
1. EINLEITUNG

1.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein invasiver, maligner Tumor, der vorwiegend an der Haut lokalisiert ist und von kutanen Melanozyten bzw. von Naevuszellen ausgeht. Bei einer in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegenen Melanom-Inzidenz von derzeit 10-45 Fällen im Jahr pro 100.000 Einwohner und einer hohen Mortalität bereits in den frühen Phasen des Primärtumors ist die Entwicklung neuer Therapieansätze, z.B. durch Regulation der Apoptose, dem „programmierten Zelltod“, eine dringende Herausforderung, zumal das maligne Melanom auf chemotherapeutische Kombinationsschemata nur in bescheidenem Maße anspricht (Orfanos und Garbe, 2001).

Bei maligner Transformation, Tumorprogression und Metastasierung konnten in den letzten Jahren Veränderungen im Ablauf Apoptose-regulierender Signalkaskaden gefunden werden. Diese Veränderungen können nicht nur zu einem ungebremsten Wachstum von malignen Zellpopulationen führen, sondern auch die körpereigenen, physiologischen Abwehrreaktionen gegen den Tumor hemmen. Darüber hinaus induziert die Mehrzahl der gängigen Chemotherapeutika sowie die Strahlentherapie zelleigene Apoptosekaskaden, wodurch die Vernichtung der Krebszellen eingeleitet werden kann. Beim Vorliegen einer Chemotherapieresistenz findet sich häufig eine Apoptosedefizienz (Johnstone et al., 2002). Die Aufklärung und Kenntnis pro- und antiapoptotischer Signalkaskaden stellt somit eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien dar. Ihre Kenntnis erscheint auch nötig, um Resistenzentwicklungen gegen Chemotherapeutika zu umgehen. Andererseits sind pro- und antiapoptotische Signalkaskaden potentielle und vielversprechende Ziele gentherapeutischer Ansätze.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass in Melanozyten und Melanomzellen eine Vielzahl von molekularen Elementen pro- und antiapoptotischer Signalkaskaden exprimiert werden, und dass Melanomzellen prinzipiell auch für Apoptosesignale zugänglich sind (Sheridan et al., 1981; Pisha et al., 1995; Hahne et al., 1996; Hussein et al., 2003). Es ist daher von großem Vorteil, diese Signalwege zu charakterisieren und zu verstehen, um Resistenzentwicklungen gegen Chemotherapeutika zu umgehen. Der Einsatz von proapoptotischen Genen in einer Kombination mit Chemotherapeutika stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, der zu einem Durchbruch in der Melanomtherapie verhelfen könnte.

1.2. Apoptose, der programmierte Zelltod

Apoptose, der programmierte Zelltod, bedeutet griechisch: „das Fallen der Blätter im Wind“ und stellt als kontrollierter Zerfall der Zellen die letzte Phase ihrer Entwicklung dar (Kerr et al., 1972; Hale et al., 1996). Täglich sterben Millionen Zellen in unserem Körper. Dieser Prozess ist nicht das Resultat einer krankhaften Entartung, sondern dient dem Wohl und der Aufrechterhaltung des gesamten Organismus. In einem gesunden Organismus ist eine Balance zwischen Proliferation von Zellen und dem Apoptose-Prozess unentbehrlich, wobei sich bei einer Störung dieses fein regulierten Systems katastrophale Folgen für den Gesamtorganismus ergeben können. So spielt eine Fehlregulation zu Gunsten verstärkter Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson) und HIV eine Rolle (Engidawork et al., 2001; Gougeon 1997). Im Gegensatz dazu kann verstärkte Apoptoseresistenz bei der Pathogenese und Biologie maligner Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen (Ashwell et al., 1994; Bargou et al., 1996). Hier ist die Apoptoseresistenz auch von grundlegender Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Zytostatika sowie immuntherapeutischen Ansätzen (Reed et al., 1994; Weinmann et al., 1997).

1.3. Mechanismen der Apoptose

Beim eukaryotischen Zelltod lassen sich prinzipiell nekrotische von apoptotischen Vorgängen unterscheiden, wobei es sich bei dem letzteren um ein genetisches Programm handelt, nach dessen Aktivierung der Zelltod eintritt. Im Gegensatz zum eher zufälligen nekrotischen Unfalltod legt der stereotype Ablauf der Apoptose die Interpretation vom „Selbstmord“ der Zelle nahe. Als wichtiger Unterschied zur Nekrose bleibt die Membranintegrität mit intakter Funktion als Permeabilitätsschranke bis zur letzten Phase, der Phagozytose durch Makrophagen, erhalten. Das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen in regelmäßigen Abständen von ca. 200 Basenpaaren kann elektrophoretisch als sogenannte DNA-Leiter sichtbar gemacht werden und gilt als entscheidendes biochemisches Kriterium der Apoptose (Ellis et al., 1991). Den DNA-Doppelstrangbrüchen geht eine Kaskade von intrazellulären Prozessen voraus, die durch ein oder mehrere proapoptotische Signale ausgelöst werden. Die intrazelluläre Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Signalwegen entscheidet letztlich über das weitere Schicksal der Zelle.

Apoptose ist ein genetisch regulierbarer, aktiver biochemischer Prozess und kann durch das Auftreten proapoptotischer bzw. durch den Verlust antiapoptotischer Signale ausgelöst

werden. Ein ausgewogenes Vorhandensein dieser beiden regulativen Schenkel stellt die Grundvoraussetzung für die biologische Homöostase und die physiologischen Funktionsabläufe im Gewebe dar (Jacobson et al., 1997; Abb.1).

