

---

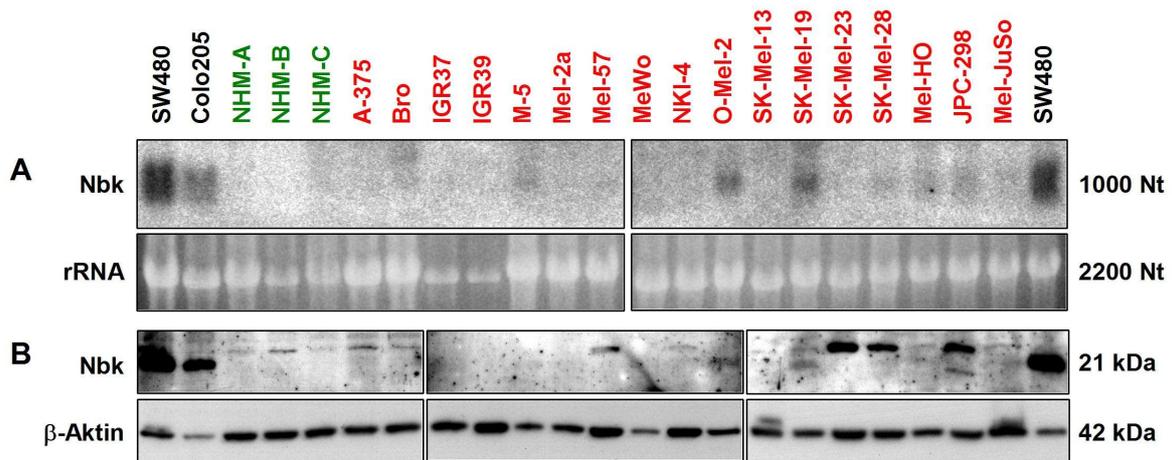
### 3. Ergebnisse

#### **3.1. Expression der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Nbk und Bax in humanen Melanomzellen**

##### **3.1.1. Basale Expression von Nbk und Bax in normalen humanen Melanozyten und humanen Melanomzelllinien**

Ziel dieses Versuches war es zu analysieren ob Nbk in normalen humanen Melanozyten (NHM) und humanen Melanomzelllinien exprimiert wird. Die basale Nbk-Expression wurde auf mRNA-Ebene (Northern-Blot) und Proteinebene (Western-Blot) analysiert. Northern-Blots wurden für 17 humane Melanomzelllinien und für drei unabhängige NHM-Kulturen durchgeführt. Die Nbk-mRNA konnte in sechs Melanomzelllinien bei 1000 Nt identifiziert werden: O-Mel-2 und SK-Mel-19 zeigten eine moderate Basalexpression, M-5, SK-Mel-28, Mel-HO und JPC-298 wiesen schwache Nbk-Expressionen im Vergleich mit den Kolonkarzinomzelllinien SW480 und Colo205, die als Positivkontrollen dienten, auf. Alle anderen Melanomzelllinien sowie die NHM-Kulturen zeigten keine Nbk-mRNA-Expression (Abb. 10 A).

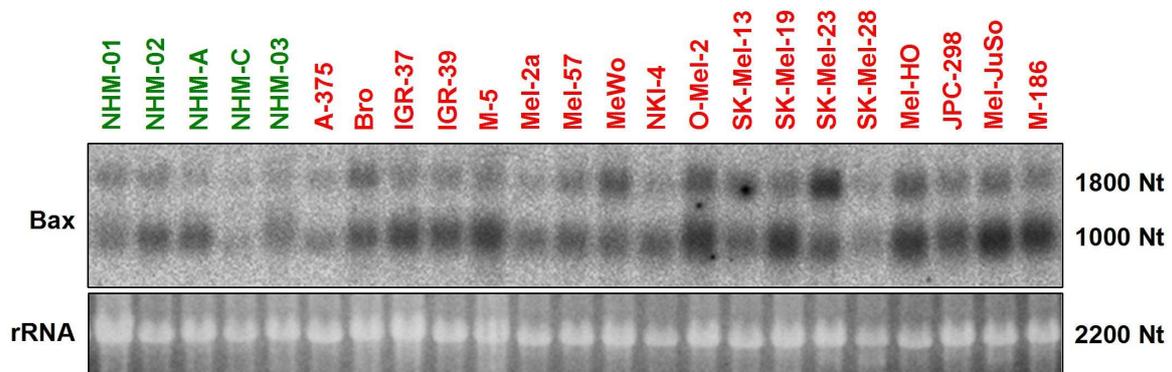
Die Western-Blot-Analysen der entsprechenden Kulturen zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit den mRNA-Daten. Eine Expression des Nbk-Proteins bei 21 kDa konnte nur in den Melanomzelllinien festgestellt werden, die bereits eine starke Nbk-mRNA-Expression aufwiesen (O-Mel-2 und SK-Mel-19). Die anderen Melanomzelllinien sowie die NHM-Kulturen zeigten keine Nbk-Proteinexpression. Im Lysat der Melanomzelllinie JPC-298 detektierte der verwendete Nbk-Antikörper eine unspezifische Proteinbande, die ca. 2 kDa unterhalb der Nbk-Bande lag und deshalb als unspezifisch betrachtet wurde (Abb. 10 B).



**Abb. 10: Humane Melanomzelllinien weisen nur eine schwache Nbk-Expression auf**

A: Die Nbk-Expression wurde auf mRNA-Ebene (1000 Nt) für drei Kulturen normaler humaner Melanozyten (NHM) und für 17 humane Melanomzelllinien im Northern-Blot festgestellt. Als Ladekontrolle wurde Ethidiumbromid-gefärbte 18S ribosomale RNA dargestellt (2200 Nt). Als Positivkontrollen für Nbk-Expression wurden die Kolonkarzinomzelllinien SW480 und Colo205 verwendet. B: Die Nbk-Proteinexpression wurde in einer entsprechenden Auswahl von NHM-Kulturen und Melanomzelllinien analysiert. Die Proteinlysate wurden in einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nbk-Antikörper detektierte das humane Nbk-Protein bei einer Höhe von 21 kDa, wie durch die Positivkontrollen SW480 und Colo205 deutlich angezeigt wird. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa). Die Proteinbande, die der Antikörper in der Zelllinie JPC-298 detektiert, ist zu klein (19 kDa) um Nbk darzustellen und wurde deshalb als unspezifisch klassifiziert.

Die Bax-Expression war im Gegensatz zur Nbk-Expression auf der mRNA-Ebene deutlich stärker ausgeprägt. Alle fünf NHM-Kulturen sowie die 18 Melanomzelllinien wiesen im Northern-Blot signifikante Expression der Bax-mRNA bei einer Höhe von 1000 Nt auf. Im Vergleich zu den NHM-Kulturen zeigten die humanen Melanomzelllinien eine stärkere Expression von Bax-mRNA (Abb. 11). Die Bande, die bei 1800 Nt detektiert wurde, zeigt eine größere Bax-Isoform (Shibata *et al*, 1999).

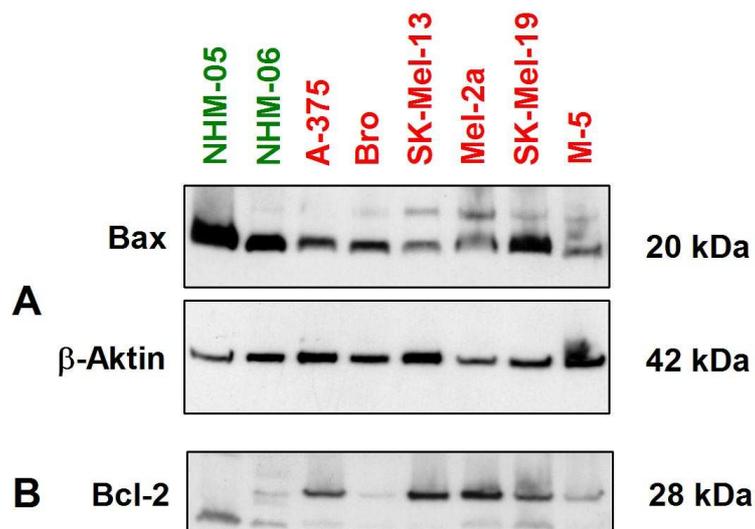


**Abb. 11: Starke Expression von Bax-mRNA in humanen Melanomzelllinien**

A: Die Bax-Expression wurde auf mRNA-Ebene (1000 Nt) für fünf Kulturen normaler humaner Melanozyten (NHM) und für 18 humane Melanomzelllinien im Northern-Blot festgestellt. Als Ladekontrolle wurde mit Ethidiumbromid gefärbte 18S ribosomale RNA verwendet (2200 Nt).

Auf der Proteinebene zeigten Melanomzelllinien und NHM jedoch ein anderes Proteinexpressionsmuster von Bax als auf der mRNA-Ebene. Von den sechs untersuchten Melanomzelllinien exprimierten fünf Kulturen weniger Bax-Protein als die zwei analysierten NHM-Kulturen. Lediglich SK-Mel-19 zeigte eine annähernd so starke Bax-Expression wie die NHM-Kulturen. Der verwendete Bax-Antikörper detektierte das Protein bei 20 kDa (Abb. 12 A).

Eine Analyse der Kulturen hinsichtlich der Bcl-2-Proteinexpression zeigte, dass die Melanomzelllinien das Bcl-2-Protein (28 kDa) stärker exprimieren als die NHM (Abb. 12 B). Das Verhältnis von Bax zu Bcl-2, das als Rheostat-Verhältnis beschrieben wurde (Korsmeyer *et al*, 1993) ist auf Proteinebene bei Melanomzellen also ungünstig verändert im Vergleich zu NHM, weil das pro-apoptotische Bax herunterreguliert und das anti-apoptotische Bcl-2 gleichzeitig heraufreguliert ist. Als Standard für die Proteinmenge wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.



**Abb. 12: Das Bax-Protein wird in humanen Melanomzelllinien schwächer und das Bcl-2-Protein stärker exprimiert als in normalen humanen Melanozyten (NHM)**

A: Die Bax-Proteinexpression wurde in zwei NHM-Kulturen und in sechs humanen Melanomzelllinien analysiert. Der verwendete Bax-Antikörper detektierte das Protein mit einer Größe von 20 kDa. B: Das Bcl-2-Protein (28 kDa) wurde in den gleichen Kulturen detektiert. Die Proteinlysate (50  $\mu$ g) wurden in einem 12%-igen Polyacrylamidgel mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (42 kDa).

### 3.1.2. Die Verringerung der Bax-Expression durch DNA-Antisense und RNA-Interferenz reduziert die Apoptosesensitivität von Melanomzellen

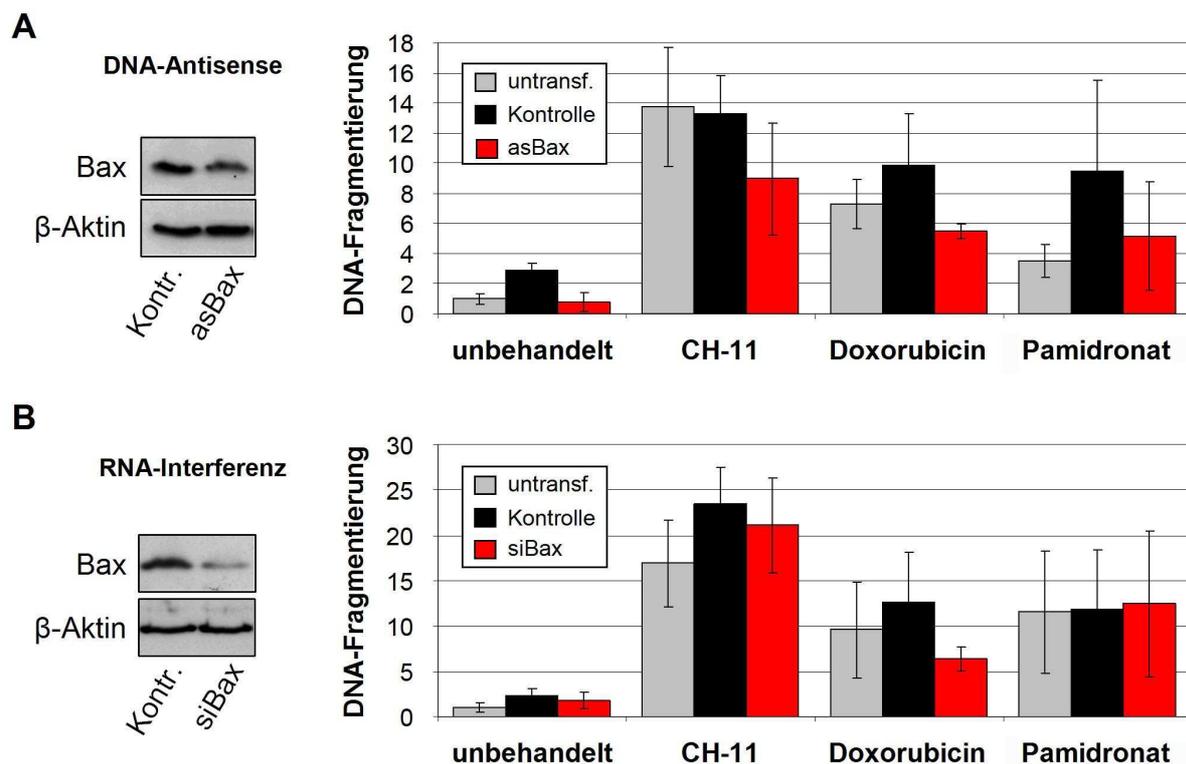
Um die Relevanz von Bax im Bax-Bcl-2-Rheostat-Verhältnis genauer zu untersuchen, wurden DNA-Antisense- und RNA-Interferenz-Konstrukte zur Verringerung der Bax-Expression angewendet. In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion in Melanomzellen durch Verstärkung der Bcl-2-Expression drastisch gesenkt werden kann (Raisova *et al*, 2001). Es zeigte sich, dass die Apoptoseresistenz bzw. Sensitivität von Melanomzellen hauptsächlich durch eine veränderte Bcl-2-Expression, bei relativ konstanter Bax-Expression, moduliert wurde. Ziel der hier durchgeführten Versuche war es nun zu überprüfen, ob durch eine Herabregulation der Bax-Expression bei gleich bleibender Bcl-2-Expression ein vergleichbarer Effekt erzielt werden kann.

Die Melanomzelllinie A-375 wurde mit DNA-Antisense-Oligodesoxyribonukleotiden (ODN), die gegen die humane Bax-mRNA (asBax) gerichtet war, transfiziert. Eine Kontrollgruppe von Zellen wurde mit einem ODN unspezifischer Sequenz transfiziert (Kontrolle), während eine andere Kontroll-Zellpopulation nicht transfiziert wurde (untransf.). Die Bax-Expression war 48 h nach asBax-Transfektion im Western-Blot nur geringfügig verringert. Trotzdem war die basale Apoptoserate gegenüber den Kontrollzellen signifikant reduziert.

Um die Sensitivität der Zellen gegenüber pro-apoptotische Stimuli zu untersuchen, wurden 24 h nach Transfektion einige Zellen mit den Chemotherapeutika Doxorubicin (0,2 µM) bzw. Pamidronat (100 µM) für weitere 24 h behandelt. Andere Zellen wurden 38 h nach Transfektion für 10 h mit dem agonistischen Antikörper gegen CD95 (CH-11, 0,5 µg/ml) behandelt.

In allen Fällen waren die mit asBax transfizierten Zellen unempfindlicher gegen die nachfolgende pro-apoptotische Behandlung als die mit dem Kontroll-ODN transfizierten Zellen. Nach CH-11- bzw. Doxorubicin-Behandlung waren die asBax-transfizierten Zellen sogar weniger empfindlich als die untransfizierten Kontrollzellen (Abb. 13 A).

Bei Transfektion von A-375 mit siRNA-Oligoribonukleotiden (ORN), die gegen die humane Bax-mRNA-Sequenz gerichtet waren (siBax), zeigte sich 48 h nach Transfektion im Western-Blot eine deutliche Verringerung der Bax-Expression auf Proteinebene. Trotzdem zeigten die mit siBax transfizierten Zellen keine erhöhte Resistenz gegen die nachfolgende pro-apoptotische Behandlung (CH-11, Doxorubicin, Pamidronat) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nur gegenüber der Doxorubicin-Behandlung zeigten die mit siBax transfizierten Zellen eine verstärkte Apoptoseresistenz (Abb. 13 B).



**Abb. 13: Die Verringerung der Bax-Expression erhöht die Apoptoseresistenz von Melanomzellen**

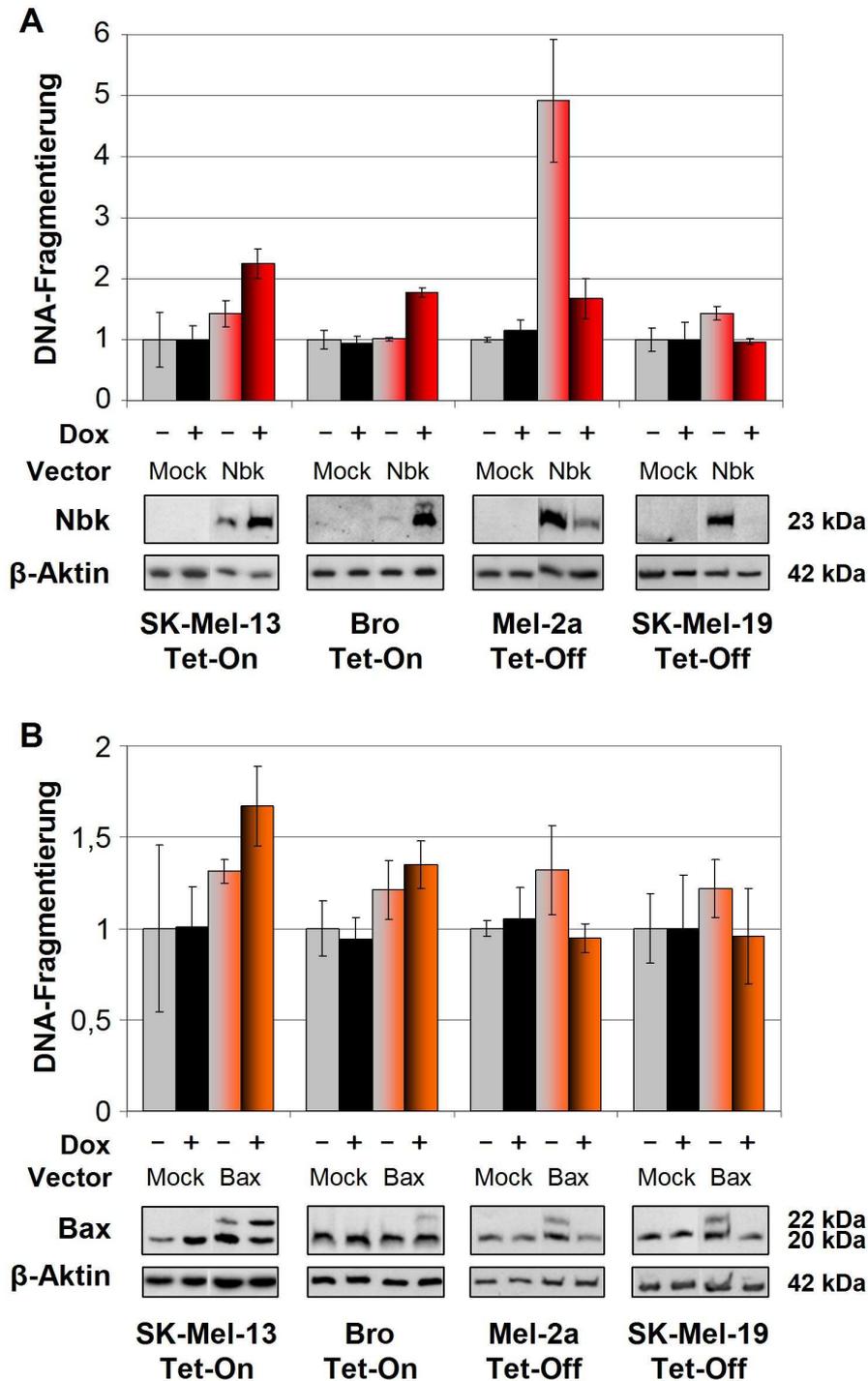
A: Die Melanomzelllinie A-375 wurde mit DNA-Antisense-Oligodesoxyribonukleotiden (ODN), gerichtet gegen die Bax-mRNA (asBax), bzw. einem ungerichteten Kontroll-ODN (Kontrolle), transfiziert. Eine zweite Kontrollgruppe blieb untransfiziert (untransf.). B: A-375 wurde mit siRNA gerichtet gegen die Bax-mRNA (siBax) oder einer ungerichteten Kontroll-siRNA (Kontrolle) transfiziert. Eine zweite Kontrollgruppe blieb untransfiziert (untransf.). A, B: Nach 38 h wurden Zellen mit dem agonistischen CD95-Antikörper (CH-11) für weitere 10 h behandelt. Andere Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit den Chemotherapeutika Doxorubicin oder Pamidronat für weitere 24 h behandelt oder blieben unbehandelt. Die relativen Apoptosewerte wurden mit dem Cell Death Detection ELISA bestimmt und auf die untransfizierte, unbehandelte Kontrolle bezogen die mit dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Jeder Balken zeigt die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von sechs Einzelwerten aus zwei unabhängigen Versuchen. Die Western-Blots zeigen jeweils die Bax-Proteinexpression in entsprechenden, parallel behandelten Kulturen. Die Proteine (50  $\mu$ g) wurden in einem 12%-igen Gel mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Der Bax-Antikörper detektierte das humane Bax-Protein bei 20 kDa, als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (42 kDa).

