs blockieren. Andere Faktoren, wie Endonuklease G oder AIF (apoptosis inducing factor) katalysieren Caspasen-unabhängig Apoptose, indem sie in den Nukleus translozieren und dort die chromosomale DNA in große Fragmente degradieren (Jozsa *et al*, 2001; Widlak und Garrard, 2005). Nach der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran ist der Zelltod unausweichlich geworden, da essentielle Funktionen der Mitochondrien nicht mehr stattfinden können (Chipuk und Green, 2005).

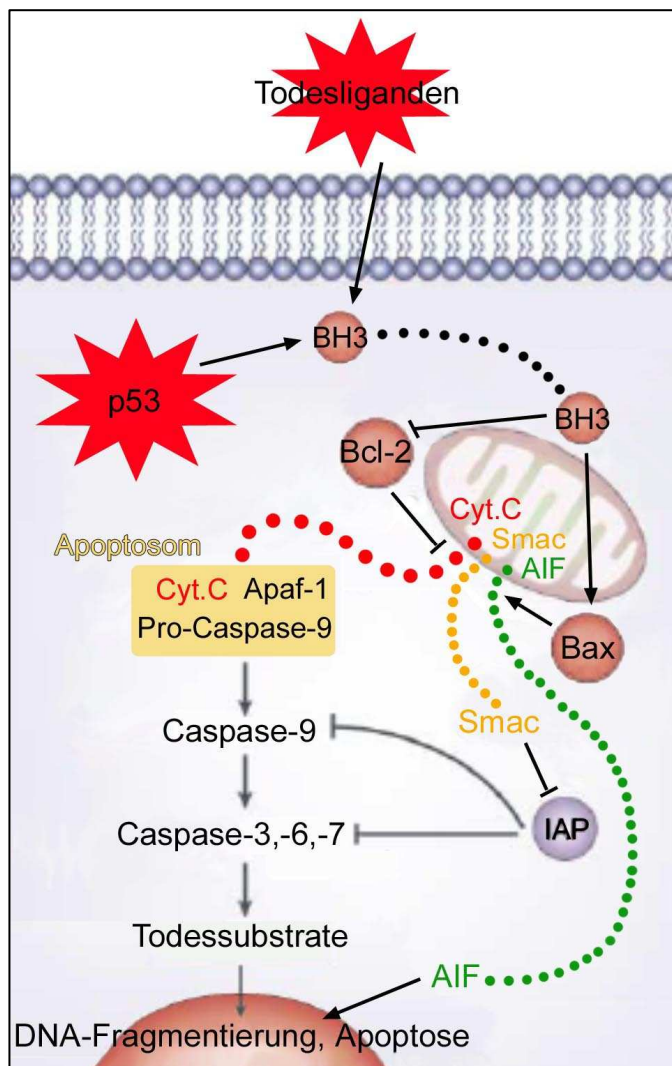


Abb. 5: Der mitochondriale Signalweg
DNA-Schäden, induziert durch UV-Strahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika, führen zur Aktivierung von p53. Über diesen Transkriptionsfaktor oder über die Todesrezeptorkaskade, werden BH3-only-Proteine der Bcl-2-Familie aktiviert, die das apoptotische Signal an die Mitochondrien transduzieren. Pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie integrieren das Todessignal an der äußeren mitochondrialen Membran. Bei einer Dominanz der pro-apoptotischen Proteine, z.B. Bax, gegenüber den anti-apoptotischen, z.B. Bcl-2, wird die mitochondriale Membran permeabilisiert und die pro-apoptotischen Faktoren Cytochrom C (Cyt.C), Smac/DIABLO (Smac) und AIF werden ins Zytosol freigesetzt. Zytosolisches Cyt. C bildet mit Apaf-1 und Pro-Caspase-9 das Apoptosom. Die Initiator-Caspase-9 wird aktiviert und prozessiert darauf hin Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7). Nach der Spaltung von Todessubstraten und dem Auftreten von DNA-Fragmentierung erfolgt der Zelltod. Smac inhibiert im Zytosol Proteine der IAP-Familie und verstärkt damit die Caspasenkaskade. AIF ist eine Endonuklease, die nach Translokation in den Zellkern, Caspasen-unabhängig DNA-Fragmentierung induzieren kann. Abb. modifiziert nach Igney und Kramer, 2002.

Todesrezeptor- und p53-unabhängige Induktion der Apoptose

Neben dem Todesrezeptor-kontrollierten und dem mitochondrialen Signalweg existieren auch noch weitere Signalwege zur Apoptoseinduktion, die entweder in eine der beiden Primärkaskaden münden oder davon unabhängig Apoptose realisieren können.

Die Serinprotease Granzyme B spielt in der Immunantwort eine wichtige Rolle (Lord *et al*, 2003). Sie wird von zytotoxischen Lymphozyten sezerniert und kann sowohl unabhängig der beiden Hauptsignalwege als auch Mitochondrien-abhängig Apoptose in Zellen (z.B. Virus-infizierte oder transformierte Zellen) induzieren. Durch das Protein Perforin werden Kanäle in der Plasmamembran von Zielzellen ausgebildet, durch die Granzyme B ins Zytosol gelangt, wo es Caspasen-unabhängig oder Caspasen-abhängig Apoptose induzieren kann (Andrade *et al*, 2004).