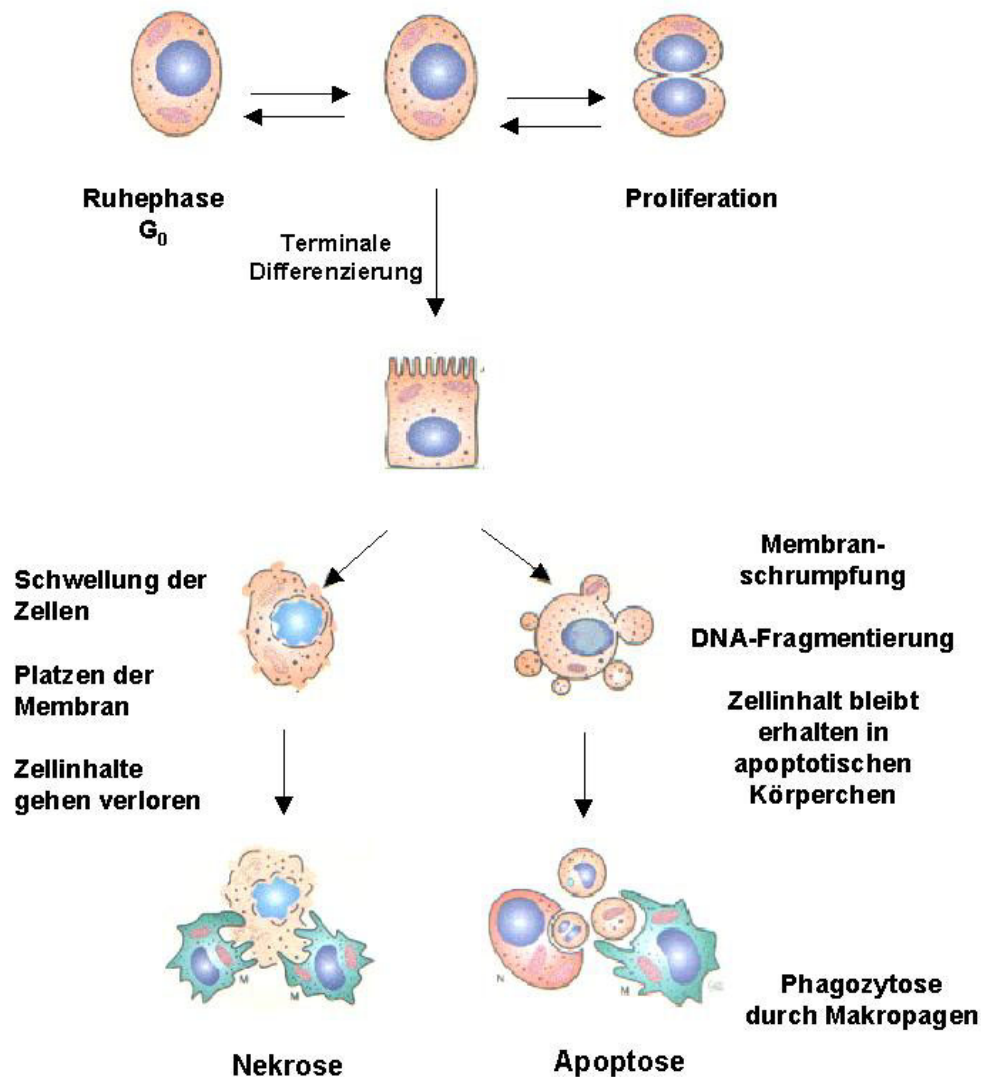


Abb.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen in apoptotischen Zellen im Vergleich zu nekrotischen Zellen

Bei Apoptose werden die Zellen nach einem festen Programm in sogenannte „apoptotische Körperchen“ zerlegt, wobei die Zellmembran erhalten bleibt und der Abbau von Zellinhalten geordnet erfolgt (DNA-Fragmentierung). Nekrose dahingegen tritt bei einer Verletzung oder Entzündung auf: Die angeschwollenen Zellen platzen, so dass die Zellinhalte verloren gehen. Bei beiden Prozessen werden die Zellreste von Fresszellen beseitigt.

1.4. Die Kontrolle der Apoptose durch Todesrezeptoren

Fas (CD95/APO-1) war das erste Mitglied einer Gruppe von „Todesrezeptoren“, Transmembran-Proteinen der TNF α -Rezeptor-Subfamilie, die an der Weiterleitung von Todessignalen maßgeblich beteiligt sind (Daniel et al., 2001). Die Fas-vermittelte Apoptose ist ein dominierender Mechanismus für die Realisierung der Immunantwort sowie für die Regulation von Entwicklung und Reifung der Immunzellen (Krammer, 2000) und wird durch den Fas-Liganden (FasL), ein TNF-verwandtes Transmembran-Protein, ausgelöst. Seine Bindung führt zur Oligomerisierung der Rezeptoren und Ausbildung des sogenannten "death inducing signaling complex" (DISC), der auch Procaspase-8 enthält. Procaspase-8 wird proteolytisch aktiviert und kann entweder direkt zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 führen (Typ I-Zellen), oder das Signal wird an der Mitochondrienmembran amplifiziert (Typ II-Zellen). Hierfür spaltet und aktiviert Caspase-8 das Bcl-2-verwandte Protein Bid, das an die Mitochondrienmembran transferiert wird und schließlich zur Freisetzung proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom C, AIF und Smac/Diablo führt (Luo et al., 1998; Li et al., 1998). Zytosolisches Cytochrom C ist essentieller Bestandteil des "Apoptosoms", das die Aktivierung der Caspase-9 vermittelt, die ihrerseits Procaspase-3 spaltet, durch welche schließlich die sogenannte Exekutionsphase der Apoptose eingeleitet wird (Li et al., 1997; Krammer, 2000; Daniel et al., 2001; Abb. 2).

Über die Expression des Fas-Liganden in Melanom-Zelllinien gab es unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits wurde berichtet, dass Melanom-Zelllinien den Fas-Liganden exprimieren und sich somit gegen tumorinfiltrierende Lymphozyten, die ihrerseits den Fas-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen, durch Induktion der Apoptose wehren könnten (Hahne, 1996). Dieser Vorgang fand als „Fas-Counterattack“ Eingang in die Literatur. Im Gegensatz dazu standen Arbeiten, denen zufolge humane Melanom-Zelllinien und Melanom-Primärkulturen keine Expression des Fas-Liganden aufwiesen (Raisova et al., 2000; Chappell et al., 1999).

