

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsanalyse von Mitgliedern der Bcl-2-Familie in Melanom-Zellen und Melanozyten-Kulturen

Die Bcl-2-Proteine stellen als anti- bzw. proapoptotisch wirkende Proteine wichtige Apoptoseregulatoren in der Zelle dar, wobei eine Dysregulation dieser Proteine den Apoptoseprozess stören kann (Gross et al., 1999). Daher sollte zunächst die basale Expression von Bcl-2, Bax, Bcl-X_S und Bcl-X_L in einer Auswahl an Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen untersucht werden.

3.1.1. Expression von Bcl-2 in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen

Zur Analyse der Bcl-2-Expression in normalen Melanozyten und Melanom-Zelllinien wurden drei Melanom-Zelllinien (A-375, Mel-2A und MeWo) sowie drei Melanozyten-Kulturen (NHM-A, NHM-B und NHM-E) parallel mittels Western Blot und Immunhistochemie untersucht. Im Western Blot zeigten zwei Melanozyten-Kulturen nur relativ geringe Expression, während die dritte Kultur (NHM-E) eine etwa 10-fach erhöhte Bcl-2-Expression im Vergleich zu den beiden anderen Melanozyten-Kulturen hatte. Dahingegen wurde bei allen drei untersuchten Melanom-Zelllinien eine relativ starke Expression von Bcl-2 detektiert (Abb.11).

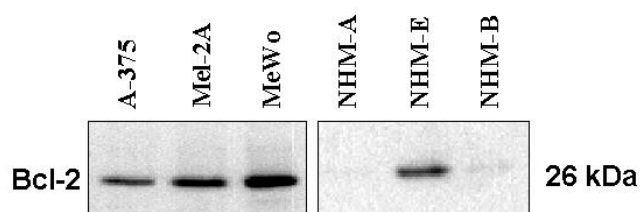


Abb.11: Detektion von Bcl-2 in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen. Lysate von jeweils 3 Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der verwendete Bcl-2-Antikörper erkennt ein Protein von 26 kDa.

Mittels APAAP (Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase)-Färbung ergaben sich parallele Daten zum Western Blot. Die APAAP-Färbung zeigte in den untersuchten Melanom-Zelllinien eine hohe Expression an Bcl-2; in den untersuchten Melanozyten-Kulturen war Bcl-2 deutlich schwächer exprimiert (Abb.12).

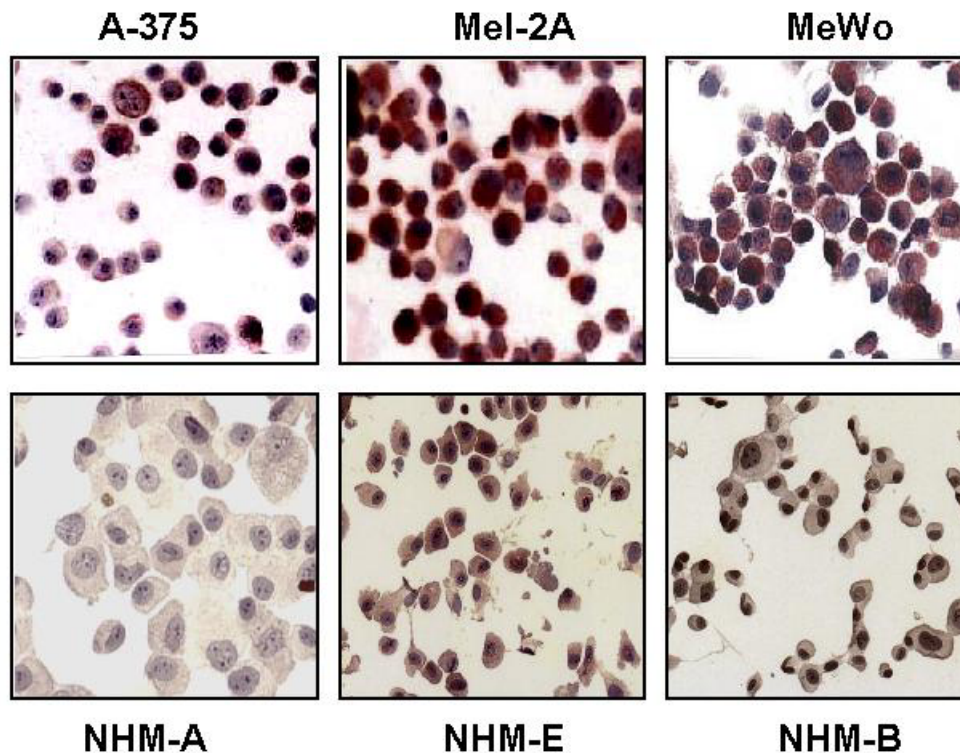


Abb.12: Stärkere immunhistochemische Detektion des Bcl-2-Antigens in Melanom-Zelllinien im Vergleich zu Melanozyten-Kulturen.

Drei Melanom-Zelllinien und drei unterschiedliche Melanozyten-Kulturen wurden auf Objektträgern mit einem Bcl-2-Antikörper inkubiert und schließlich mit Hilfe der APAAP-Technik angefärbt.

3.1.2. Unterschiedlich hohe Bax- und Bcl-2-Expression in Melanom-Zelllinien

In verschiedenen Tumor-Zelllinien wurde bereits gezeigt, dass eine hohe Expression antiapoptotischer im Vergleich zur Expression proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie für die Apoptose-Defizienz gegenüber Zytostatika und anderen Apoptose-Stimuli verantwortlich sein kann. (Campos et al., 1993; Colomble et al., 1998; Dole et al., 1995; Ortiz-Rey et al., 2002 ; Del Poeta et al., 2002). Hier wurden 13 Melanom-Zelllinien und sechs Melanozyten-Kulturen bezüglich ihrer Expression von Bcl-2 und Bax auf Protein-Ebene untersucht. Aus Zellen mit einer Konfluenz von 50-70% wurden Proteinextrakte gewonnen, durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Bcl-2 wurde mit einer Größe von 26 kDa, Bax mit 21 kDa in allen Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen detektiert. Die Western Blots bestätigten nochmals, dass Melanom-Zelllinien im Vergleich zu den meisten Melanozyten-Kulturen das Protein Bcl-2 relativ stark exprimierten, wohingegen die Bax-Expression unverändert blieb (Abb.13).

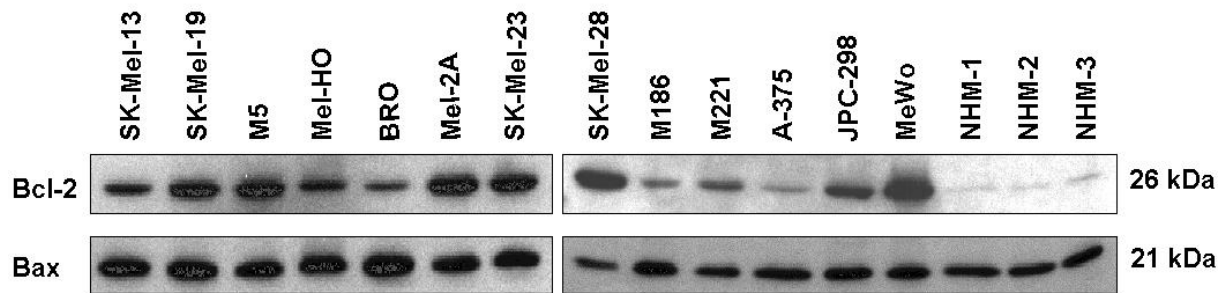


Abb.13: Das Bcl-2-Protein wird in Melanozyten schwächer exprimiert als in Melanom-Zelllinien.

Western Blots von 13 Melanom-Zelllinien und 3 Melanozyten-Kulturen (NHM) für Bcl-2 und Bax sind dargestellt. Je 60 μg der Protein-Lysate wurden in 15%igen PA-Gelen (Polyacrylamid-Gelen) aufgetrennt. Die Expression von Bcl-2 und Bax wurde auf derselben Membran durch eine nachfolgende Inkubation analysiert.

3.1.3. Bax/Bcl-2-Expressionsrate in CH-11-sensitiven und nicht sensitiven Melanom-Zellen

Aufgrund von Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten die in unserem Labor verwendeten Melanom-Zelllinien in zwei Untergruppen eingeteilt werden: Etwa die Hälfte (6/11) der untersuchten Melanom-Zelllinien war gegenüber dem CD95/Fas-Signal resistent, welches mittels des agonistischen CD95-Antikörpers CH-11 gegeben wurde, während die anderen Melanom-Zelllinien (5/11) sich sensitiv verhielten. Parallel zur CH-11-Sensitivität der Zellen verhielt sich auch die Sensitivität gegen C_2 -Ceramid, einen weiteren Apoptoseinduktor (Raisova et al., 2000). Zum besseren Verständnis dieses unterschiedlichen Verhaltens wurde die in Western Blots nachgewiesene Expression des proapoptotischen Proteins Bax und des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 für 13 Melanom-Zelllinien und 3 Melanozyten-Kulturen densitometrisch quantifiziert. Es zeigte sich ein relativ hohes Protein-Mengenverhältnis von Bax/Bcl-2 für die Fas-sensitiven Melanom-Zelllinien, während das Bax/Bcl-2-Verhältnis bei allen Fas-resistenten Zelllinien signifikant erniedrigt war (Tab.3; Abb.14).

Tabelle 3: Bax/Bcl-2-Rate in Melanom-Zelllinien.

Sensitive Zelllinien	Bax/Bcl-2-Rate¹
BRO	2,9
A-375	2,7
SK-Mel-13	2,4
M-186	2,0
Mel-HO	1,5
Mittelwert	2,3 ± 0,5
Median	2,5

Resistente Zelllinien	Bax/Bcl-2-Rate¹
MeWo	0,48
SK-Mel-28	0,45
SK-Mel-23	0,75
M-221	0,95
Mel-2A	1,0
JPC-298	1,05
Mittelwert	0,9 ± 0,3
Median	1,0

- 1) Die für Bax ermittelten Expressionswerte wurden durch die zugehörigen Bcl-2-Werte dividiert (arbiträre Zahlenwerte). Mittelwerte und dazugehörige Standardabweichungen sowie Medianwerte sind angegeben.

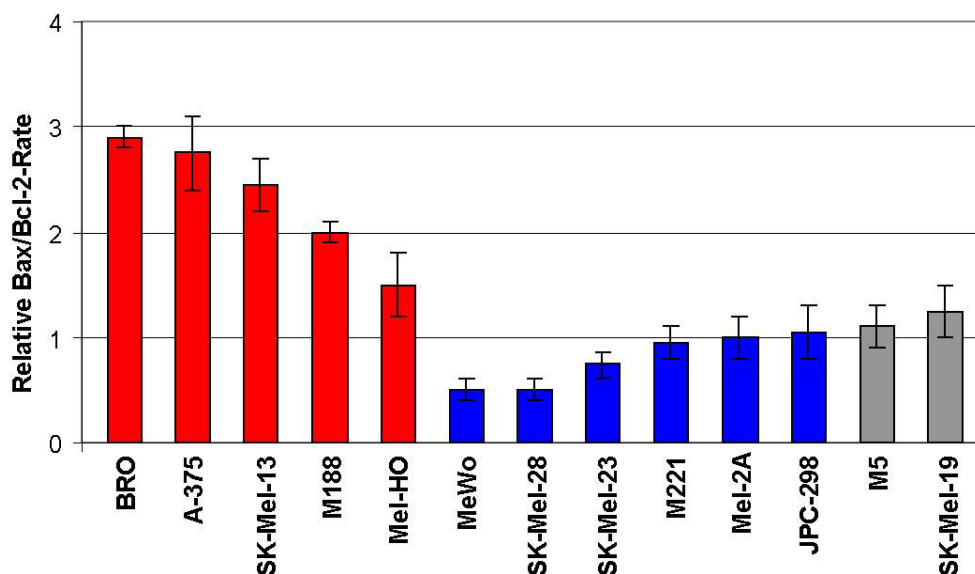


Abb.14: Grafische Darstellung der Bax/Bcl-2-Expressionsrate in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen.

Rote Balken wurden für CH-11-sensitive Zellen und blaue Balken für resistente Zelllinien gewählt. Für M5 und SK-Mel-19 wurde die CH-11 Sensitivität nicht bestimmt (graue Balken).

3.1.4. Analyse der Bcl-X_L- und der Bcl-X_S-Expression in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen

Bcl-X_L (antiapoptotisch) und Bcl-X_S (proapoptotisch) stellen zwei alternative Spleissprodukte der Bcl-X-mRNA dar. Auf Proteinebene wurde eine Expressionsanalyse des antiapoptotischen Bcl-X_L und des proapoptotischen Bcl-X_S in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen mittels Western Blot durchgeführt. Bcl-X_L mit der Größe von 29 kDa wurde sowohl in Melanom-Zelllinien als auch in Melanozyten-Kulturen detektiert. Nach densitometrischer Quantifizierung der Proteinbanden zeigte Bcl-X_L in 4 von 8 Melanom-Zelllinien (SK-Mel-13, Mel-HO, BRO und A-375) eine deutlich stärkere Expression im Vergleich zu den untersuchten Melanozyten-Kulturen (Abb.15). Demgegenüber war Bcl-X_S mit einer Größe von 21 kDa in den untersuchten Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen im Western Blot nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

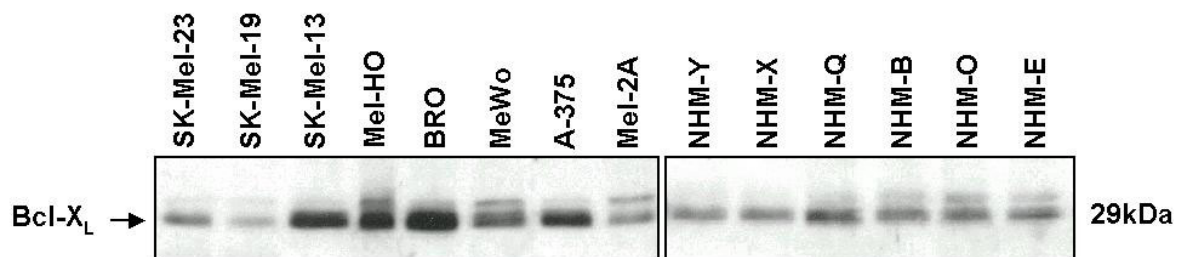


Abb.15: Bcl-X_L wird in einigen Melanom-Zelllinien auf Proteinebene stark exprimiert.