Eine weitere Apoptosekaskade wird durch die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) aktiviert. In drei unterschiedlichen MAP-Kinase-Kaskaden (Erk, p38, JNK), die jeweils aus einem System von hintereinander geschalteten Phosphorylierungsschritten bestehen, wird ein weites Spektrum physiologischer Prozesse in humanen Zellen kontrolliert. Während die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (Erk) den Zellzyklus stimulieren bzw. Apoptose inhibieren können, und p38 vor allem durch inflammatorische Zytokine aktiviert wird, hat die MAP-Kinase JNK (c-Jun Amino-terminale Kinase), deren Expression durch zellulären Stress (Entzug von Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung) induziert werden kann, pro-apoptotische Funktionen (Johnson und Lapadat, 2002). JNK kann sowohl direkt, durch die Phosphorylierung und Inaktivierung von Bcl-2 und Bcl-x_L, als auch indirekt, durch Induzierung der CD95-Proteinexpression über Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun, pro-apoptotische Wirkung entfalten (Yamamoto *et al*, 1999; Kuwabara *et al*, 2003). Zell- und Stimulus-abhängig kann JNK-Aktivität auch anti-apoptotische Wirkung entfalten, z.B. durch Phosphorylierung und Inaktivierung des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins Bad in B-Lymphozyten (Yu *et al*, 2003). In Melanomzellen wurde nach JNK-Aktivierung die Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Signalweg beschrieben (Kunz *et al*, 2001).

1.5. Die Proteine der Bcl-2-Familie

Die Bcl-2-Proteine kontrollieren die Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien und nehmen damit eine Schlüsselposition innerhalb des mitochondrialen Apoptoseweges ein. Die allgemein akzeptierte Theorie des Rheostat-Modells besagt, dass das molare Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen darüber bestimmt, ob Apoptose ausgelöst oder verhindert wird (Korsmeyer *et al*, 1993). Die humane Bcl-2-Familie besteht aus mehr als 20 bisher identifizierten pro- und anti-apoptotischen Proteinen, die sich anhand der Anzahl ihrer alpha-helikalen BH-Domänen (Bcl-2 homology) unterscheiden

(Adams und Cory, 1998). Die Bcl-2-Proteine besitzen zwischen einer und vier dieser konservierten Domänen, die notwendig für die Interaktionen der verschiedenen Bcl-2-Proteine miteinander sind. Zusätzlich besitzen sie eine carboxyterminale, hydrophobe Domäne, die entscheidend für eine Membranbindung ist (Nguyen *et al*, 1993).