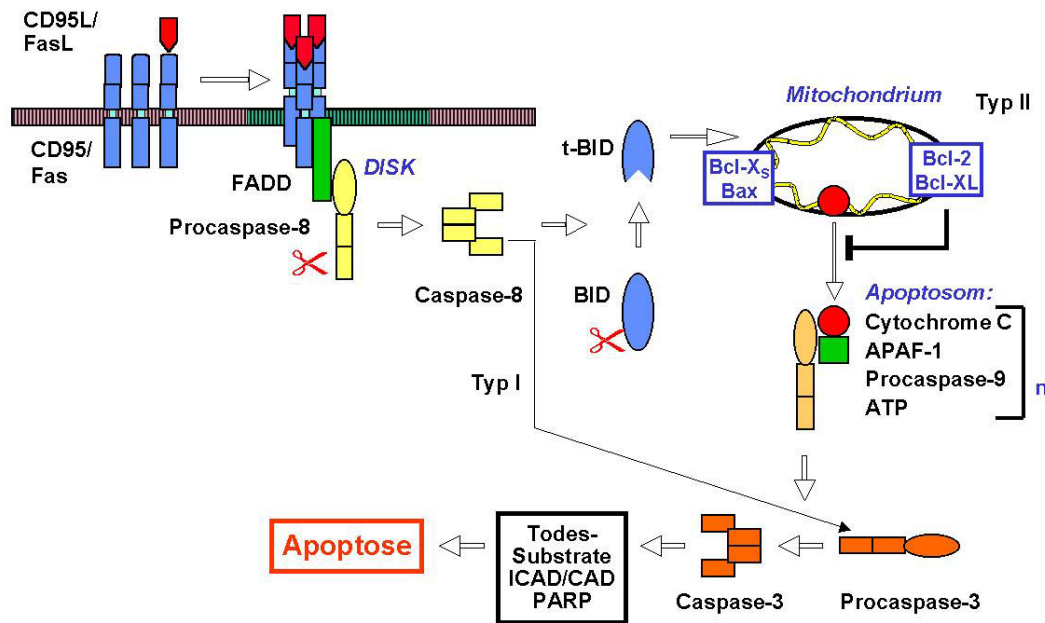


Abb.2 : Zwei Signalwege der CD95/Fas-vermittelten Apoptose. Typ I: Der erste Signalweg erfolgt durch die FADD-vermittelte Rekrutierung von Procaspase-8 an den CD-95-Rezeptorkomplex und direkte Aktivierung der Caspase-Kaskade. TypII: Der zweite Signalweg kann durch Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid eingeschlagen werden. Die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 hat die Exponierung der Interaktionsdomäne CARD zur Folge, wodurch es Apaf-1 ermöglicht wird, an die CARD von Procaspase-9 zu binden. Caspase-9 wird daraufhin vermutlich in ähnlicher Weise wie Caspase-8 durch Autoproteolyse aktiviert. Beide Caspasen sind in der Lage, eine proteolytische Caspase-Kaskade auszulösen, die zum programmierten Zelltod führt. Die Freisetzung der Endonuclease CAD durch Caspase-3 verursacht die charakteristische DNA-Fragmentierung. Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie verhindern die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C und/oder die Bindung von Cytochrom C an Apaf-1. So inhibiert Bcl-2 nur den mitochondrialen Apoptoseweg, nicht aber den FADD/Caspase-8-vermittelten direkten Signalweg.

1.5. Caspasen und ihre Rolle bei der Kontrolle der Apoptose

In der Exekutionsphase werden spezifische Proteasen aktiviert, die lebenswichtige intrazelluläre Proteine abbauen (Porter et al., 1997). Sie gehören zur Familie der Caspasen (Cytosolic Aspartate-Specific Cysteine Proteases) die derzeit 14 Mitglieder umfasst (Cohen, 1997;). Apoptose wird von einer Kaskade dieser Enzyme schrittweise realisiert. Sie bestehen aus einer hoch konservierten Familie aus Cystein-Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat spalten (Cysteinyl-Aspartasen). Die proteolytische Prozessierung und Aktivierung der Caspasen stellen entscheidende Schritte im Apoptoseprozess dar (Alnemri et al., 1996; Miller et al., 1997).

Von 14 bekannten Caspasen bei Säugern wurden 12 Mitglieder auch beim Menschen gefunden. Caspasen werden mit einer N-terminalen Prodomäne als Zymogen synthetisiert. Aufgrund ihrer phylogenetischen Beziehungen sind Caspasen in drei Hauptgruppen einzuteilen: Die erste Gruppe ist in das apoptotische Programm involviert, die Mitglieder der zweiten Gruppe sind für die posttranslationale Prozessierung von Zytokinen bei Entzündungsprozessen verantwortlich (Enari et al., 1998) (Abb.3). Die Caspase-14-Aktivierung wurde mit der Enddifferenzierung von Keratinozyten *in vivo* und *in vitro* in Korrelation gebracht (Eckhart et al., 2000). Die Apoptose-Caspasen unterteilen sich in die Initiatorcaspasen-2, -8, -9 und -10 und die Effektorcaspasen-3, -6 und -7. Bisher wurden keine humanen Homologe der murinen Caspasen-11 und -12 identifiziert, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind.

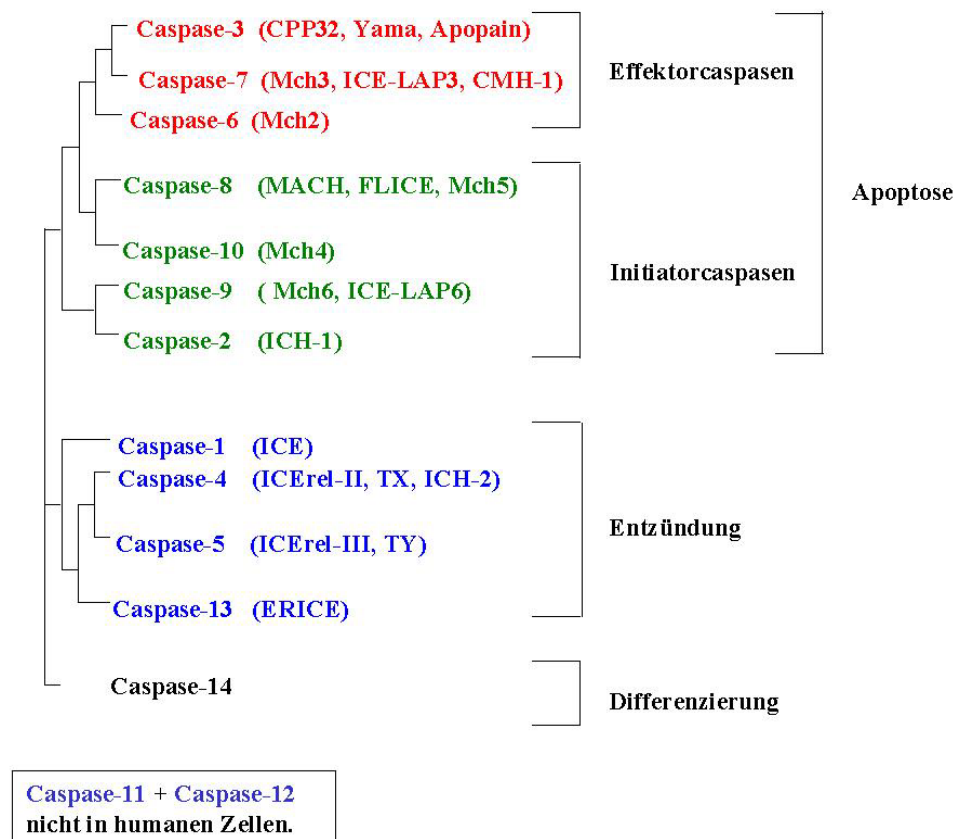


Abb.3: Die humane Caspasen-Familie. Aufgrund ihrer Substratspezifität lassen sich Caspasen in drei wichtige Gruppen einteilen: Caspasen, welche die Prozessierung von Zytokinen vermitteln und an der Entwicklung der Entzündung entscheidenden Anteil haben (blau), apoptotische Initiatorcaspasen (grün) apoptotische Effektorcaspasen (rot). Ausgenommen der Effektor Caspasen-3, -6 und -7 (rot), die nur eine kurze Peptid-Prodomäne besitzen (<30 kDa), enthalten alle anderen Caspasen eine lange (>10 kDa) Prodomäne.