Je 60 µg der Protein-Lysate von 8 Melanom-Zelllinien und 6 Melanozyten-Kulturen (NHM) wurden in 15%igen PA-Gelen aufgetrennt. Der Anti-human Bcl-X-Antikörper erkennt beide Spleissprodukte, Bcl-X_L und Bcl-X_S, letzteres war jedoch nicht nachweisbar.

3.2. Analyse der Expression der bcl-X_L- und bcl-X_S-Gene auf mRNA-Ebene in Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen

3.2.1. Detektion von Bcl-X_L und Bcl-X_S im Northern Blot

Aufgrund mangelnder Detektierbarkeit der Bcl-X_S-Expression auf Proteinebene wurde die Expression der bcl-X-Spleissprodukte auf mRNA-Ebene untersucht. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert und im Northern Blot analysiert. Für die Hybridisierung wurde als Sonde die vollständige bcl-X_L-cDNA (760 bp) verwendet, die vorher durch RT-PCR kloniert wurde (siehe 3.4.1.). Mit dieser Sonde sollten bei einer Hybridisierung beide Transkripte, bcl-X_L und bcl-X_S erkannt werden. Für bcl-X_L mRNA wurde eine Größe von 2,9 kb und für bcl-X_S eine Größe von 2,7 kb angegeben (Navarro et al., 1999). Auch in Melanomzelllinien konnte bcl-

X_L auf mRNA-Ebene mit einer Länge von 2,9 kb nachgewiesen werden, wohingegen eine Expression von $bcl-X_S$ -mRNA nicht detektierbar war (Abb.17). Zur Normierung wurde der Northern-Blot mit einer Sonde für das „Haushaltsgen“ β -Aktin rehybridisiert. Die Expression der $bcl-X_L$ -mRNA zeigte sich in den untersuchten Melanom-Zelllinien (außer A-375 und Mel-HO) tendenziell höher als in den untersuchten Melanozyten-Kulturen (Abb.16).

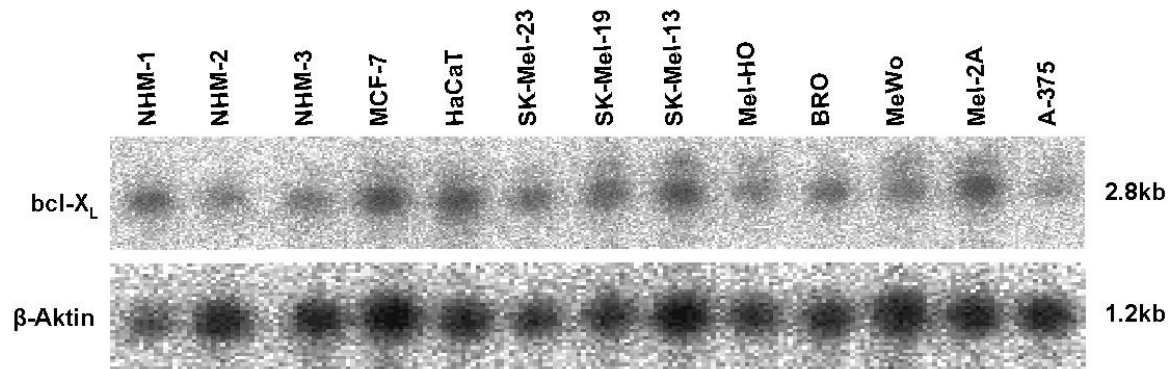


Abb.16: Die Expression der $bcl-X_L$ -mRNA zeigt sich in Melanom-Zelllinien tendenziell erhöht im Vergleich zu Melanozyten-Kulturen (NHM).

Die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und MCF-7-Mammakarzinom-Zellen wurden als zusätzliche Kontrollen verwendet. $bcl-X_S$ -mRNA war in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisbar. Das Haushaltsgen β -Aktin diente als Ladungskontrolle der Gesamt-RNA.

3.2.2. Detektion von $bcl-X_L$ - und $bcl-X_S$ -mRNA mittels RT-PCR

Eine Expression von $Bcl-X_S$ war in den untersuchten Melanomzelllinien und Melanozytenkulturen weder mittels Western Blot noch im Northern Blot nachweisbar. Um $bcl-X_S$ -mRNA nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Sowohl $bcl-X_L$ - als auch $bcl-X_S$ -mRNA wurden mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR unter Verwendung von β -Aktin als Kontrolle nachgewiesen. Die RT-PCR bestätigte die Tendenz der erhöhten Expression von $bcl-X_L$ in Melanom-Zelllinien im Vergleich zu Kulturen normaler humaner Melanozyten. Außerdem konnte mit dieser Methode auch $bcl-X_S$ -mRNA detektiert werden (Abb.17). Die Expression von $bcl-X_S$ war deutlich schwächer als die $bcl-X_L$ -Expression mit einer Tendenz zur verminderten Expression in Melanom-Zellen (mit Ausnahme der Zelllinie Mel-2A).

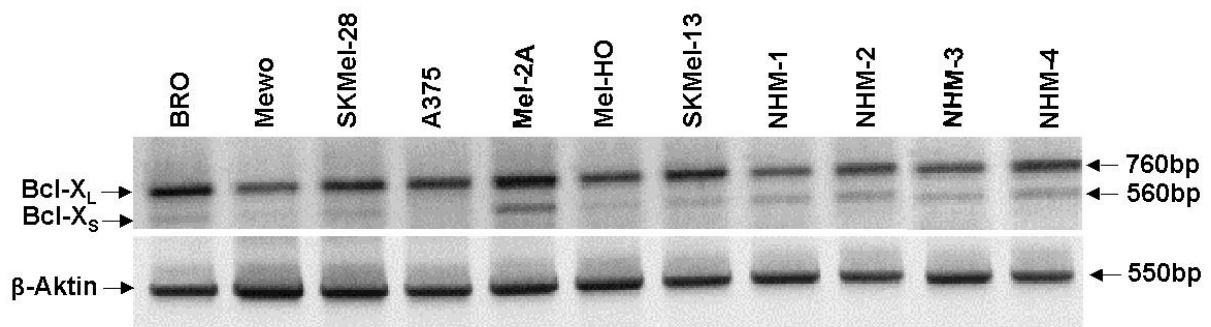


Abb.17: Bcl-X_L-mRNA wird in humanen Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen stärker exprimiert als mRNA von bcl-X_S.

Die bcl-X_L- und bcl-X_S-mRNA Expression wurde in 7 Melanom-Zelllinien und 4 normalen humanen Melanozyten-Kulturen (NHM) mittels RT-PCR analysiert. Ausgenommen von Mel-2a zeigten die untersuchten Melanom-Zelllinien eine tendenziell schwächere Expression von bcl-X_S als die NHM. Die Enden der PCR-Primer waren so gewählt, dass vollständige cDNA von bcl-X_L und bcl-X_S simultan amplifiziert werden konnte. Die Amplifizierung von β -Aktin diente als Kontrolle.

3.3. Überexpression von Bcl-2 in stabil transfizierten Melanom-Zelllinien

Zum besseren Verständnis der Rolle von Bcl-2 für die Apoptoseresistenz von Melanom-Zellen wurden die beiden Zelllinien A-375 (etabliert von einem primären Melanom) und Mel-HO (Melanom-Metastase) mit einem pIRES1neo/mbcl-2-Plasmid (Müller-Wieprecht et al., 2000) sowie mit dem pIRES1neo/Vektor als Kontrolle nach einem in unserem Labor speziell für Melanom-Zellen angepassten Protokoll stabil transfiziert. Das Plasmid pIRES1neo/mbcl-2 enthält neben den Resistenzgenen für Geneticin-418 und Ampicillin eine hinter dem konstitutiv aktiven CMV (Cytomegalie-Virus)-Promotor klonierte murine vollständige cDNA des bcl-2-Gens. Die Expression des bcl-2-Gens ist über eine pIRES-Sequenz an die Expression des Resistenzgens gekoppelt, so dass die resistenten Klone auch das klonierte bcl-2-Gen exprimieren sollten.

Die Zelllinien wurden bei 50% Konfluenz mit pIRES/mbcl-2 unter Verwendung von Pfx-2-Lipiden (Invitrogen) transfiziert. Nach zwei Tagen wurde die Selektion mit Geneticin-418 begonnen. Überlebende Klone wurden vereinzelt, in Kultur vermehrt und im Western Blot mit einem Antikörper auf Bcl-2-Expression getestet. Eine Überexpression des Bcl-2-Proteins konnte in allen untersuchten Klonen beider Melanom-Zelllinien im Western Blot nachgewiesen werden (Abb.18). Die Quantifizierung für jeweils 3 Klone ergab eine 40- bis 50-fache Erhöhung der Bcl-2-Expression im Vergleich zu Vektor-Transfektanten für die Klone A375-Bcl-2 und eine 20- bis 30-fache Erhöhung für Mel-HO-Bcl-2 Klone. Um zu untersuchen, ob die Überexpression des Bcl-2-Proteins auch eine Bax-Regulation nach sich

zieht, wurde dieselbe Membran mit einem polyklonalen Anti-human-Bax-Antikörper inkubiert. Eine signifikante Änderung der Bax-Expression konnte im Western Blot aber nicht festgestellt werden (Abb.18). Pro Zelllinie wurden zwei Bcl-2-Klone für die nachfolgenden Experimente ausgewählt.

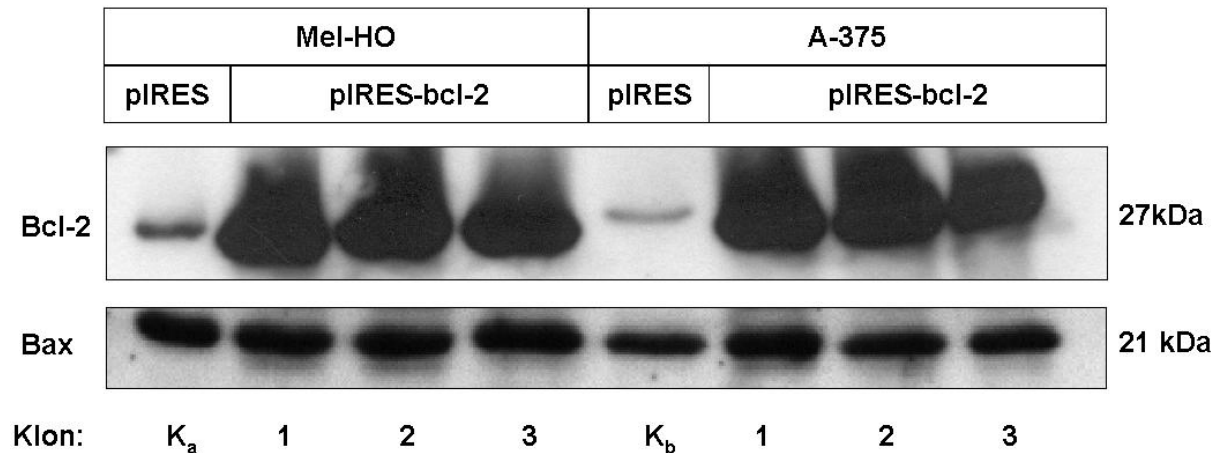


Abb.18: Überexpression des Bcl-2 Proteins in stabil mit pIRES1neo/mbcl-2 transfizierten A-375 und Mel-HO Zellen.

Die konstitutive Überexpression von Bcl-2 ist exemplarisch in jeweils 3 Klonen der Melanom-Zelllinien Mel-HO (1, 2 und 3) und A-375 (1, 2 und 3) gezeigt. Die Inkubation mit dem Anti-human-Bax-Antikörper ließ keine Änderung der Bax-Expression nach Überexpression von Bcl-2 erkennen. Die basale Expression von Bcl-2 und Bax ist in den Kontrollen Mel-HO (K_a) und A-375 (K_b) zu sehen, die mit dem pIRES1neo-Vektor allein transfiziert wurden.

3.3.1. Einfluss der Überexpression von Bcl-2 auf die Fas-vermittelte Apoptose in Melanom-Zelllinien

Die mit Bcl-2 transfizierten Melanom-Zellklone Mel-HO/Bcl-2 (1, 2) und A-375/Bcl-2 (2, 3) wurden auf ihre Sensitivität gegenüber dem agonistischen Fas-Antikörper CH-11 getestet. Dazu wurden die Zellen bei 60%iger Konfluenz nach 38 Stunden in Kultur für weitere 10 Stunden mit dem CH-11-Antikörper inkubiert und anschließend die Apoptoserate mittels ELISA quantifiziert. Konstitutive Bcl-2-Überexpression reduzierte die basale Apoptoserate in Mel-HO-Klonen um den Faktor 7 (Klon 1) bzw. 5 (Klon 2) und in A-375-Klonen um den Faktor 3 (Klon 2) bzw. 5 (Klon 3). Parallel verringerte sich die durch CH-11 ausgelöste Apoptose in den Mel-HO-Klonen um den Faktor 22 (Klon 1) bzw. 9 (Klon 2) und in den A-375-Klonen um den Faktor 8 (Klon 2) bzw. 16 (Klon 3) (Abb.19). Dies belegt die kritische Rolle der Bax/Bcl-2-Rate als Rheostat, der die Anfälligkeit der Zellen für Apoptose bestimmt (Raisova et al., 2001).