### 3.1.3. Transiente Überexpression von Nbk und Bax induziert Apoptose in Tetracyclin-regulierbaren Melanomzelllinien

Um die Auswirkungen von Nbk- bzw. Bax-Überexpression auf die Apoptoseregulation von Melanomzellen zu untersuchen, wurde sowohl die Nbk-cDNA als auch die Bax-cDNA in Tetracyclin-regulierbare Melanomzellen transient transfiziert. Die vollständige, mit einem myc-tag markierte humane Nbk-cDNA wurde in das Tetracyclin-regulierbare Expressionsplasmid pTRE2 subkloniert (pTRE-Nbk). Ebenso wurde die myc-markierte, humane Bax-cDNA in pTRE2 subkloniert (pTRE-Bax). Nach transienter Transfektion von pTRE-Nbk in Tetracyclin-regulierbare Melanomzellen ließ sich Apoptose signifikant nach Doxycyclin-Behandlung in SK-Mel-13-Tet-On und Bro-Tet-On induzieren. Ähnliche Ergebnisse wurden mit den Tet-Off-Zelllinien Mel2a-Tet-Off und SK-Mel-19-Tet-Off erreicht, in denen Apoptose durch den Entzug von Doxycyclin induziert wurde. Parallel durchgeführte Western-Blots zeigten die Doxycyclin-abhängige Proteinexpression von myc-markierten, 23 kDa großen Nbk-Protein (Abb. 14 A).

Nach transienter Transfektion mit pTRE-Bax und anschließender Doxycyclininduktion ließ sich ebenfalls in allen vier Zelllinien Apoptose auslösen, jedoch in einem geringeren Ausmaß als nach pTRE-Nbk-Transfektion. Die Western-Blot-Analysen paralleler Zellkulturen zeigte die Doxycyclin-abhängige Expression von myc-markiertem Bax bei 22 kDa, jedoch auch eine relative starke Proteinbande von endogen exprimiertem Bax (20 kDa, Abb. 14 B).

Diese starke basale Bax-Expression, im Verhältnis zur Expression des endogenen Bax, mag der Grund für die geringere Induktion von Apoptose nach Bax-Transfektion sein. Nach Nbk-Transfektion zeigte sich ein ähnliches Bild bei SK-Mel-19. In dieser Melanomzelllinie, die die stärkste basale Nbk-Expression aufwies, zeigte sich auch die geringste Apoptoseinduktion aller vier untersuchten Zelllinien nach Nbk-Transfektion.

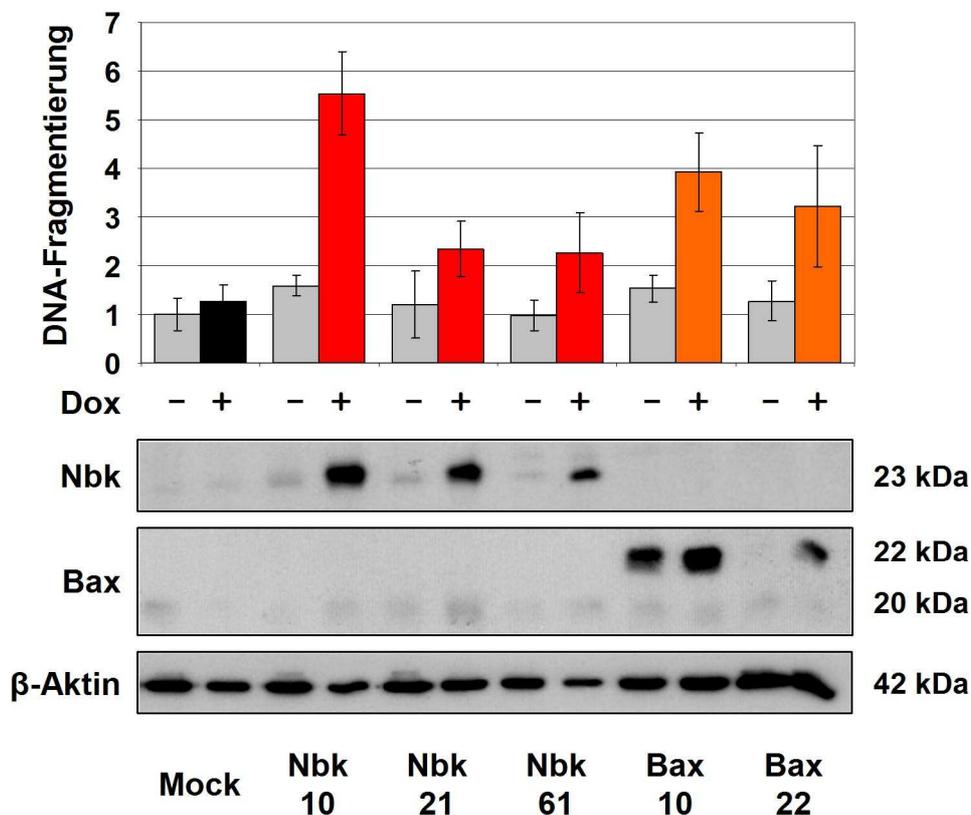


**Abb. 14: Transiente Transfektion von Nbk oder Bax induziert Apoptose in Melanomzelllinien**

Die relativen Apoptosewerte, gemessen als DNA-Fragmentierung, wurden für zwei Tet-On- (SK-Mel-13-Tet-On, Bro-Tet-On) und zwei Tet-Off-Melanomzelllinien (Mel2a-Tet-Off, SK-Mel-19-Tet-Off) nach transienter Transfektion mit pTRE-Nbk (A) oder pTRE-Bax (B) gemessen. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem pTRE2-Vektor transfiziert (Mock). In Tet-On-Zellen wurde die Genexpression durch Doxycyclin-Gabe (+), in Tet-Off-Zellen durch Doxycyclin-Entzug (-) induziert. Rote Balken zeigen die Apoptosewerte nach Nbk-, orange Balken nach Bax-Transfektion. Graue Balken zeigen Zellen ohne Doxycyclin-, schwarze Balken mit Doxycyclin-Behandlung. Die Western-Blots zeigen die Nbk- (A) bzw. Bax-Expression (B) aus Proteinextrakten (50 µg) von Parallelkulturen (12% Gel). β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Hintergrund-Apoptose nach Mock-Transfektion wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt und die anderen Apoptosewerte darauf bezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (jeweils Dreifachwerte) sind gezeigt.

### 3.1.4. Stabile Überexpression von Nbk und Bax induziert Apoptose in Tetracyclin-regulierbaren Melanomzellen

Nach Transfektion von pTRE-Nbk bzw. pTRE-Bax in die Tetracyclin-regulierbare Melanomzelllinie SK-Mel-13-Tet-On wurden stabil transfizierte Zellklone isoliert (SKM13-Nbk-10, -21, -61, SKM13-Bax-10, -22). In allen Nbk- bzw. Bax-Zellklonen ließ sich durch 48 h Doxycyclin-Behandlung Apoptose auslösen. Die Stärke der Proteinexpression zeigte eine relativ gute Übereinstimmung mit der Höhe der Apoptoseinduktion (Abb. 15). Die zwei Zellklone, die die deutlichste Proteinexpression und Apoptoseinduktion aufwiesen, SKM13-Nbk-10 und SKM13-Bax-10 wurden für die weiteren Versuche als SKM13-Nbk und SKM13-Bax ausgewählt.

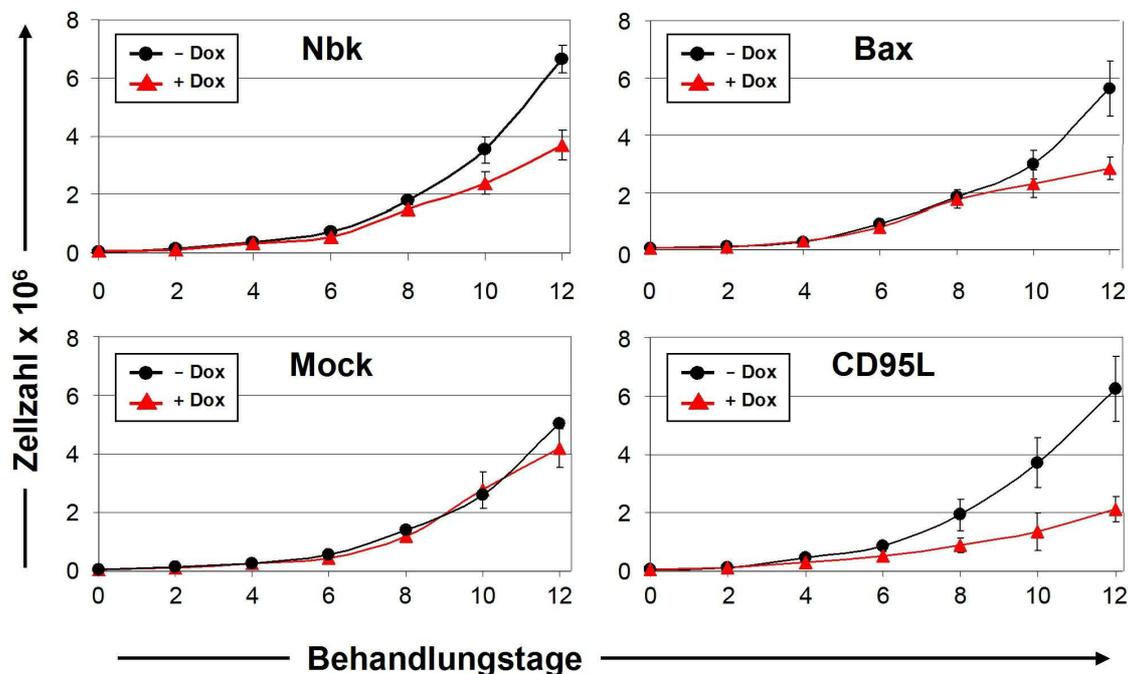


**Abb. 15: Die stabile Nbk- bzw. Bax-Überexpression induziert Apoptose in Melanomzellen**

Dargestellt sind relative Apoptosewerte nach stabiler Transfektion der Zelllinie SK-Mel-13-Tet-On mit dem pTRE2-Plasmid (Mock), dem pTRE-Nbk-Plasmid (SKM13-Nbk-10, -21, -61) oder dem pTRE-Bax-Plasmid (SKM13-Bax-10, Bax-22). Zur Induktion der Expression wurden die Zellen für 48 h mit Doxycyclin behandelt (+). Nicht-induzierte Zellen (-) wiesen nur eine minimale Expression auf. Die Proteinexpression von Nbk und Bax in Parallelkulturen ist im unteren Bereich dargestellt. Je 50 µg Protein wurden im 12% Gel aufgetrennt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (42 kDa). Die basale Apoptose nach Mock-Transfektion wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (jeweils Dreifachwerte) sind angegeben.

### 3.1.5. Die Expression pro-apoptotischer Gene hemmt die Proliferationsrate in Melanomzellen

Die Anzahl der Zellen einer Zellpopulation wird durch das Verhältnis zwischen Proliferation und Zelltod bestimmt. Um die Auswirkungen der Nbk- bzw. Bax-Überexpression auf die Proliferationsrate von Melanomzellen zu bestimmen, wurden Wachstumskurven erstellt. SK-Mel-13-Tet-On-Melanomzellen die stabil mit Nbk (SKM13-Nbk) oder Bax (SKM13-Bax) transfiziert waren, wurden für zwölf Tage mit Doxycyclin oder ohne kultiviert. Zur Zellzahlbestimmung wurden jeden zweiten Tag Parallelkulturen geerntet und die adhärennten Zellen gezählt. Als Negativkontrolle wurden Zellen, die stabil mit dem pTRE2-Plasmid transfiziert worden waren, verwendet (SKM13-Mock). Als Postivkontrolle dienten SK-Mel-13-Tet-On-Zellen, die stabil mit dem CD95L-Liganden (SKM13-CD95L) transfiziert waren und deren Apoptoseverhalten bereits gut beschrieben worden war (Eberle *et al*, 2003). Nach zwölf Tagen Doxycyclin-Behandlung waren die Zellzahlen, sowohl bei SKM13-Nbk als auch bei SKM13-Bax, im Vergleich mit den Doxycyclin-unbehandelten Zellen um 45% bzw. 50% reduziert. Die Proliferation der Mock-Zellen wurde durch die Doxycyclin-Behandlung nicht beeinträchtigt, die Zellzahl der CD95L-überexprimierenden Zellen war am deutlichsten, um 66% verringert (Abb. 16).



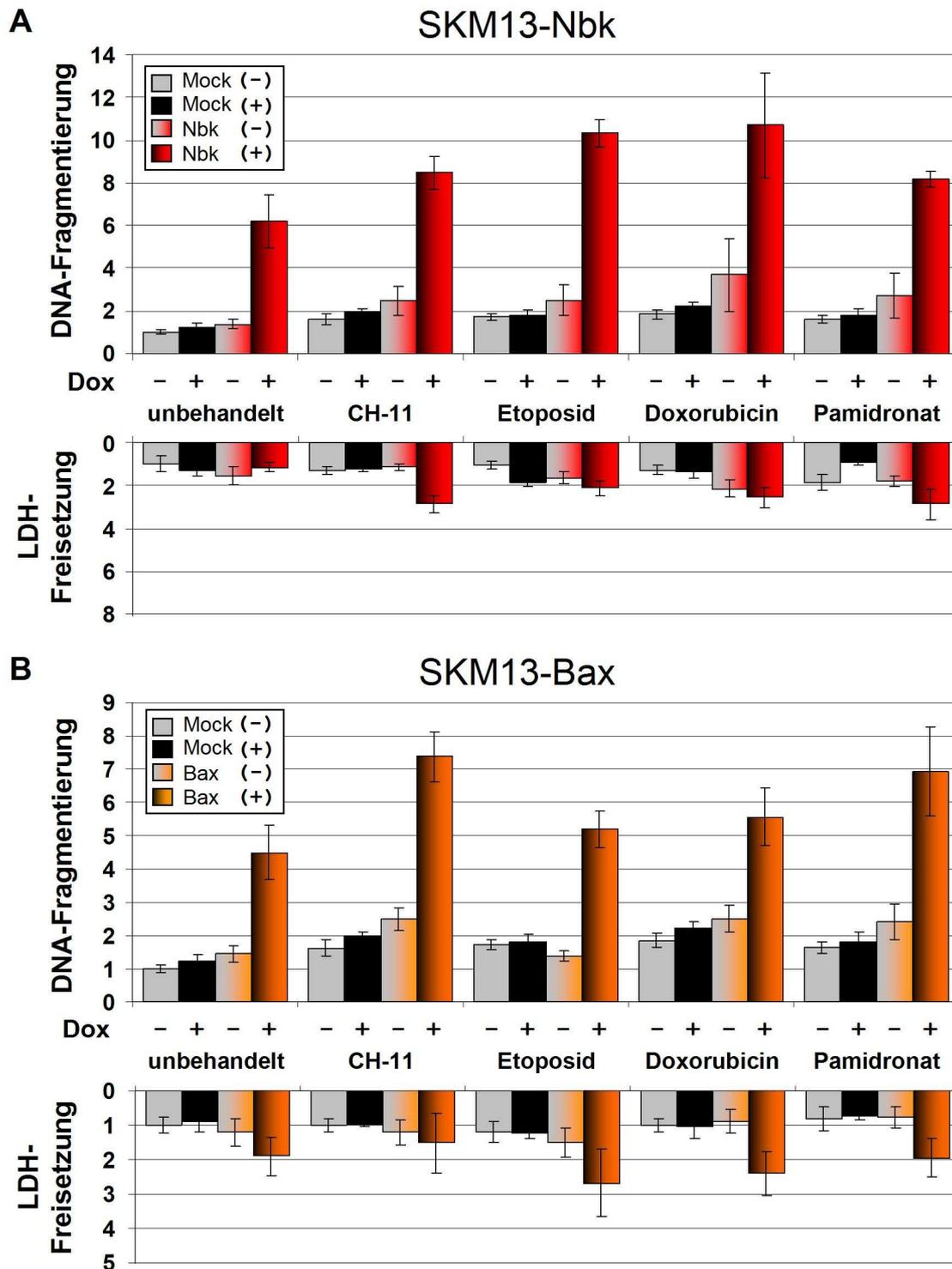
**Abb. 16: Sowohl Nbk- als auch Bax-Expression inhibiert das Wachstum von Melanomzellen**

Die Zellklone resultieren aus der stabilen Transfektion von SK-Mel-13-Tet-On-Zellen mit pTRE-Nbk (Nbk), pTRE-Bax (Bax), pTRE2 (Mock) und pTRE-CD95L (CD95L). SKM13-Nbk, SKM13-Bax, SKM13-Mock (Negativkontrolle) und SKM13-CD95L (Positivkontrolle) wurden für zwölf Tage unter Doxycyclin-Behandlung (+ Dox, Start der Behandlung an Tag 0) kultiviert und mit entsprechenden, nicht-induzierten Zellen verglichen (- Dox). Zur Zellzahlbestimmung wurden alle zwei Tage Parallelkulturen geerntet und die adhärennten Zellen aus zwei wells einer 6-well-Platte gezählt.

### 3.1.6. Nbk und Bax sensitivieren Melanomzellen für pro-apoptotische Stimuli

Nachdem festgestellt worden war, dass die Überexpression von Nbk bzw. Bax Apoptose und eine Hemmung der Proliferation in Melanomzellen bewirken konnte, stellte sich die Frage ob die Nbk- bzw. Bax-Überexpression auch die Apoptoseresistenz in Melanomzellen verringern kann. Hierfür wurden SKM13-Nbk- und SKM13-Bax-Zellen mit den Chemotherapeutika Etoposid (0,3  $\mu\text{M}$ , 24 h), Doxorubicin (0,2  $\mu\text{M}$ , 24 h) und Pamidronat (100  $\mu\text{M}$ , 24 h) sowie einem agonistischen CD95-Antikörper (CH-11, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 12 h) behandelt. Diese zusätzlichen Todesstimuli wurden in relativ geringer Konzentration appliziert, so dass sie für sich alleine keine Apoptose induzieren konnten.

Während deshalb bei den Kontrollzellen (SKM13-Mock) keine Apoptose ausgelöst wurde, führte die Überexpression von Nbk, in Kombination mit Chemotherapeutika bzw. CH-11, zu einer signifikanten Verstärkung der Apoptoserate, bei vernachlässigbaren Nekrosewerten (Abb. 17 A). Auch die Überexpression von Bax resultierte in eine deutliche Sensitivierung der Melanomzellen gegenüber pro-apoptotischen Stimuli (Abb. 17B).