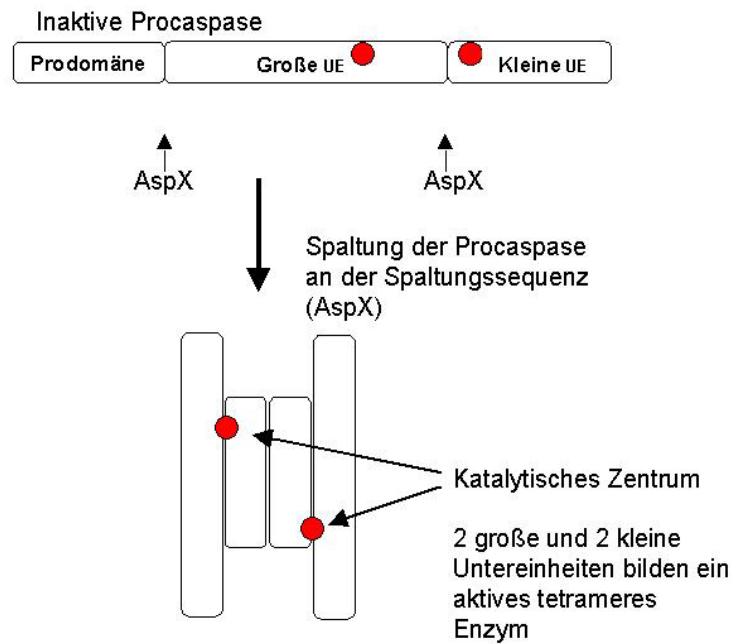
Eine wichtige Gruppe von Proteinen, die die Aktivität von Caspasen regulieren, stellen die IAP-Proteine (Inhibitor of Apoptosis) dar. Zur Zeit sind sechs humane Mitglieder der IAP-Familie bekannt: NIAP, C-IAP1, C-IAP2, XIAP, Survivin und BRUCE. Sie inhibieren die Caspase-Aktivität durch Bindung an spezifische Peptid-Sequenzen der Caspasen. Somit besteht eine wichtige Aufgabe der IAP-Proteine in der Inhibition der Caspasen, und sie besitzen damit eine antiapoptotische Wirkung (Deveraux und Reed, 1999).

Caspasen sind Übermittler in einer Signalkaskade, die schließlich in der Zerlegung von Zellbestandteilen endet. Manche dieser Proteine verleihen den Zellen Schutz vor dem Zelltod, wie z.B. das Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Protein (PARP; Chinnaiyan et al., 1996; Fraser und Evan, 1996). PARP ist ein Enzym, das in den DNA-Reparatur-Mechanismus involviert ist. Eine Spaltung dieses Enzyms durch Caspase-3 führt zur Inaktivierung (Cohen, 1997). Solche Enzyme stehen am Ende der Apoptosekaskade und führen zur Degeneration zellulärer Strukturen. Andere Proteine wurden durch Caspasen aktiviert, und so hat beispielsweise die Abspaltung des Inhibitors ICAD (**I**nhibitory of **C**aspase **A**ctivated **D**esoxyribonuclease) von der Endonuclease CAD durch Caspase-3 die Freisetzung von CAD zur Folge, die wiederum für die charakteristische DNA-Fragmentierung in Vielfache von 200 Basenpaaren verantwortlich ist (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997). Unter nicht-apoptotischen Bedingungen ist der Inhibitor an CAD assoziiert. Caspasen tragen auch direkt zu den morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen bei, wie die Zerstörung von Lamin A zeigt. Lamin A besteht aus einem „Kopf-an-Schwanz-Polymer“ filamentöser Proteine, den Laminen. Sie bilden eine stabile Struktur unter der Kernmembran und unterstützen auch die Chromatin-Struktur. Während der Apoptose werden die Lamine gespalten, was zum Zusammenbruch der Lamin A-Struktur führt und zur Kondensation des Chromatins beiträgt.

Aktive Caspasen bilden ein Heterotetramer aus zwei identischen großen Untereinheiten von etwa 20 kDa und zwei identischen kleinen Untereinheiten von etwa 10 kDa. Caspasen werden als Zymogene synthetisiert, die eine N-terminale Prodomäne sowie jeweils eine große und eine kleine Untereinheit enthalten. Für die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen bedarf es mindestens zweier aufeinanderfolgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander sowie von der Prodomäne zu trennen. Die Aktivierung ist in Abb.4 am Beispiel der Caspase-1 gezeigt.

Abb.4: Caspasen-Struktur und ihre Aktivierung am Beispiel der Caspase-1:

Caspasen werden als inaktive Form in der Zelle synthetisiert. Die Spaltung der katalytisch inaktiven Procaspase-1 führt zum aktiven Heterotetramer der Caspase-1, das aus jeweils zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten (UE) besteht.



1.6. AIF und der Caspasen-unabhängige Apoptoseweg

AIF (Apoptosis Inducing Factor) ist ein Flavoprotein und zeigt hohe Homologie zu Oxidoreduktasen von Vertebraten (*Xenopus laevis*) als auch Nicht-Vertebraten wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*, Pflanzen, Pilzen, Eubakterien und Archaeobakterien (Lorenzo et al., 1999; Daugas et al., 2000). Phylogenetisch gesehen ist AIF daher ein sehr altes Protein, das die erste Welle des Zelltodes während der frühen Embryogenese kontrolliert (Lorenzo et al., 1999; Joza et al., 2001). Das AIF-Vorläuferprotein wird im Zytoplasma synthetisiert und dann in die Mitochondrien transportiert. Normalerweise befindet sich AIF im Intermembranraum der Mitochondrien und ist an der Elektronentransfer-Kette beteiligt (Abb.5). Im Falle einer Apoptoseinduktion transloziert AIF zum Nukleus und veranlasst dort auf bisher nicht bekannte Weise die Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung in 50kb-Einheiten, wie an isolierten Nuklei von HeLa-Zellen gezeigt werden konnte (Susin et al., 1999).