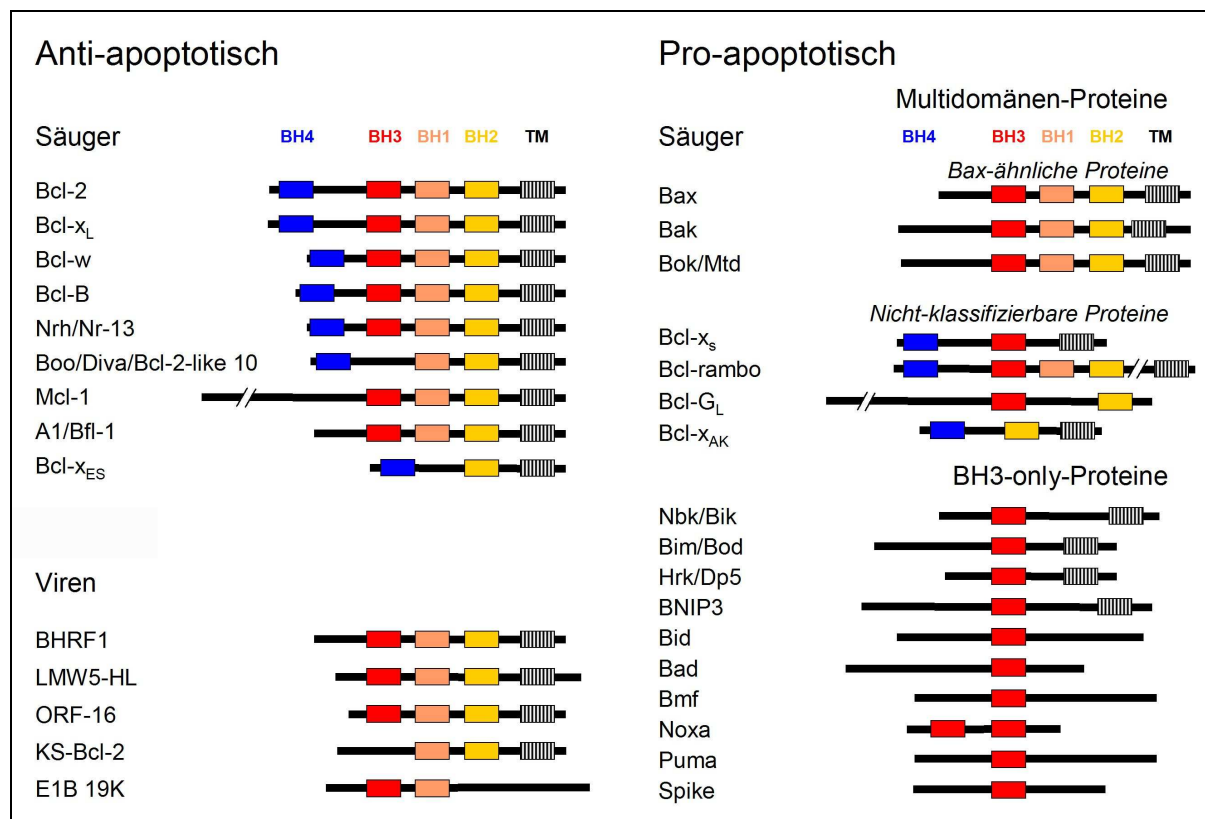


Abb. 6: Schematische Darstellung der Bcl-2-Proteine

Auf der linken Seite sind die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine dargestellt. Die humanen anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine besitzen entweder drei oder vier BH-Domänen (Bcl-2 homology). Rechts dargestellt sind die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie. Gemeinsames Merkmal aller pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine ist die BH3-Domäne (Ausnahme: Bcl-x_{AK}). Die pro-apoptotische Gruppe unterteilt sich in drei Untergruppen. Die Multidomänenproteine (Bax und Bax-ähnliche sowie nicht-klassifizierbare Proteine) und die größte Untergruppe, die nur die BH3-Domäne besitzenden BH3-only-Proteine. Viele Bcl-2-Proteine weisen eine hydrophobe Transmembrandomäne (TM) auf, die es ihnen ermöglicht an Membranen zu binden.

Als erstes Mitglied dieser Familie von Apoptoseregulatoren wurde das namensgebende, anti-apoptotische Bcl-2-Protein (B-cell lymphoma) identifiziert (Tsujimoto *et al*, 1985). Weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie wurden aufgrund von Sequenzhomologien oder durch Interaktion mit Bcl-2 identifiziert (Chao und Korsmeyer, 1998). Bcl-2-Proteine können über die Bindung ihrer BH-Domänen untereinander wechselwirken. Bei der Heterodimerisierung zwischen einem pro- und einem anti-apoptotischen Bcl-2-Protein bindet das pro-apoptotische Protein mit seiner exponierten BH3-Domäne an die BH1-, BH2- und BH3-Domänen des anti-apoptotischen Proteins. Diese drei BH-Domänen bilden dabei eine Struktur, die als hydrophobe Tasche bezeichnet wird (Sattler *et al*, 1997). Die BH4-Domäne

des anti-apoptotischen Proteins nimmt eine stabilisierende Funktion ein (Huang, 2002). Während die heterodimere Bindung zwischen anti- und pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen die Aktivität beider Proteine neutralisiert, potenziert die Dimerisierung zweier pro-apoptotischer Proteine ihre Wirkungskraft.

Pro-apoptotische Multidomänenproteine

Die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine unterteilen sich anhand der Anzahl ihrer BH-Domänen in die Gruppe der Multidomänenproteine, die weiterhin in die Untergruppen der Bax-ähnlichen und der nicht-klassifizierbaren Proteine unterteilt werden können, sowie in die Gruppe der so genannten BH3-only-Proteine.

Die Bax-ähnlichen Proteine (Bax, Bak, Bok/Mtd) besitzen zwei oder drei BH-Domänen. Ihre pro-apoptotische Aktivität wurde zuerst auf das Fehlen der BH4-Domäne zurückgeführt, bis Bcl-x_S identifiziert wurde, eine pro-apoptotische Spleißvariante des Bcl-x-Gens, die über die BH4-Domäne verfügt (Boise *et al*, 1993). Das namensgebende Protein dieser pro-apoptotischen Unterfamilie, Bax (Bcl-2 associated protein X), kann mit Bcl-2 interagieren und dessen anti-apoptotische Funktionen aufheben oder parallel dazu direkt pro-apoptotisch wirksam sein (Oltvai *et al*, 1993). In gesunden Zellen liegt Bax als Monomer im Zytosol vor. Die BH-Domänen sind in diesem Zustand durch den carboxyterminalen Bereich des Proteins maskiert (Suzuki *et al*, 2000). Auf einen pro-apoptotischen Stimulus hin erfährt Bax eine Konformationsänderung, transloziert zu einem Mitochondrium und assoziiert dort lose mit seinem carboxyterminalen Bereich in der äußeren Membran. Mit der nun exponierten BH3-Domäne dimerisiert Bax, je nach Vorhandensein, mit anti-apoptotischen oder pro-apoptotischen Multidomänenproteinen. Überwiegen die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine in diesem Prozess, wird Bax inaktiviert und damit die Apoptose verhindert. Dominieren die pro-apoptotischen Proteine an den Mitochondrien, kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderer mitochondrialer Faktoren.

Inwieweit die Homodimerisierung von Bax bzw. die Hetero-Oligomerisierung mit Bak für die pro-apoptotische Aktivität von Bedeutung ist, wurde noch nicht geklärt. Hinsichtlich der Wirkungsweise von Bax nimmt man an, dass das Protein Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran durch eigene Insertion oder durch Interaktion mit vorhandenen Kanalproteinen ausbilden kann. Daraufhin werden Cytochrom C und andere intermembrane Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt. Zytoplasmatisches Cytochrom C bindet an Apaf-1 und aktiviert über Caspase-9 die Effektor-Caspase-3. Bax kann allerdings auch bei bestehender Caspaseninhibition, eventuell über die Freisetzung von AIF, Apoptose auslösen. In humanen Melanomzellen werden die pro-apoptotischen Multidomänenproteine

Bax, Bak, Bok/Mtd und Bcl-x_{AK} exprimiert, Bcl-x_S dagegen nicht (Hossini *et al*, 2003; Hussein *et al*, 2003a; Hossini *et al*, 2005).