**Abb. 17: Nbk und Bax sensitivieren Melanomzellen für pro-apoptotische Signale**

Stabil Nbk-transfizierte (A) oder Bax-transfizierte (B) SK-Mel-13-Tet-On-Melanomzellen wurden mit (+) oder ohne (-) Doxycyclin vorinkubiert. Nach 36 h wurde eine Population von Zellen mit dem agonistischen CD95-Antikörper (CH-11) für weitere 12 h inkubiert. Andere Zellen wurden nach 24 h Doxycyclin-Vorinkubation für weitere 24 h mit Chemotherapeutika behandelt (Etoposid, Doxorubicin, Pamidronat). Die relativen Apoptosewerte wurden auf die der unbehandelten Mock-Zellen bezogen, die mit dem Wert 1 gleichgesetzt wurden. Die relative Nekrose wurde anhand der LDH-Freisetzung gemessen und auf den Wert der unbehandelten Mock Zellen bezogen, der mit dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Die Balken der Nekrosewerte wurden invertiert dargestellt. Jeder Balken repräsentiert die Mittelwerte  $\pm$  SD von Dreifachwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.7. Nbk und Bax verlangsamen das Melanomwachstum *in vivo*

In den vorangegangenen Experimenten konnte sowohl nach Nbk- als auch nach Bax-Überexpression in Melanomzellen eine Verringerung der Proliferation, eine Induktion von Apoptose und eine Sensitivierung für pro-apoptotische Stimuli gezeigt werden. Um das pro-apoptotische Potential von Nbk und Bax *in vivo* zu untersuchen, wurden jeweils zehn Nacktmäusen SKM13-Nbk- bzw. SKM13-Bax-Zellen subkutan in beide Flanken, ventral injiziert. Zur Promotorinduktion erhielt eine Hälfte der Mäuse vom Tag der Melanomzellimpfung an Doxycyclin über das Trinkwasser, während die andere Hälfte als Kontrollgruppe kein Doxycyclin erhielt. Nach zwei bis drei Wochen Wachstum waren alle 40 Tumore sichtbar. Die Überexpression von Nbk verzögerte aber das Melanomwachstum signifikant, was sich in zu 45% kleineren Tumoren nach 46 Tagen Wachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe manifestierte ( $p < 0.03$ ; Abb. 18 A). Die Bax-Überexpression verlangsamte das Tumorwachstum etwas weniger deutlich (39% kleinere Tumoren nach 46 Tagen, Abb. 18 B).

Insgesamt ließ sich beobachten, dass die Tumore aus den SKM13-Bax-Zellen deutlich langsamer wuchsen als die Tumore aus den SKM13-Nbk-Zellen. Dies könnte daran liegen, dass die SKM13-Bax-Zellen auch ohne Doxycyclin-Behandlung bereits eine Bax-Expression aufwiesen (Abb. 15). Die Doxycyclin-Behandlung alleine hatte keinen Effekt auf das Tumorwachstum, wie sich bei Mäusen zeigte, die mit pTRE2-Plasmiden transfizierten Zellklonen (SKM13-Mock) beimpft worden waren (nicht dargestellt).



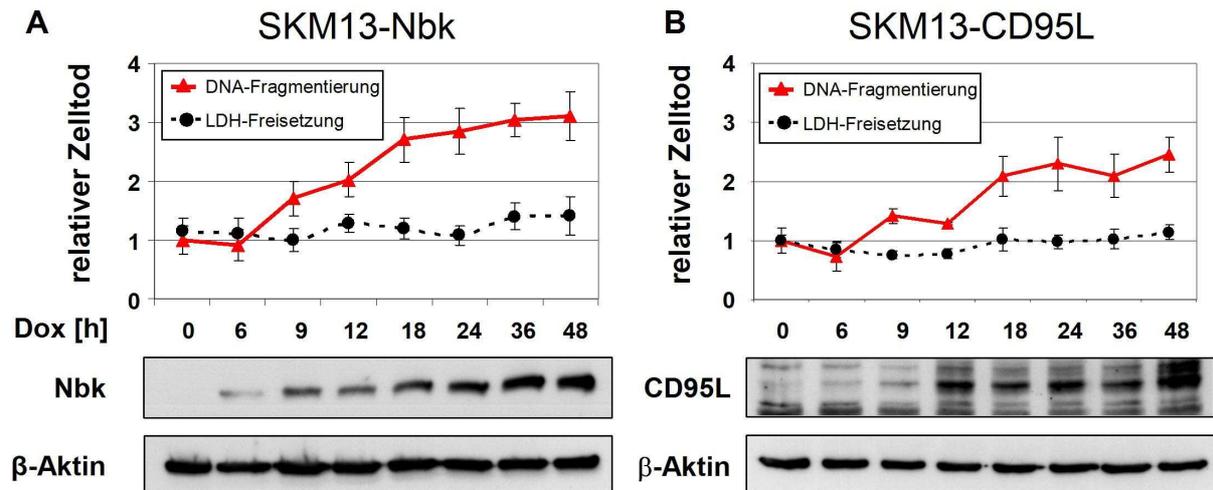
### 3.2. Verstärkung der Doxycyclin-regulierten Expression der pro-apoptotischen Proteine Nbk und CD95-Ligand in humanen Melanomzellen

#### 3.2.1. Zeitabhängige Regulation der Doxycyclin-induzierten Proteinexpression und Apoptoseinduktion bei SKM13-Nbk und SKM13-CD95L

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ließ sich durch die Überexpression der pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine Nbk und Bax Apoptose in Melanomzellen auslösen. Da der Mechanismus der Nbk-induzierten Apoptose in Melanomzellen, im Gegensatz zum Bax-induzierten Signalweg, noch ungeklärt war wurde für die weiteren Experimente der Fokus auf das BH3-only-Protein Nbk gelegt. Als Positivkontrolle wurden SK-Mel-13-Melanomzellen verwendet, die durch stabile Überexpression des CD95-Liganden die klassische Todesligand-kontrollierte Apoptosekaskade Doxycyclin-abhängig aktivieren können (Eberle *et al*, 2003).

Um festzustellen wie die Apoptoseinduktion mit der Stärke der Nbk-Expression zusammenhängt, wurden Zeitkinetiken erstellt. Als Positivkontrolle wurde die Apoptoseinduktion nach Überexpression des CD95-Liganden (CD95L) gewählt. Eine zeitabhängige Expressionsanalyse von SKM13-Nbk-Zellen zeigte, dass die Nbk-Proteinexpression bereits 6 h nach Doxycyclin-Gabe einsetzte und dann bis 48 h nach Doxycyclin-Behandlung relativ gleichmäßig zunahm. Die Nbk-Überexpression wurde von Apoptoseinduktion, gemessen als DNA-Fragmentierung, begleitet. Eine Zunahme von Nekrose, die durch die LDH-Freisetzung ins Zellmedium charakterisiert wurde, konnte dabei nicht festgestellt werden (Abb. 19 A).

Bei den CD95L-überexprimierenden Zellen (SKM13-CD95L) zeigte sich eine leichte Zunahme der CD95L-Expression 6-9 h nach Doxycyclin-Gabe, gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg der CD95L-Expression 12-48 h nach Doxycyclin-Behandlung. Auch hier wurde die Proteinexpression von Apoptose-, jedoch nicht von Nekroseinduktion, begleitet (Abb. 19 B).



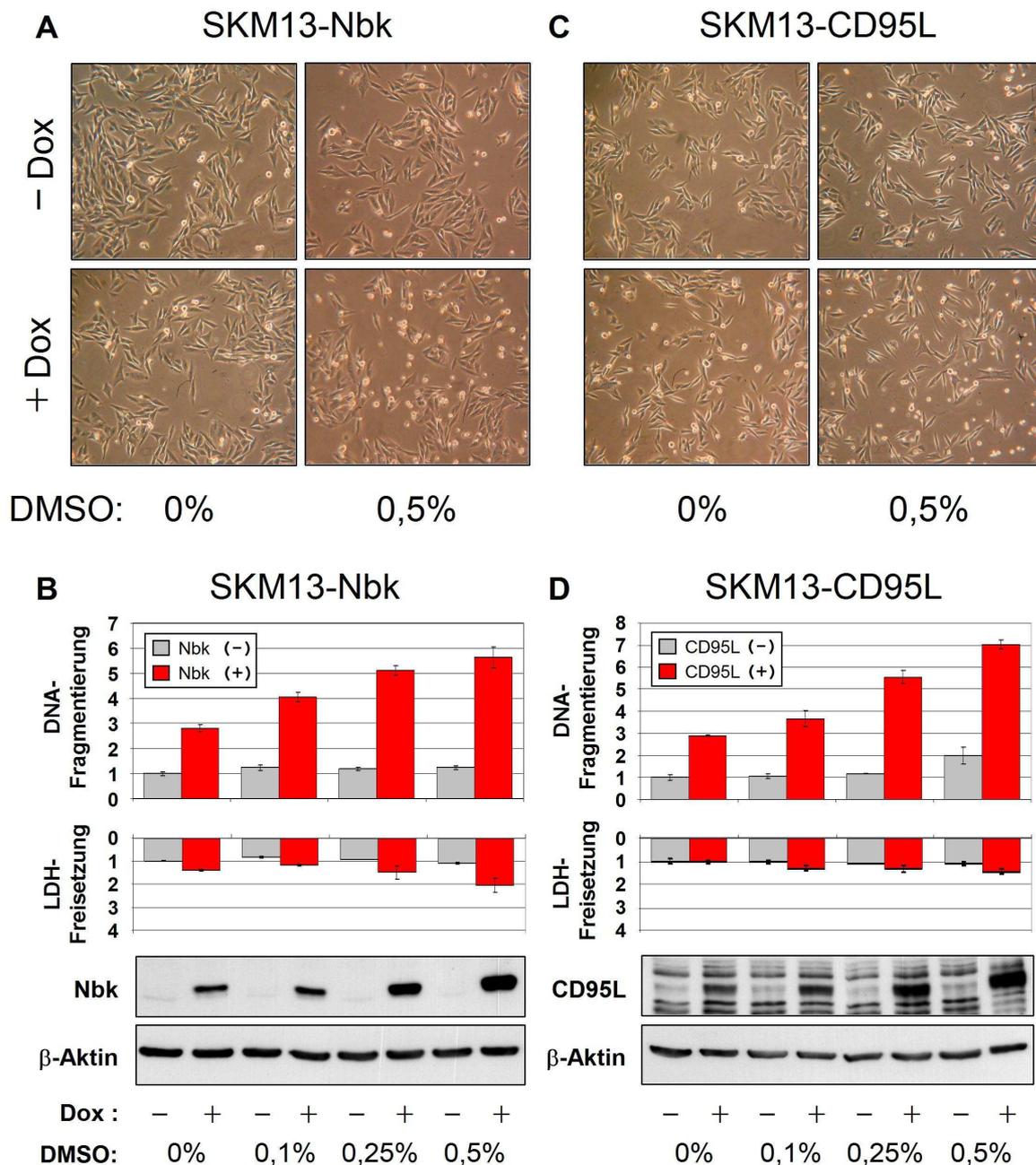
**Abb. 19: Die zunehmende Expression von Nbk und CD95L wird von Apoptose begleitet**  
 (A) SKM13-Nbk- und (B) SKM13-CD95L-Zellen wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  mit Doxycyclin behandelt. Die relativen Apoptose- und Nekrosewerte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion gemessen. Der Wert der basalen Apoptose- bzw. Nekrosewerte (ohne Doxycyclin-Behandlung) wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments (Dreifachwerte) dargestellt. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt. In Parallelkulturen wurde die Nbk- (23 kDa) bzw. CD95L-Expression (41 kDa) im Western-Blot festgestellt. Die Proteinlysate (50  $\mu$ g) wurden in einem 12%-igen Polyacrylamidgel mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (42 kDa).

### 3.2.2. DMSO verstärkt die Doxycyclin-induzierte Expression von Nbk und CD95L in stabil-transfizierten Melanomzellen

In verschiedenen Experimenten wurde das Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) eingesetzt. Hier zeigte sich ein interessanter Nebeneffekt. Durch die gleichzeitige Behandlung mit DMSO und Doxycyclin von SKM13-Nbk- und SKM13-CD95L-Zellen, wurde die Proteinexpression von Nbk und CD95L abhängig von der DMSO-Konzentration signifikant verstärkt. Diese Verstärkung der Expression beschränkte sich auf die beiden Doxycyclin-regulierten Gene, während die  $\beta$ -Aktin-Expression nicht beeinflusst wurde.

Nach der Behandlung mit 0,5% DMSO, parallel zur Doxycyclininduktion von SKM13-Nbk-Zellen (48 h), zeigte sich bereits lichtmikroskopisch eine deutliche Zunahme toter Zellen im Zellmedium, im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 20 A). Mit steigender DMSO-Konzentration verstärkte sich sowohl die Nbk-Expression als auch die Nbk-induzierte Apoptose, während keine erhöhten Nekrosewerte festgestellt werden konnten (Abb. 20 B). Die Apoptose-Verstärkung beruhte dabei eindeutig auf einem synergistischen Effekt zwischen DMSO und Doxycyclin, da durch DMSO alleine keine Apoptose ausgelöst wurde.

Bei SKM13-CD95L zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Durch die Kombination von Doxycyclininduktion und DMSO-Behandlung ließ sich die Proteinexpression von CD95L und die damit einhergehende Apoptoseinduktion konzentrationsabhängig verstärken (Abb. 20 C, D).



**Abb. 20: DMSO verstärkt die Doxycyclin-induzierte Proteinexpression in stabil-transfizierten SK-Mel-13-Zellen**

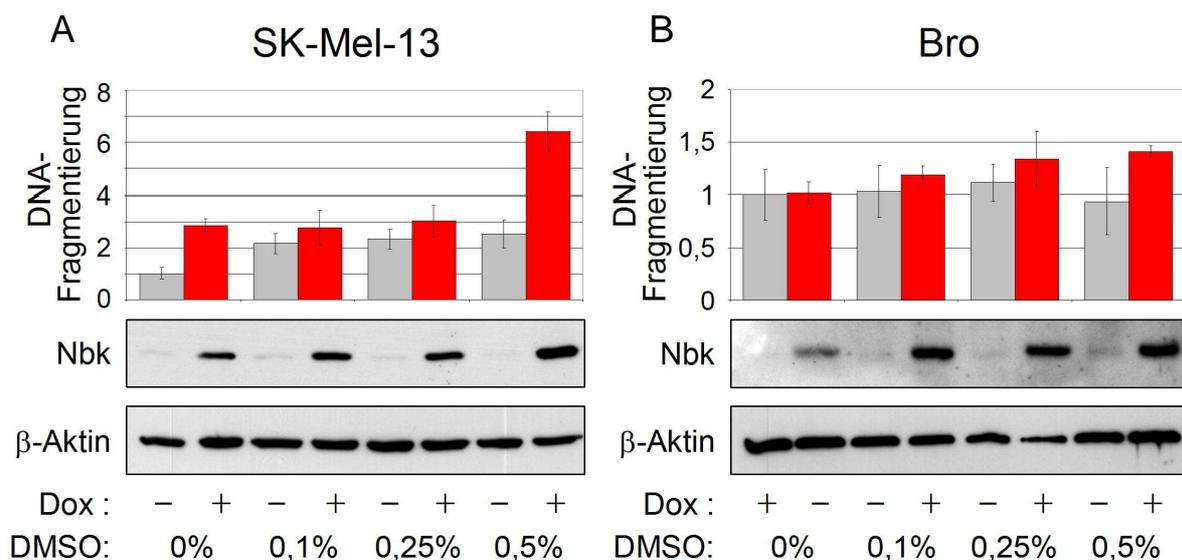
SKM13-Nbk (A) und SKM13-CD95L (C) wurden mit Doxycyclin (+ Dox) oder ohne (-Dox) mit der angegebenen DMSO-Konzentration (0% bzw. 0,5%) inkubiert und nach 48 h photographiert. Tote Zellen haben sich abgelöst und sind anhand einer runden Morphologie zu erkennen.

SKM13-Nbk- (B) und SKM13-CD95L-Zellen (D) wurden für 48 h mit Doxycyclin behandelt. Einige Zellen wurden zusätzlich mit DMSO inkubiert (0,1%, 0,25%, 0,5%). Für die relativen Apoptose- und Nekrosewerte wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments (Dreifachwerte) dargestellt. Der Wert der basalen Apoptose- bzw. Nekroserate (Dreifachwerte) wurde mit 1 gleichgesetzt (0% DMSO, kein Doxycyclin). Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. In Parallelkulturen wurde die Nbk- (23 kDa) bzw. CD95L-Expression (41 kDa) im Western-Blot dargestellt. Die Proteinlysate (50  $\mu$ g) wurden in einem 12%-igen Polyacrylamidgel mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa).

### 3.2.3. DMSO verstärkt die Doxycyclin-regulierbare Proteinexpression nach transienter Transfektion von Nbk in die Melanomzelllinien SK-Mel-13 und Bro

Um auszuschließen, dass die DMSO-verstärkte Proteinexpression nur ein Zellklon-spezifisches Phänomen darstellte, wurden SK-Mel-13-Tet-On-Zellen mit Nbk transient transfiziert. Nach 48 h Inkubation mit Doxycyclin und DMSO zeigte sich, dass auch bei den transient transfizierten Zellen die Nbk-Expression konzentrationsabhängig durch DMSO erhöht wurde. Apoptosenachweise in Parallelkulturen ergaben, dass die pro-apoptotische Aktivität von Nbk ebenfalls gesteigert wurde (Abb. 21 A). Um weiter zu überprüfen ob dieser Effekt auf SK-Mel-13-Zellen beschränkt war, wurde zusätzlich die Tet-On-Melanomzelllinie Bro-Tet-On mit Nbk transient transfiziert und die Zellen zusätzlich zur Doxycyclininduktion (48 h) mit DMSO behandelt. Auch bei Bro-Tet-On ließ sich eine Zunahme in der Nbk-Expression und die damit einhergehende Apoptoseinduktion beobachten (Abb. 21 B).

Die Behandlung der Tet-On-Zellen mit DMSO erwies sich somit als ein einfaches und wirkungsvolles Mittel zur Steigerung der Doxycyclin-induzierten Proteinexpression.



**Abb. 21: DMSO verstärkt die induzierte Nbk-Expression nach transienter Transfektion in den Melanomzelllinien SK-Mel-13 und Bro**

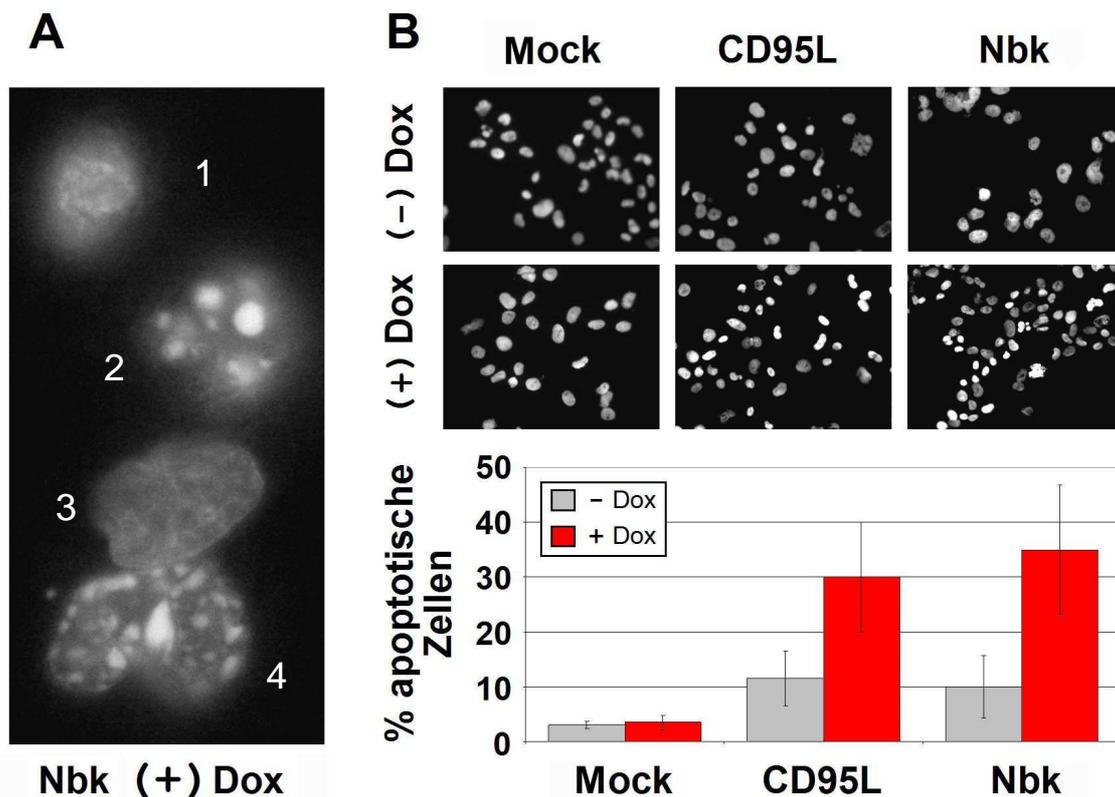
(A) SK-Mel-13-Tet-On-Zellen und (B) Bro-Tet-On-Zellen wurden mit Nbk transient transfiziert und 48 h mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert. Einige Zellen wurden parallel mit DMSO behandelt (0,1%, 0,25%, 0,5%), andere Zellen verblieben ohne DMSO-Behandlung (0%). Die relativen Apoptosewerte wurden aus den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Experiments (Dreifachwerte) ermittelt. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Der Wert der basalen Apoptoserate wurde mit 1 gleichgesetzt (0% DMSO, ohne Doxycyclin). Proteinlysate (50  $\mu$ g) aus Parallelkulturen wurden in einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nbk wurde bei 23 kDa detektiert, als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa).