In einem zellfreien System (Susin et al., 1999; Susin et al., 2000) sowie in intakten Zellen (Loeffler et al., 2001; Ferri et al., 2000) konnte rekombinantes AIF nach Überexpression Apoptose induzieren, wobei in der Folge ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, nukleäre Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung auftraten. Zytoplasmatisches AIF-Protein kann durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus wiederum verstärkte Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien veranlassen (Loeffler et al., 2001). Bemerkenswerterweise kann AIF-vermittelte Apoptose durch Überexpression von Bcl-2

gehemmt werden; Bcl-2 Überexpression kann aber nach erfolgter Freisetzung von AIF in das Zytosol den apoptotischen Effekt nicht mehr stoppen (Susin et al., 1996; Susin et al., 1999; Loeffler et al., 2001). Der Apoptose-Effekt durch Überexpression von AIF wurde durch Caspase-Inhibitoren nicht blockiert (Susin et al., 1999; Loeffler et al., 2001; Ferri et al., 2000), so dass die AIF-vermittelte Apoptose eine alternative, Caspasen-unabhängige Signaltransduktion beim programmierten Zelltod darzustellen scheint.

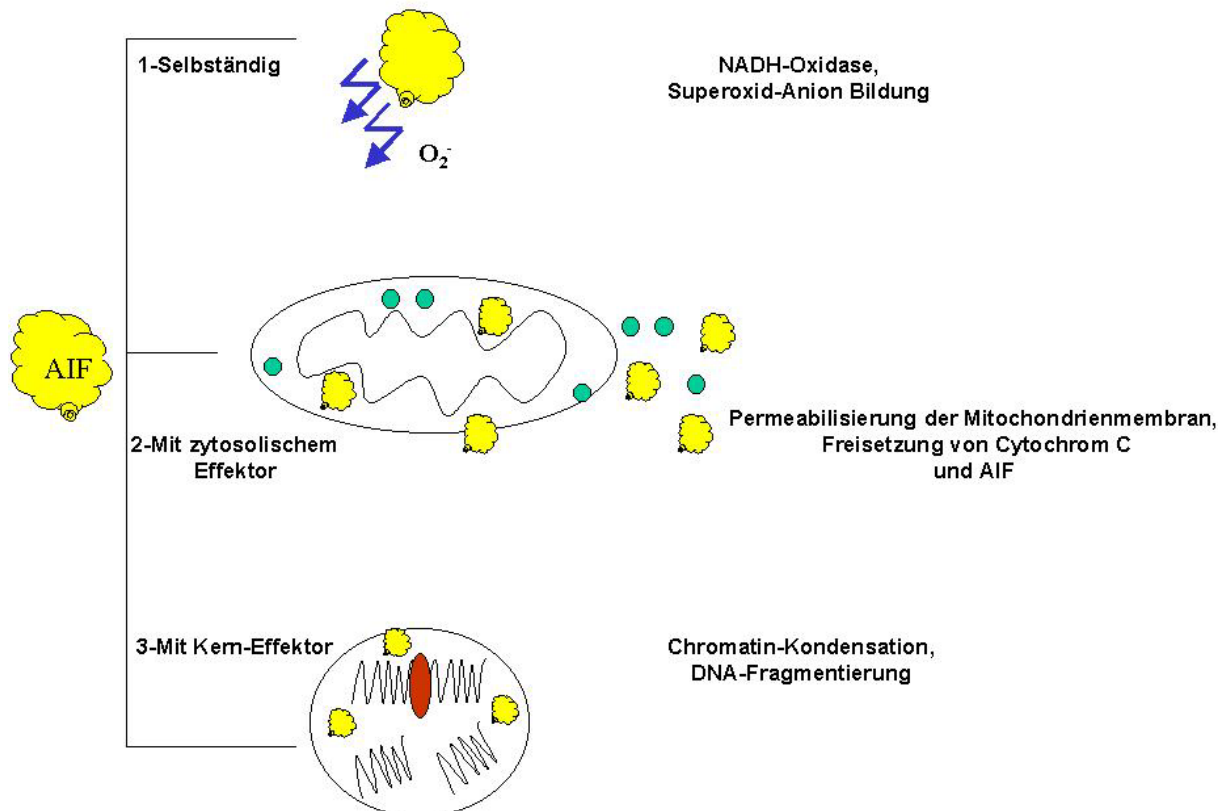


Abb.5: Drei unterscheidbare Funktionen von AIF: (1) AIF ist eine NADH-Oxidase, die für ihren katalytischen Elektronentransfer FAD als prosthetische Gruppe benötigt. (2) AIF führt zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran in einem zellfreien System. Ob dieser Effekt von der AIF-Redox-Aktivität abhängt, ist zur Zeit nicht bekannt. (3) AIF wirkt direkt im Kern, gezeigt in gereinigten Nuklei in einem zell- und zytosolfreien System. (Nach Candé et al., 2002)

1.7. Die Bcl-2-Genfamilie

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) wurde als erstes Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie identifiziert (Tsujimoto et al., 1984). Weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie bzw. verwandte Proteine wurden aufgrund von Sequenzhomologie oder ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert (Chao et al., 1998). Sie können nach ihrer Aktivität in zwei Hauptgruppen

von proapoptotischen bzw. antiapoptotischen Proteinen unterschieden werden. Für viele zelluläre Systeme wird angenommen, dass das molare Verhältnis zwischen proapoptotischen (Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid, Bik, Hrk u.a.) und antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 u.a.) Mitgliedern der Bcl-2-Familie über die Empfänglichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen entscheiden kann (Oltvai et al., 1993). Die Proteine der Bcl-2-Familie, von denen über 28 Mitglieder in Säugerzellen gefunden wurden, sind von entscheidender regulatorischer Bedeutung bei der mitochondrial vermittelten Apoptose (Gross et al., 1999; Gross et al., 2001).

Der Namensgeber der Familie, das antiapoptotische Bcl-2, ist ein integrales Protein der Mitochondrienmembran. Viele proapoptotische Mitglieder der Familie, z.B. Bid oder Bad, hingegen sind zytosolisch oder nur lose an Membranen assoziiert, andere wie z.B. Bcl-X_S und Bax konnten erst nach ihrer Aktivierung in der mitochondrialen Membran lokalisiert werden. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Proteine der Bcl-2-Familie ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Homo- wie auch Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der Familie. Einige Mitglieder der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-X_S und Bad) entfalten ihre proapoptotische Wirkung durch kompetitive Dimerisierung mit antiapoptotischen Proteinen. Liegt beispielsweise ein Überschuss an Bcl-2 vor, kommt es zur Bildung von Bcl-2-Homodimeren und damit zur Hemmung der Apoptose. Bei einem Überschuss an Bcl-X_S können hingegen bevorzugt Bcl-2/Bcl-X_S-Heterodimere gebildet werden, wodurch die antiapoptotische Aktivität von Bcl-2 unterbunden wird (Gross et al., 1999; Kroemer, 1997).

