

4. DISKUSSION

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein physiologisch essentieller Prozess für die Embryogenese und Aufrechterhaltung der Homöostase zwischen Zellproliferation und Eliminierung, um anormale, falsch platzierte, beschädigte oder nicht funktionsfähige Zellen durch gesunde ersetzen zu können. Eine Dysregulation der Apoptose-Mechanismen führt in Krebszellen oft zu Apoptose-Resistenz und kann damit den Erfolg einer Chemotherapie verhindern (Hett, 1998). Für das maligne Melanom, eine bösartige Geschwulstbildung der Haut bzw. Schleimhäute, die von pigmentbildenden Geweben wie Melanozyten oder Naevuszellen ausgeht, ist die Resistenz gegenüber Zytostatika charakteristisch (Serrone und Hersey, 1999). Die Aufklärung Apoptose-relevanter Signalwege in Melanom-Zellen erscheint daher besonders dringlich.

4.1. Hohe Bcl-2- und Bcl-X_L-Expression in Melanom-Zelllinien

Die Bcl-2-Proteine stellen wichtige Faktoren bei der Apoptoseregulation dar (Gross et al., 1999). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie für die Regulation der Apoptose in humanen Melanom-Zelllinien untersucht. Hierzu wurden Expressionsprofile antiapoptotischer und proapoptotischer Vertreter der Bcl-2-Familie in Melanozyten-Kulturen und Melanom-Zelllinien erstellt. Im Durchschnitt zeigte sich eine hohe Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L in Melanom-Zelllinien im Vergleich zur meist nur schwachen Expression in Melanozyten-Kulturen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen an einer kleineren Auswahl anderer Melanom-Zelllinien, in denen keine Unterschiede in der Bcl-2- bzw. Bcl-X_L-Expression zwischen Melanom-Zelllinien und normalen Melanozyten-Kulturen gesehen wurden (Selzer et al., 1998). Eine Studie an Gewebeproben maligner Melanome zeigte jedoch eine Zunahme des Proteingehaltes an Bcl-2 bzw. Bcl-X_L in den Zellen mit steigender Progression der Tumore (Leiter et al., 2000) und steht so im Einklang mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen. Auch in Prostatakarzinom-Zellen wurde eine hohe Expression des Bcl-2-Proteins gefunden, wobei die Expression mit der Tumor-Progression und der Resistenz gegenüber einer Hormontherapie zunahm (Krajewska et al., 1996). Für mehrere Mammakarzinom-Zelllinien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die hohe Bcl-2-Expression für die Tumorigenität und Resistenz gegenüber der Behandlung mit Apoptose-Stimuli verantwortlich ist (Reed et al., 1994).

Bax als proapoptotisches Protein wurde in allen untersuchten Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen etwa gleich stark exprimiert, möglicherweise da Bax im Zytoplasma

zunächst als inaktive Form vorliegt und seine Aktivierung weitere Protein-Wechselwirkungen benötigt (Gross et al., 1999). Die Expression von Bax wird durch den Tumorsuppressor p53 reguliert (Miyashita und Reed., 1995), der am Promotor des bax-Gens binden kann und dort die Transkription dieses proapoptotischen Genes transaktiviert (Tang et al., 1998). Eine weitere mögliche Erklärung für die unveränderte Bax-Expression in Melanom-Zelllinien könnte die hohe Expression von p53 und dessen niedrige Mutationsrate im humanen Melanom sein (Saenz-Santamaria et al., 1995).