### **3.3. Der Mechanismus der Nbk-induzierten Apoptose im Vergleich zur CD95L-induzierten Apoptose in humanen Melanomzellen**

#### **3.3.1. Nbk induziert Chromatinkondensation und Zellkernverdichtung in Melanomzellen**

Typische Merkmale apoptotischer Zellen sind Chromatinkondensation und die damit einhergehende Zellkernverdichtung. Mit Hilfe von Bisbenzimid, einem Farbstoff der in die chromosomale DNA von Zellen interkaliert und diese anfärbt, lassen sich Chromatinkondensation und Zellkernschrumpfung darstellen. In starker Vergrößerung lässt sich zudem die Auflösung der Zellkernmembran in apoptotisch weit fortgeschrittenen Zellen erkennen (Abb. 22 A).

Die Auswertung Bisbenzimid-gefärbter Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ermöglicht es Aussagen über die Apoptoseinduktion von Zellkulturen auf Einzelzellniveau zu treffen. Nach Doxycyclin-Behandlung für 48 h wurden SKM13-Nbk-, SKM13-CD95L- und SKM13-Mock-Zellen mit Bisbenzimid angefärbt und im Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet. SKM13-Nbk und SKM13-CD95L wiesen nach Doxycyclininduktion deutliche Chromatinkondensation und Zellkernverdichtung im Vergleich zu den nicht-induzierten Zellen und zu den Mock-Zellen auf. Die Quantifizierung der Bisbenzimid-gefärbten Zellen ergab bei SKM13-Nbk eine Zunahme der Zellkerne mit kondensierter DNA auf 35% +/- 12% im Vergleich zu nur 10% +/- 6% in nicht-induzierten Zellen ( $p < 0,0005$ ) und weniger als 4% in SKM13-Mock-Zellen. Für SKM13-CD95L zeigte sich ein Anstieg von 12% +/- 5% in unbehandelten Zellen auf 30% +/- 10% in Doxycyclin-behandelten Zellen ( $p < 0,03$ , Abb. 22 B).



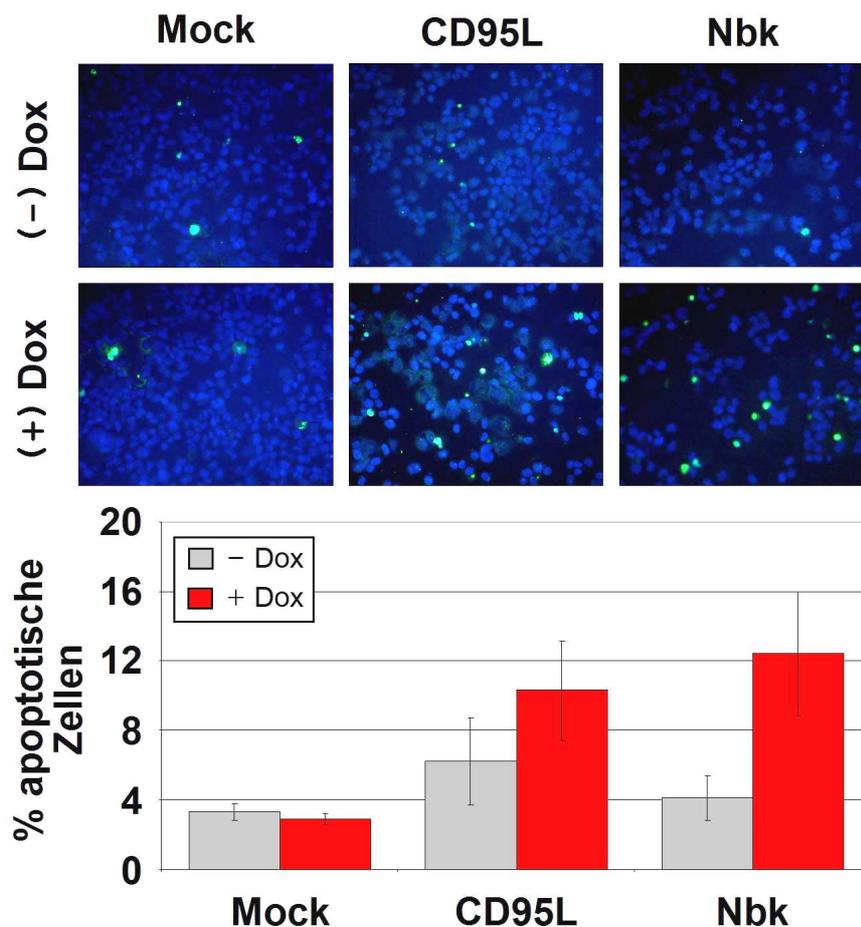
**Abb. 22: Apoptoseinduktion nach Nbk- bzw. CD95L-Expression wird von Chromatinkondensation und Schrumpfen des Zellkerns begleitet**

Chromatinkondensation und Zellkernverdichtung wurden in SKM13-Nbk-, SKM13-CD95L und SKM13-Mock-Zellen 48 h nach Doxycyclin-Behandlung (+ Dox) oder ohne Doxycyclininduktion (- Dox) mit Hilfe von Bisbenzimid-Färbung dargestellt. (A) Unter starker Vergrößerung (~2000-fach) werden die verschiedenen Stadien apoptotischer Zellkerne nach Nbk-Überexpression deutlich. Man erkennt einen geschrumpften Zellkern (1), einen Kern mit sich auflösender Kernmembran (2) sowie Chromatinkondensation (4). Im Vergleich dazu sieht man einen unveränderten Zellkern (3). (B) Unter geringer Vergrößerung (100-fach) sind Zellkerne mit Chromatinkondensation als intensiv angefarbte, geschrumpfte Kerne zu erkennen. Es wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Dreifachwerten quantifiziert.

### 3.3.2. Nbk-Expression führt zu DNA-Einzelstrangbrüchen

Mit Hilfe der TUNEL-Technik (terminal dUTP nick-end labeling) können Einzelstrangbrüche in der DNA dargestellt werden. Die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) fügt fluoreszenzmarkierte Basen an freie 3'-OH-DNA-Enden an. Je stärker die DNA fragmentiert ist desto deutlicher wird demnach der Zellkern angefarbt. Auf diese Weise lässt sich DNA-Fragmentierung in einzelnen Zellen visuell darstellen.

Nach Nbk-Induktion waren 12% +/- 4% der Zellen TUNEL-positiv im Vergleich zu nur 4% +/- 1% in nicht-induzierten Zellen ( $p < 0,0007$ ). Nach CD95L-Expression zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Bei den Doxycyclin-induzierten SKM13-CD95L-Zellen waren 10% +/- 3% angefarbt, bei den nicht-induzierten Zellen 6% +/- 3% ( $p < 0,0004$ ). Bei der Negativkontrolle SKM13-Mock wiesen 3% der Zellen die TUNEL-Färbung auf (Abb. 23).



**Abb. 23: Auftreten von DNA-Einzelstrangbrüchen nach Nbk-Expression in Melanomzellen**

Oben: DNA-Einzelstrangbrüche wurden 96 h nach Doxycyclininduktion (+ Dox) oder ohne Doxycyclin-Behandlung (- Dox) in SKM13-Nbk-, SKM13-CD95L- und SKM13-Mock-Zellen mit Hilfe der TUNEL-Färbung dargestellt. Die Zellen wurden mit Bisbenzimid gegengefärbt um das Auszählen zu erleichtern. Unten: Es wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils Dreifachwerten dargestellt.

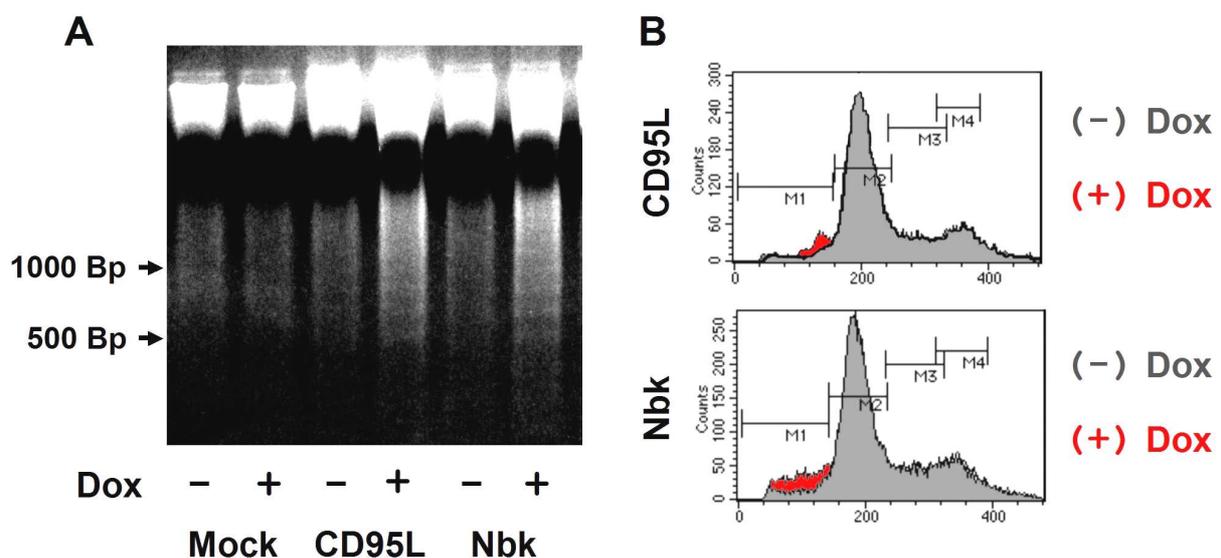
### 3.3.3. DNA-Leiter und hypodiploide Zellkerne nach Nbk-Induktion

Ein charakteristisches Merkmal apoptotischer Zellen ist die spezifische Fragmentierung der genomischen DNA in Spaltprodukte von definierter Größe. Die klassische Methode zur Detektion von DNA-Fragmentierung ist die DNA-Leiter. Die Gesamt-DNA induzierter und nicht-induzierter SKM13-Nbk-, SKM13-CD95L- und SKM13-Mock-Zellen wurde in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht-Bestrahlung photographiert (Abb. 24 A).

Apoptotische Zellen besitzen aufgrund der DNA-Fragmentierung weniger DNA im Zellkern als normale Zellen, da kleine DNA-Fragmente durch Kernporen aus dem Zellkern diffundieren können. Mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS) lässt sich die DNA-Menge einer Zelle messen. Die Zellzyklusanalyse (Nicoletti-Assay) bietet deshalb die Möglichkeit

den Verlust von DNA durch DNA-Fragmentierung, in Propidiumjodid-gefärbten Zellkernen, quantitativ zu bestimmen.

In SKM13-Nbk-Zellen die für 96 h mit Doxycyclin behandelt wurden, ließen sich 14% hypodiploide Zellkerne (sub G1 peak, Kerne mit weniger DNA als in der G1-Phase des Zellzyklus) feststellen, im Vergleich zu 6% in nicht-induzierten Zellen. Für SKM13-CD95L-Zellen zeigten sich 96 h nach Doxycyclin-Behandlung 8% der Zellkerne als hypodiploid, während ohne Doxycyclin-Behandlung 3% der Kerne zu wenig DNA aufwiesen (Abb. 24 B). Die Doxycyclin-Gabe alleine hatte keinen Effekt auf die Zellen, wie sich nach Doxycyclin-Behandlung von SKM13-Mock-Zellen zeigte (Daten nicht dargestellt).



**Abb. 24: DNA-Fragmentierung und hypodiploide Zellen nach Induktion von Nbk**

(A) Die Gesamt-DNA wurde aus SKM13-Mock-, SKM13-CD95L- und SKM13-Nbk-Zellen nach 48 h Doxycyclin-Behandlung (+) oder ohne Doxycyclin-Gabe (-) extrahiert und im Agarosegel aufgetrennt (1%). (B) Der DNA-Gehalt von SKM13-Nbk- und SKM13-CD95L-Zellen, die mit Propidiumjodid gefärbt worden waren, wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Die Zellen wurden vorher für 96 h, mit Doxycyclin (+ Dox) oder ohne (-Dox) inkubiert. Die Graphik für die Doxycyclin-behandelten Zellen wurde hinter die Graphik der Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung gelegt. Der sub G1 peak, d. h. die zusätzlichen Zellen, die nach Doxycyclininduktion weniger DNA aufwiesen als in der G1-Phase, wurde rot angefärbt.

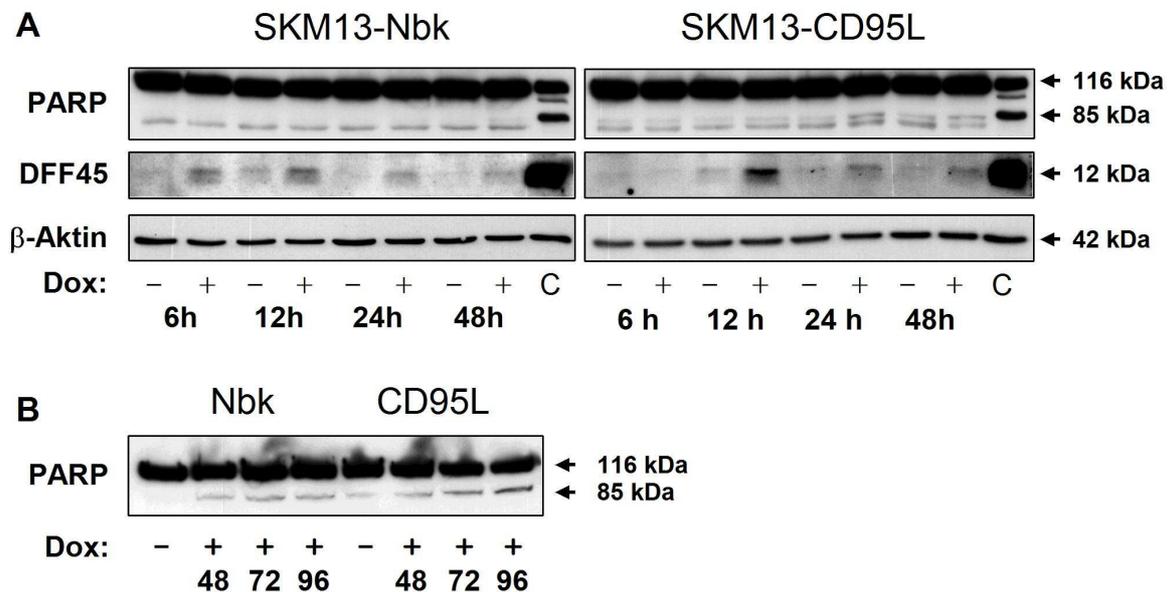
### 3.3.4. Geringe Spaltung der Todessubstrate DFF45 und PARP im Zuge der Nbk-induzierten Apoptose

Neben der DNA-Fragmentierung ist die Spaltung spezifischer Todessubstrate durch Proteasen ein kritisches Kennzeichen apoptotischer Zellen. Ein wichtiges Todessubstrat ist DFF45 (DNA Fragmentation Factor 45), der Inhibitor von DFF40, einer Endonuklease, die maßgeblich für DNA-Fragmentierung in eukaryotischen Zellen verantwortlich ist. Die Spaltung von DFF45 im Verlauf der Apoptose resultiert in die Freisetzung und Aktivierung

von DFF40. In murinen Zellen bezeichnet man DFF40 und DFF45 als CAD (Caspase-Activated DNase) und ICAD (Inhibitor of CAD).

Insgesamt zeigte sich nur eine geringe Spaltung von DFF45 nach Induktion von Nbk. Zwar war zu allen Zeitpunkten nach Doxycyclin-Gabe (6-48 h) das DFF45-Spaltprodukt (12 kDa) detektierbar, jedoch nur in sehr geringen Mengen verglichen mit der Positivkontrolle (C, Jurkat-Zellen die für 24 h mit Doxorubicin behandelt wurden). Bei SKM13-CD95L zeigte sich 12 h nach Doxycyclin-Behandlung ein relativ deutliches Spaltprodukt von DFF45, welches allerdings 24 h und 48 h nach CD95L-Induktion nur noch schwach nachweisbar war (Abb. 25 A).

Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) ist ein wichtiges DNA-Reparaturenzym und ist ein häufig beschriebenes Spaltprodukt in der Apoptose. Bei Nbk-Überexpression zeigte sich eine leichte Verstärkung des PARP-Spaltprodukts (85 kDa) relativ spät nach Doxycyclininduktion (48-96 h). Bei SKM13-CD95L waren dagegen schon nach 24 h geringe Mengen des PARP-Spaltproduktes vorhanden. Ein deutliches PARP-Spaltprodukt fand sich allerdings auch bei CD95L-Überexpression erst zu späteren Zeitpunkten. Gemessen an der nahezu unveränderten PARP-Proform (116 kDa), zeigte sich sowohl nach Nbk- als auch nach CD95L-Induktion nur eine sehr schwache Spaltung. Ein deutlicher Abbau der Proform erfolgte nur in der Positivkontrolle (C, Doxorubicin-behandelte Jurkat-Zellen, Abb. 25 A, B).

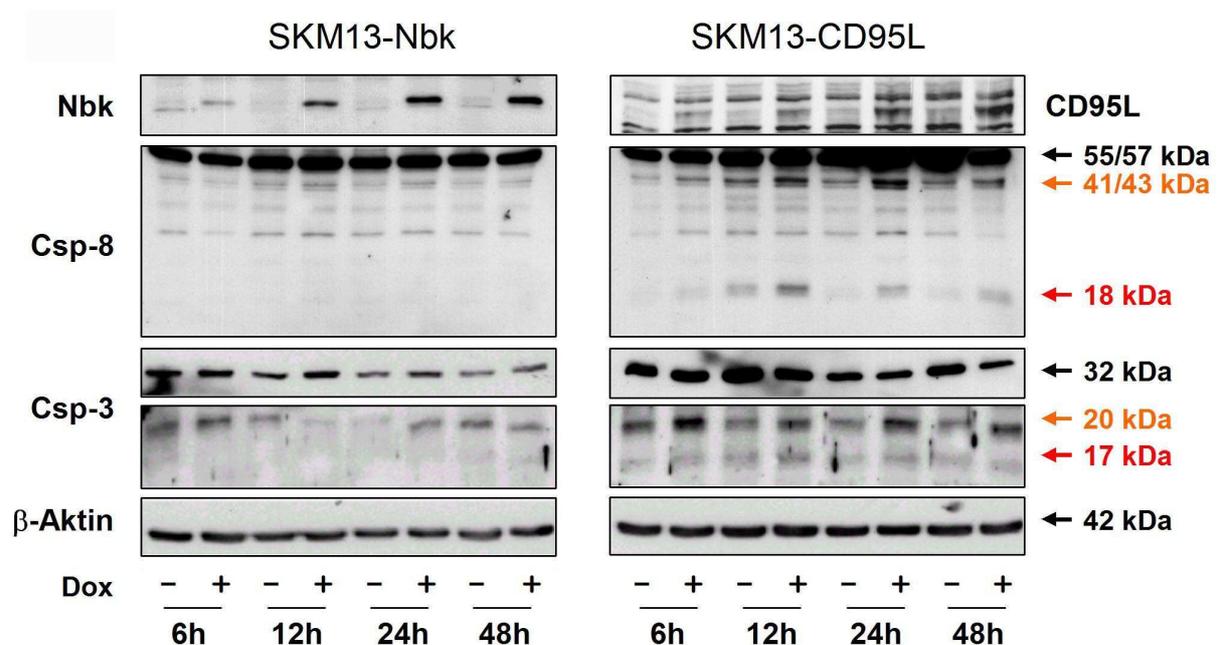


**Abb. 25: Spaltung der Todessubstrate DFF45 und PARP nach Induktion von Nbk bzw. CD95L**  
SKM13-Nbk und SKM13-CD95L wurden mit (+) oder ohne (-) Doxycyclin für 6 h, 12 h, 24 h, 48 h (A) sowie für 48 h, 72 h und 96 h inkubiert (B). Die Proteinlysate (50 µg) wurden in einem 7,5%-igen (PARP) bzw. 12%-igen (DFF45) Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit den Antikörpern gegen PARP bzw. DFF45 inkubiert. Der verwendete DFF45-Antikörper erkennt das inaktive Spaltprodukt bei 12 kDa. Der PARP-Antikörper bindet an die 116 kDa große Proform sowie das Spaltprodukt bei 85 kDa. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet (42 kDa). Als Positivkontrolle wurden Extrakte aus Jurkat-Zellen verwendet, die für 24 h mit 1 µM Doxorubicin behandelt worden waren (C).