BH3-only-Proteine

Im Gegensatz zu den Bax-ähnlichen Proteinen besitzen die BH3-only-Proteine (Bim, Nbk/Bik, Hrk, BNIP3, Bid, Bad, Bmf, Noxa, Puma und Spike) ausschließlich die BH3-Domäne. Diese scheint als potenzielle Todesdomäne zu fungieren und ein notwendiges Charakteristikum aller pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine zu sein. Die Ausnahme von dieser Regel bildet das kleine pro-apoptotische Spleißprodukt des Bcl-x-Gens, Bcl-x_{AK}. Dieses verfügt über keine BH3-Domäne, induziert jedoch signifikant Apoptose in Melanomzellen (Hossini *et al*, 2005).

Die genauen Funktionen der zehn bisher identifizierten BH3-only-Proteine sind noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Eine allgemein akzeptierte Theorie besagt, dass sie stromaufwärts der Multidomänenproteine in der Apoptosekaskade angesiedelt sind und als Signal-spezifische Sensoren das Apoptosesignal an die Mitochondrien weiterleiten (Borner, 2003). Untersuchungen zeigten, dass BH3-only-Proteine selektiv auf einen bestimmten apoptotischen Reiz hin exprimiert bzw. aktiviert werden (Han *et al*, 2001).

Die BH3-only-Proteine Noxa (noxious) und Puma (p53 upregulated mediator of apoptosis) werden nach DNA-Schäden und p53-Aktivierung transaktiviert. Beispiele für posttranslationale Regulation von BH3-only-Proteinen sind z.B. die proteolytische Aktivierung von Bid (BH3 interacting domain death agonist) durch Caspase-8 und die aktivierende Dephosphorylierung von Bad (Bcl2-antagonist of cell death), die zu einer Freisetzung des Proteins von inhibierenden 14-3-3-Proteinen führt (Zha *et al*, 1996). Zu einer Aktivierung durch Freisetzung kommt es ebenfalls beim BH3-only-Protein Bmf (Bcl-2 modifying factor). Dieses wird während der Anoikis, der Apoptoseinduktion bei Verlust der Zell-Matrix-Kontakte, von Aktinfilamenten des Zytoskeletts abgelöst (Puthalakath *et al*, 2001).

Unabhängig von dem Weg ihrer Aktivierung verstärken BH3-only-Proteine das pro-apoptotische Signal und leiten es an Multidomänenproteine weiter. Aufgrund ihrer Fähigkeit sowohl pro- und anti-apoptotische oder nur anti-apoptotische Multidomänenproteine binden zu können, werden BH3-only-Proteine als Aktivierer (Bid, Bim) oder Sensitivierer (alle anderen BH3-only-Proteine) klassifiziert (Letai *et al*, 2002). Sensitivierende BH3-only-Proteine können ausschließlich anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-x_L an der äußeren Mitochondrienmembran binden. Sie besetzen damit potentielle Bindungsstellen für pro-apoptotische Multidomänenproteine, wie z.B. Bax, und sensitivieren die Zelle damit, da aktiviertes Bax nun nicht mehr durch anti-apoptotische Bcl-2-Proteine inhibiert werden kann. Aktivierende BH3-only-Proteine können zusätzlich die Oligomerisierung von Bax und Bax-

ähnlichen Proteinen begünstigen. Auch eine von den Multidomänenproteinen unabhängige pro-apoptotische Wirkungsweise der BH3-only-Proteine wird nicht ausgeschlossen (Naumann *et al*, 2003).

In Melanomzellen konnte die Expression der BH3-only-Proteine Bid und Bad nachgewiesen werden (Hussein *et al*, 2003a), das pro-apoptotische Potential von Bik/Nbk (Bcl-2 interacting killer/natural born killer) (Boyd *et al*, 1995; Han *et al*, 1996) wurde bis zu dieser Arbeit in Melanomzellen noch nicht untersucht.