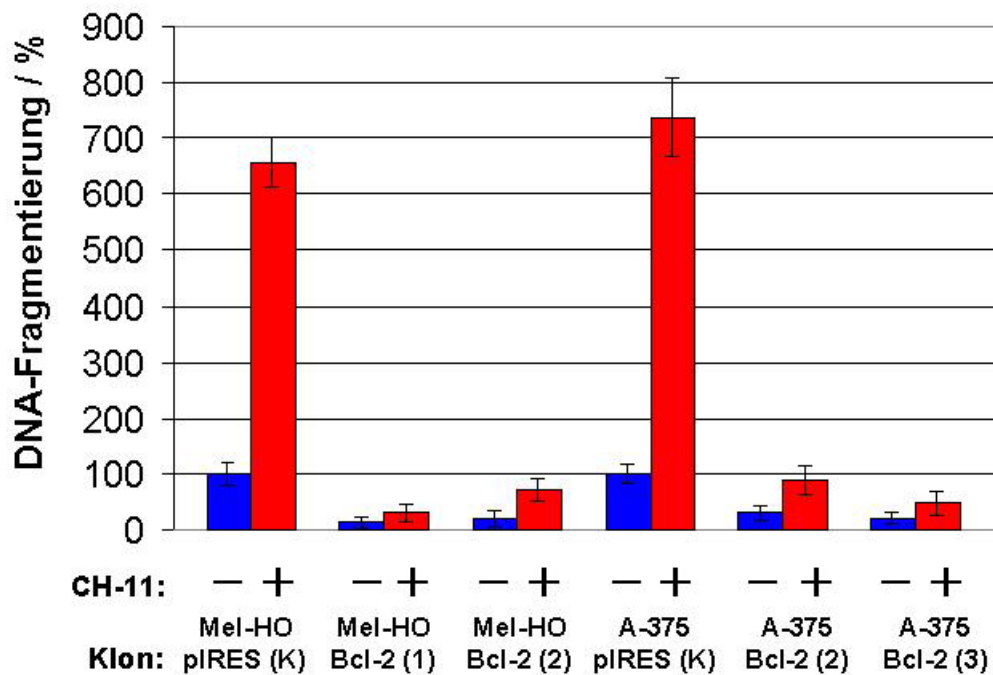


Abb.19: Überexpression von Bcl-2 inhibiert Fas-vermittelte Apoptose.

Stabil mit Bcl-2 oder zur Kontrolle mit dem Vektor pIRES transfizierte Klone (K) von Mel-HO-Zellen (Klon 1 und 2) und A-375-Zellen (Klon 2 und 3) wurden 10 Stunden mit (+) bzw. ohne (-) CH-11 inkubiert und anschließend die Apoptoserate bestimmt. Angegeben ist jeweils die absolute Apoptoserate bezogen auf den Kontrollwert ohne CH-11 (-), der gleich 100% gesetzt wurde.

3.4. Klonierung von bcl-X_L- und bcl-X_S-Konstrukten

3.4.1. TOPO-TA-Klonierung von bcl-X_L und bcl-X_S

Mittels RT-PCR unter Verwendung von einem Primerpaar wurde die vollständige cDNA beider bcl-X-Spleissvarianten, bcl-X_L und bcl-X_S, hergestellt und amplifiziert. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abb.20) und aus dem Gel eluiert. Das amplifizierte cDNA-Fragment von bcl-X_L war 765 bp und das von bcl-X_S 576 bp lang.

Abb.20: Herstellung der vollständigen $bcl-X_L$ - und $bcl-X_S$ -cDNA mittels RT-PCR.

RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR wurden in Abschnitt 2.2.3. beschrieben.

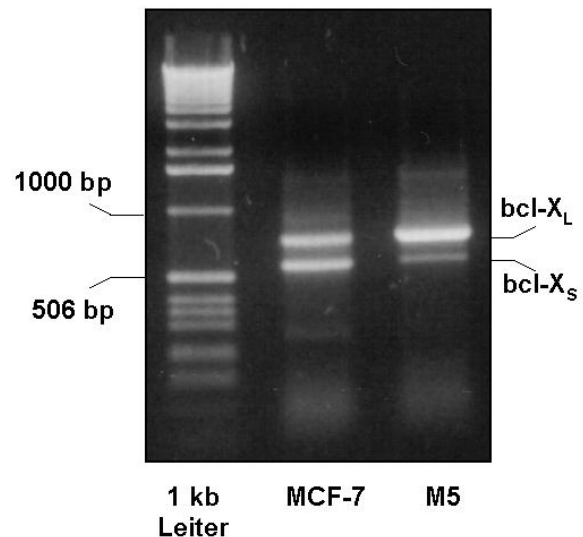
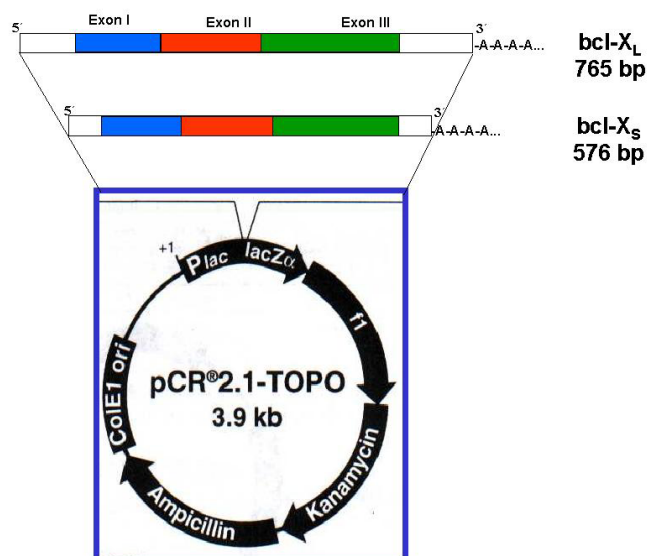


Abb.21: Klonierung von $bcl-X_L$ und $bcl-X_S$ mittels RT-PCR in einen TOPO-TA-Vektor.

Der linearisierte Vektor wurde mit $bcl-X_L$ - bzw. $bcl-X_S$ -cDNA ligiert, die Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt und anschließend analysiert.



Nachfolgend wurden die Fragmente mit dem TOPO-TA-Klonierungsvektor (Invitrogen), der speziell für PCR-Klonierungen geeignet ist, ligiert (Abb.21) und in kompetente Zellen (*E. coli*, DH-5 α) transformiert. Die Zellen wurden auf Agarplatten mit dem Selektions-Antibiotikum Ampicillin selektiert. Von den weißen Klonen (vom Insert zerstörtes LacZ-Gen) wurden einige kultiviert und nach der Plasmid-Präparation einem Restriktionsverdau unterzogen. Nach Bestätigung des erwarteten Restriktionsmusters wurde die korrekte Basenabfolge der klonierten cDNA-Fragmente durch DNA-Sequenzierung beider Stränge nachgewiesen.

3.4.2. Subklonierung von *bcl-X_L* und *bcl-X_S* in das Plasmid pTRE

Für die Untersuchungen in Melanom-Zellen wurde ein Expressionssystem mit induzierbaren Promotoren verwendet. Das Tet-On-System (Gossen und Bujard, 1992) ist in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert, und einige Tet-On-Melanom-Zelllinien standen zur Verfügung (Eberle et al., 2002). Die klonierten cDNA-Fragmente von *bcl-X_L* bzw. *bcl-X_S* wurden über *EcoR* I Schnittstellen in den Vektor pTRE (Clontech) hinter den mit Tetracyclin oder Doxycyclin induzierbaren CMV-Promotor kloniert (Abb.22). Der Vektor wurde dazu in dephosphorylierter Form verwendet, um eine Religation von pTRE zu verhindern. Die Plasmid-DNA von jeweils 10 erhaltenen Bakterienklonen wurde durch Minipräparation isoliert und in einer Restriktionsanalyse auf die Orientierung des klonierten Gens hin überprüft. Für beide Spleissvarianten wurden mehrere Klone in „Sense“-Orientierung sowie in „Antisense“-Orientierung gefunden. Je cDNA und Orientierung wurde ein Klon ausgewählt und einer Maxipräparation mit einem Endotoxin-freien DNA-Kit (Qiagen) unterzogen. Nach der Plasmid-Präparation wurden die Klone mit Hilfe einer detaillierten Restriktionsanalyse weiter charakterisiert.

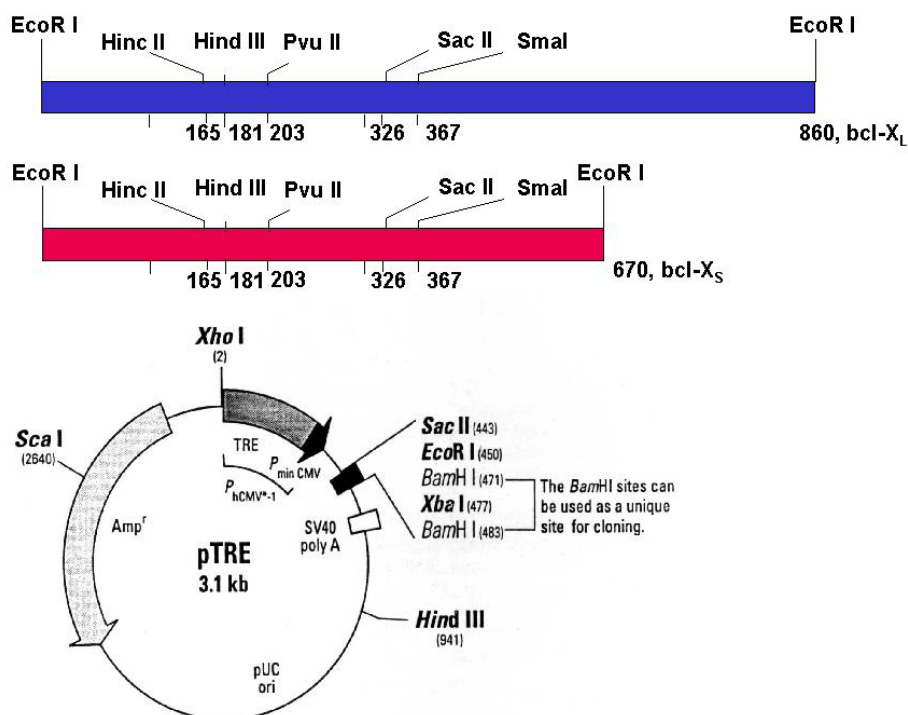


Abb.22: Klonierte cDNA von *bcl-X_L* und *bcl-X_S* sowie der pTRE-Vektor.

3.4.3. Überprüfung der Orientierung der *bcl-X_L*- und *bcl-X_S*-Konstrukte mittels Restriktionsanalyse

Nach der Insertion von *bcl-X_L* und *bcl-X_S* in pTRE wurden jeweils 10 Klone überprüft und von diesen je drei positive Klone weiter untersucht. Die rekombinanten DNA-Plasmide wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt. Die entstandenen Fragmente wurden mit der Restriktionskarte (Abb.22) verglichen: Sense-Orientierung zeigte sich bei Restriktion mit Hind III durch zwei Fragmente mit 1170 und 2695 bp für *bcl-X_L* bzw. 980 und 2694 bp für *bcl-X_S*; Antisense-Orientierung führte bei *bcl-X_L* zu zwei Fragmenten von 535 und 3330 bp bzw. bei *bcl-X_S* zu 574 und 3101 bp Fragmenten (Abb.23). Die Orientierung wurde mit weiteren Restriktionsenzymen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Restriktionsmuster belegten, dass die Fragmente sowohl in Sense- als auch Antisense-Orientierung richtig in den Vektor eingebaut waren.

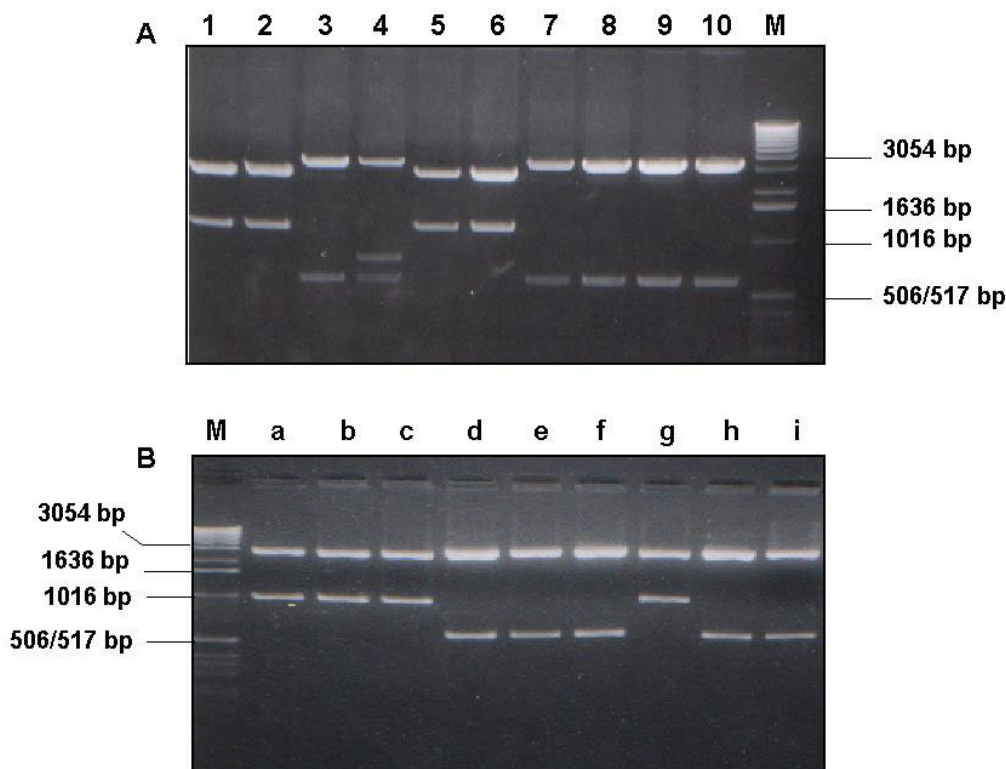


Abb.23: Restriktionsanalyse von pTRE-*bcl-X_L* und pTRE-*bcl-X_S* durch Hind III.

A (*bcl-X_L*): Spur 1, 2, 5 und 6 mit Sense-Orientierung: 1170 bp und 2695 bp;
Spur 3, 7, 8, 9 und 10 mit Antisense-Orientierung: 535 bp und 3330 bp;
M: Marker (1kb Leiter).

B (*bcl-X_S*): Spur a, b, c und g mit Sense-Orientierung: 980 bp und 2694 bp;
Spur d, e, f, h und i mit Antisense-Orientierung: 574 bp und 3101 bp.