Die Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier konservierte Bcl-2-Homologie-Domänen BH1-BH4 mit jeweils alpha-helikaler Struktur (Adams und Cory, 1998; Tsujimoto und Shimizu, 2000a,b). Während die antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2, Bcl-X_L, A1, Mcl-1 alle vier Domänen tragen, fehlen den proapoptotischen Proteinen entweder die aminoterminal gelegene BH4-Domäne und/oder die BH1- und die BH2-Domäne. Einzig die BH3-Domäne, die als potentielle „Todesdomäne“ fungiert, scheint ein notwendiges Charakteristikum aller proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie zu sein. Zusätzlich besitzen viele Mitglieder eine carboxyterminale hydrophobe Domäne (TM), die entscheidend für die Membranlokalisation ist (Nguyen et al., 1993). Nur wenige proapoptotische Proteine dieser Familie besitzen auch die BH4-Domäne wie Bcl-X_S und Bcl-Rambo (Abb.6).

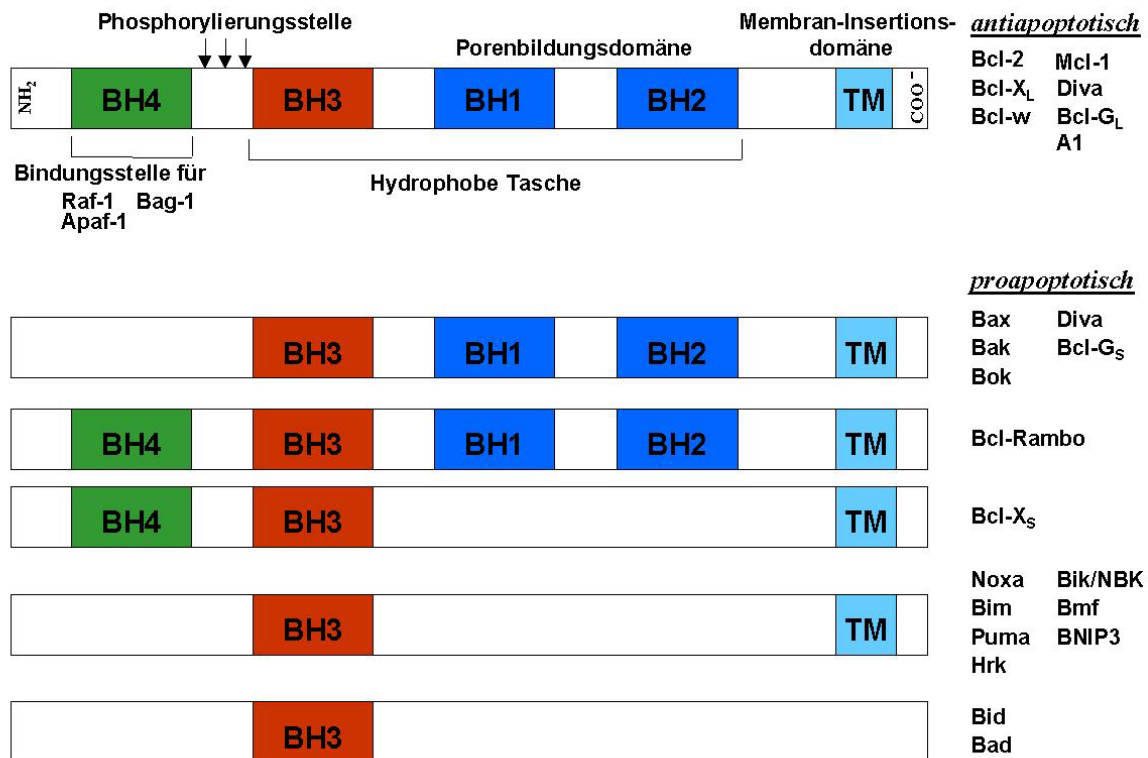


Abb.6: Schematische Darstellung der Struktur von pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie unterscheiden sich durch unterschiedliche Kombination von Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1 - BH4). Während die antiapoptotischen Proteine alle vier Domänen aufweisen, haben die proapoptotischen Mitglieder höchstens drei BH-Domänen. Mit Ausnahme von Bcl-Rambo ist Bcl-X_S das einzige proapoptotische Protein in dieser Familie, das neben der BH3- auch eine BH4-Domäne besitzt.

Es wurden verschiedene Proteine beschrieben, die an Bcl-2 Proteine binden können. So bindet die Proteinkinase Raf-1 an die BH4-Domäne von Bcl-2 und wird auf diese Weise an die Mitochondrienmembran transportiert (Blagosklonny et al., 1997). Bag-1 ist mit dem HGF-Rezeptor (hepatocyte growth factor) assoziiert und somit eventuell ein Adaptermolekül zwischen dem Tyrosinkinase-Rezeptor und der antiapoptotischen Maschinerie (Bardelli et al., 1996).

Es wurde gezeigt, dass die BH4-Domäne der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L notwendig und ausreichend für die Inhibierung der VDAC-Aktivität (voltage-dependent anion channel) ist. VDAC-Proteine sind kanalbildende, integrale Membran-Proteine, die durch ihre Öffnung unter anderem die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol ermöglichen (Shimizu et al., 2000b). Ein Mechanismus zur Regulation der Aktivität der Bcl-2 Proteine ist die Phosphorylierung der Loop-Region von Bcl-X_L und Bcl-2, welche zwischen der BH4- und BH3-Domänen liegt. Es konnte gezeigt werden, dass Deletionen der

Loop-Struktur die antiapoptotische Funktion von Bcl-X_L und Bcl-2 unterdrücken (Chang et al., 1997).

1.7.1. Bcl-2 als Onkogen

Das bcl-2-Gen wurde ursprünglich in folliculären B-Zell-Lymphom-Zellen entdeckt, die eine 14;18 Translokation aufweisen. Die immunhistochemisch nachweisbare Expression von Bcl-2 ist noch kein ausreichendes Zeichen der malignen Transformation einer Zelle. Das Protein besitzt jedoch eine wichtige physiologische Funktion: Insbesondere in verschiedenen Stammzellen findet sich eine hohe Bcl-2-Expression, die das Überleben dieser wichtigen Zellpopulation sichert. In der Haut wird Bcl-2 konstitutiv in basalen Keratinozyten exprimiert, der Zellschicht, die durch regelmäßige Zellteilung das Reservoir für die Erneuerung der Epidermis bildet. Bereits in den suprabasalen Schichten der Epidermis ist das Protein immunhistochemisch nicht mehr nachweisbar (Morales-Ducret et al., 1995; Verhaegh et al., 1995).