### 3.3.5. Keine Aktivierung von Caspasen in der durch Nbk induzierten Apoptose in Melanomzellen

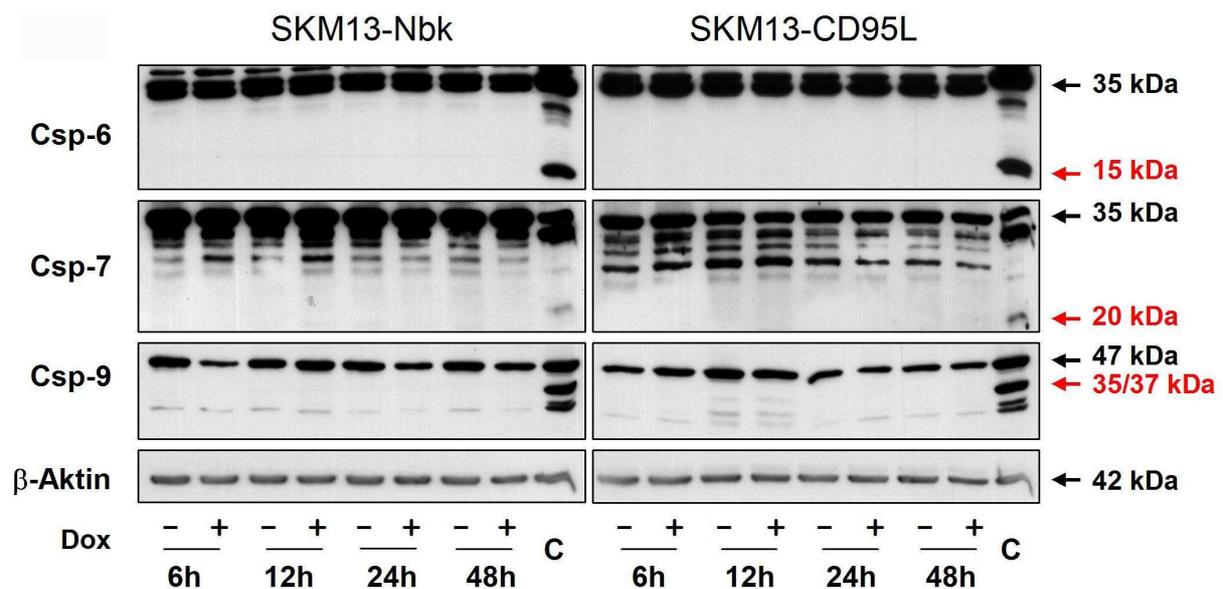
Caspasen sind Cystein-abhängige **Aspartat-spaltende Proteasen** mit einer hohen Relevanz in den Apoptosekaskaden vieler verschiedener Zellsysteme. Die Aktivierung von Caspasen geschieht über aktivierende Proteolyse der inaktiven Zymogene (Proform) in aktive Spaltprodukte (Riedl und Shi, 2004). Diese lassen sich im Western-Blot darstellen.

Die Western-Blot-Analysen für Doxycyclin-induzierte SKM13-Nbk-Zellen zeigten keine Spaltung der Initiator-Caspase-8 oder der Effektor-Caspase-3. Im Gegensatz dazu wurde nach Induktion von CD95L durch Doxycyclin-Behandlung in SKM13-CD95L-Zellen die Proform der Caspase-8 (55 und 57 kDa) zu dem aktiven 18 kDa Spaltprodukt prozessiert. Ebenso zeigte sich die proteolytische Aktivierung der Caspase-3-Proform (32 kDa) zu den Spaltprodukten bei 20 kDa und 17 kDa (Abb. 26).



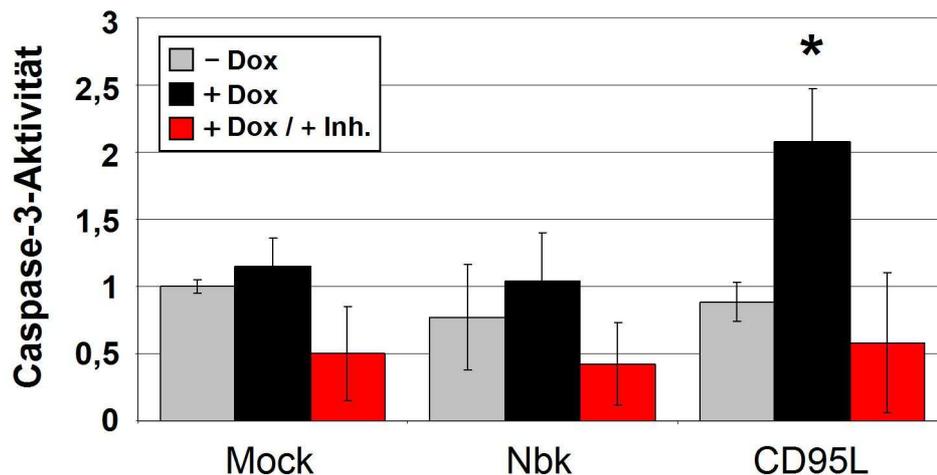
**Abb. 26: Keine Spaltung von Caspase-3 und Caspase-8 nach Nbk-Expression in Melanomzellen** SKM13-Nbk bzw. SKM13-CD95L wurden mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h inkubiert. Von den Proteinlysaten wurden je 50  $\mu$ g Protein in einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proform von Caspase-8 wurde als Doppelbande bei 55 und 57 kDa detektiert. Die Proform von Caspase-3 wurden bei 32 kDa festgestellt. Intermediäre Spaltprodukte (orange dargestellt) zeigten sich für Caspase-8 bei 41 und 43 kDa und für Caspase-3 bei 20 kDa. Die aktiven Spaltprodukte (rot dargestellt) wurden von Caspase-8 bei 18 kDa und von Caspase-3 bei 17 kDa detektiert. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa).

Neben Caspase-3 gibt es zwei weitere Effektor-Caspasen in der apoptotischen Signalkaskade, Caspase-6 und -7. Um zu überprüfen, ob anstelle von Caspase-3 diese Effektor-Caspasen in der Nbk-induzierten Apoptose involviert sind, wurden die Proteinlysate auf Aktivierung von Caspase-6 und -7 sowie auf Spaltprodukte der Initiator-Caspase des mitochondrialen Signalwegs, Caspase-9, untersucht. Aktive Spaltprodukte dieser Caspasen konnten jedoch weder in SKM13-Nbk- noch in SKM13-CD95L-Zellen detektiert werden, sondern nur in der Positivkontrolle (C, Jurkat-Zellen, die mit 1  $\mu$ M Doxorubicin für 24 h behandelt worden waren, Abb. 27).



**Abb. 27: Keine Spaltung der Caspase-6, -7 und -9 nach Induktion von Nbk in Melanomzellen**  
SKM13-Nbk bzw. SKM13-CD95L wurden mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h inkubiert. Von den Proteinlysaten wurden je 50  $\mu$ g Protein im 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Caspasen-Proformen wurden bei 35 kDa (Caspase-6, -7) und 47 kDa (Caspase-9) detektiert. Die katalytisch aktiven Spaltprodukte (rot dargestellt) bei 15 kDa (Caspase-6), 20 kDa (Caspase-7) sowie 35 und 37 kDa (Caspase-9) ließen sich ausschließlich in der Positivkontrolle (C) detektieren (Jurkat-Zellen, behandelt mit 1  $\mu$ M Doxorubicin für 24 h). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa).

Zusätzlich wurde ein enzymatischer Nachweis für die Aktivität der wichtigsten Effektor-Caspase der Apoptosekaskade, Caspase-3, durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Western-Blot-Ergebnissen zeigte sich keine erhöhte Caspase-3-Aktivität 24 h nach Doxycyclininduktion in SKM13-Nbk-Zellen, im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen oder zu SKM13-Mock-Zellen. Im Gegensatz dazu war die Caspase-3-Aktivität in Doxycyclin-behandelten SKM13-CD95L-Zellen signifikant um den Faktor 2,3 gesteigert ( $p < 0.001$ , Abb. 28).



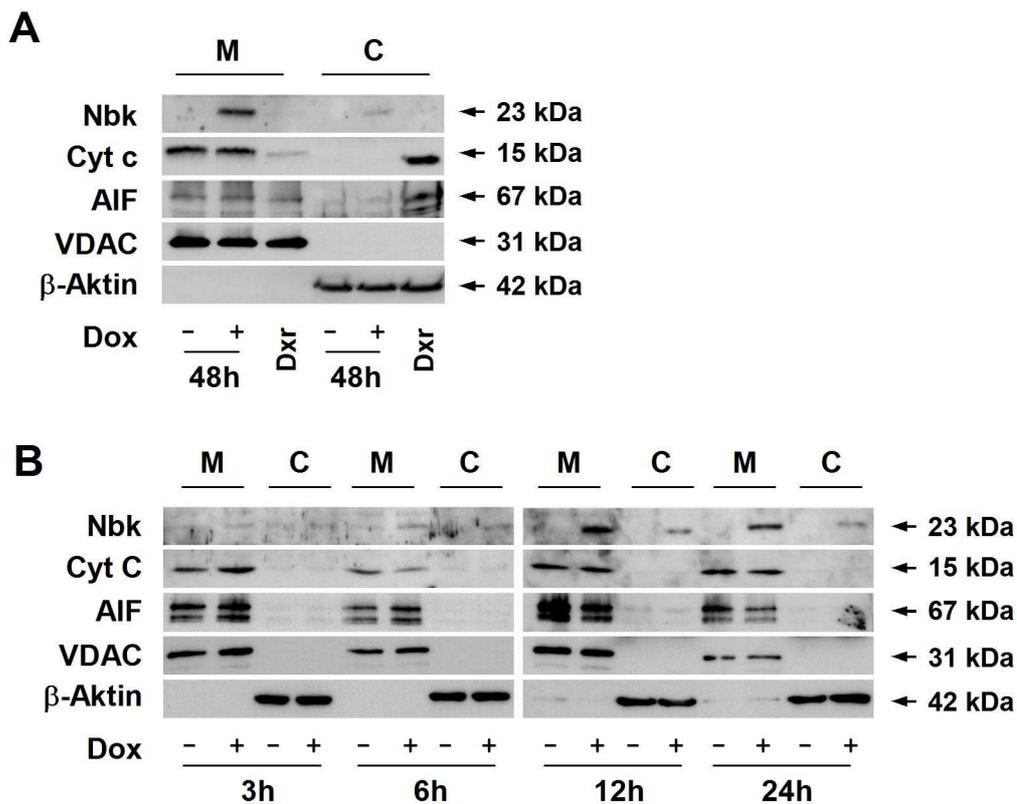
**Abb. 28: Keine Caspase-3-Aktivität nach Nbk-Induktion in Melanomzellen**

Die Enzymaktivität von Caspase-3 wurde in Zellextrakten von SKM13-Nbk, SKM13-CD95L und SKM13-Mock nach 24 h Inkubation mit Doxycyclin (+ Dox) oder ohne (- Dox) analysiert. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden Doxycyclin-behandelte Zellextrakte zusammen mit einem Caspase-3-Inhibitor (+ Dox / + Inh.) inkubiert. Nach Zugabe des Caspase-3-Substrates zu dem jeweiligen Zellextrakt wurden Zeitkinetiken erstellt von denen hier nur der 2 h Wert dargestellt wurde. Basale Aktivität von Caspase-3 in nicht-induzierten Mock-Zellen (- Dox) wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt. Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Doppelwerten wurden angegeben.

**3.3.6. Keine Freisetzung der pro-apoptotischen mitochondrialen Faktoren Cytochrom C und AIF im Verlauf der Nbk-induzierten Apoptose**

Die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien gilt neben der Aktivierung von Caspase-9 als wichtiges Merkmal der Aktivierung des intrinsischen Apoptosesignalweges. Für SKM13-CD95L-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass nach Induktion von CD95L Cytochrom C und AIF (apoptosis inducing factor) ins Zytosol gelangen (Eberle *et al*, 2003). Um die Freisetzung von Cytochrom C und von AIF nach Nbk-Induktion zu untersuchen, wurde die Membran- und Organellfraktion vom zytosolischen Überstand der SKM13-Nbk-Zellen getrennt.

Zunächst wurde die Lokalisation von Nbk untersucht. Doxycyclin-induziertes Nbk-Protein ließ sich hauptsächlich, beginnend 6 h nach Doxycyclin-Gabe, in der Membran- und Organellfraktion detektieren. Anschließend wurden beide Fraktionen auf Cytochrom C und AIF hin untersucht. Zu einer Freisetzung dieser Proteine kam es jedoch zu keinem Zeitpunkt (zwischen 3 und 48 h nach Doxycyclin-Behandlung) nach Nbk-Induktion (Abb. 29 B). Um zu untersuchen ob eine vollständige Blockierung des mitochondrialen Signalwegs vorlag, wurden SKM13-Nbk-Zellen für 24 h mit 1  $\mu$ M Doxorubicin behandelt. In dieser Positivkontrolle zeigte sich jedoch, im Gegensatz zur Nbk-induzierten Apoptose, eine deutliche Freisetzung von Cytochrom C und auch von AIF in das Zytosol (Abb. 29 A).



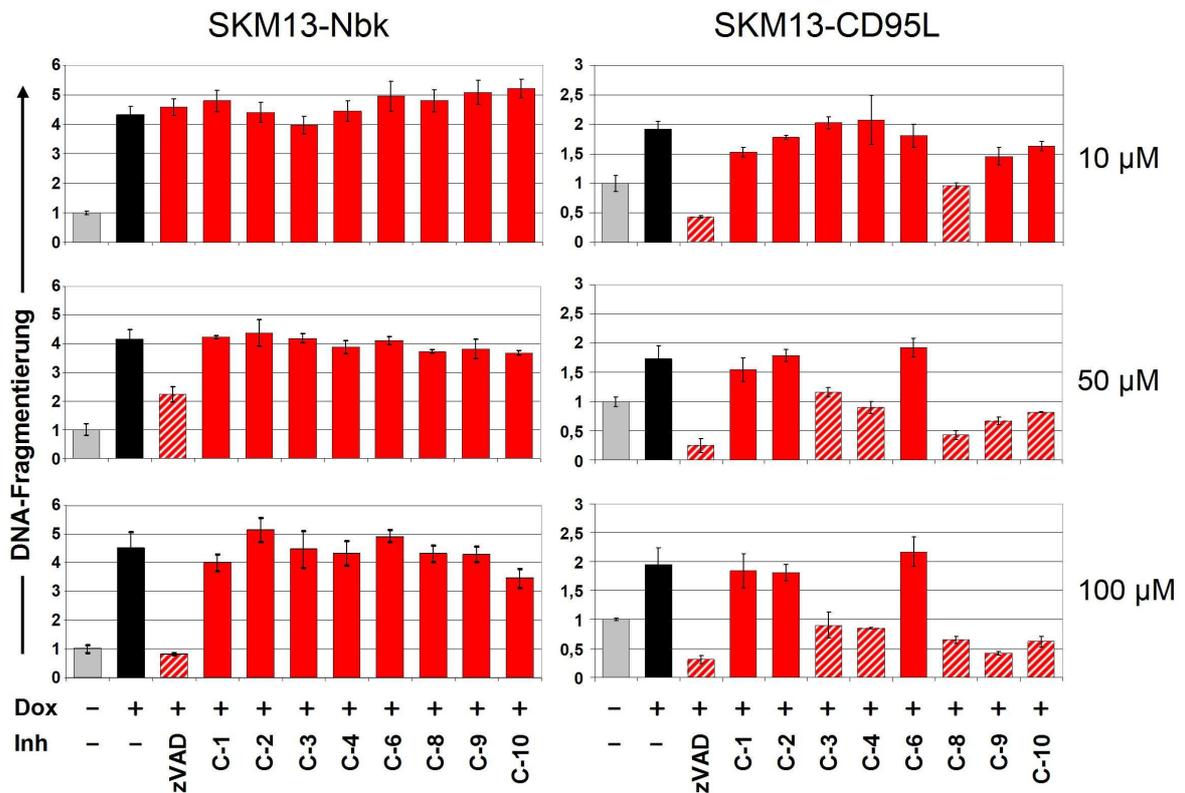
**Abb. 29: Nach Induktion von Nbk erfolgt keine Freisetzung mitochondrialer Faktoren in das Zytosol**

Die Membranfraktion (M), die auch die Zellorganellen enthält, wurde von der zytosolischen Fraktion (C) aus SKM13-Nbk-Zellen mit Hilfe von Zentrifugation isoliert. Die Proteinlysate wurden in einem 15%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. VDAC und β-Aktin dienen als Ladekontrollen für die Membran- bzw. Zytosolfraktionen. (A) Die Zellen wurden für 48 h mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert und Nbk deutlich induziert. Nur bei der Positivkontrolle, SKM13-Nbk-Zellen die für 24 h mit 1 μM Doxorubicin behandelt wurden (Dxr), ließ sich die Freisetzung von Cytochrom C und AIF in das Zytosol feststellen. (B) Auch zu anderen Zeitpunkten wie 3 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Nbk-Induktion kam es zu keiner Freisetzung der pro-apoptischen, mitochondrialen Intermembranproteine. Das Nbk-Protein (23 kDa) ließ sich beginnend 6 h nach Induktion vor allem in der Membranfraktion detektieren.

### 3.3.7. Keine Hemmung der Nbk-induzierten Apoptose durch selektive Caspaseinhibitoren

Um die Rolle der Caspasen in der Nbk-induzierten Apoptosekaskade weiter aufzuklären, wurden selektive Caspaseinhibitoren verwendet. Diese Oligopeptidinhhibitoren wurden in ansteigenden Konzentrationen (10, 50 und 100 μM) zu den Zellen gegeben. SKM13-Nbk-Zellen und als Positivkontrolle SKM13-CD95L-Zellen wurden mit oder ohne Inhibitoren mit Doxycyclin für 48 h induziert. Während die CD95L-induzierte Apoptose signifikant durch die Inhibitoren für Caspase-3 (zDEVD-fmk), -4 (zYVAD-fmk), -8 (zIETD-fmk), -9 (zLEHD-fmk)

und Caspase-10-ähnliche Proteasen (zAEVD-fmk) reduziert wurde (in den Konzentrationen 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M), konnten diese Inhibitoren die Nbk-induzierte Apoptose nicht verringern. Lediglich der Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk, der an ein allgemeines, funktionelles Motiv aller Caspasen bindet, blockierte in 100  $\mu$ M Konzentration vollständig die Nbk-induzierte Apoptose. Bei einer zVAD-fmk Konzentration von 50  $\mu$ M wurde die Apoptose nur um 46% +/- 4% inhibiert. In 10  $\mu$ M Konzentration hatte zVAD-fmk keinen reduzierenden Effekt auf die Nbk-induzierte Apoptose, im Gegensatz zur CD95L-induzierten Apoptose, die bereits vollständig mit 10  $\mu$ M zVAD-fmk blockierbar war (Abb. 30).