3.4.4. Transiente Transfektion von Bcl-X_S und Bcl-X_L in Melanom-Zelllinien

Bcl-X_S und Bcl-X_L wurden hinsichtlich ihrer Apoptose-relevanten Funktionen in drei verschiedenen Melanom-Zelllinien überprüft. Dazu wurden die Zelllinien SKM-13-Tet-On, BRO-Tet-On und Mel-2A-Tet-Off verwendet, die durch stabile Transfektion mit dem Tet-On- bzw. Tet-Off-Plasmid aus den parentalen Zelllinien SK-Mel-13, BRO und Mel-2A generiert worden waren (Eberle et al., 2002, 2003). Nach transienter Transfektion mit pTRE-bcl-X_S bzw. pTRE-bcl-X_L zeigte die Analyse im Western Blot die Überexpression der exogenen Proteine mit unterschiedlicher Stärke in den drei untersuchten Melanom-Zelllinien. Die Expression der Proteine wurde dabei in SKM-13-Tet-On und BRO-Tet-On durch Zugabe von Doxycyclin sowie in Mel-2A-Tet-Off durch Entzug von Doxycyclin induziert (Bcl-X_S: Abb.24 , Bcl-X_L: Abb.25).

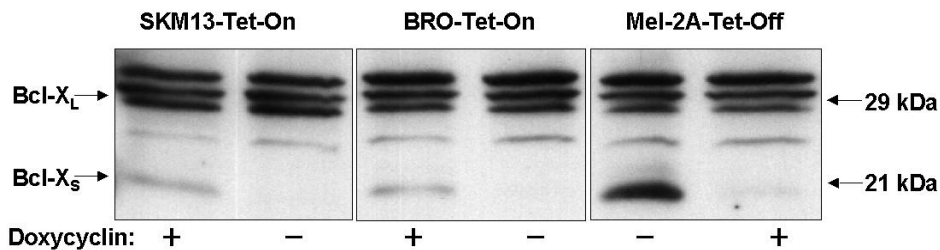


Abb.24: Überexpression von Bcl-X_S nach transienter Transfektion.

Induzierte Überexpression von Bcl-X_S in drei Tetracyclin-regulierbaren Melanom-Zelllinien. In SKM13-Tet-On und BRO-Tet-On wird die Expression durch Zugabe, in Mel-2A-Tet-Off durch Entzug von Doxycyclin induziert. Der Western Blot zeigt eine relativ starke Expression von Bcl-X_S nach Doxycyclin-Entzug (-) in Mel-2A-Tet-Off im Vergleich zu nicht induzierenden Bedingungen (+); SKM13-Tet-On und BRO-Tet-On zeigten nach Doxycyclin-Behandlung (+) eine relativ schwächere aber dennoch deutliche Expression von Bcl-X_S.

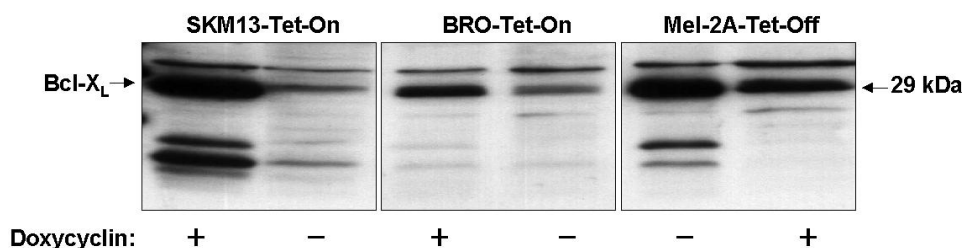


Abb.25: Überexpression von Bcl-X_L nach transienter Transfektion.

Induzierte Überexpression von Bcl-X_L in drei Tetracyclin-regulierbaren Melanom-Zelllinien. In SKM13-Tet-On und BRO-Tet-On wird die Expression durch Zugabe, in Mel-2A-Tet-Off durch Entzug von Doxycyclin induziert. Der Western Blot zeigt eine deutlich stärkere Expression von Bcl-X_L nach Doxycyclin-Behandlung (+) in SKM13-Tet-On und nach Doxycyclin-Entzug (-) in Mel-2A-Tet-Off als unter nicht induzierenden Bedingungen in den beiden Zelllinien. Die BRO-Tet-On Zelllinie zeigte eine deutliche, aber schwächere Induktion von Bcl-X_L nach Doxycyclin-Behandlung (+). In allen Transfektanten waren nach transienter Transfektion mit Bcl-X_L auch zusätzliche Banden von nicht geklärter Bedeutung detektierbar.

Nach transientscher Transfektion von $bcl-X_S$ und $bcl-X_L$ in die drei Melanom-Zelllinien SKM-13-Tet-On, BRO-Tet-On und Mel-2A-Tet-Off wurde die Apoptoseregulation mittels des Cell Death Detection ELISA (Roche) untersucht. Die Quantifizierung ergab bei SKM13-Tet-On sowie Mel-2A-Tet-Off nach Induktion von $Bcl-X_S$ eine signifikant erhöhte Apoptoserate, und die Induktion von $Bcl-X_L$ verringerte die Apoptoserate in Mel-2A-Tet-Off- und Bro-Tet-On-Zellen (Abb.26). Auffällig bei diesen durch transiente Transfektionen erzielten Ergebnissen war eine zum Teil große Schwankungsbreite, die eine genaue Bestimmung der Apoptose-relevanten Funktionen von $Bcl-X_S$ und $Bcl-X_L$ erschwerten. Zur Bestätigung der vermuteten proapoptotischen Wirkung von $Bcl-X_S$ und antiapoptotischen Wirkung von $Bcl-X_L$ wurden daher stabile Transfektionen durchgeführt.

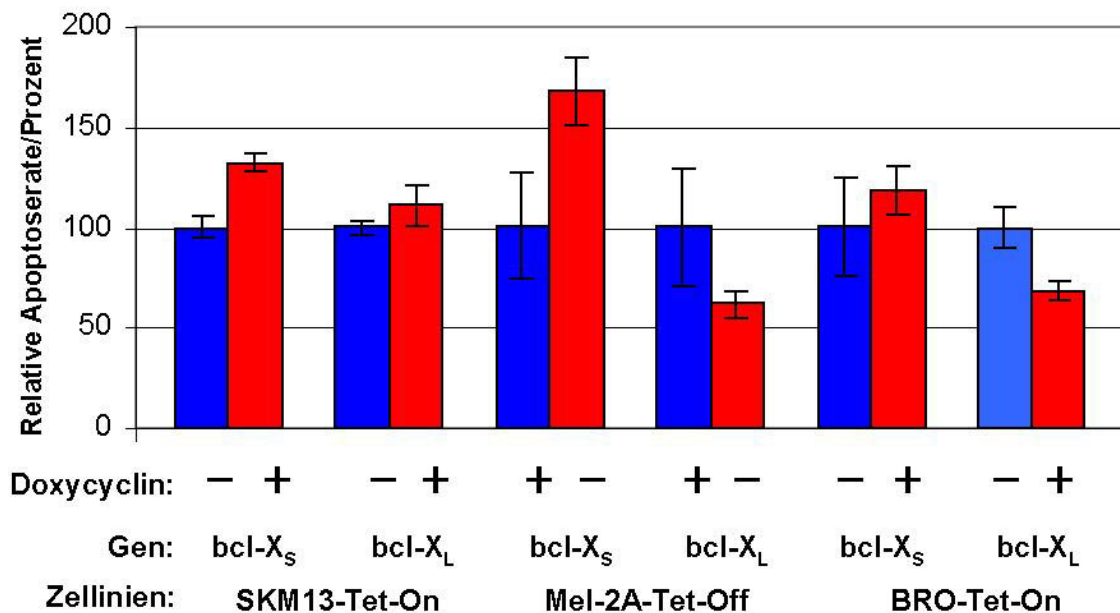


Abb.26: DNA-Fragmentierung nach Überexpression von $Bcl-X_S$ und $Bcl-X_L$ durch transiente Transfektion.

Drei Tetracyclin-regulierbare Melanomzelllinien wurden mit der vollständigen cDNA des humanen $bcl-X_S$ - bzw. $bcl-X_L$ -Gens transient transfiziert. Nach 48 Stunden Behandlung mit Doxycyclin (+) in SKM13-Tet-On und BRO-Tet-On sowie Entzug von Doxycyclin (-) bei Mel-2A-Tet-Off im Vergleich zu nicht induzierenden Bedingungen wurde die Apoptose gemessen. Die DNA-Fragmentierung wurde photometrisch mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA (Roche) bestimmt, nicht induzierte Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. Jedes Experiment wurde dreimal in Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.4.5. Stabile Transfektion der Melanom-Zelllinie SKM13-Tet-On mit $bcl-X_L$ und $bcl-X_S$

Zur Transfektion mit pTRE- $bcl-X_L$ und pTRE- $bcl-X_S$ wurde die Zelllinie SKM13-Tet-On verwendet, die bereits mit dem Tet-On-Plasmid transfiziert worden war (Abb.27A). Das Tet-On-Plasmid vermittelt Geneticin-Resistenz, so dass unter selektiven Bedingungen nur transfizierte Zellen wachsen. Bei 50-60% Konfluenz wurde SKM13-Tet-On mit den Plasmiden pTRE- $bcl-X_L$ bzw. pTRE- $bcl-X_S$ sowie dem Plasmid pTK-Hyg kotransfiziert. Das Plasmid pTK-Hyg vermittelt Hygromycin-Resistenz. Unter Geneticin/Hygromycin-Doppelselektion wurden dann stabile doppelt transfizierte Klone herangezüchtet. Die folgenden Abbildungen zeigen den zeitlichen Verlauf der Transfektionen (27B/C). SK-Mel-13-Zellen zeigen relativ starkes Wachstum in der Zellkultur. Sie unterscheiden sich von Melanozyten-Kulturen, da sie sich rasch teilen, morphologisch dedifferenziert erscheinen (Abb.27) und weniger Melanin enthalten. Melanozyten dahingegen haben längere dendritische Ausläufer (Eberle et al., 1993). Bei einer Konfluenz von 50-60% wurden die Zellen transfiziert und nach zwei Tagen (80-100% konfluent) in Selektionsmedium mit 400 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin kultiviert. Nach 15 Tagen Hygromycin-Behandlung waren etwa 90% der Zellen abgestorben (Abb.27B). Von den überlebenden Zellen wuchsen einzelne Klone an (Abb.27C). Das Wachstum der isolierten einzelnen Klone und die weitere Passage dauerten 9 Wochen. Nachdem die stabilen Zelllinien 70% Konfluenz erreicht hatten, wurden sie zur Induktion mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin behandelt. Die Zellen wurden nach zwei Tagen geerntet und auf mRNA- Ebene untersucht.

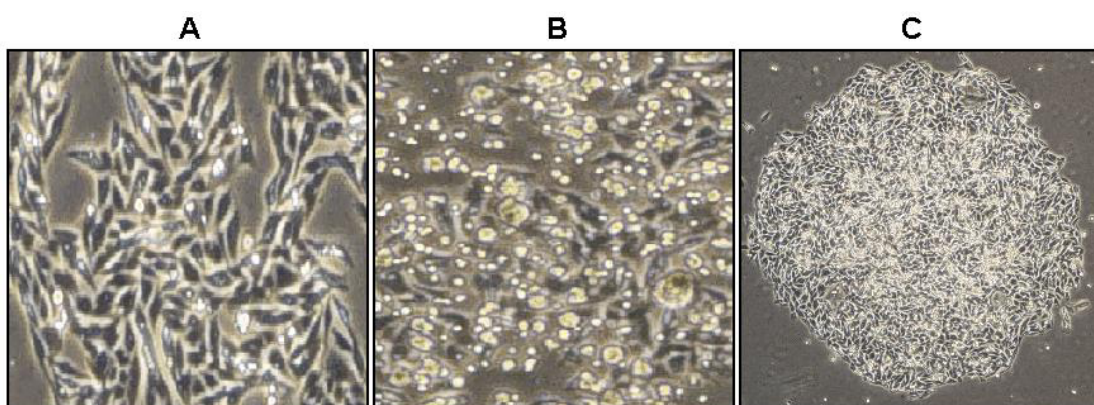


Abb.27: A: SKM13-Tet-On Zelllinie vor der Transfektion. B: Die Selektion nach der Transfektion. C: Stabil mit pTRE- $bcl-X_S$ transfizierter Einzelklon.

Sechs Wochen nach Vollendung der Selektion hatten sich einzelne Zellhaufen gebildet, die nach weiterer Kultivierung bis zu ausreichender Größe (C) von den anderen Zellhaufen separiert wurden. Diese Einzelklone wurden nach Induktion mit Doxycyclin auf die Expression von $Bcl-X_S$ bzw. $bcl-X_L$ untersucht.

3.4.6. Screening der transfizierten SKM13-Zellklone mittels Northern Blot

Aus je 40 Einzelklonen von SKM13- X_S und SKM13- X_L wurde nach 48 Stunden Inkubation mit Doxycyclin die Gesamt-RNA isoliert und im Northern Blot analysiert. Zur Hybridisierung wurde die cDNA von $bcl-X_L$ als radioaktiv markierte Sonde verwendet. Von den jeweils 40 untersuchten transfizierten Klonen exprimierten 10 $bcl-X_S$ -Klone und 19 $bcl-X_L$ -Klone die gesuchte mRNA. Die Abbildung 28a/b zeigt die Überexpression von $bcl-X_S$ als auch von $bcl-X_L$ nach Doxycyclin-Behandlung. Bei einigen Klonen wurde die Expression auch ohne Behandlung mit Doxycyclin beobachtet, vermutlich bedingt durch eine Durchlässigkeit des Promotors im pTRE-Plasmid. Die endogene $bcl-X_L$ -mRNA wurde bei einer Größe von 2,9 kb, exogene $bcl-X_L$ -mRNA aufgrund des Konstruktes jedoch bei 0,8 kb detektiert (28b). Die exogene $bcl-X_S$ -mRNA wurde bei 0,7 kb detektiert (Abb.28a)

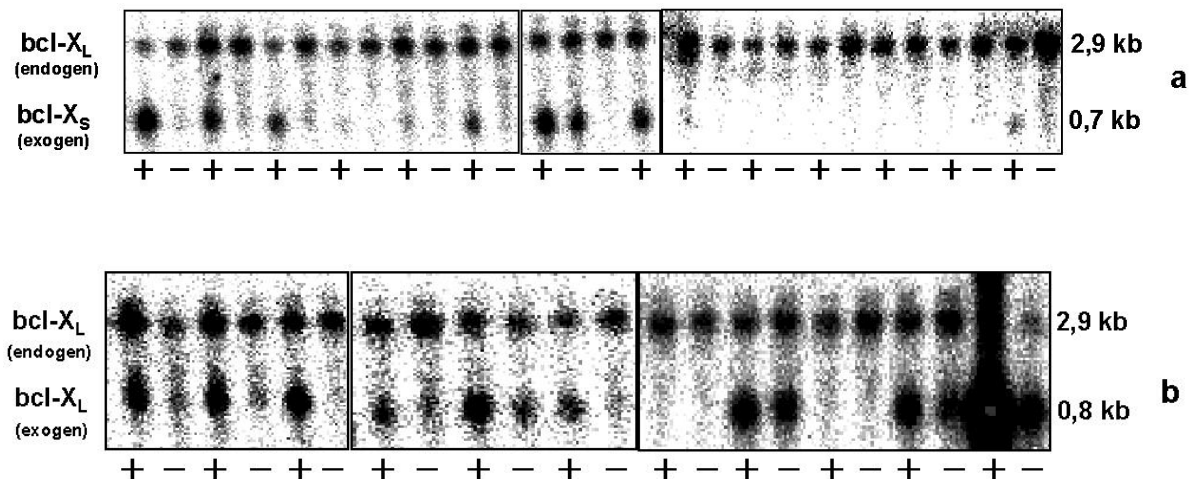


Abb.28: Detektion der exogenen mRNA von a: $bcl-X_L$ und b: $bcl-X_S$ in SKM13-Klonen mittels Northern Blot.