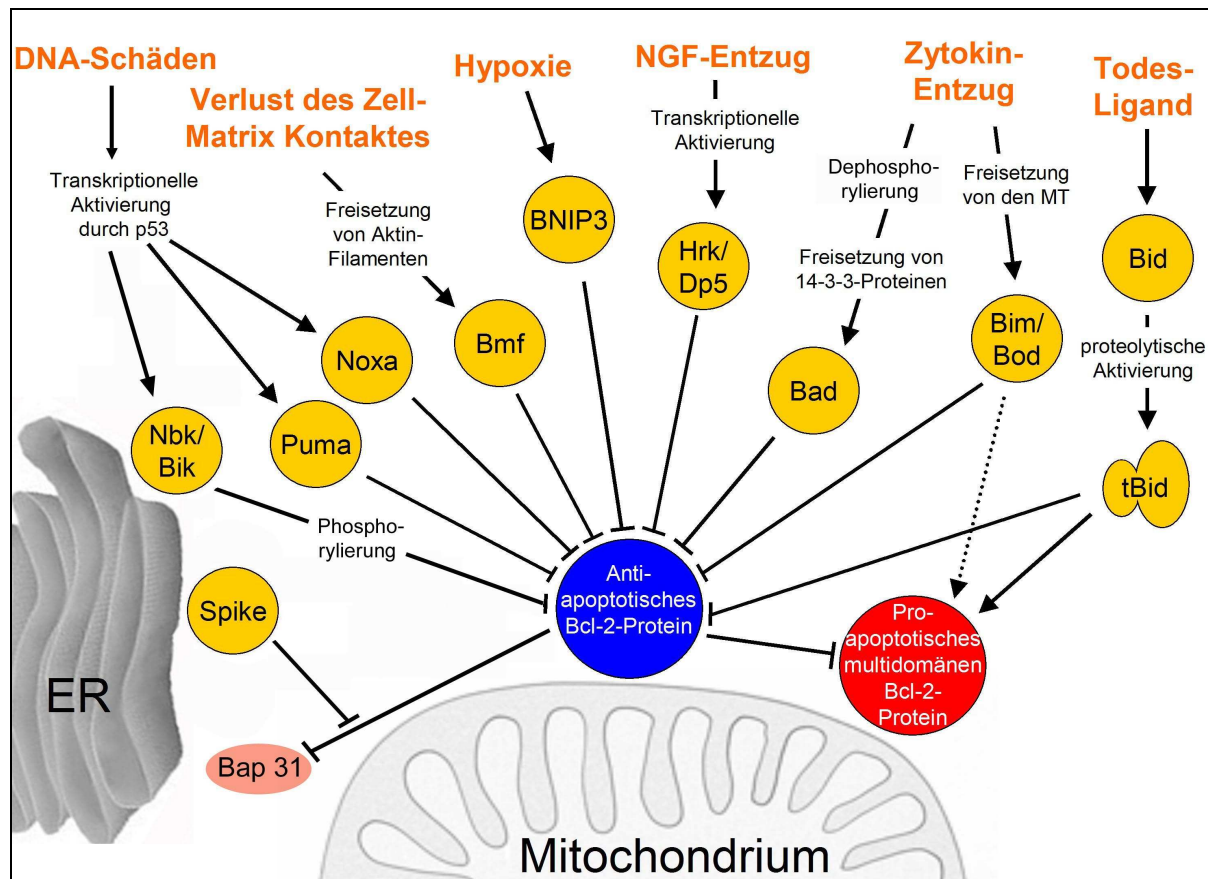


Abb. 7: BH3-only-Proteine fungieren oberhalb der Multidomänenproteine als Todessignalspezifische Sensoren.

Durch individuelle Todessignale werden BH3-only-Proteine aktiviert und translozieren an die Mitochondrien, wo sie anti-apoptotische Bcl-2-Proteine binden und inaktivieren (alle BH3-only-Proteine) oder durch direkte Interaktion pro-apoptotische Multidomänenproteine aktivieren (nur Bid und Bim). Nbk/Bik und Spike sind vor ihrer Aktivierung am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Aktives Spike bindet an $Bcl-x_L$ und verdrängt und befreit dadurch das pro-apoptotische Protein Bap 31. MT = Mitochondrien.

Das BH3-only-Protein Nbk/Bik (natural born killer/Bcl-2 interacting killer)

Nbk wird nach DNA-Schäden sowohl p53-abhängig (Mathai *et al*, 2002), als auch p53-unabhängig (Paquet *et al*, 2004) verstärkt exprimiert. Posttranslational wird die Nbk-Aktivität über Phosphorylierung durch Casein-Kinase-II-verwandte Enzyme gesteuert. Im Gegensatz zum BH3-only-Protein Bad, das durch Dephosphorylierung aktiviert wird, benötigt Nbk die

Phosphorylierung zweier Epitope (Threonin 33/Serin 35) um seine maximale proapoptotische Aktivität entfalten zu können (Verma *et al*, 2001).

Exprimiert wird Nbk unter physiologischen Bedingungen vor allem in epithelialen und hämatopoetischen Zellen, was auf eine Gewebe-spezifische Apoptoseaktivität des Proteins hinweist (Daniel *et al*, 1999; Coultas *et al*, 2004). Durch die Überexpression von exogenem Nbk konnte jedoch auch schon in anderen Geweben Apoptose induziert werden (Orth und Dixit, 1997; Daniel *et al*, 1999; Germain *et al*, 2002; Naumann *et al*, 2003; Gillissen *et al*, 2003). Eine bedeutende Funktion konnte für Nbk zusammen mit dem BH3-only-Protein Bim in der Apoptosekontrolle der murinen Testis-Entwicklung gezeigt werden. Während die Entwicklung sowohl bei Nbk- als auch bei Bim-Knockout-Mäusen normal verläuft, weisen Doppelknockout-Mäuse mit kombinierter Nbk- und Bim-Defizienz verkleinerte Testes, eine stark reduzierte Anzahl von Spermatozyten, sowie Infertilität auf (Coultas *et al*, 2005).