**Abb. 30: Keine Blockierung der Nbk-induzierten Apoptose durch selektive Caspaseinhibition**  
SKM13-Nbk- und SKM13-CD95L-Zellen wurden ohne Doxycyclin (grauer Balken), mit Doxycyclin (schwarzer Balken), oder mit Doxycyclin und den entsprechend angegebenen Inhibitoren (rote Balken) für 48 h inkubiert. Die relativen Apoptosewerte (Dreifachwerte) wurden auf die basale Apoptose der unbehandelten Zellen bezogen, die mit dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Eine signifikante Reduzierung der Apoptose (Student's t-test,  $p < 0.05$ ) wurde durch gestreifte Balken dargestellt. Die Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren waren 10  $\mu$ M (obere Reihe), 50  $\mu$ M (mittlere Reihe) und 100  $\mu$ M (untere Reihe). Während der Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk die Aktivität aller Caspasen blockiert, binden und inaktivieren die als C-1 bis C-10 benannten Inhibitoren spezifisch an Caspase-1- bis Caspase-10-ähnliche Proteasen.

### 3.3.8. Die Pancaspaseninhibitoren zVAD-fmk und QVD-OPh hemmen Apoptose nach Nbk-Induktion weniger effektiv als nach CD95L-Induktion

Im vorausgegangenen Experiment war gezeigt worden, dass lediglich ein Caspaseninhibitor mit breiter Wirksamkeit effektiv die Nbk-induzierte Apoptose blockieren konnte. Um die Wirksamkeit von Pancaspaseninhibitoren bei SKM13-Nbk im Vergleich mit SKM13-CD95L genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich zu zVAD-fmk noch ein zweiter Breitbandinhibitor, QVD-OPh, eingesetzt. In Konzentrationsreihen für beide Inhibitoren zeigte sich, dass die Nbk-induzierte Apoptose durch zVAD-fmk sowie durch QVD-OPh prinzipiell blockierbar war. Diese Sensitivität zeigte sich jedoch erst bei deutlich höheren Konzentrationen der Inhibitoren als bei der CD95L-induzierten Apoptose. Für die mit zVAD-fmk behandelten SKM13-Nbk-Zellen zeigte sich erneut, dass die Apoptoseinduktion bei einer zVAD-fmk-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  partiell inhibiert und bei 100  $\mu\text{M}$  vollständig blockiert wurde. Für SKM13-CD95L reichte bereits eine zVAD-fmk-Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ , um die Apoptose zu reduzieren. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wurde die Apoptoseinduktion vollständig blockiert.

Auch für den Pancaspaseninhibitor QVD-OPh zeigten sich vergleichbare Resultate. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  war die Apoptoseinduktion in SKM13-Nbk-Zellen vollständig blockiert. Bei SKM13-CD95L ließ sich jedoch schon bei einer Konzentration von 50 nM eine deutliche Inhibition der Apoptose beobachten. Bei 200 nM QVD-OPh zeigte sich die vollständige Blockierung der Apoptose durch CD95L (Abb. 31).

Die Behandlung der SKM13-Nbk-Zellen mit selektiven Caspaseinhibitoren hatte keine Reduzierung der Apoptoseinduktion gezeigt. Lediglich die Pancaspaseninhibitoren zVAD-fmk und QVD-OPh konnten die Apoptoseinduktion bei SKM13-Nbk blockieren. Da diese Breitbandinhibitoren jedoch nicht nur spezifisch Caspasen inhibieren sondern auch an andere Cysteinproteasen binden können, so z.B. auch Cathepsine (Schotte *et al*, 1999), wurden im nachfolgenden auch Cathepsininhibitoren auf ihre Wirksamkeit in der Nbk-induzierten Apoptose untersucht.



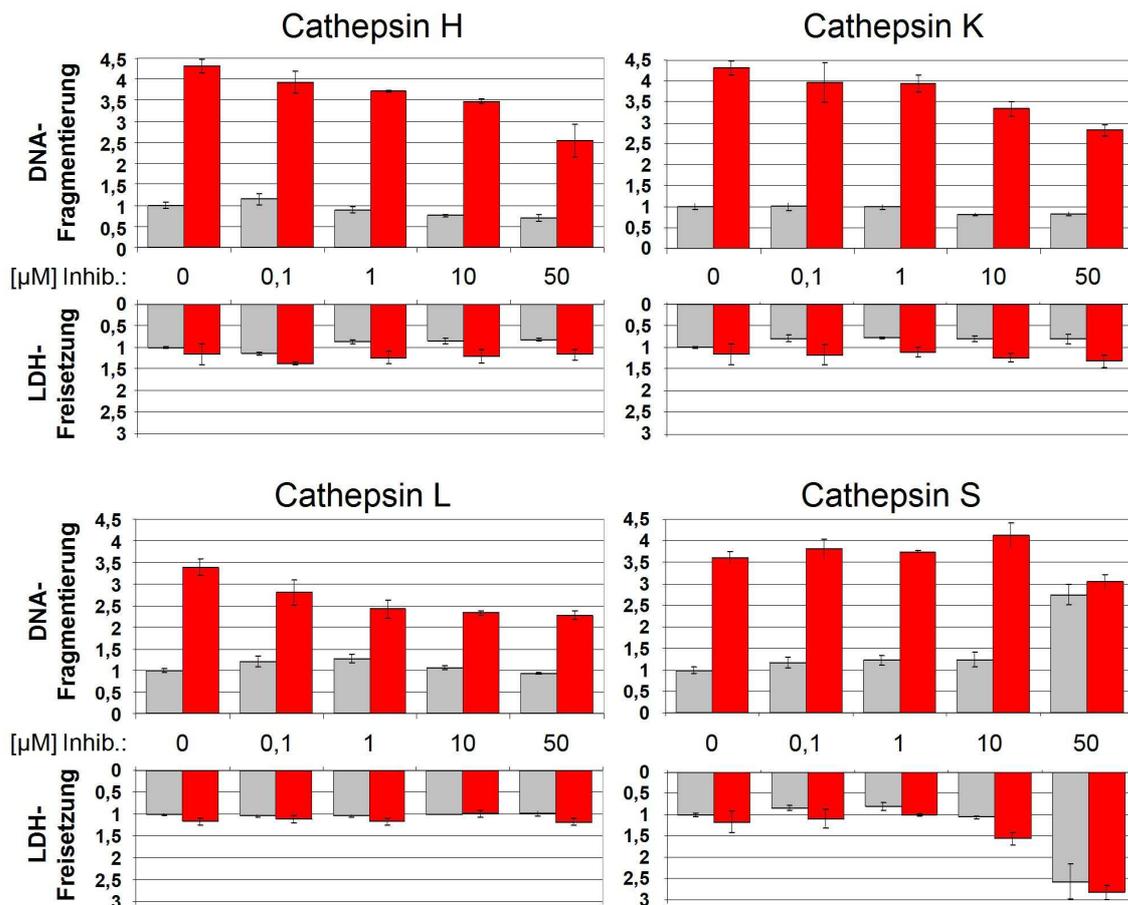
**Abb. 31: Die Pancaspaseninhibitoren zVAD-fmk und QVD-OPh können erst in hohen Konzentrationen die Nbk-induzierten Apoptose hemmen**

SKM13-Nbk-Zellen (obere Reihe) und SKM13-CD95L-Zellen (untere Reihe) wurden mit Doxycyclin (rote Balken) oder ohne (graue Balken) für 48 h inkubiert. Zusätzlich wurden der Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk (linke Seite) oder QVD-OPh (rechte Seite) in den angegebenen Konzentrationen den Zellen zugesetzt. Die relativen Apoptose- bzw. Nekrosewerte (Dreifachwerte) wurden auf den jeweiligen Basalwert (nicht-induziert, unbehandelt) bezogen, der mit dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Eine signifikante Reduzierung der Apoptose (Student's t-test,  $p < 0.05$ ) wurde durch gestreifte Balken dargestellt.

### 3.4. Die Rolle der Cathepsine in der Nbk- und der CD95L-induzierten Apoptose

#### 3.4.1. Selektive Cathepsininhibitoren verringern die Apoptose nach Nbk-Induktion

Cathepsine sind Cysteinproteasen, die eine hohe Ähnlichkeit mit den Caspasen aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen nehmen Cathepsine an der Proteindegradierung in den Lysosomen teil. In den letzten Jahren wurden ihnen jedoch auch zunehmend Caspasen-ähnliche Funktionen in apoptotischen Signalwegen beschrieben (Leist und Jaattela, 2001). Um die Relevanz der Cathepsine im Nbk-induzierten Apoptosesignalweg zu untersuchen, wurden selektive Oligopeptidinhibitoren, gerichtet gegen Cathepsin H, K, L und S eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Inhibition von Cathepsin H, K und L die Apoptose bei SKM13-Nbk reduzierte, ohne dass Nekrose ausgelöst wurde. Im Gegensatz dazu, führte der Cathepsin S-Inhibitor nicht zu einer Reduktion der Apoptose sondern lediglich, in Konzentrationen ab 50  $\mu\text{M}$ , zu einer erhöhten Nekrose der Zellen (Abb. 32).

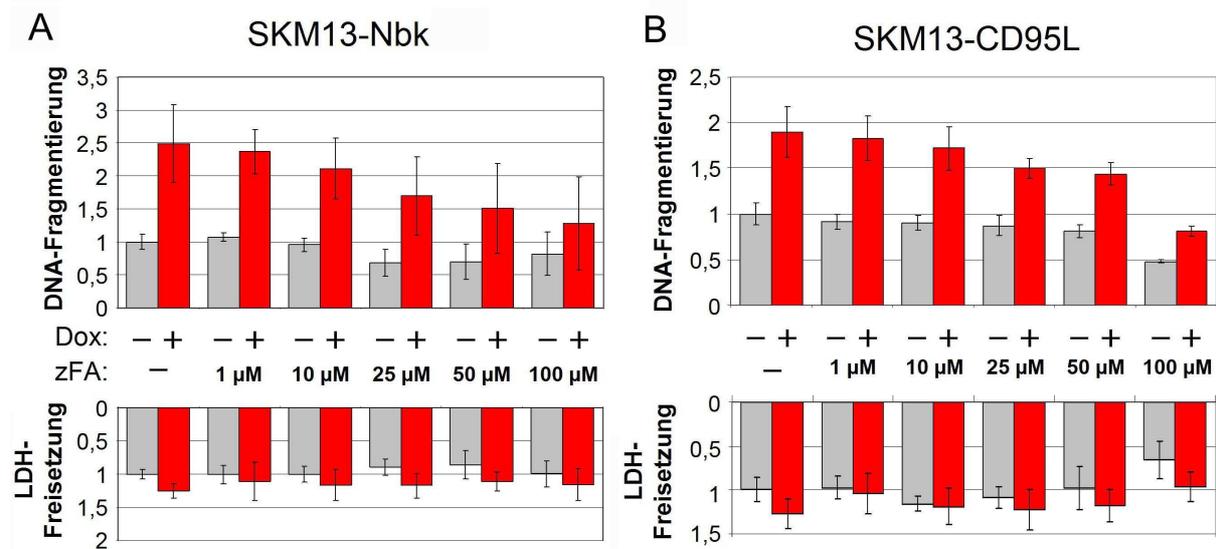


**Abb. 32: Partielle Inhibition der Nbk-induzierten Apoptose durch selektive Cathepsininhibitoren**  
SKM13-Nbk-Zellen wurden ohne Doxycyclin (graue Balken) oder mit (rote Balken) für 48 h inkubiert. Parallel dazu wurden selektive Cathepsininhibitoren gerichtet gegen Cathepsin H, K, L und S zu den jeweiligen Zellen in Konzentration von 0,1 - 50  $\mu\text{M}$  gegeben. Die relativen Apoptose- und Nekrosewerte (Dreifachwerte) wurden auf die nicht-induzierten, unbehandelten Kontrollzellen bezogen, deren Wert mit 1 gleichgesetzt wurde.

### 3.4.2. Der Inhibitor zFA-fmk hemmt die durch Nbk und die durch CD95L induzierte Apoptose durch Blockierung der Aktivität der Cathepsine B und L

Nachdem die Inhibition einzelner Cathepsine nur eine geringe Reduktion der Nbk-induzierten Apoptose bewirkt hatte, sollten nun die Auswirkungen gleichzeitiger Inhibition mehrerer Cathepsine untersucht werden. Deshalb wurde zFA-fmk, ein Inhibitor von Cathepsin B und Cathepsin L, zusammen mit Doxycyclin SKM13-Nbk- und SKM13-CD95L-Zellen appliziert. Mit zunehmender Konzentration inhibierte zFA-fmk die Apoptoseinduktion nach Nbk-Expression. Bereits mit 1  $\mu\text{M}$  zFA-fmk wurde die Apoptose leicht inhibiert, bei 100  $\mu\text{M}$  war sie nahezu auf Kontrollniveau abgesenkt (Abb. 33 A).

Ein ähnlicher Effekt zeigte sich nach CD95L-Induktion. In einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  reduzierte zFA-fmk die Apoptoseinduktion um 50%. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  senkte der Inhibitor die Apoptoseinduktion auf den Kontrollwert der unbehandelten, nicht-induzierten Zellen ab (Abb. 33 B).



**Abb. 33: Der Inhibitor von Cathepsin B und L, zFA-fmk, inhibiert die Apoptose nach Nbk- bzw. CD95L-Induktion**

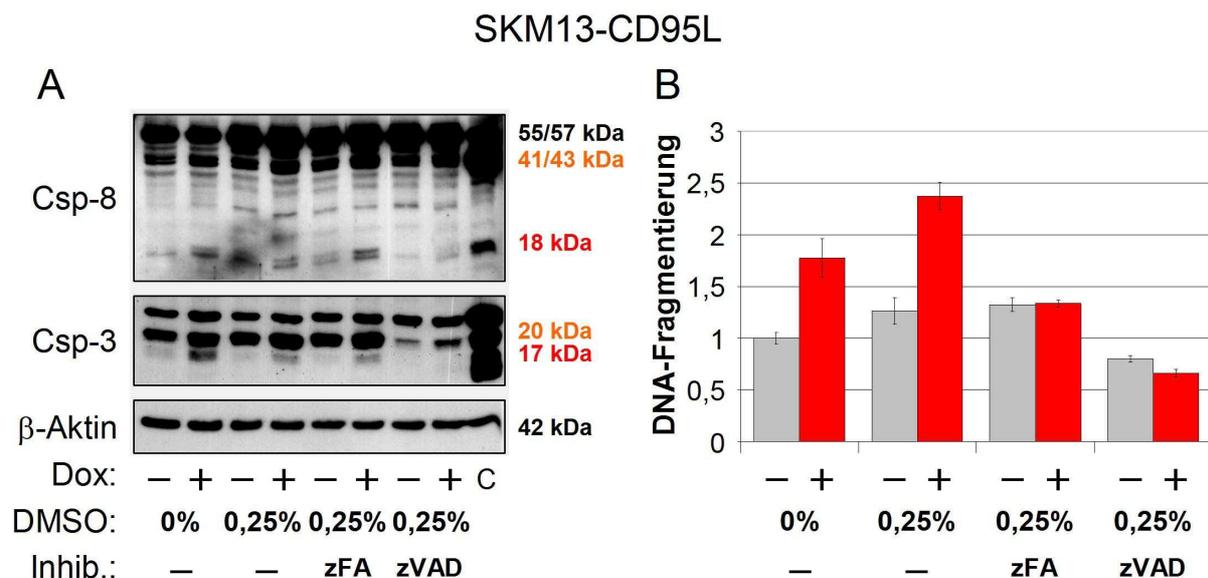
SKM13-Nbk- und SKM13-CD95L-Zellen wurden für 48 h ohne Doxycyclin (graue Balken) oder mit Doxycyclin (rote Balken) inkubiert. Der Inhibitor von Cathepsin B und L, zFA-fmk, wurde den Zellen parallel zur Doxycyclin-Behandlung in Konzentrationen von 1-100  $\mu\text{M}$  appliziert. Die relativen Apoptose- und Nekrosewerte (Dreifachwerte) wurden auf die nicht-induzierten, unbehandelten Kontrollen bezogen, deren Wert mit 1 gleichgesetzt wurde.

### 3.4.3. Der Inhibitor zFA-fmk blockiert die durch CD95L induzierte Apoptose ohne die Spaltung von Caspase-3 und Caspase-8 zu hemmen

Um zu untersuchen, ob zFA-fmk auch unspezifisch an Caspasen bindet, wurden SKM13-CD95L-Zellen nach Behandlung mit zFA-fmk auf Caspasenspaltung im Western-Blot untersucht.

Nach 24 h Doxycyclininduktion und zeitgleicher Behandlung mit zFA-fmk (50  $\mu$ M) wiesen die Zellen aktive Spaltprodukte sowohl von Caspase-3 als auch von Caspase-8 auf. Im Gegensatz dazu zeigten SKM13-CD95L-Zellen, die mit zVAD-fmk (10  $\mu$ M) inkubiert worden waren und als Kontrolle fungierten, keine aktiven Spaltprodukte der Caspasen (Abb. 34 A). In Parallelkulturen die auf Apoptose hin untersucht wurden zeigte sich eine Inhibition der Apoptose durch zFA-fmk trotz bestehender Caspasenaktivität (Abb. 34 B).

Der Inhibitor von Cathepsin B und Cathepsin L, zFA-fmk, verhindert also Apoptose ohne die proteolytische Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8 zu beeinträchtigen.



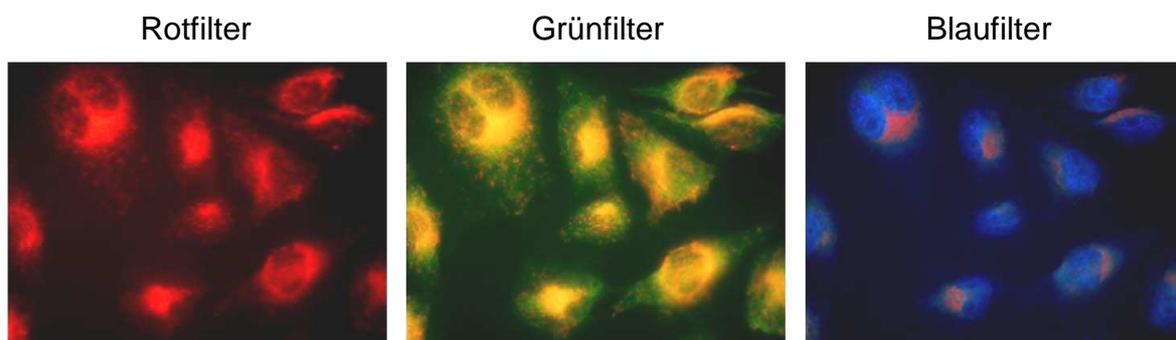
**Abb. 34: Der Inhibitor von Cathepsin B und L, zFA-fmk, blockiert die CD95L-induzierte Apoptose trotz Aktivität von Caspase-8 und Caspase-3**

SKM13-CD95L-Zellen wurden für 24 h mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert. Zusätzlich wurden die angegebenen Zellen mit 0,25% DMSO, 50  $\mu$ M zFA-fmk oder 10  $\mu$ M zVAD-fmk behandelt. (A) Die aktiven Spaltprodukte von Caspase-8 (18 kDa) und Caspase-3 (17 kDa) sind rot markiert. Die intermediären Spaltprodukte von Caspase-8 (41 kDa, 43 kDa) und Caspase-3 (20 kDa) sind orange dargestellt. Die Proform von Caspase-8 wurde als Doppelbande bei 55 kDa und 57 kDa detektiert. Die Proteinlysate (50  $\mu$ g) wurden im 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt, als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (42 kDa). Als Positivkontrolle C wurden Extrakte von Doxorubicin-behandelten (1  $\mu$ M, 24 h) Jurkat-Zellen verwendet. (B) Relative Apoptosewerte (Dreifachwerte) wurden in Parallelkulturen bestimmt. Doxycyclin-unbehandelte Zellen (-) sind mit einem grauen Balken dargestellt, Doxycyclin-behandelte Zellen (+) mit einem roten Balken. Die basalen Apoptosewerte unbehandelter, nicht-induzierter Zellen wurden mit dem Wert 1 gleichgesetzt; die Apoptosewerte der übrigen Zellen wurden auf diese bezogen.