(+): mit Doxycyclin-, (-): ohne Doxycyclin-Behandlung

3.5. Proteinexpression von Bcl-X_L und Bcl-X_S in SKM13-Klonen

Vier stabil mit $bcl-X_S$ und zwei mit $bcl-X_L$ transfizierte Klone von SKM13-Tet-On wurden nach 48-stündiger Inkubation mit Doxycyclin auf Proteinebene analysiert. Je 60 µg Gesamt-Protein wurden im Western Blot mit dem polyklonalen Anti-human-Bcl-X-Antikörper, der beide Spleissvarianten erkennt, analysiert.

Die vier Subklone von Bcl-X_S (Bcl-X_S-1, Bcl-X_S-3, Bcl-X_S-4 und Bcl-X_S-5) zeigten eine unterschiedlich starke Expression von Bcl-X_S (Abb.29). Die Quantifizierung der Banden ergab eine um das 10-50-fache gesteigerte Expression nach Doxycyclin-Behandlung im

Vergleich zu nicht induktiven Bedingungen. Die zwei Bcl-X_L-Subklone zeigten eine 3-fache Erhöhung der Expression von Bcl-X_L im Vergleich zu nicht induktiven Bedingungen (Abb.30). Eine geringe Basisexpression von Bcl-X_S-Protein wurde unter nicht induktiven Bedingungen beobachtet, die auf die Durchlässigkeit des Promotors zurückzuführen ist. Dies war bei den Bcl-X_L-Subklonen stärker ausgeprägt als bei der Bcl-X_S-Klonen, was damit erklärt werden könnte, dass die basale Expression von Bcl-X_S einen Selektionsnachteil darstellt und die basale Bcl-X_L-Überexpression möglicherweise den Zellen einen Wachstumsvorteil verleiht.

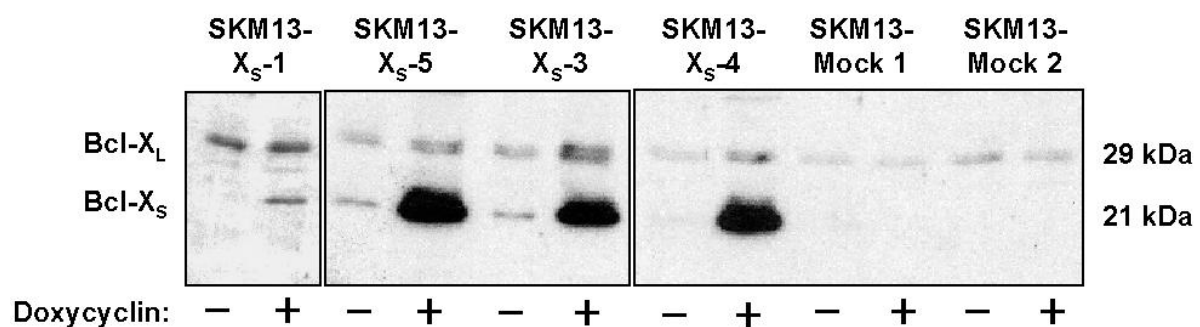
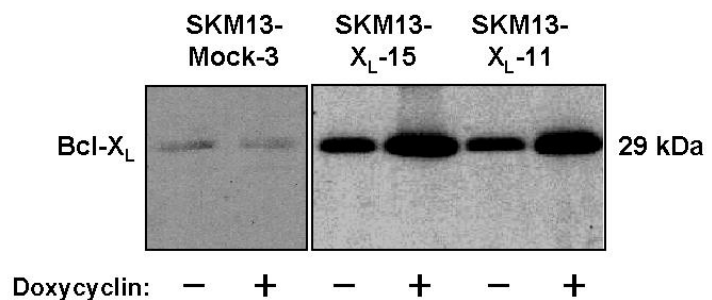


Abb.29: Überexpression von Bcl-X_S-Protein in stabilen SKM13-Subklonen.

Induzierte Überexpression von Bcl-X_S in vier Tetracyclin-regulierbaren Subklonen von SK-Mel-13. Der Western Blot zeigt eine starke Expression von Bcl-X_S nach Doxycyclin-Behandlung (+) im Vergleich zu nicht induzierenden Bedingungen (-) in den Klonen 3, 4 und 5, während in Klon 1 die Expression schwach war. Mock 1 und Mock 2 sind hier als Negativ-Kontrolle gezeigt.

Abb.30: Überexpression von Bcl-X_L-Protein in stabilen SKM13-Subklonen.

Induzierte Überexpression von Bcl-X_L in zwei Tetracyclin-regulierbaren Subklonen von SKM13-Tet-On. Der Western Blot zeigt eine deutlich stärkere Expression von Bcl-X_L nach Doxycyclin-Behandlung (+) als unter nicht induzierenden Bedingungen (-). Mock 3 ist hier als Negativ-Kontrolle dargestellt.



3.6. Einfluss der Überexpression von Bcl-X_S und Bcl-X_L auf die basale Apoptoserate

Stabil mit Bcl-X_S bzw. Bcl-X_L transfizierte Klone von SKM13-Tet-On wurden 48 Stunden nach Doxycyclin-Induktion hinsichtlich der Apoptose mittels ELISA untersucht. Alle vier Subklone von Bcl-X_S zeigten erhöhte Apoptoseraten nach Doxycyclin-Induktion (Abb.30).

Die Quantifizierung ergab in den Subklonen Bcl-X_S-3, Bcl-X_S-4 und Bcl-X_S-5 im Vergleich zu nicht induktiven Bedingungen eine auf 270%, 200% bzw. 300% erhöhte Apoptoserate. Im Gegensatz dazu war in den beiden Subklonen von Bcl-X_L eine leichte Inhibition der basalen Apoptose festzustellen (Abb.31). Der Klon Bcl-X_S-1 mit einer deutlich geringeren Expression von Bcl-X_S im Vergleich zu den anderen Klonen zeigte dementsprechend auch nur eine niedrige Apoptoserate.

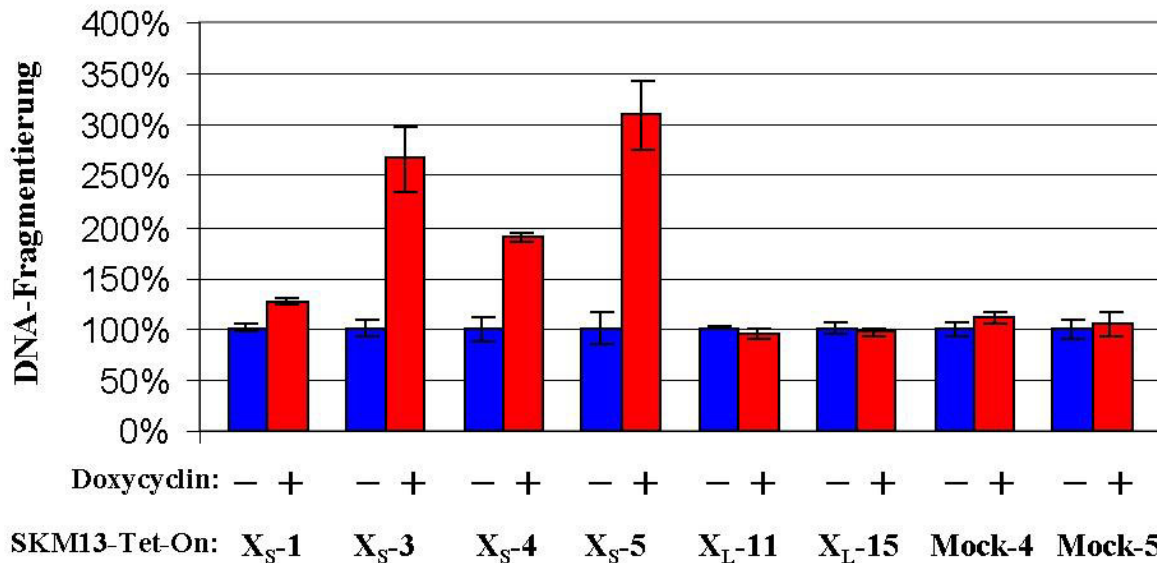


Abb.31: Erhöhte DNA-Fragmentierung nach Überexpression von Bcl-X_S in SKM13-Subklonen. Vier Bcl-X_S-Subklone und zwei Bcl-X_L-Subklone wurden 48 Stunden mit Doxycyclin behandelt (+) bzw. nicht behandelt (-). Die DNA-Fragmentierung wurde photometrisch mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA (Roche) bestimmt, nicht behandelte Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. Die Experimente wurden dreimal in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Parallel wurde untersucht, ob sich die Bcl-X_S-Überexpression zytotoxisch auf die Zellen auswirkt. Zu diesem Zweck wurden die Zellkultur-Überstände der Bcl-X_S- und Bcl-X_L-Klone auf ihren Gehalt an LDH (Lactat-Dehydrogenase) überprüft. LDH ist ein Enzym, das beim zytotoxischen Zelltod im Medium nachweisbar ist. Die Bcl-X_S-Subklone zeigten nur eine geringe Erhöhung der Zytotoxizität nach Doxycyclin-Induktion im Vergleich zur Apoptoseinduktion. (Abb.32).

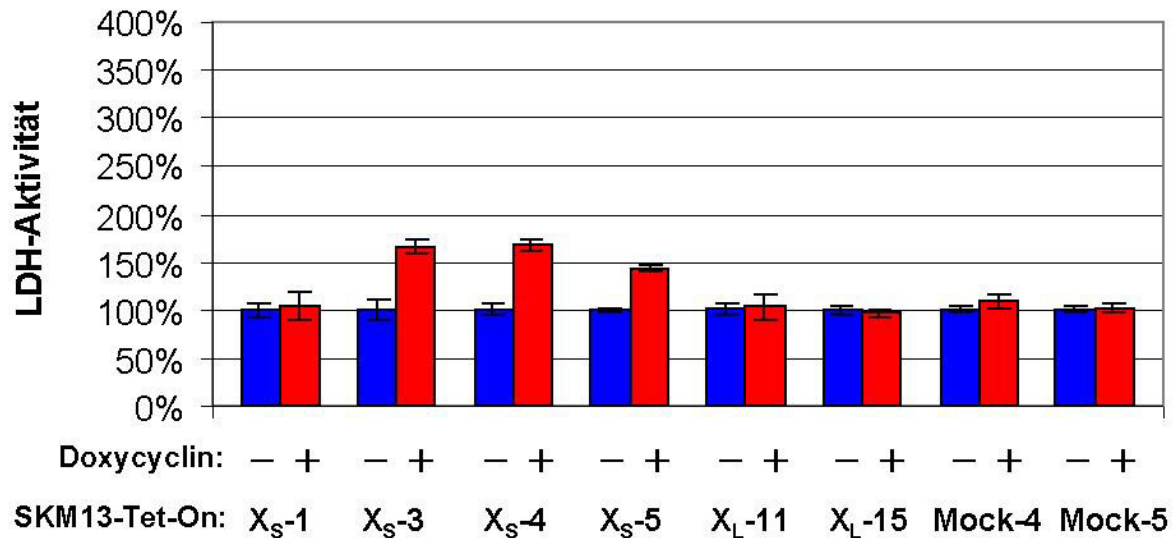


Abb.32: Geringer zytotoxischer Effekt durch Bcl-X_S-Überexpression.

Die Zytotoxizität wurde parallel zur Apoptosemessung photometrisch durch die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase gemessen. Rote Säulen repräsentieren Doxycyclin-behandelte Zellen (+) und blaue unbehandelte Zellen (-), die gleich 100% gesetzt wurden. Die Werte der behandelten Zellen wurden darauf bezogen.

3.7. Apoptose-Kinetik der stabil mit Bcl-X_S transfizierten Zellen nach Doxycyclin-Induktion

Die Durchführung von Kinetik-Experimenten für die SKM13-X_S- und SKM13-X_L-Klone diente zur Bestimmung der maximale Apoptoserate. Die Expression von Bcl-X_S konnte acht Stunden nach Doxycyclin-Induktion im Western Blot mit dem polyklonalen Anti-human-Bcl-X-Antikörper, der beide Spleissvarianten erkennt, detektiert werden. Die maximale Expression wurde nach 36 Stunden erreicht (Abb.33B). Parallel dazu stieg die Apoptoserate durch die Bcl-X_S-Expression nach acht Stunden unter Doxycyclin und erreichte ihr Maximum bei 36 Stunden (Abb.33A). Die Expression von Bcl-X_L wurde bereits beim ersten Messwert nach vier Stunden detektiert und nahm bis zum letzten Messwert von 48 Stunden zu (Abb.33B), im Gegensatz dazu änderte sich die Apoptoserate jedoch bei Bcl-X_L-transfizierten Zellen nicht wesentlich. Die Zytotoxizität war für beide Subklone nur gering.

