

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie  
des Universitätsklinikums Benjamin Franklin  
der Freien Universität Berlin  
Leiter: Prof. Dr. Prof. h.c. C.E. Orfanos  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. C.C. Geilen, Dr. J. Eberle

**Die Bedeutung von Bcl-2-Proteinen für die Regulation der  
Apoptose beim malignen Melanom**

**Inauguraldissertation**  
zur Erlangung  
der Doktorwürde der Naturwissenschaften  
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Amir Masoud Hossini**  
aus  
**Teheran / Iran**

Berlin 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 07.11.2003

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	Das maligne Melanom	1
1.2.	Apoptose, der programmierte Zelltod	2
1.3.	Mechanismen der Apoptose	2
1.4.	Die Kontrolle der Apoptose durch Todesrezeptoren	4
1.5.	Caspasen und ihre Rolle bei der Kontrolle der Apoptose	5
1.6.	AIF und der Caspasen-unabhängige Apoptoseweg	8
1.7.	Die Bcl-2-Genfamilie	9
1.7.1.	Bcl-2 als Onkogen	12
1.7.2.	Die Rolle der Bcl-2-Familie bei der mitochondrial vermittelten Apoptose	12
1.8.	Apoptoseregulation durch Bcl-X	14
1.9.	Fragestellung	16
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>17</b>
2.1.1.	Eukaryotische Zellen und Nährlösungen	17
2.1.2.	Enzyme	18
2.1.3.	Antibiotika	19
2.1.4.	Nährmedium für Bakterien	19
2.1.5.	Vektoren und Plasmide	19
2.1.6.	Primer	20
2.1.7.	Längen-Marker	21
2.1.8.	Kits	21
2.1.9.	Material zur Proteinanalytik	22
2.1.10.	Antikörper	22
2.1.11.	Apoptose-Stimulanzien	23
2.1.12.	Lösungen	23

2.1.13.	Chemikalien und Radiochemikalien	24
2.1.14.	Sonstige Materialien	25
2.1.15.	Geräte	26
<b>2.2.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>28</b>
2.2.1.	Allgemeine Methoden	28
2.2.1.1.	Sterilisierung von Lösungen und Nährmedien	28
2.2.1.2.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	28
2.2.1.3.	Ethanol-Fällung von DNA	28
2.2.1.4.	Agarosegel-Elektrophorese	29
2.2.1.5.	Autoradiographie	29
2.2.2.	DNA-Techniken	29
2.2.2.1.	Klonierungstechniken	29
2.2.2.2.	Tet-On <sup>TM</sup> -Genexpressionssystem	31
2.2.2.3.	Restriktion	32
2.2.2.4.	Dephosphorylierung	33
2.2.2.5.	Ligation	33
2.2.2.6.	Transformation kompetenter Bakterien-Zellen	34
2.2.2.7.	β-Galaktosidase-Test	35
2.2.2.8.	Plasmid-Minipräparation	36
2.2.2.9.	Plasmid-Midipräparation	36
2.2.2.10.	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	37
2.2.2.11.	Sequenzierung der DNA	38
2.2.3.	RNA-Techniken	39
2.2.3.1.	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	39
2.2.3.2.	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	40
2.2.3.3.	Northern Blot	42
2.2.4.	Techniken zur Proteinanalytik	47
2.2.4.1.	Herstellung von Zelllysaten	47
2.2.4.2.	Harnstoff-Puffer zum Nachweis von PARP	48

2.2.4.3.	CHAPS-Puffer zum Nachweis von Caspasen	48
2.2.4.4.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.2.4.5.	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli	49
2.2.4.6.	Western Blot	51
2.2.5.	Zellbiologische Methoden	53
2.2.5.1.	Allgemeine Methoden der Zellkultur	53
2.2.5.2.	Transfektion eukaryotischer Zellen	53
2.2.5.3.	APAAP-Färbung	55
2.2.5.4.	Quantifizierung der Apoptose (DNA-Fragmentierung)	57
2.2.5.5.	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	59
2.2.5.6.	Zytotoxizitätstest	59
2.2.5.7.	Tierexperimente	61
2.2.6.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	61
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>62</b>
3.1.	Expressionsanalyse von Mitgliedern der Bcl-2-Familie in Melanom-Zellen und Melanozyten-Kulturen	62
3.1.1.	Expression von Bcl-2 in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen	62
3.1.2.	Unterschiedlich hohe Bax- und Bcl-2-Expression in Melanom-Zelllinien	63
3.1.3.	Bax/Bcl-2-Expressionsrate in CH-11-sensitiven und nicht sensitiven Melanom-Zellen	64
3.1.4.	Analyse der Bcl-X <sub>L</sub> - und Bcl-X <sub>S</sub> -Expression in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen	66
3.2.	Analyse der Expression der bcl-X <sub>L</sub> - und bcl-X <sub>S</sub> -Gene auf mRNA-Ebene in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen	66
3.2.1.	Detektion von Bcl-X <sub>L</sub> und Bcl-X <sub>S</sub> im Northern Blot	66
3.2.2.	Detektion von bcl-X <sub>L</sub> - und bcl-X <sub>S</sub> -mRNA mittels RT-PCR	67
3.3.	Überexpression von Bcl-2 in stabil transfizierten Melanom-Zelllinien	68
3.3.1.	Einfluss der Überexpression von Bcl-2 auf die Fas-vermittelte Apoptose in	