#### 3.4.4. Nbk und CD95L induzieren eine Anhebung des lysosomalen pH-Wertes

Cathepsine werden als inaktive Zymogene synthetisiert, die erst nach ihrem Import in die Lysosomen aktiviert werden. Für eine relevante Funktion im Rahmen der Apoptose müssten die aktiven Cathepsine aus den Organellen ins Zytosol freigesetzt werden. Zur Anfärbung der Lysosomen eignet sich der Farbstoff Acridin-Orange der als pH-Indikator in saurem Milieu rotes Licht emittiert und bei neutralem pH-Wert grün erscheint. Lysosomen weisen unter normalen Bedingungen einen sauren pH-Wert von ca. 5,0 auf. Nach Permeabilisierung der lysosomalen Membran kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes und damit zu einem Farbumschlag von rot auf grün.

Zur Etablierung der Methode wurden zunächst nicht-induzierte SKM13-Nbk-Zellen für 30 min mit Acridin-Orange (5 µg/ml) inkubiert und anschließend mit Bisbenzimid (1 µg/ml) gegengefärbt (Abb. 35).



**Abb. 35: Anfärbung der Lysosomen mit Hilfe von Acridin-Orange**

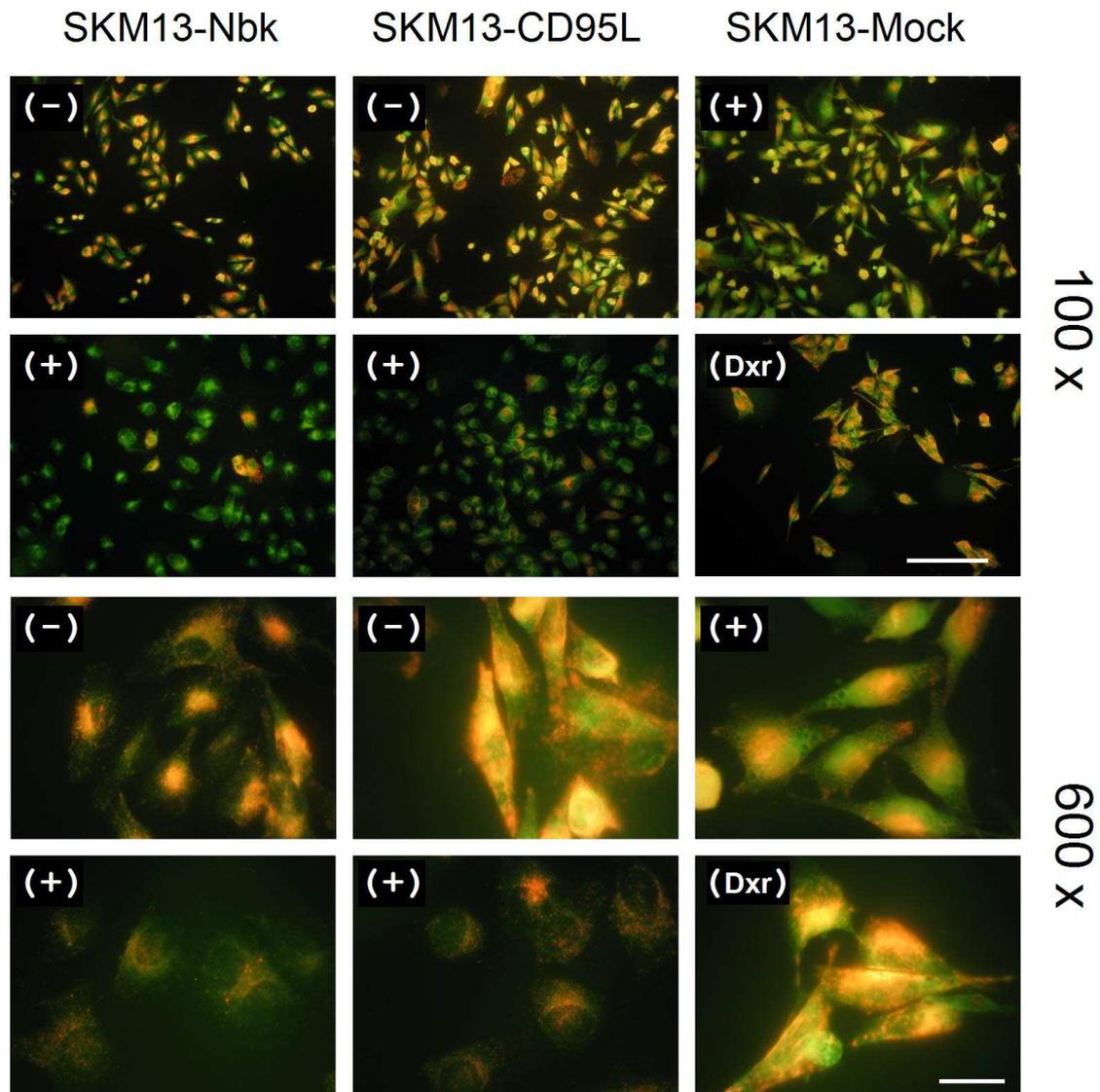
SKM13-Nbk-Zellen wurden für 30 min mit Acridin-Orange und Bisbenzimid inkubiert und die Zellfärbung im Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet. (Rotfilter): In saurem Milieu emittiert Acridin-Orange rotes Licht und markiert damit die Lysosomen. (Grünfilter): Das Zytoplasma mit neutralem pH-Wert wird durch Acridin-Orange grün angefärbt, die Lysosomen erscheinen in diesem Filter gelb-orange. (Blaufilter): Die Bisbenzimid-gefärbten Zellkerne erscheinen blau, die rot-gefärbten Lysosomen sind perinukleär lokalisiert.

Um die Lysosomen in Melanomzellen nach Überexpression von Nbk und CD95L oder nach Doxorubicin-Behandlung zu untersuchen, wurden SKM13-Nbk-, SKM13-CD95L- und SKM13-Mock-Zellen für 48 h mit Doxycyclin behandelt und anschließend für 30 min mit Acridin-Orange (5 µg/ml) inkubiert.

Nach 48 h Doxycyclin-abhängiger Nbk-Induktion waren deutlich weniger Lysosomen in den Zellen angefärbt als in den nicht-induzierten Kulturen. Der pH-Wert in den Lysosomen wurde also durch die Nbk-Überexpression erhöht. Nach CD95L-Induktion zeigte sich ein ähnliches Bild. Der lysosmale pH-Wert änderte sich nach Doxycyclin-Behandlung von sauer nach neutral.

In der Negativkontrolle (Doxycyclin-behandelte SKM13-Mock-Zellen) blieb der lysosomale pH-Wert unverändert. Auch mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelte SKM13-

Mock-Zellen (1  $\mu\text{M}$ , 24 h) zeigten trotz erheblicher Apoptoseinduktion keine Veränderungen an den Lysosomen. Die Acridin-Orange Färbung der Lysosomen blieb konstant, eine Veränderung des lysosomalen pH-Wertes hatte nicht stattgefunden (Abb. 36).



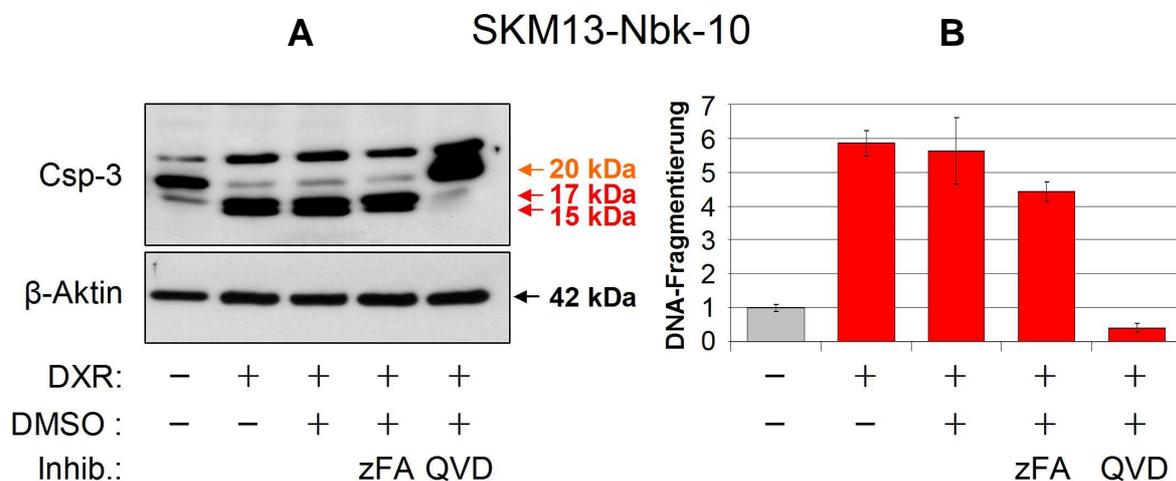
**Abb. 36: Nach Nbk- bzw. CD95L-Expression kommt es zu einer Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes**

SKM13-Nbk-, SKM13-CD95L- und SKM13-Mock-Zellen wurden für 48 h mit Doxycyclin behandelt (+) oder ohne Doxycyclin inkubiert (-). SKM13-Mock-Zellen wurden zusätzlich für 24 h mit 1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin (Dxr) behandelt. Die Zellen wurden mit Acridin-Orange (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 min) inkubiert und im Immunfluoreszenzmikroskop im Grünfilter ausgewertet. Die oberen beiden Reihen zeigen Zellen, die mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Die unteren beiden Reihen zeigen Zellen, die mit 600-facher Vergrößerung photographiert wurden. Der Balken stellt 10  $\mu\text{m}$  dar.

### 3.4.5. Doxorubicin-induzierte Apoptose aktiviert Caspase-3 in SKM13-Nbk-Zellen und ist nur schwach hemmbar durch den Inhibitor zFA-fmk

Das Chemotherapeutikum Doxorubicin inhibiert das Enzym Topoisomerase-II, wodurch DNA-Strangbrüche induziert werden. Auf diese Weise sollte Doxorubicin den klassischen, mitochondrialen Apoptoseweg in Melanomzellen aktivieren. Im vorangegangenen Experiment hatte sich gezeigt, dass Doxorubicin-induzierte Apoptose keine Auswirkungen auf die Lysosomen hatte. Um weiter zu untersuchen, ob Cathepsine in der Apoptose nach Doxorubicin-Behandlung eine relevante Funktion haben, wurden nicht-induzierte SKM13-Nbk-Zellen mit Doxorubicin behandelt. Gleichzeitig wurden die Zellen entweder mit dem Cathepsininhibitor zFA-fmk oder zur Kontrolle mit dem Pancaspaseninhibitor QVD-OPh behandelt.

Nach Doxorubicin-Stimulation wurde Caspase-3 deutlich in die aktiven Spaltprodukte mit 17 kDa und 15 kDa Größe prozessiert und auch Apoptose ausgelöst. Durch QVD-OPh-Behandlung konnte sowohl die Caspasenspaltung als auch die Apoptoseinduktion verhindert werden. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivierung der Caspase-3 durch zFA-fmk nicht inhibiert (Abb. 37 A). Auch die Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Doxorubicin wurde kaum durch zFA-fmk gehemmt (Abb. 37 B).



**Abb. 37: Die Doxorubicin-induzierte Apoptose in Melanomzellen wird nur gering durch den Inhibitor zFA-fmk abgeschwächt**

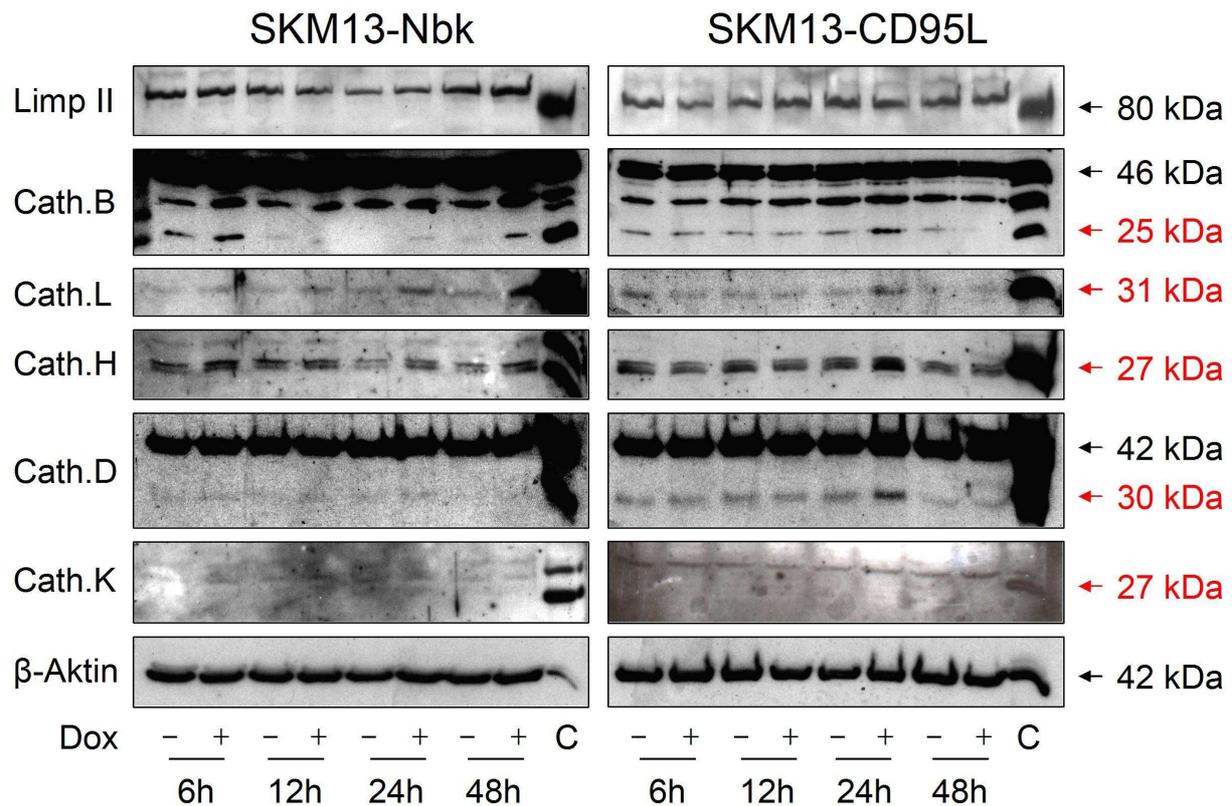
Nicht-induzierte SKM13-Nbk-Zellen wurden für 24 h mit Doxorubicin (1  $\mu$ M) behandelt. Die entsprechend markierten Zellen wurden zusätzlich mit dem gegen Cathepsin B und L gerichteten Inhibitor zFA-fmk (100  $\mu$ M) oder mit dem Pancaspaseninhibitor QVD-OPh (10  $\mu$ M) inkubiert. (A) Proteinlysate (50  $\mu$ g) wurden im 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die aktiven Spaltprodukte der Caspase-3 (17 kDa, 15 kDa) sind rot dargestellt, das intermediäre Spaltprodukt (20 kDa) ist orange markiert. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa). (B) Die relativen Apoptosewerte (Dreifachwerte) wurden in Parallelkulturen bestimmt. Die basale Apoptose der unbehandelten Kontrolle (grauer Balken) wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt und alle anderen Apoptosewerte darauf bezogen.

#### **3.4.6. Die Freisetzung der Cathepsine aus den Lysosomen erfolgt früh nach Nbk-Expression, jedoch erst spät nach CD95L-Induktion**

Mit Hilfe der Acridin-Orange-Färbung ließ sich ein Anstieg des lysosomalen pH-Wertes nach Nbk- und CD95L-Induktion in Melanomzellen detektieren. Um festzustellen, ob es parallel dazu zu einer Permeabilisierung der lysosomalen Membran und zu einer Freisetzung von intralysosomalen Enzymen gekommen war, wurden Lysosomen-freie Zellextrakte von SKM13-Nbk bzw. SKM13-CD95L nach 6 h, 12 h, 24 h und 48 h Doxycyclin-Behandlung hergestellt. Hierfür wurden durch Zentrifugation die Lysosomen und andere Zellorganellen vom Überstand isoliert. Das lysosomale Markerprotein Limp II (lysosomal integral membrane protein II) wurde eingesetzt um den Überstand auf Verunreinigung mit Lysosomen überprüfen zu können.

Es zeigte sich, dass Limp II nur im Organellenpellet (Positivkontrolle), nicht aber im Überstand nachzuweisen war. Bereits 6 h nach Nbk-Induktion wurde aktives Cathepsin B in das Zytosol freigesetzt. Auch die Menge der aktiven Spaltprodukte von Cathepsin L und Cathepsin H nahm leicht nach Nbk-Expression im Zytosol zu. Wohingegen aktives Cathepsin D und Cathepsin K nicht im Zytosol detektiert werden konnten.

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach CD95L-Induktion ein anderes Bild. Erst 24 h nach Gabe von Doxycyclin wurden aktives Cathepsin B, L, H und D im Zytosol nachgewiesen. Das Spaltprodukt von Cathepsin K konnte nicht im Zytosol detektiert werden (Abb. 38).

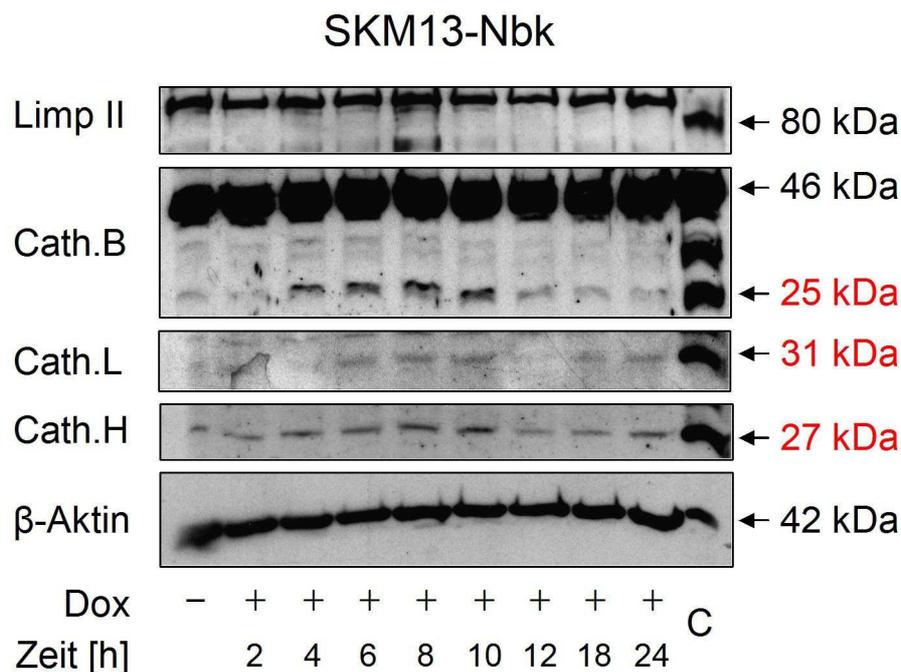


**Abb. 38: Freisetzung von Cathepsinen 6 h nach Nbk- und 24 h nach CD95L-Expression**

SKM13-Nbk- bzw. SKM13-CD95L-Zellen wurden für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert. 20 µg Protein der Lysosomen-freien Überstände wurden im 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde das lysosomale Protein Limp II verwendet (80 kDa). Antikörper, die gegen Cathepsin B, L, H, D und K gerichtet waren, wurden zur Detektion der aktiven Spaltprodukte (rot dargestellt) verwendet. Die Antikörper gegen Cathepsin B und D detektierten zusätzlich die inaktiven Proformen der Enzyme (40 und 42 kDa). Als Positivkontrolle für Cathepsin-Expression (C) diente das Lysosomen-reiche Zellpellet. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet (42 kDa).