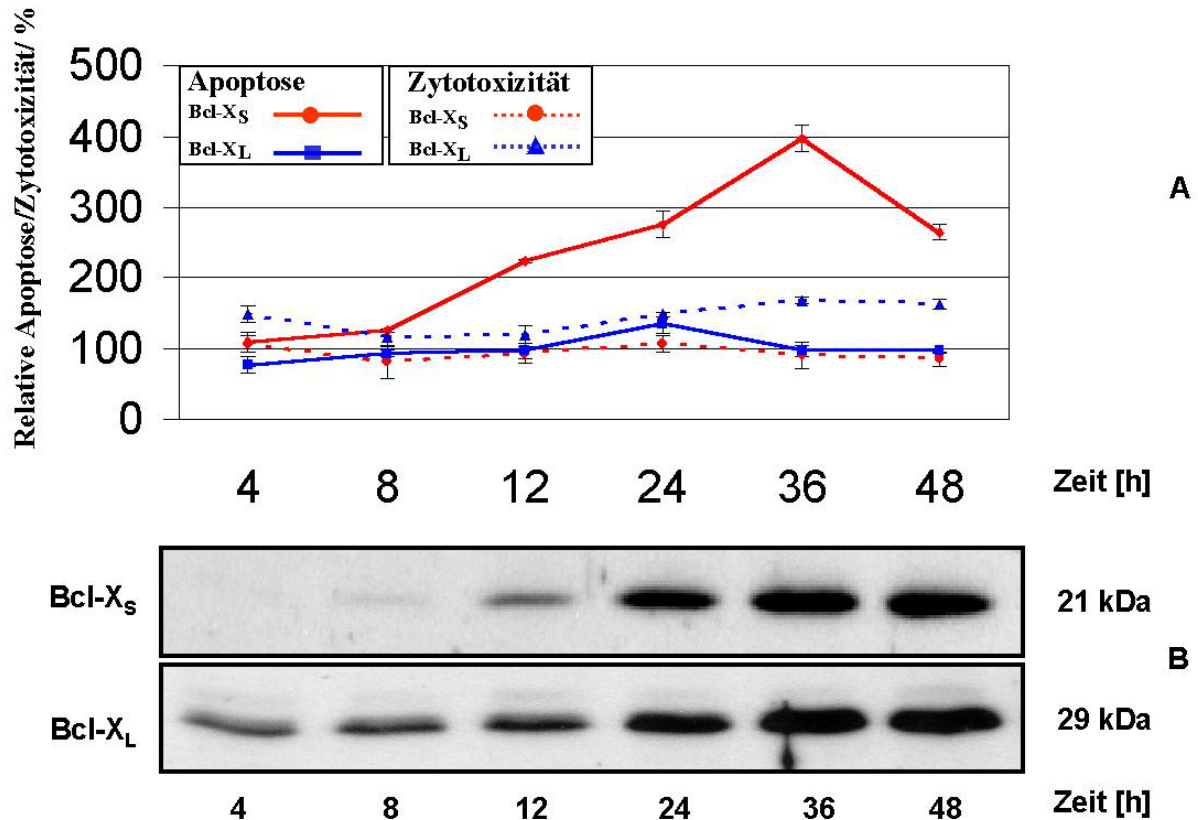


Abb.33: Die Bcl-X_S-Überexpression wirkt im Gegensatz zu Bcl-X_L in Melanom-Zellen proapoptotisch.

In beiden stabilen SKM13-Subklonen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion von Bcl-X_S bzw. Bcl-X_L mit Doxycyclin die Apoptoserate mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA bzw. die Zytotoxizität mittels LDH-Aktivität bestimmt. Parallel dazu wurde die Proteinexpression im Western Blot mit einem Antikörper, der beide Spleissvarianten von Bcl-X erkennt, untersucht.

3.8. Inhibition von Fas-vermittelter Apoptose durch Bcl-X_L-Überexpression

Das antiapoptotische Bcl-X_L-Protein kann in vielen Zellen Apoptose, die über mitochondriale Wege vermittelt wird, blockieren. Hier wurde die Wirkung der Bcl-X_L-Überexpression auf Fas-vermittelte Apoptose in den SKM13-Klonen Bcl-X_L-11 und Bcl-X_L-15 getestet. Als Kontrolle wurden Vektor-transfizierte Zellen (Mock) verwendet. Nach 38 Stunden Doxycyclin-Induktion von Bcl-X_L und weiteren zehn Stunden Inkubation mit dem agonistischen Fas-Antikörper CH-11 wurden die Apoptoseraten bestimmt. Während CH-11 in den Mock-transfizierten Zellen den bereits bekannten starken Anstieg der Apoptose auslöste, wurde dieser proapoptotische Effekt durch Bcl-X_L-Überexpression signifikant reduziert (Abb.34). Die Wirkung wurde schon durch die latente Bcl-X_L-Expression (wegen der „Promotor-Durchlässigkeit“) ohne Doxycyclin-Zugabe erreicht, konnte aber nach Induktion

in der Tendenz noch gesteigert werden. Durch die Induktion von Bcl-X_L war auch eine Tendenz zur Reduktion der basalen Apoptoserate in beiden Klonen festzustellen.

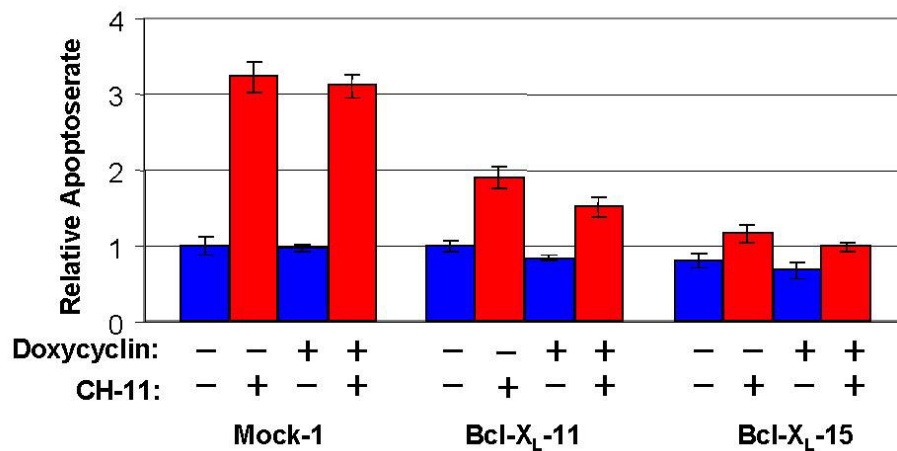


Abb.34: Bcl-X_L-Überexpression inhibiert Fas-vermittelte Apoptose.

Die SKM13-Klone Mock 1, Bcl-X_L-11 und Bcl-X_L-15 wurden ohne oder mit Doxycyclin kultiviert. Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen mit dem agonistischen Fas-Antikörper CH-11 behandelt. Die Fas-vermittelte Apoptose wurde durch Bcl-X_L signifikant reduziert: Gezeigt ist die relative Apoptoserate im Vergleich zu Kontrollen ohne Doxycyclin bzw. ohne CH-11.

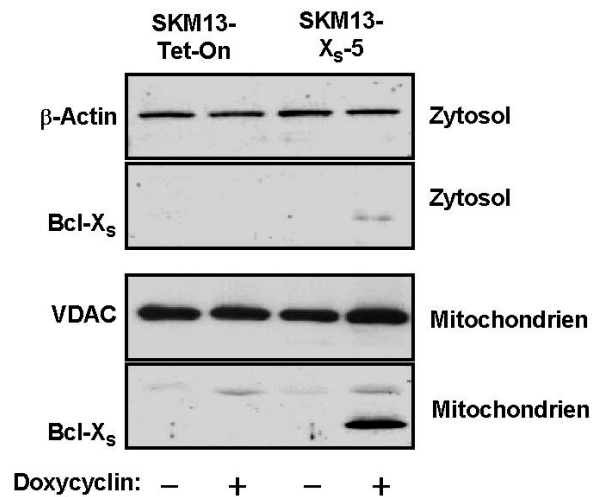
3.9. Der Mechanismus der Bcl-X_S-vermittelten Apoptose

3.9.1. Lokalisierung des Bcl-X_S-Proteins

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich die inaktive Form des endogenen Bcl-X_S-Proteins im Zytosol befindet und das Protein nach Erhalt eines Todessignals durch eine Konformationsänderung aktiviert wird. Es kann daraufhin in die äußere mitochondriale Membran wandern und dort durch Komplexbildung mit antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-X_L deren Effekt aufheben (Jia et al., 1999; Lindenboim et al., 2000). Um zu untersuchen, wo sich das exogene Bcl-X_S nach der Überexpression in Melanom-Zellen befand, wurden SKM13-Bcl-X_S-5-Zellen nach 48 Stunden Doxycyclin-Induktion einer Zellfraktionierung unterzogen. Die Proteine der Mitochondrien- und der zytosolischen Fraktion wurden in einem 15%igen PA-Gel aufgetrennt und in Western Blots analysiert. Diese zeigten eine deutliche Anreicherung des exogenen Bcl-X_S in der mitochondrialen Fraktion (Abb.35). Als Kontrolle dienten SKM13-Tet-On-Zellen. Als Ladekontrolle für die zytosolische Fraktion diente β -Aktin, für die Mitochondrien-Fraktion wurde das ausschließlich in den Mitochondrien vorkommende Kanalprotein VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) verwendet.

Abb.35: Lokalisation des Bcl-X_S-Proteins nach Überexpression in SKM13-Bcl-X_S-5.

Die Zellen wurden zwei Tage nach der Doxycyclin-Behandlung geerntet und einer Zellfraktionierung unterzogen. Bcl-X_S wurde mit einem Anti-human Antikörper gegen Bcl-X detektiert. Zum Mengenabgleich wurde die Membran der zytosolischen Fraktionen mit einem β -Aktin-, die der Mitochondrien-Fractionen mit einem VDAC-Antikörper inkubiert.



3.9.2. Geringe Aktivierung der Caspase-8 nach Bcl-X_S-Überexpression

In der Apoptosekaskade liegt die Initiator-Caspase-8 „upstream“ der Mitochondrien und kann über die Spaltung des proapoptotischen Proteins Bid zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Aktivierung der Effektor-Caspase-3 führen (Scaffidi et al., 1998.). Im folgenden sollte die Rolle der wichtigsten Caspasen bei der durch Bcl-X_S vermittelten Apoptose geklärt werden. Die Zellen wurden nach 24 bzw. 48 Stunden Doxycyclin-Induktion bei einer Konfluenz von 70% geerntet. Proteinlysate daraus wurden im Western Blot mit einem anti-humanen Antikörper gegen die Pro- und die aktive Form von Caspase-8 untersucht. Eine deutliche, wenn auch schwache Aktivierung der Caspase-8 sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Bcl-X_S-Induktion war festzustellen (Abb.36). Die aktiven Spaltprodukte der Procaspase-8 wurden bei 18, 41 und 43 kDa als zusätzliche Banden detektiert. Besonders stark zeigten sie sich in den zur Kontrolle mit Etoposid-behandelten Jurkat-Zellen.

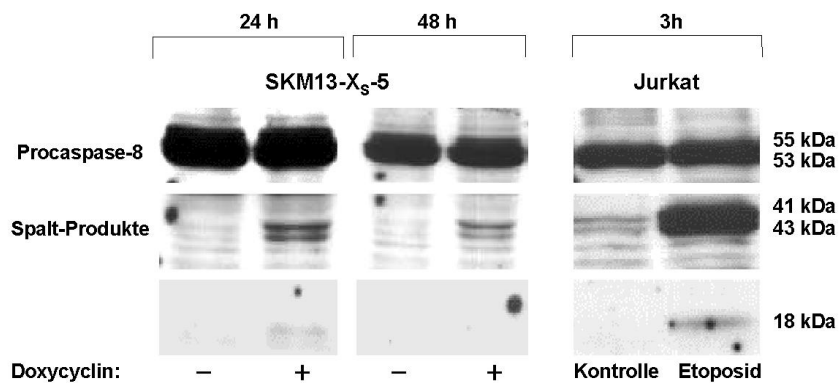


Abb.36: Aktivierung der Caspase-8 nach Überexpression von Bcl-X_S.

SKM13-X_S-5-Zellen wurden 24 und 48 Stunden nach Inkubation mit Doxycyclin lysiert und im Western Blot auf Caspase-8-Aktivität untersucht. Jurkat-Zellen wurden 3 Stunden mit Etoposid behandelt und dienten als Positiv-Kontrolle.

3.9.3. Verminderung der Cytochrom C-Menge in den Mitochondrien nach Bcl-X_S-Überexpression

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytosol ist essentiell zur Bildung des „Apoptosoms“, in dem Caspase-9 aktiviert wird, die ihrerseits Procaspase-3 durch Spaltung aktivieren kann (Krammer, 2000; Daniel et al., 2001).

Um zu überprüfen, ob die durch Bcl-X_S vermittelte Apoptose von Cytochrom C abhängig ist, wurden SKM13-X_S-5-Zellen nach 24 und 48 Stunden Doxycyclin-Behandlung geerntet und nach Mitochondrien und Zytosol fraktioniert. Die Fraktionen wurden in einem 15%igen PA-Gel aufgetrennt und im Western Blot unter Verwendung des Antikörpers gegen humanes Cytochrom C analysiert. In SKM13-bcl-X_S-Zellen konnte keine Freisetzung von Cytochrom C detektiert werden, aber eine deutliche Abnahme des mitochondrialen Cytochrom C-Gehaltes um den Faktor 4 bzw. 2 wurde 24 bzw. 48 Stunden nach Doxycyclin-Induktion festgestellt (Abb.37). Als Ladekontrolle für Cytochrom C diente β -Aktin, die Reinheit der Fraktionen wurde durch das ausschließlich in den Mitochondrien vorkommende Kanalprotein VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) belegt. Ein stabil mit dem Fas-Liganden transfizierter Klon wurde als Kontrolle für die Freisetzung von Cytochrom C verwendet, da bei der Fas-vermittelten Apoptose Cytochrom C freigesetzt wird (Eberle et al., 2003).