In Melanozyten und Melanomzellen wurde ebenfalls eine konstitutive Expression von Bcl-2 beobachtet, sowohl *in situ* als auch in Zellkulturen (Plattenberg et al., 1995). In allen untersuchten gutartigen Pigmentmalen, in 67% der primären Melanome und 54% der Melanom-Metastasen war Bcl-2 immunhistologisch nachweisbar (Ramsay et al., 1995). Verschiedentlich wurde versucht, Bcl-2 als prognostischen Marker bei der Bewertung maligner Melanome zu verwenden. So wurden in einer Studie Lymphknotenmetastasen von Melanom-Patienten mittels Durchflußzytometrie (FACS) auf die Expression von Bcl-2 hin untersucht. In etwa einem Drittel der Metastasen wurde eine starke Expression des Onkoproteins detektiert, und dies war mit einer signifikant kürzeren Überlebensrate assoziiert (Grover und Wilson, 1996). Ferner wurde gezeigt, dass die Bcl-2-Expression in primären Melanomen, die später metastasierten, höher war als in nicht metastasierenden Melanomen (Hernberg et al., 1998). Bcl-2 inhibiert Apoptose und kann daher Melanomen indirekt einen Wachstumsvorteil verleihen. (Leiter et al., 2000).

1.7.2. Die Rolle der Bcl-2-Familie bei der mitochondrial vermittelten Apoptose

Es ist noch ungeklärt, wie die Bcl-2-Familie den Apoptose-Mechanismus auf mitochondrialer Ebene kontrollieren kann. Dazu wurden mehrere Modelle und Hypothesen vorgeschlagen (Harris und Thompson, 2000). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und in der Lage, die Freisetzung der proapoptischen

Proteine Cytochrom C, Smac/Diablo, Endonuklease G, AIF (Apoptosis Inducing Factor) und HtrA2/Omi (High temperatur) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol und somit die Membranpermeabilität zu regulieren (Nguyen et al., 1993; Krajewski et al., 1993; Tanaka et al., 1993; Tsujimoto und Shimizu, 2000; Ravagnan et al., 2002). Einige Mitglieder der Bcl-2-Familie sind fähig, Kanäle in synthetischen Lipid-Membranen zu bilden und somit die Freisetzung der proapoptotischen Moleküle zu veranlassen oder zu blockieren. Diese Kanalbildung konnte für das Apoptose-induzierende Bax, aber auch für die antiapoptotischen Proteine Bcl-X_L und Bcl-2 nachgewiesen werden (Minn et al., 1999; Antonsson et al., 1997; Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997; Tanaka et al., 1993). Auch Bid, ein Mitglied der BH-3-only-Subfamilie, die nur wenig Sequenzhomologie zu Bcl-X_L, Bcl-2 oder Bax und Bak zeigt, ist in der Lage, in synthetischen Membranen Kanäle zu bilden (Schendel et al., 1997). Ob die Proteine der Bcl-2-Familie auch *in vivo* Membranporen oder Ionenkanäle bilden können, ist aber noch umstritten.

Aufgrund der Poren-bildenden Eigenschaft von Bax vermag das Protein zu oligomerisieren und könnte in der äußeren Mitochondrienmembran eine Pore formen, durch die dann Cytochrom C freigesetzt wird. Alternativ könnte Bax einen Ionenkanal bilden, der zur Destabilisierung des mitochondrialen Transmembranpotentials beiträgt (Antonsson et al., 2000; Liu et al., 1996). Darüber hinaus können die Bax-Oligomere mit VDAC, dem spannungsabhängigen Anionenkanal, größere Kanäle zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran bilden und so die Freisetzung proapoptotischer Moleküle, vor allem von Cytochrom C, veranlassen (Shimizu et al., 2000). Hierfür spricht, dass durch einen Anti-VDAC-Antikörper die Freisetzung von Cytochrom C bei Bax-induzierter Apoptose gehemmt werden konnte (Shimizu et al., 2001). Dabei unterliegt die Oligomerisierung von Bax einer negativen Kontrolle durch Heterodimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-X_L (Shimizu et al., 1999; Shimizu et al., 2000). Auch in Mutationsanalysen wurde gezeigt, dass VDAC für die Freisetzung von Cytochrom C nach Bax-vermittelter Apoptose essentiell ist (Shimizu et al., 1999 und 2000a, 2000b; Shimizu und Tsujimoto, 2000).

In einem alternativen Modell wird vermutet, dass die Proteine der Bcl-2-Familie die Öffnung der PTP(permeability transition pore)-Kanäle regulieren. Diese bilden sich aus Komplexen der VDAC-Kanäle in der äußeren mit den ANT- Poren (Adenine Nucleotide Translocator) in der inneren Mitochondrienmembran. Sowohl anti- als auch proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie sind in der Lage, mit den PTP zu interagieren (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Shimizu et al., 2000b; Brenner et al., 2000). Mit dem Nachweis der Bcl-2- und Bax-Proteine an den Kontaktstellen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran konnte diese

Hypothese unterstützt werden (Krajewski et al., 1993; Motoyama et al., 1998; Gilbert et al., 1999; Eskes et al., 2000).

Während proapoptische Proteine wie Bax und Bak zur Permeabilisierung der Mitochondrien beitragen, wird das mitochondriale Transmembranpotential durch antiapoptische Mitglieder der Proteinfamilie wie Bcl-2 und Bcl-X_L stabilisiert (Tsujimoto und Shimizu, 2000a,b; Kroemer und Reed, 2000; Martinou und Green, 2001). Dabei scheint die Fähigkeit der BH-4-Domäne, den Anionenkanal VDAC zu verschließen, eine entscheidende Rolle zu spielen (Shimizu et al., 2000b). Diese Studien zeigen die Assoziation der Bcl-2-Familienmitglieder mit Proteinen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran. Ob die Daten auf die Situation in humanen Zellen übertragbar sind, ist noch fraglich, da die Experimente in Hefe durchgeführt wurden und Hefen selber weder Bcl-2-Proteine noch Caspasen besitzen (Shimizu et al., 1999; Priault et al., 1999; Shimizu et al., 2000; Roucou et al., 2000; Fleury et al., 2002).