Um die Freisetzung der Cathepsine nach Nbk-Überexpression weiter zu untersuchen, wurde eine zweite Zeitreihe von SKM13-Nbk 2-24 h nach Doxycyclin-Behandlung angefertigt. Es zeigte sich, dass Cathepsin B bereits 4 h nach Induktion der Nbk-Expression aus den Lysosomen ins Zytosol gelangte. Nach einem verstärkten Vorkommen der aktiven Form von Cathepsin B bereits 4-10 h nach Nbk-Induktion, zeigte sich zu späteren Zeitpunkten (12-24 h) die erneute Abnahme des Spaltproduktes im Zytosol (Abb. 39).

Unmittelbar nach Induktion der Nbk-Überexpression werden die Lysosomen permeabilisiert und lysosomale Cathepsine, vor allem Cathepsin B, ins Zytosol freigesetzt.



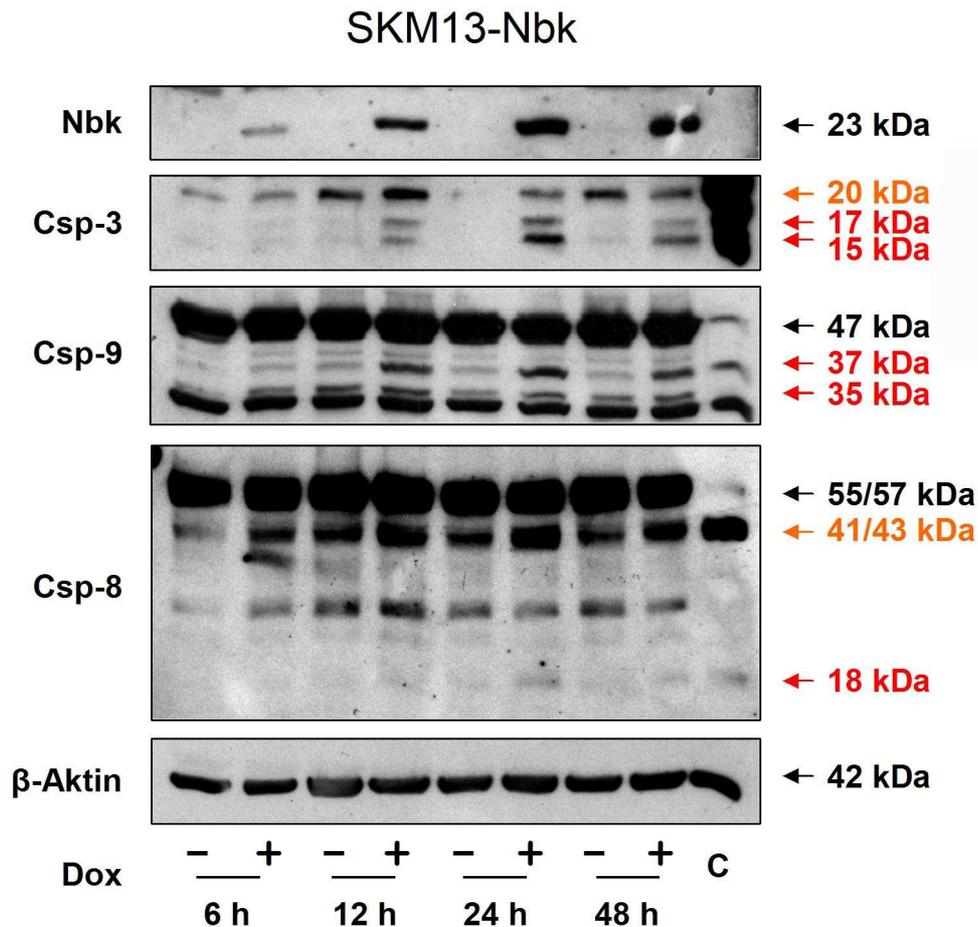
**Abb. 39: Die Nbk-Expression induziert eine frühe Freisetzung von Cathepsinen**

SKM13-Nbk-Zellen wurden nach 2-24 h Doxycyclininduktion (+) oder ohne Doxycyclin-Behandlung (-) geerntet. Lysosomen-freie Überstände wurden mit Hilfe von Zentrifugation hergestellt. 20  $\mu$ g Protein aus den Überständen wurden im 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Überstände wurden auf Anwesenheit der aktiven Spaltprodukte von Cathepsin B, L und H (rot dargestellt) sowie der Proform von Cathepsin B (46 kDa) untersucht. Als Lysosomen-Marker wurde Limp II (80 kDa), als Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa). Als Positivkontrolle (C) diente das Lysosomen-reiche Zellpellet.

**3.4.7. Die Verstärkung der Nbk-Expression mit Hilfe von DMSO führt schließlich auch zur Spaltung von Caspasen**

Die DMSO-Behandlung stabiler Tet-On-Klone hatte zu einer massiven Verstärkung der Doxycyclin-abhängigen Proteinexpression und der daraus resultierenden Apoptoseinduktion geführt (siehe Kapitel 3.2.). Um den Einfluss dieser DMSO-verstärkten Nbk-Überexpression auf die proteolytische Aktivierung der Caspasen zu untersuchen, wurden SKM13-Nbk-Zellen mit 0,5% DMSO behandelt und parallel dazu für 6-48 h mit Doxycyclin inkubiert. Proteinlysate wurden gesammelt und auf Caspasenspaltung im Western-Blot analysiert.

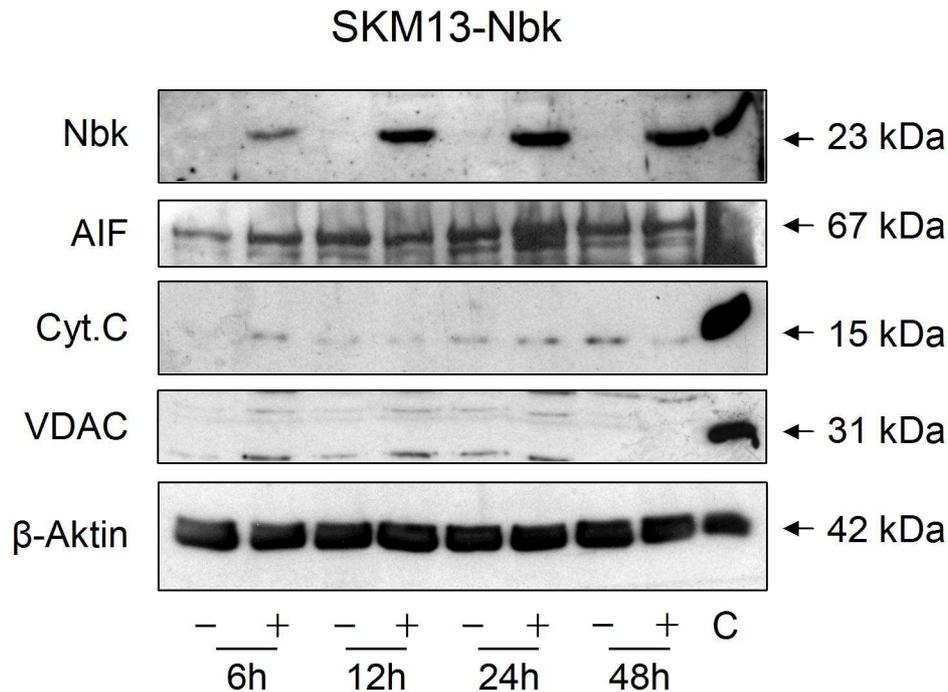
Beginnend 12 h nach Doxycyclin-Gabe zeigten sich nun nach massiver Überexpression von Nbk deutliche Spaltprodukte von Caspase-3 (17/15 kDa) und Caspase-9 (35/37 kDa). Auch Caspase-8 war schwach ab 24 h nach Doxycyclin-Behandlung zu ihrem aktiven Spaltprodukt bei 18 kDa prozessiert (Abb. 40).



**Abb. 40: Nach Verstärkung der Nbk-Expression durch DMSO werden Caspasen aktiviert**  
 SKM13-Nbk-Zellen wurden mit 0,5% DMSO inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h behandelt. Von den Proteinlysaten wurden je 100 µg Protein im 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die katalytisch aktiven Spaltprodukte (rot dargestellt) von Caspase-3 wurden bei 17 und 15 kDa, von Caspase-9 bei 37 und 35 kDa und von Caspase-8 bei 18 kDa detektiert. Intermediäre Spaltprodukte (orange dargestellt) wurden von Caspase-3 bei 20 kDa und von Caspase-8 bei 41 und 43 kDa detektiert. Die Proformen der Caspase-9 (47 kDa) und Caspase-8 (55/57 kDa) wurden ebenfalls detektiert. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet (42 kDa). Als Positivkontrolle für Caspasenaktivität wurden Extrakte von Doxorubicin-behandelten (1µM, 24 h) Jurkat-Zellen verwendet (C).

Um festzustellen, ob ebenfalls Cytochrom C und AIF nach DMSO-verstärkter Nbk-Expression ins Zytosol gelangten, wurden Mitochondrien-freie Zellüberstände 6-48 h nach Doxycyclin-Behandlung unter DMSO-Anwesenheit hergestellt. Es zeigte sich aber, dass auch nach DMSO-verstärkter Nbk-Expression weder Cytochrom C noch AIF signifikant aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt wurden (Abb. 41).

Obwohl keine der untersuchten pro-apoptotischen, mitochondrialen Faktoren im Zytosol vorlagen, wurde Caspase-9 prozessiert und aktiviert. Eine mögliche Erklärung für diese Caspasenspaltung nach DMSO-verstärkter Nbk-Expression könnte in der Cathepsinfreisetzung begründet liegen. Cathepsine können Caspasen unabhängig von Cytochrom C prozessieren und damit aktivieren (Vancompernelle *et al*, 1998).

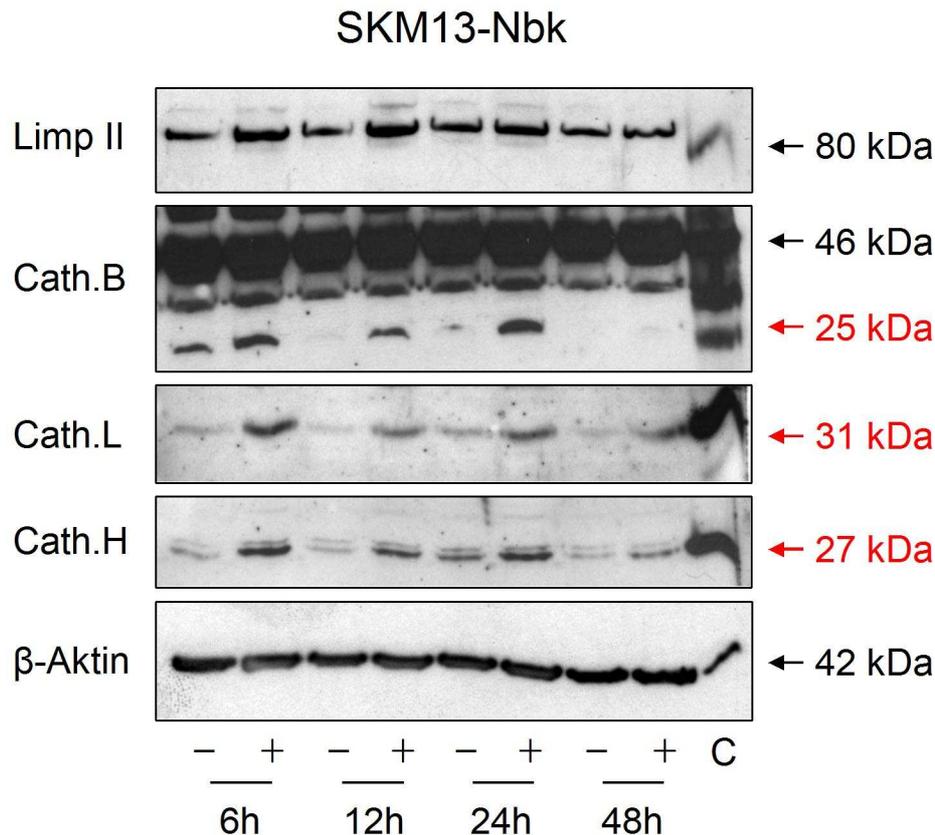


**Abb. 41: Auch nach DMSO-verstärkter Nbk-Expression wird kein Cytochrom C freigesetzt**  
 SKM13-Nbk-Zellen wurden für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h mit 0,5% DMSO und zusätzlich mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert. Mitochondrien-freie Überstände wurden durch Zentrifugation hergestellt und 20 µg Protein in einem 12%-igen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Die Überstände wurden auf Cytochrom C und AIF (15 kDa / 67 kDa) untersucht. Als mitochondrialer Marker wurde VDAC (31 kDa), als Protein-Ladekontrolle β-Aktin verwendet (42 kDa). Das Mitochondrien-reiche Pellet diente als Positivkontrolle (C).

#### 3.4.8. Die DMSO-verstärkte Nbk-Expression führt zur Verstärkung der Cathepsinfreisetzung

Durch DMSO-Verstärkung der Nbk-Überexpression kam es zur Prozessierung von Caspasen bei SKM13-Nbk, beginnend 12 h nach Doxycyclin-Behandlung. Um die Auswirkungen der DMSO-verstärkten Nbk-Überexpression auf die Cathepsinfreisetzung zu untersuchen wurden SKM13-Nbk-Zellen parallel zur Doxycyclininduktion mit 0,5% DMSO inkubiert. Lysosomen-freie Überstände wurden mit Hilfe von Zentrifugation hergestellt.

Tatsächlich zeigte sich eine deutlich verstärkte Cathepsinfreisetzung. Beginnend 6h nach Nbk-Expression wurden Cathepsin B, L und H ins Zytosol freigesetzt (Abb. 42). Diese Freisetzung der Cathepsine erfolgt also nachweislich vor der Spaltung der Caspasen und legt eine Cathepsin-induzierte Prozessierung der Caspasen nahe.



**Abb. 42: Die DMSO-Verstärkung der Nbk-Expression erhöht die Cathepsinfreisetzung aus den Lysosomen**

SKM13-Nbk-Zellen wurden für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h mit DMSO und parallel dazu mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert. Lysosomen-freie Überstände der Proteinlysate wurden mit Hilfe von Zentrifugation hergestellt. Als Kontrolle für die Reinheit des Überstands wurde das Lysosomen-Protein Limp II verwendet (80 kDa). Antikörper, die gegen Cathepsin B, L und H gerichtet waren, wurden zur Detektion der aktiven Spaltprodukte (rot dargestellt) verwendet. Der Cathepsin B-Antikörper detektierte zusätzlich die inaktive Proform des Enzyms bei 46 kDa. Als Positivkontrolle für Cathepsin-Expression diente das Lysosomen-reiche Zellpellet (C). 15 µg Protein wurden in einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet (42 kDa).

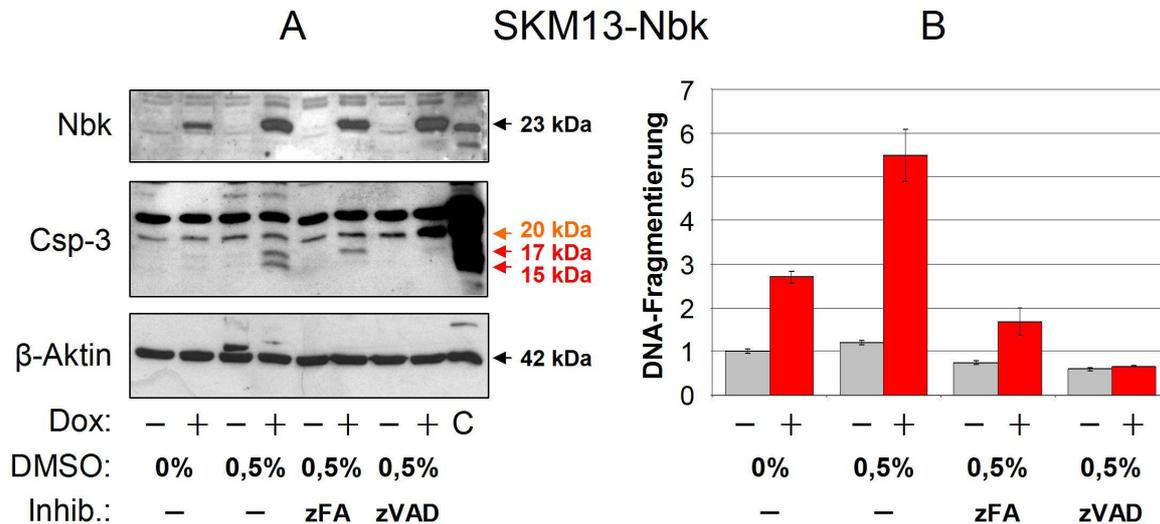
### 3.4.9. Der Inhibitor zFA-fmk hemmt die Nbk-induzierte Apoptose und verändert das Spaltprodukt von Caspase-3 nach DMSO-Verstärkung

Zur Klärung der Interaktionen zwischen den Cathepsinen und den Caspasen im Apoptosesignalweg nach Nbk-induktion wurden SKM13-Nbk-Zellen für 24 h mit 0,5% DMSO und zusätzlich mit 100 µM zFA-fmk bzw. 100 µM zVAD-fmk inkubiert.

Durch die DMSO-induzierte Verstärkung der Nbk-Überexpression erfolgte die Spaltung von Caspase-3 in die aktiven Spaltprodukte 17 kDa und 15 kDa. Durch die zFA-fmk-Behandlung wurde die Spaltung der Caspase-3-Proform in das aktive 17 kDa große Spaltprodukt nicht verhindert, aber die weitere Aufspaltung zum 15 kDa großen Protein war blockiert.

Nach Behandlung mit zVAD-fmk wird die Prozessierung von Caspase-3 vollständig inhibiert (Abb. 43 A).

In Parallelkulturen die auf Apoptose hin untersucht wurden zeigte sich erneut, dass durch die Behandlung sowohl mit zFA-fmk als auch mit zVAD-fmk die Apoptoseinduktion durch Nbk stark reduziert war (Abb. 43 B).



**Abb. 43: Der Inhibitor zFA-fmk hemmt die Apoptoseinduktion und verändert das Spaltprodukt der Caspase-3 nach DMSO-verstärkter Nbk-Expression**

SKM13-Nbk-Zellen wurden für 24 h mit Doxycyclin (+) oder ohne (-) inkubiert. Zusätzlich wurden die angegebenen Zellen mit 0,5% DMSO, 100  $\mu$ M zFA-fmk oder 100  $\mu$ M zVAD-fmk behandelt. (A) Die aktiven Spaltprodukte der Caspase-3 sind bei 15 und 17 kDa zu erkennen (rot), das intermediäre Spaltprodukt bei 20 kDa (orange). Die Proteinlysate (100  $\mu$ g) wurden im 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt, als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (42 kDa). Als Positivkontrolle wurden Extrakte von Doxorubicin-behandelten (1  $\mu$ M, 24 h) Jurkat-Zellen verwendet (C). (B) Relative Apoptosewerte (Dreifachwerte) wurden in Parallelkulturen bestimmt. Doxycyclin-unbehandelte Zellen (-) sind mit einem grauen Balken dargestellt, Doxycyclin-behandelte Zellen (+) mit einem roten Balken. Die basalen Apoptosewerte unbehauelter, nicht-induzierter Zellen wurden mit dem Wert 1 gleichgesetzt und die Apoptosewerte der übrigen Zellen auf diese bezogen.

Diese Ergebnisse belegen die Relevanz der Cathepsine sowohl in der Nbk- als auch der CD95L-induzierten Apoptosekaskade in Melanomzellen.

Mit Beginn der Nbk-Expression (4-10 h nach Induktion) wurden sofort Cathepsin B, L und H in das Zytosol freigesetzt. Bei sehr starker Nbk-Überexpression (DMSO-Verstärkung) wurden 12 h nach Induktion Caspase-3 und -9 prozessiert. Eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien erfolgte nicht.

In der Apoptose nach CD95L-Expression, die Caspasen-abhängig verläuft, wurden Cathepsin B, L, H und D relativ spät (24 h nach Induktion) ins Zytosol freigesetzt. Die Prozessierung von Caspase-3 und Caspase-8 erfolgte bereits zu einem früheren Zeitpunkt (12 h nach Doxycyclin-Gabe).