1.6. Caspasen-unabhängiger Zelltod

Die Cysteinproteasen der Caspasenfamilie besitzen entscheidende Funktionen in der Apoptoseregulation vieler Spezies. Trotzdem ist die Caspasenaktivierung kein ubiquitärer Prozess der Apoptose und sollte nicht mit dieser gleichgesetzt werden. Zum einen sind einige Mitglieder der Caspasenfamilie (Caspase-1, -4, -5) nicht in apoptotische Signalwege involviert, zum anderen gibt es Hinweise auf Apoptosewege, die nicht durch Caspaseninhibition verhindert werden können. Z. B. kann die Protease Granzyme B, die von zytotoxischen T-Zellen sezerniert wird, in Zielzellen Caspasen-unabhängig DNA-Fragmentierung induzieren, indem sie direkt ICAD spaltet (Thomas *et al*, 2000). Einen ähnlichen Effekt vermittelt die Endonuklease AIF (apoptosis inducing factor), die unter physiologischen Bedingungen im intrazellulären Raum der Mitochondrien lokalisiert ist und dort in der Elektronentransportkette mitwirkt. Nach der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran gelangt AIF in Zytosol, transloziert in den Nukleus und fragmentiert, eventuell im Zusammenspiel mit Endonuklease G, chromosomale DNA (Susin *et al*, 1999; Loeffler *et al*, 2001). AIF-abhängiger Zelltod konnte sowohl in Apaf-1-, als auch in Caspase-3-defizienten Zellen ausgelöst werden (Susin *et al*, 2000). Auch für ein Bcl-2-Protein, das BH3-only-Protein BNIP3, ist beschrieben, dass es in Anwesenheit des Caspaseninhibitors zVAD-fmk (N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon) Apoptose in humanen Zellen auslösen kann (Cizeau *et al*, 2000). Für die BH3-only-Proteine Bid, Bim und Bad, die Caspasen-abhängig Apoptose auslösen können, wurde gezeigt, dass sie nach Überexpression auch in Apaf-1-defizienten Zellen, sowie unter zVAD-fmk-Behandlung, proapoptotisch wirksam waren (Cheng *et al*, 2001).

Eine mögliche Erklärung für die oftmals unzureichende Hemmung der Apoptose durch Caspaseninhibitoren ist, dass in Zellen nach Permeabilisierung der Mitochondrien vitale

Funktionen zusammenbrechen und multiple Todessignale auf die Zellen einwirken, die durch alleinige Caspaseninhibition nicht mehr aufzuhalten sind (Kroemer und Martin, 2005). Allerdings stellt sich dann die Frage, welche Proteasen, anstelle der Caspasen, für die apoptotischen Prozesse in diesen Zellen verantwortlich sind. Außerdem können auch typische Todesliganden wie CD95L oder TNF α , zumindest in einigen Zellen, Caspasen-unabhängig Apoptose induzieren (Foghsgaard *et al*, 2001).

Verschiedene Formen des Caspasen-unabhängigen programmierten Zelltodes

Die Bezeichnung Apoptose wird häufig synonym zum Begriff programmierter Zelltod verwendet. Tatsächlich bezeichnet Apoptose nur eine Form von programmiertem Zelltod. In den letzten Jahren wurde es immer mehr offensichtlich, dass die klassische Zweiteilung in Apoptose und Nekrose nicht mehr hinlänglich ausreicht, um Zelltod zu charakterisieren. Neben apoptotischem Zelltod durch Caspasenaktivität existiert auch ein programmierter Zelltod mit begleitender Caspasenaktivierung, sowie ganz ohne Caspasenaktivität. Je nach morphologischer Veränderung und involvierten Proteinen wurden diese alternativen Wege des programmierten Zelltodes als Autophagie, Paraptosis, mitotische Katastrophe, Apoptose-ähnlicher sowie Nekrose-ähnlicher Zelltod beschrieben (Kitanaka und Kuchino, 1999; Sperandio *et al*, 2000; Lockshin *et al*, 2000; Wyllie und Golstein, 2001; Shintani und Klionsky, 2004). All diese Formen von programmiertem Zelltod werden durch aktive, zelluläre Prozesse ausgeführt und können, im Gegensatz zur Nekrose, über Manipulation ihrer Signalwege reguliert werden.

Der Begriff Autophagie bezeichnet eine Form des Caspasen-unabhängigen Zelltodes, bei der Organellen und große Bestandteile des Zytoplasmas in Vesikel eingeschlossen dem lysosomalen System der Zelle unterworfen werden (Gozuacik und Kimchi, 2004). In der Paraptosis dominieren mitogen-aktivierte Protein-Kinasen, deren Aktivität im Anschwellen der Mitochondrien und des ERs resultieren (Sperandio *et al*, 2004). In die mitotische Katastrophe (King und Cidlowski, 1995) stürzen Zellen mit fehlerhaftem Zellzyklus, sowie nach DNA-Schäden und nach Behandlung mit Mikrotubuli-stabilisierenden Agenzien. Der Zelltod geschieht p53-abhängig, die Mitochondrien werden permeabilisiert und Caspasen sekundär aktiviert. Im Gegensatz zur klassischen Apoptose verhindern weder Caspaseninhibition noch Bcl-2-Überexpression den Zelltod durch mitotische Katastrophe (Castedo *et al*, 2004). Wie auch immer die Caspasen-unabhängige Form des programmierten Zelltodes bezeichnet wird, sie stellt wahrscheinlich einen Schutzmechanismus dar, mit dem Organismen sich gegen Zellen schützen können, deren Caspasenkaskade blockiert ist (Lockshin und Zakeri, 2004).