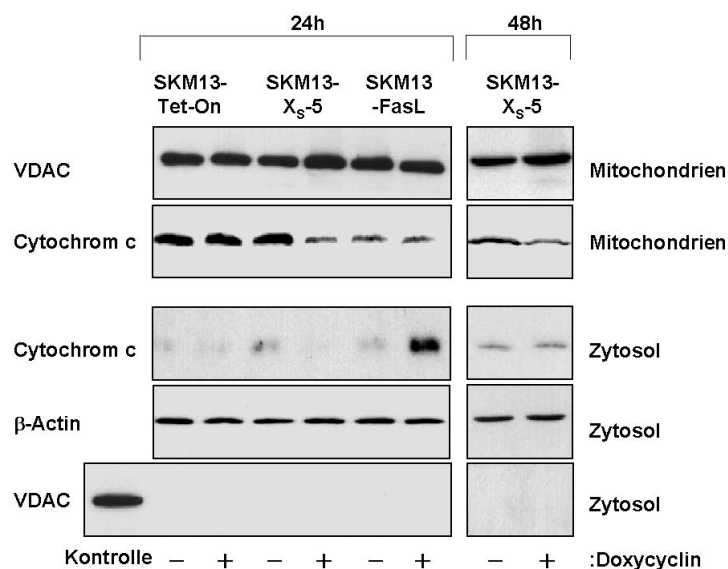


Abb.37: Verminderung des Cytochrom C-Gehaltes in den Mitochondrien nach Überexpression des Bcl-X_S Proteins.

Zur Detektion der Cytochrom C-Freisetzung wurden die Zellen nach 24 bzw. 48 Stunden Induktion fraktioniert und die zytosolischen und mitochondrialen Extrakte im Western Blot mit einem Antikörper gegen Cytochrom C analysiert. Die Menge an Cytochrom C in den Mitochondrien nahm signifikant ab, doch eine Freisetzung ins Zytosol konnte nicht beobachtet werden. β -Aktin und VDAC dienten als Lade- bzw. Reinheitskontrolle.

3.9.4. Freisetzung von AIF nach Bcl-X_S-Überexpression

AIF (Apoptosis Inducing Factor) ist ein proapoptotisches Protein, das sich im Intermembran-Raum der Mitochondrien befindet. Eine Freisetzung von AIF in das Zytosol hat die Induktion der Apoptose zur Folge. Dieser Apoptoseweg wird als Caspasen-unabhängig angesehen, dessen Mechanismus aber bisher nicht eindeutig geklärt ist (Susin et al., 1999.). Hier stellte sich die Frage, ob nach Überexpression von Bcl-X_S in SKM13-Zellen eine AIF-Freisetzung stattfindet. Nach 6 und 48 Stunden Inkubation mit Doxycyclin wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt, und nach Auftrennung der mitochondrialen und zytosolischen Extrakte im 8% PA-Gel wurde AIF im Western Blot mit einem Anti-human-AIF-Antikörper detektiert. Eine Abnahme des mitochondrialen AIF in Bcl-X_S-Transfektanten konnte 6 sowie 48 Stunden nach Induktion festgestellt werden; eine signifikante Zunahme des AIF-Gehaltes im Zytosol zeigte sich nach 48 Stunden (Abb.38).

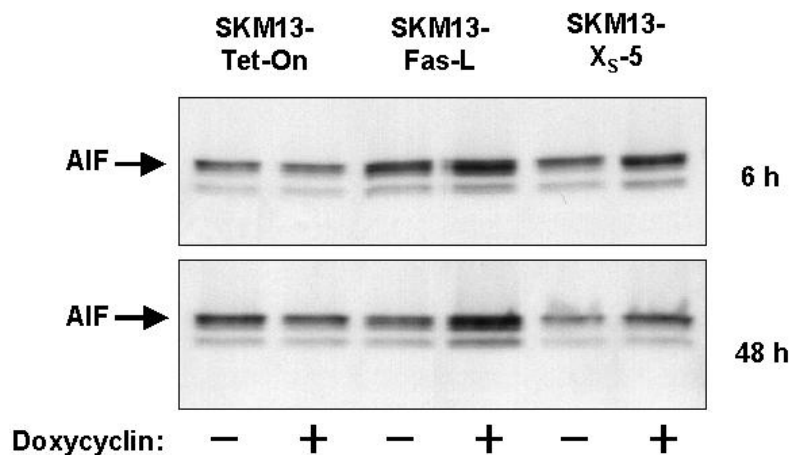


Abb.38: AIF-Freisetzung nach Bcl-X_S-Expression.

Zur Lokalisierung von AIF wurde nach Inkubation mit Doxycyclin eine Fraktionierung der SKM13-X_S-5-Zellen durchgeführt. Die Zellextrakte wurden im Western Blot mit einem Anti-human-AIF-Antikörper analysiert. AIF-Freisetzung zeigte sich in Bcl-X_S- sowie FasL-Transfektanten nach Doxycyclin-Induktion, aber nicht in Kontrollzellen.

3.9.5. Nur geringe Aktivierung von Procaspase-3 nach Bcl-X_S-Überexpression

Die Effektor-Caspase-3 liegt im Signalweg „downstream“ der Mitochondrien und wird bei fast allen Apoptosewegen unter Caspasen-Beteiligung aktiviert. SKM13-X_S-5-Zellen wurden auf Caspase-3-Aktivität hin untersucht. Sie wurden nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation mit Doxycyclin geerntet und die Extrakte im Western Blot analysiert. Zwei verschiedene

Antikörper wurden verwendet, von denen einer nur Procaspase-3 mit 35 kDa und der zweite ausschließlich die aktiven Spaltprodukte mit 17 und 19 kDa erkennt. Nach 24 Stunden Bcl-X_S-Induktion waren Spaltprodukte der Caspase-3 nur schwach und nach 48 Stunden nicht mehr zu detektieren. Als Positiv-Kontrolle wurden Jurkat-Zellen, die drei Stunden mit Etoposid behandelt worden waren, verwendet. Auch die Spaltprodukte der Caspase-3-Substrate PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und ICAD-CAD (Proform der Caspase-aktivierten DNase) konnten im Gegensatz zu den Positiv-Kontrollen in SKM13-X_S-5-Zellen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt) (Abb.39). Um eine mögliche Beteiligung der Caspase-3 bei der Bcl-X_S-vermittelten Apoptose nochmals zu überprüfen, wurde ihre Aktivität mit Hilfe eines Caspase-3-Aktivitätsassays gemessen. SKM13-X_S-5-Zellen wurden 24 und 48 Stunden mit Doxycyclin inkubiert. Jeweils 2 Millionen Zellen wurden lysiert und einem Aktivitätsassay unterzogen. Neben SKM13-X_S-5- wurden SKM13-Tet-On-Zellen zur Kontrolle mitgeführt. 24 Stunden nach der Bcl-X_S-Induktion zeigte sich ein geringer Anstieg der Caspase-3-Aktivität um den Faktor 1,3 (Abb.40). Im Vergleich dazu stieg die Caspase-3-Aktivität in Jurkat-Kontrollzellen um den Faktor 8 (Daten nicht gezeigt). Eine Inhibition durch den Caspase-3-spezifischen Inhibitor DEVD-CHO reduzierte die Caspase-3-Aktivität auf Werte unterhalb der Kontrollzellen und wies damit den gemessenen Anstieg der Aktivität als Caspase-3-spezifisch aus. Nach 48 Stunden änderte sich die Caspase-3-Aktivität durch Bcl-X_S-Überexpression nicht mehr (Daten nicht gezeigt).

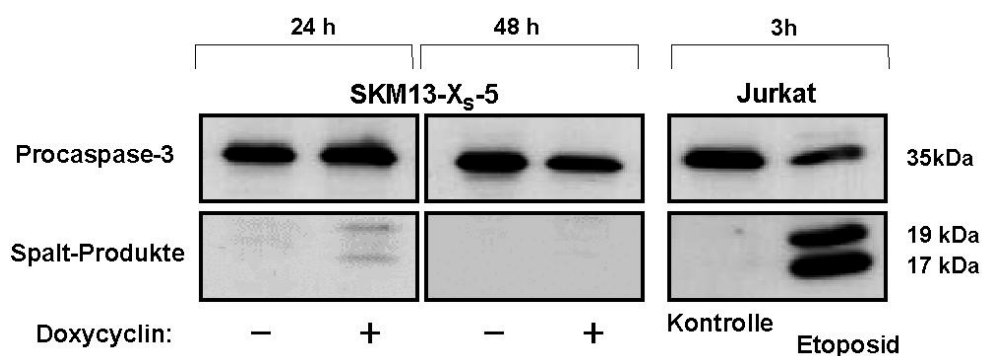


Abb.39: Geringere Aktivierung von Caspase-3 nach Bcl-X_S-Expression.

SKM13-X_S-5-Zellen wurden nach 24 und 48 Stunden Inkubation mit Doxycyclin lysiert und im Western Blot mit Anti-human-Antikörpern gegen (Pro-)caspase-3 analysiert. Jurkat-Zellen wurden drei Stunden mit Etoposid behandelt und dienten als Positiv-Kontrolle

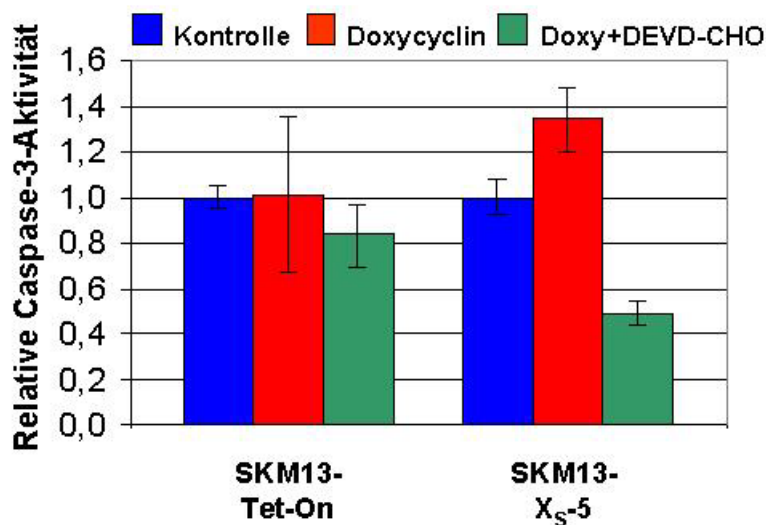


Abb.40: Die Caspase-3-Aktivität erhöhte sich 24 Stunden nach Bcl-X₅-Überexpression um den Faktor 1,3.

24 Stunden nach der Bcl-X₅-Induktion mit Doxycyclin (rote Säulen) wurde die Caspase-3-Aktivität in SKM13-Zellen mit einem Caspase-3-Aktivitätsassay photometrisch bestimmt. Als Standard wurden SKM13-Tet-On-Zellen verwendet, als Kontrolle der Caspase-3-Spezifität wurden die Zellen mit dem Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO behandelt (grüne Säulen).

3.9.6. Keine Aktivierung von Caspase-6 und Caspase-7 durch Bcl-X₅-Überexpression

Caspase-6 und Caspase-7 liegen wie Caspase-3 als Effektor-Caspasen „downstream“ der Mitochondrien und können ebenfalls nach ihrer Aktivierung Apoptose induzieren. Die zwei Effektor-Caspasen wurden im Western Blot auf ihre Aktivierung durch Bcl-X₅ überprüft. Dazu wurden SKM-13-X₅-5-Zellen bei 70%iger Konfluenz geerntet und im Western Blot mit Anti-human-Caspase-6- bzw. -Caspase-7-Antikörpern inkubiert. Eine konstitutive Präsenz des Spaltprodukts von Caspase-6 konnte in SKM13-X₅-5-Zellen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden mit einer Größe von 15 kDa nachgewiesen werden (Abb.41). Diese war jedoch nicht von der Bcl-X₅-Expression abhängig. Die Spaltprodukte des Caspase-6-Substrates Lamin A waren ebenfalls in allen SKM13-X₅-5-Proben nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Caspase-7- Spaltprodukte mit einer Größe von 20 kDa war nicht zu detektieren (Abb.41). Als Positiv-Kontrolle dienten Jurkat-Zellen, die drei Stunden mit Etoposid behandelt worden waren. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

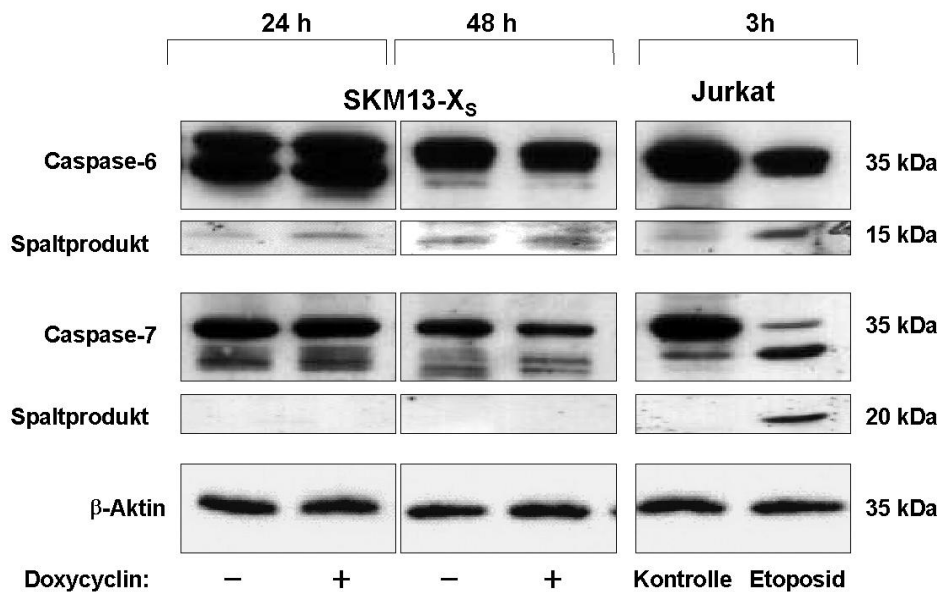


Abb.41: Keine Bcl-X_S-spezifische Aktivierung von Caspase-6 und Caspase-7

SKM13-X_S-5-Zellen wurden nach 24 bzw. 48 Stunden Doxycyclin-Inkubation geerntet und lysiert. Die Proteinextrakte wurden im Western Blot auf Caspase-6- sowie Caspase-7-Aktivität überprüft. Bcl-X_S-vermittelte Caspase-6- und Caspase-7-Aktivität zeigte sich im Gegensatz zu Etoposid-behandelten Jurkat-Kontrollzellen nicht. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

3.10. Identifizierung eines neuen Bcl-2-Familienmitglieds

Während die bcl-X-Spleissvariante bcl-X_L alle vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domänen) trägt, besitzt bcl-X_S nur die BH-Domänen 3 und 4 (Boise et al., 1993). Bei der Sequenzierung der klonierten bcl-X-Gene bcl-X_S und bcl-X_L wurde eine Sequenz ohne die BH-3-Domäne, jedoch mit der BH-2-Domäne gefunden. Dieses neue Gentranskript beinhaltet also nur die Domänen 2 und 4, nicht aber 1 und 3, und repräsentiert damit eine bisher unbekannte bcl-X-Spleissform (Abb.42). In einem hoch auflösenden 1%igen Agarosegel konnten die verschiedenen bcl-X-Spleissvarianten, die durch RT-PCR generiert worden waren, unterschieden werden (Abb.43). Das neue Transkript, bcl-X_{S18} genannt nach der Größe des Proteins von 18 kDa (später gezeigt), konnte mit einer Länge von 470 bp im Gel neben bcl-X_S mit 560 bp und bcl-X_L mit 760 bp in den zwei untersuchten Melanom-Zelllinien SK-Mel-13 und M5 detektiert werden. Als Kontrolle wurde die DNA des sequenzierten Plasmids mit bcl-X_{S18} amplifiziert (pTRE-X_{S18}).