1.8. Apoptoseregulation durch Bcl-X

Ein besonderes Mitglied der Bcl-2-Familie stellt Bcl-X dar. Es wurde durch Kreuzhybridisierung mit bcl-2 gefunden. Das Gen besteht aus drei Exonen, wobei der kodierende Bereich in Exon 2 und Exon 3 liegt, während Exon 1 nicht kodierend und von Exon 2 durch ein 283 Basenpaare langes fakultatives Intron getrennt ist (Grillot et al., 1997). Aus dem Primärtranskript können zwei Spleißprodukte mit entgegengesetzter Aktivität gebildet werden, die als Bcl-X_L (long; antiapoptisch) und als Bcl-X_S (short; proapoptisch) beschrieben sind (Boise et al., 1993; Fang et al., 1994; Gonzalez-Garcia et al., 1995). Außerdem wurde die Spleissvarianten bcl-X_{ΔTM} und bcl-X_β identifiziert, über deren Funktion bisher nichts genaues bekannt ist (Shiraiwa et al., 1996; Grillot et al., 1997).

Das Protein Bcl-X_L mit 233 Aminosäuren hat große Sequenz- und Strukturähnlichkeiten mit Bcl-2. Das kleinere Transkript, bcl-X_S, kodiert ein Protein mit 170 Aminosäuren; ihm fehlen 63 Aminosäuren, in denen die BH1- und BH2-Domänen liegen (Boise et al., 1993). Durch eine Serie von Mutationen in den BH1- und BH2-Domänen von Bcl-2 und Bcl-X_L konnte gezeigt werden, dass diese Domänen für die Heterodimerisierung mit Bax benötigt werden und für die antiapoptische Funktion der Bcl-2- und Bcl-X_L-Proteine wichtig sind (Oltavi et al., 1993; Sedlak et al., 1995).

Bcl-X_L ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, wo es durch Bindung an Cytochrom C dessen Freisetzung in das Zytosol und damit die Aktivierung von Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) und der folgenden Caspase-Kaskade inhibiert

(Kharbanda et al., 1997). Aufgrund der fehlenden BH1- und BH2-Regionen ist Bcl-X_S nicht mehr fähig, mit anderen Mitgliedern der Bcl-2-Familie, vor allem Bax und Bad, Heterodimere zu bilden, kann aber noch mit geringer Affinität mit Bcl-X_L und Bcl-2 heterodimerisieren und dadurch deren antiapoptotische Funktion inhibieren (Boise et al., 1993; Minn et al., 1996). Bei der Heterodimerisierung kann man zwischen BH3-Donoren und -Akzeptoren unterscheiden (Gross et al., 1999). Durch Strukturaufklärung des BH3-Akzeptors Bcl-X_L konnte gezeigt werden, dass BH1, BH2 und BH3 eine hydrophobe Tasche bilden, in welcher die unverdeckte BH3-Domäne eines BH3-Donors, beispielsweise Bcl-X_S, binden kann (Sattler et al., 1997).

Das antiapoptotische Protein Bcl-X_L wird in hämatopoietischen Zellen, myeloischen Vorläufern und Makrophagen (Lotem und Sachs, 1995; Chatterjee et al., 1997; Packham et al., 1998; Sevilla et al., 1999), lymphatischen Vorläufern der B-Zellen (Fang et al., 1994; Grillot et al., 1996) und doppelt positiven CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen exprimiert (Grillot et al., 1995). Interessanterweise ist jedoch die proapoptotische Form Bcl-X_S in murinen T- oder myeloischen Zellen nicht detektierbar (Gonzales-Garcia et al., 1995; Packham et al., 1998; Sevilla et al., 1999). Bcl-X_S-Expression wurde bisher vor allem in Geweben mit hohem Zellumsatz wie unreifen Thymozyten gefunden, Bcl-X_L-Expression dagegen hauptsächlich in langlebigen, postmitotischen Zellen wie Gehirnzellen (Boise et al., 1993; Gonzalez-Garcia et al., 1995).

1.9. Fragestellung

Die Aufklärung der Apoptoseregulation in Tumorzellen ist besonders für aggressive und therapieresistente Tumoren wie das maligne Melanom von großem Interesse, da ein gentherapeutischer Ansatz unter Verwendung proapoptotischer Gene eine vielversprechende Therapiestrategie darstellen könnte.

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie stellen wichtige Regulatoren der Apoptose dar. Für viele zelluläre Systeme wird angenommen, dass das Mengenverhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie über das Schicksal der Zelle - Überleben oder programmierter Zelltod - entscheidet. Bcl-X ist ein Mitglied dieser Familie, das in zwei Spleissvarianten als antiapoptotisches Bcl-X_L und als proapoptotisches Bcl-X_S gegensätzliche Funktionen ausübt. Die Bedeutung des Verhältnisses von anti- zu proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie wurde in verschiedenen Tumoren bereits gezeigt. Bisher war die Relevanz der Bcl-2-Familie und im besonderen von Bcl-X_S beim malignen Melanom jedoch nur unzureichend geklärt.

In der hier vorgelegten Arbeit sollten daher zunächst zwei antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, Bcl-2 und Bcl-X_L, und zwei proapoptotische Proteine, Bcl-X_S und Bax, in Melanomzellen hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Mengenverhältnisse zueinander untersucht werden. Dabei war insbesondere auch eine Korrelation zwischen dem Mengenverhältnis von Bcl-2 zu Bax mit der Sensitivität gegenüber dem agonistischen Fas-Antikörper CH-11 zu untersuchen. Durch Überexpression von Bcl-2 in einer sensitiven Melanom-Zelllinie sollte überprüft werden, ob Resistenz gegenüber dem Antikörper erzeugt werden könnte. Umgekehrt sollte durch Überexpression des proapoptotischen Bcl-X_S-Proteins in Melanomzellen eine mögliche Apoptoseinduktion überprüft werden. Dazu sollte das bcl-X_S-Gen in ein Tetracyclin-regulierbares Expressionssystem kloniert und in Melanom-Zelllinien induzierbar zur Expression gebracht werden. Der Einfluss der Überexpression des proapoptotischen Proteins Bcl-X_S auf die Apoptoseregulation in Melanomzellen sollte außerdem in Kombination mit Zytostatika und anderen Apoptose-Stimuli überprüft werden. Schließlich war die bisher nur unzureichend verstandene Bcl-X_S-Signaltransduktion in Melanom-Zellen näher zu untersuchen. Die mögliche therapeutische Verwendbarkeit von Bcl-X_S sollte in Tierexperimenten geprüft werden.