ER und Lysosomen im Caspasen-unabhängigen programmierten Zelltod

Neben den Mitochondrien scheinen vor allem die Lysosomen und das Endoplasmatische Retikulum (ER) vorherrschende Funktionen im Caspasen-unabhängigen, programmierten Zelltod zu besitzen. Über das ER, das der wichtigste Kalziumspeicher der Zelle ist, werden Kalzium-abhängige Cysteinproteasen, die Calpaine, aktiviert. Diese Proteasen können regulierend in Apoptosewege eingreifen; ob sie jedoch Caspasenaktivität ersetzen oder nur ergänzen können, ist noch nicht geklärt (Wood *et al*, 1998; Wang, 2000; Takano *et al*, 2005). Möglicherweise kann das Apoptosesignal von aktivierten Calpainen auch an die Lysosomen transportiert werden (Yamashima, 2004). Diesen Organellen, in denen unter physiologischen Bedingungen vor allem unspezifische Proteindegradierung stattfindet, wird eine essentielle Funktion im Zusammenhang mit Caspasen-unabhängigem Zelltod zugetraut (Herr und Debatin, 2001). Über 60 verschiedene Proteasen sind in den Lysosomen lokalisiert, unter ihnen die Cathepsine, eine Familie von Cysteinproteasen.

1.7. Lysosomen und Cathepsine in der Apoptose

Cathepsine gehören, genauso wie die Calpaine und die Caspasen, zur humanen Familie der Cysteinproteasen. Zu den Cathepsinen gehören Cathepsin B, L, H, F, O, X/Z, C, die ubiquitär exprimiert sind, sowie Cathepsin K, S, V, W, deren Expression auf bestimmte Gewebe beschränkt ist (Berdowska, 2004). Cathepsin D und E sind Aspartatproteasen, Cathepsin G ist eine Serinprotease. Cathepsine sind in den Lysosomen lokalisiert und haben dementsprechend unter physiologischen Bedingungen wichtige Funktionen bei der Proteindegradierung. Eine Ausnahme bildet Cathepsin W, das unter physiologischen Bedingungen im ER von natürlichen Killerzellen lokalisiert ist (Berdowska, 2004). Abseits ihrer Rolle in den Lysosomen wurden für Cathepsine auch Funktionen bei der Differenzierung von Keratinozyten, dem Haarzyklus, der Proteinreifung und der Degradierung der extrazellulären Matrix beschrieben (Jedeszko und Sloane, 2004).

Die Regulierung der proteolytischen Aktivität der Cathepsine erfolgt über verschiedene Mechanismen. So werden Cathepsine zunächst als inaktive Zymogene, die eine Pro-Domäne besitzen, im Zytoplasma synthetisiert. Bei der Inkorporation des Enzyms in das Lysosom wird die Pro-Domäne abgespalten und die Protease aktiviert (Cygler und Mort, 1997; Rozman *et al*, 1999). Aktivierte Cathepsine werden vor allem über den pH-Wert, aber auch über posttranslationale Modifikationen und über Proteolyse reguliert (Turk *et al*, 1993; Kirschke *et al*, 1995). Eine zentrale Bedeutung bei der Kontrolle der Cathepsinaktivität kommt zudem den endogenen Cathepsininhibitoren, den Cystatinen, zu (Abrahamson und Grubb, 1994).

Cathepsine bei Metastasierung

In der klassischen Zweiteilung des Zelltodes in Apoptose und Nekrose wurden den Lysosomen und ihren Proteasen nur nachgeschaltete und untergeordnete Funktionen zugesprochen. Nachdem erkannt wurde, dass in maligne transformierten Zellen die Lysosomenverteilung von perinukleär nach peripher verändert ist und dass viele Tumore (z.B. Melanom, Gliom, Bronchial-, Prostata-, Kolorektal- und Mammakarzinom) eine erhöhte Expression einiger lysosomaler Enzyme aufweisen (Koblinski *et al*, 2000), rückten diese Organellen stärker in den Fokus des Interesses. Es zeigte sich, dass Tumore durch die Sekretion lysosomaler Proteasen die extrazelluläre Matrix degradieren und damit ihre Invasivität erhöhen können (Ishidoh und Kominami, 1995). Beim malignen Melanom sind Cathepsin B und L verstärkt exprimiert und weisen zudem starke enzymatische Aktivität auf (Kageshita *et al*, 1995; Goldmann *et al*, 1999; Frohlich *et al*, 2001). Die Überexpression von Cathepsin B korreliert, aufgrund der Funktion bei der Metastasierung, mit einer schlechten Prognose der betroffenen Patienten (Goldmann *et al*, 1998; Otto *et al*, 1999).