Zur Einordnung der funktionellen Relevanz von $\text{bcl-X}_{\text{S18}}$ wurde die Melanom-Zelllinie SKM13-Tet-On stabil mit dem $\text{pTRE-X}_{\text{S18}}$ -Konstrukt und pTK-Hyg kotransfiziert und auf Proteinebene untersucht. Nach Doxycyclin-Induktion zeigte sich eine deutliche Überexpression des Proteins mit einer Größe von 18 kDa in zwei von drei untersuchten Klonen im Western Blot nach Inkubation mit einem Anti-human-Bcl-X-Antikörper (Abb.44). Als Kontrolle diente der Bcl-X_S -Klon SKM13- X_S -5. Die Wirkung des Proteins $\text{Bcl-X}_{\text{S18}}$ ist bisher nicht bekannt.

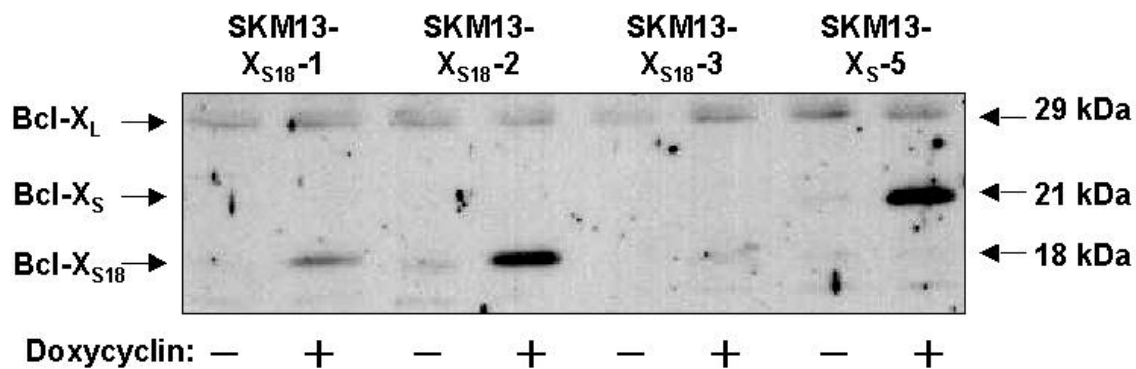


Abb.44: Überexpression des $\text{Bcl-X}_{\text{S18}}$ -Proteins in stabilen SKM13-Subklonen.

Induzierte Überexpression von $\text{Bcl-X}_{\text{S18}}$ in zwei Tetracyclin-regulierbaren Subklonen von SK-Mel-13. Der Western Blot zeigt eine schwächere und eine starke Expression von $\text{Bcl-X}_{\text{S18}}$ in den Klonen SKM13- X_{S18} -1 bzw. SKM13- X_{S18} -2 nach Doxycyclin-Behandlung (+) im Vergleich zu nicht induzierenden Bedingungen (-). SKM13- X_S -5 zeigt die Expression des Bcl-X_S -Proteins.

3.11. Untersuchung zur möglichen therapeutischen Verwendung von Bcl-X_S

Um die mögliche Verwendbarkeit der Bcl-X_S -Überexpression für einen therapeutischen Ansatz zu prüfen, wurde:

- die Kombination mit Chemotherapeutika untersucht und
- die Wirksamkeit als Anti-Tumorstrategie im Tierexperiment getestet.

3.11.1. Kombination der Bcl-X_S -Überexpression mit weiteren Apoptose-Stimuli in Melanom-Zellen

Hier sollte beantwortet werden, ob die Bcl-X_S -vermittelte Apoptose bei Melanom-Zellen in Kombination mit verschiedenen Apoptose-Stimuli verstärkend wirken kann. Konfluente SKM13- X_S -5 Zellen wurden 24 Stunden mit Doxycyclin inkubiert, bevor die Zytostatika VP-16 (Etoposid), DTIC (Dacarbazin) oder die Apoptose-Stimuli CH-11, Ceramid und Pamidronat, appliziert wurden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Apoptoseraten mittels

ELISA und parallel die Zytotoxizität bestimmt. Bei allen verwendeten Apoptose-Stimuli konnte die Apoptoserate durch Bcl-X_S zusätzlich gesteigert werden (Abb.45) Der Zuwachs nach CH-11-Applikation war aufgrund der hohen Apoptoseinduktion durch den agonistischen Fas-Antikörper relativ gering, die schwächere apoptotische Wirkung der übrigen Apoptose-Stimuli konnte aber durch Bcl-X_S-Überexpression etwa jeweils verdoppelt werden.

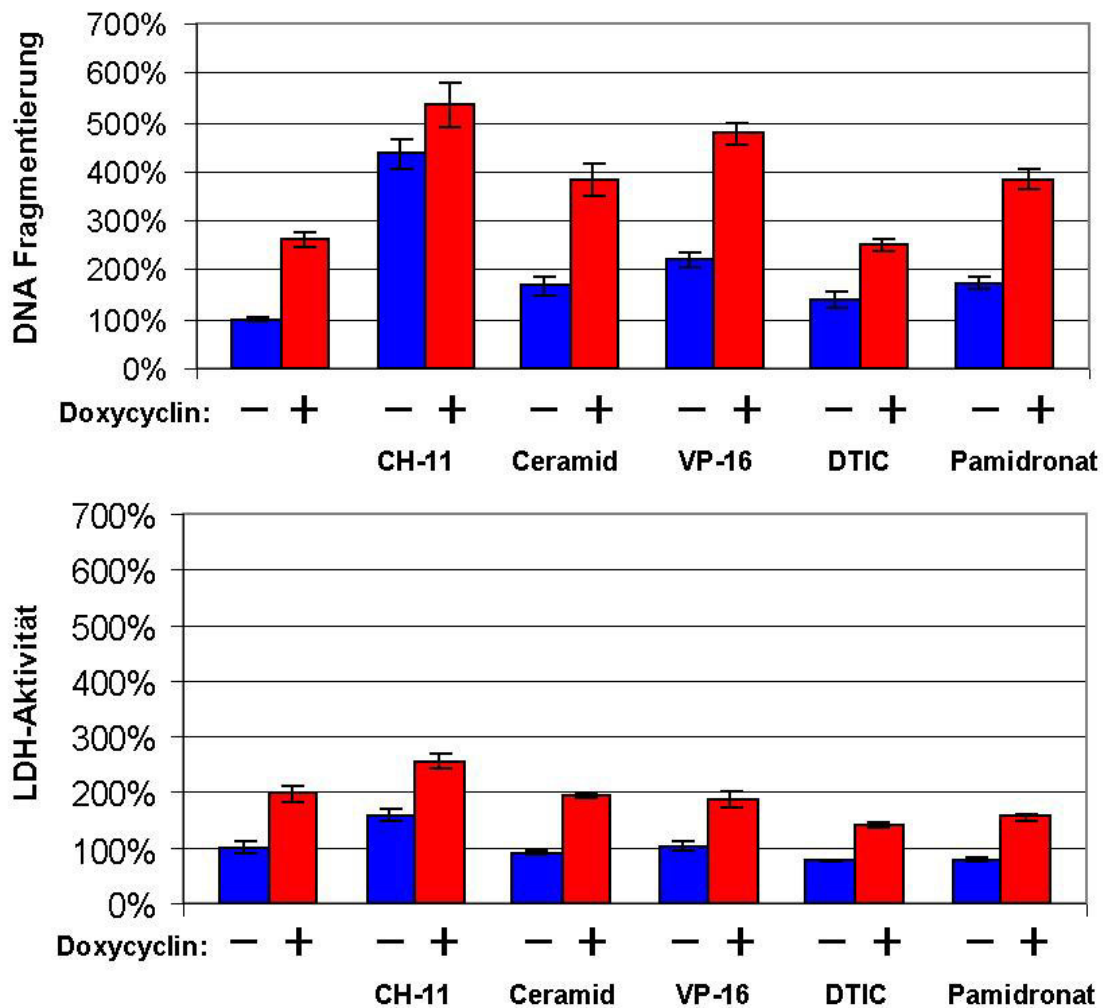


Abb.45: Die Bcl-X_S-Überexpression sensibilisiert Melanom-Zellen für Apoptose-Stimuli.

Der Klon SKM13-Bcl-X_S-5 wurde 24 Stunden mit Doxycyclin (rote Säulen) oder ohne Doxycyclin (blaue Säulen) inkubiert, bevor die Zellen mit verschiedenen Apoptose-Stimuli für weitere 24 h behandelt wurden. Anschließend wurden Apoptose (DNA-Fragmentierung) und Zytotoxizität (LDH-Aktivität) parallel gemessen und als relative Werte zur Kontrolle (ohne Stimulans bzw. ohne Doxycyclin) angegeben. Die Experimente wurden dreimal in Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.11.2.Reduzierte Tumorigenität von Melanom-Zellen nach Bcl-X_S-Induktion *in vivo*

Mit den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob sich die *in vitro* festgestellte proapoptotische Wirkung von Bcl-X_S auch auf die Tumorigenität der Melanom-Zellen im Nacktmaus-Modell, d.h. *in vivo* auswirkt. Jeweils eine Million Zellen des SKM13-Bcl-X_S-5-Klons wurden in zehn immundefiziente Balb-C-Mäuse subkutan in beide Flanken injiziert. Einen Tag später erhielten fünf Mäuse mit ihrem Trinkwasser Doxycyclin, die zweite Gruppe von fünf Kontrollmäusen bekam kein Doxycyclin. Ab 30 Tagen nach der Induktion wurden die entstandenen Tumore zwei- bis dreimal in der Woche vermessen. Nach sieben Wochen waren die gebildeten Tumore in den unbehandelten Tieren um den Faktor 5-6 größer als nach Bcl-X_S-Induktion in den mit Doxycyclin behandelten Mäusen. Im Gegensatz zum steilen Anstieg des Tumorwachstums in den Kontrollmäusen wuchsen die Tumore nach Bcl-X_S-Induktion nur langsam in den ersten 54 Tagen, nahmen danach aber schneller an Größe zu (Abb.46A). Somit kam es durch die Bcl-X_S-Überexpression in den untersuchten Melanom-Zellen zu einer deutlich verzögerten Entwicklung von Melanomen im Nacktmaus-Modell (Abb. 46B).



7 Wochen nach Injektion (Ohne Doxycyclin)

A



7 Wochen nach Injektion (Mit Doxycyclin)

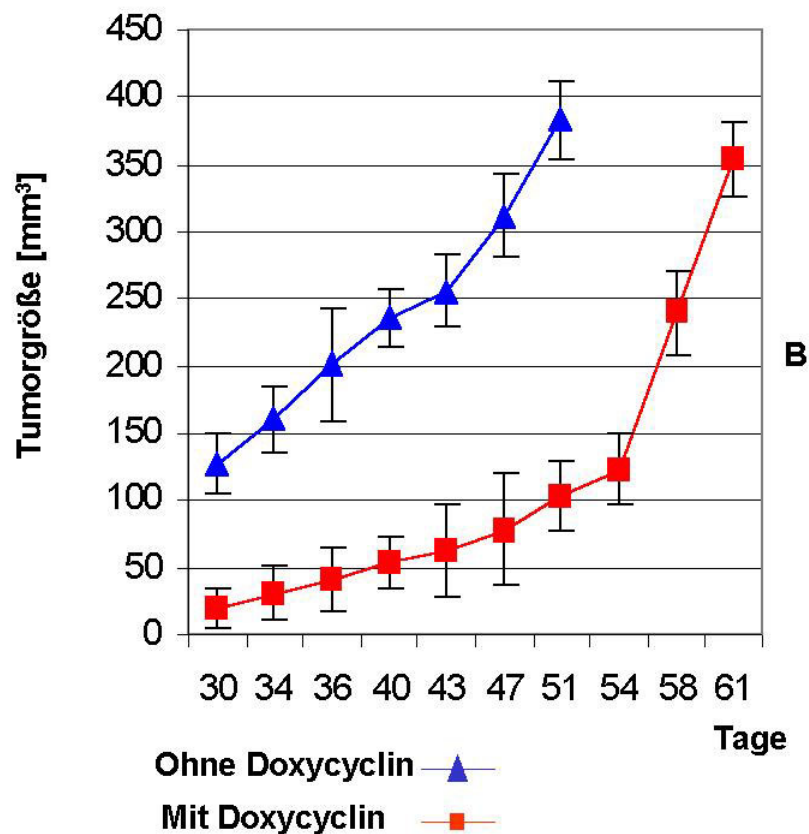


Abb.46: Verzögertes Tumorwachstum *in vivo* nach Bcl-X_S-Expression.

(A) Die Fotos zeigen Balb-C Mäuse (nu/nu) 7 Wochen nach der Inokulation von Melanom-Zellen, die stabil mit Bcl-X_S transfiziert worden waren. Die Expression von Bcl-X_S stand unter der Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren Promotors. Die Bilder zeigen das Wachstum der Tumore in Tieren, die kein Doxycyclin bekamen und im Gegensatz dazu Mäuse unter Doxycyclin. (B) Im Diagramm ist die Entwicklung der Tumore im zeitlichen Ablauf in Kontrollmäusen (blaue Linie) und in mit Doxycyclin behandelten Tieren (rote Linie) zu sehen.