	Melanom-Zelllinien	69
3.4.	Klonierung von bcl-X <sub>L</sub> - und bcl-X <sub>S</sub> -Konstrukten	70
3.4.1.	TOPO-TA-Klonierung von bcl-X <sub>L</sub> und bcl-X <sub>S</sub>	70
3.4.2.	Subklonierung von bcl-X <sub>L</sub> und bcl-X <sub>S</sub> in das Plasmid pTRE	72
3.4.3.	Überprüfung der Orientierung der bcl-X <sub>L</sub> - und bcl-X <sub>S</sub> -Konstrukte mittels Restriktionsanalyse	73
3.4.4.	Transiente Transfektion von Bcl-X <sub>S</sub> und Bcl-X <sub>L</sub> in Melanom-Zelllinien	74
3.4.5.	Stabile Transfektion der Melanom-Zelllinie SKM13-Tet-On mit bcl-X <sub>L</sub> und bcl-X <sub>S</sub>	76
3.4.6.	Screening der transfizierten SKM13-Zellklone mittels Northern-Blot	77
3.5.	Proteinexpression von Bcl-X <sub>L</sub> und Bcl-X <sub>S</sub> in SKM13-Klonen	77
3.6.	Einfluss der Überexpression von Bcl-X <sub>S</sub> und Bcl-X <sub>L</sub> auf die basale Apoptoserate	78
3.7.	Apoptose-Kinetik der stabil mit Bcl-X <sub>S</sub> transfizierten Zellen nach Doxycyclin-Induktion	80
3.8.	Inhibition von Fas-vermittelter Apoptose durch Bcl-X <sub>L</sub> -Überexpression	81
3.9.	Der Mechanismus der Bcl-X <sub>S</sub> -vermittelten Apoptose	82
3.9.1.	Lokalisierung des Bcl-X <sub>S</sub> Proteins	82
3.9.2.	Geringe Aktivierung der Caspase-8 nach Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression	83
3.9.3.	Verminderung der Cytochrom C-Menge in den Mitochondrien nach Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression	84
3.9.4.	Freisetzung von AIF nach Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression	85
3.9.5.	Nur geringe Aktivierung von Procaspase-3 nach Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression	85
3.9.6.	Keine Aktivierung von Caspase-6 und Caspase-7 durch Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression	87
3.10.	Identifizierung eines neuen Bcl-2-Familienmitglieds	88
3.11.	Untersuchung zur möglichen therapeutischen Verwendung von Bcl-X <sub>S</sub>	90
3.11.1.	Kombination der Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression mit weiteren Apoptose-Stimuli in	

	Melanom-Zellen	90
3.11.2.	Reduzierte Tumorigenität von Melanom-Zellen nach Bcl-X <sub>S</sub> -Induktion <i>in vivo</i>	92
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	94
4.1.	Hohe Bcl-2- und Bcl-X <sub>L</sub> -Expression in Melanom-Zelllinien	94
4.1.1.	Bcl-2 wirkt als negativer Apoptoseregulator in Melanom-Zellen	95
4.1.2.	Suppression der Apoptose durch Bcl-X <sub>L</sub> in Melanom-Zellen	96
4.1.3.	Bcl-X <sub>S</sub> wirkt als positiver Apoptoseregulator in Melanom-Zellen	97
4.2.	Mechanismen der Bcl-X <sub>S</sub> -vermittelten Apoptose	98
4.2.1.	Exogen exprimiertes Bcl-X <sub>S</sub> ist vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert	99
4.2.2.	Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression führt zu Verlust von mitochondrialem Cytochrom C	100
4.2.3.	Die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 nach Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression ist transient	100
4.2.4.	Bcl-X <sub>S</sub> -Überexpression stimuliert AIF-vermittelte Apoptose	101
4.3.	Bcl-X <sub>S</sub> wirkt additiv, Bcl-X <sub>L</sub> inhibitorisch in Kombination mit weiteren Apoptose-Stimuli	102
4.3.1.	Bcl-X <sub>S</sub> hemmt das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	103
4.4.	Identifizierung einer neuen Spleissvariante von bcl-X	103
4.5.	Weiterführende Fragestellungen	104
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	106
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	107
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	108

<b>8.</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	120
8.1.	Originalarbeiten	120
8.2.	Kurzveröffentlichungen	120
8.3.	Manuskripte	121
<b>9.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	122
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	125
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	126
<b>12.</b>	<b>Erklärungen</b>	127