Cathepsine im Apoptosesignalweg

In den letzten Jahren häuften sich dagegen Hinweise darauf, dass die Cathepsine nicht nur bei der Metastasierung, sondern auch im Apoptosesignalweg maßgeblich beteiligt sind. Aktive Cathepsine sind in gesunden Zellen zwar primär in den Lysosomen oder Endosomen lokalisiert, können aber während der Apoptose in das Zytosol freigesetzt werden. Damit die Enzyme aus den Lysosomen gelangen können, muss zuerst die lysosomale Membran permeabilisiert werden. Möglicherweise spielen dabei membranschädigende ROS (reactive oxygen species) eine Rolle (Roberg und Ollinger, 1998). Spekuliert wird ebenfalls, ob pro-apoptotische Bcl-2-Proteine, aufgrund ihrer Kanal-bildenden Fähigkeiten, zur Permeabilisierung der Lysosomenmembran beitragen können (Zhao *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2001). Für die Relevanz der lysosomalen Membranintegrität in der Apoptose spricht die Tatsache, dass das Hitzeschock-Protein HSP-70, das AIF-antagonisierend wirksam ist, seine anti-apoptotische Funktion durch die Stabilisierung der lysosomalen Membran erhält (Nylandsted *et al*, 2004).

In verschiedenen Apoptosesignalwegen, induziert durch oxidativen Stress, TNF α und Chemotherapeutika, konnte eine aktive Beteiligung verschiedener Cathepsine nachgewiesen werden (Roberg *et al*, 1999; Guicciardi *et al*, 2000; Broker *et al*, 2004). Die genaue Funktion von Cathepsinen in der Apoptose wird allerdings noch kontrovers diskutiert und mag in verschiedenen Zellen unterschiedlicher Ausprägung sein. Einige Arbeiten zeigten eine indirekte Caspasenaktivierung nach Cathepsin-abhängiger Spaltung des BH3-only-Proteins Bid (Heinrich *et al*, 2004; Werneburg *et al*, 2004) sowie eine direkte Prozessierung und

Aktivierung von Caspasen durch Cathepsine (Schotte et al, 1998; Vancompernelle et al, 1998). Andere Arbeiten wiesen für Cathepsin B eine direkte Effektorproteasenaktivität nach, mit der Fähigkeit anstelle von Caspasen selbstständig Exekutionsprozesse der Apoptose durchzuführen (Foghsgaard et al, 2001). Auch für Cathepsin D konnte gezeigt werden, dass es durch Aktivierung von Bax zur Freisetzung von AIF führen kann und damit Caspasen-unabhängig Apoptose induziert (Bidere et al, 2003).

1.7. Fragestellung der Arbeit

Das Auftreten des malignen Melanoms wird von einer frühen Metastasierung begleitet, die momentan mit Hilfe von Chemo-, Radio- oder Immuntherapie nur unzureichend behandelt werden kann. Aufgrund einer hohen Therapieresistenz der Tumorzellen ist die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, wie z.B. die Induktion von Apoptose in Melanomzellen, von großer Bedeutung. Der Einsatz pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine stellt einen viel versprechenden Ansatz in der Entwicklung zukünftiger Krebstherapien dar, da diese Proteine bedeutende Regulatoren der Apoptose in vielen Zellen sind.

Aus diesem Grund sollte das pro-apoptotische Potential je eines Vertreters aus einer der beiden pro-apoptotischen Untergruppen der Bcl-2-Familie in Melanomzellen überprüft werden. Bax, als ein Vertreter der pro-apoptotischen Multidomänenproteine, besitzt die Fähigkeit Apoptose in vielen Tumorzelllinien zu induzieren. Im Vergleich zu Bax sollte mit Nbk/Bik ein Vertreter der BH3-only-Proteine charakterisiert werden, der in Melanomzellen noch nicht untersucht worden war. Durch die ektopische Expression dieser Proteine, die in gesunden Zellen beide durch p53 transaktiviert werden können, sollte zudem die Inaktivität des p53-Weges in Melanomzellen überbrückt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die basale Expression beider Proteine in Melanomzellen im Vergleich zu normalen humanen Melanozyten untersucht werden. Durch induzierte Überexpression von Bax bzw. Nbk in Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien sollte ihr Potential zur Apoptoseinduktion miteinander verglichen werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob Resistenz gegenüber Chemotherapeutika mit Hilfe der Überexpression dieser pro-apoptotischen Effektoren zu überwinden ist. Die mögliche therapeutische Verwendbarkeit von Bax und Nbk beim malignen Melanom sollte schließlich in Tierexperimenten, mit Hilfe von xenotransplantierten Mäusen, validiert werden.

Da der Mechanismus der Apoptoseinduktion über BH3-only-Proteine in Melanomzellen nur unzureichend verstanden war, sollte im Besonderen der Signalweg der Nbk-induzierten Apoptose untersucht werden. Als Goldstandard wurde der Apoptosesignalweg nach Überexpression des CD95-Liganden gewählt, da dieser Weg in Melanomzellen bereits relativ gut charakterisiert war. Die Apoptose nach induzierter Nbk-Überexpression sollte auf verschiedenen Ebenen, von der Caspasenaktivierung über die Spaltung der Todessubstrate

bis hin zur DNA-Fragmentierung, untersucht werden, da die genaue Kenntnis der zellulären Vorgänge die Voraussetzung zur Überwindung von Therapieresistenz in Melanomzellen durch Apoptoseinduktion darstellt.

Bei der Untersuchung der Nbk-induzierten Apoptose zeigten sich interessanterweise eine weitgehende Unabhängigkeit von den klassischen Caspasensignalwegen, sowie eine besondere Bedeutung der lysosomalen Cathepsine.