Das proapoptotische Protein Bcl-X_S war weder in den Melanom-Zelllinien SK-Mel-23, SK-Mel-19, SK-Mel-13, Mel-HO, BRO, MeWo und A-375 noch in den untersuchten Melanozyten-Kulturen auf Proteinebene nachweisbar. Auch in anderen Untersuchungen an Melanom-Zelllinien und Melanozyten-Kulturen konnte die Expression des Bcl-X_S-Proteins nicht nachgewiesen werden (Heer-Ress et al., 2002). Weitere Untersuchungen an humanen Myelom-Zellen zeigten eine gegenüber Bcl-X_S dominante Proteinexpression von Bcl-X_L (Xerri et al., 1996). In einer Studie auf RNA-Ebene wurde eine signifikant hohe bcl-X_L-Expression im Vergleich zu geringer Expression von bcl-X_S-mRNA in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gefunden, wobei der Verlust von bcl-X_S hier als ungünstiger prognostischer Faktor gewertet wurde (Yamaguchi et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte bcl-X_S auf mRNA-Ebene nur mit Hilfe einer hochempfindlichen RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden, wobei die allgemein schwache Expression in Melanom-Zellen im Vergleich zu normalen Melanozyten-Kulturen tendenziell verringert erschien. Auch in malignen Lymphomen konnte mittels RT-PCR im Vergleich zu deutlicher bcl-X_L-Expression nur wenig bcl-X_S-mRNA detektiert werden (Xerri et al., 1996).

So präsentieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schon mit der begrenzten Auswahl der untersuchten Bcl-2-Proteine ein Übergewicht der antiapoptotischen im Vergleich zu den proapoptotischen Proteinen in den hier betrachteten Melanom-Zellen im Vergleich zu normalen Melanozyten. Da sich die Proteine der Bcl-2-Familie oft gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen (Gross et al., 1999), könnte der Überhang an antiapoptotischen Proteinen die Apoptoseinduktion in den Tumorzellen verhindern und so zum malignen Wachstum beitragen.

4.1.1. Bcl-2 wirkt als negativer Apoptoseregulator in Melanom-Zellen

In unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass Melanom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber CH-11 (agonistischer FAS-Antikörper) in zwei Gruppen eingeteilt werden können, in CH-11-resistente und -sensitive Zellen. Hier konnte demonstriert

werden, dass das Mengenverhältnis des proapoptotischen Bax zum antiapoptotischen Bcl-2-Protein in Melanom-Zellen mit der Sensitivität gegenüber der agonistischen Stimulation von Fas durch CH-11 korreliert, d.h. Zellen mit hohem Bcl-2/Bax-Expressionsverhältnis zeigten sich resistent gegenüber CH-11. Parallel korrelierte das Expressionsverhältnis mit der Ceramid-Sensitivität. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf aufbauend die Relevanz des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins für die CH-11-Sensitivität weiter überprüft. In den zwei CH-11-sensitiven Melanom-Zelllinien A-375 und Mel-HO mit einem niedrigeren Bcl-2/Bax-Verhältnis wurde Bcl-2 stabil überexprimiert, was eine drastische Verminderung der Sensitivität zur Folge hatte. Gleichfalls wurde die basale Apoptoserate in den Melanom-Zellen durch die Bcl-2-Überexpression reduziert. Somit bestätigte sich die eminente Rolle von Bcl-2 als negativer Apoptoseregulator in Melanom-Zellen. Auch in anderen Zellen ist Bcl-2 von besonderer Bedeutung für die Regulation der Apoptose. So verleiht eine Überexpression von Bcl-2 in HaCaT-Keratinocyten diesen Zellen Resistenz gegen die Apoptose-Stimuli C2-Ceramid, TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Müller-Wieprecht et al., 2000). Ebenso konnte in Pankreaskarzinom-Zellen die Überexpression von Bcl-2 eine durch das Apoptosestimulans 9-cis-Retinsäure induzierte Apoptose inhibieren (Pettersen et al., 2002). Schätzungen zufolge wird angenommen, dass in über 60% der Tumore die Hochregulation der Bcl-2- und/oder der Bcl-X_L-Expression für die Resistenz gegenüber Apoptose-Stimuli verantwortlich ist (Campus et al., 1993; Colombel et al., 1998; Dole et al., 1995; Sierra et al., 1995). Untersuchungen an anderen Tumoren (Harnblasenkrebs, myeloische Leukämie, Brustkrebs) bestätigen die Bedeutung des Bcl-2/Bax-Expressionsverhältnisses für die Resistenz gegenüber Zytostatika, Strahlung und anderen Apoptose-Stimuli (Ortiz-Rey et al., 2002; Su et al., 1998; Del Poeta et al., 2002; Gazzaniga et al., 1996). Bcl-2 ist als antiapoptotisches Protein in der äußeren mitochondrialen Membran aktiv und kann dort die Freisetzung des proapoptotischen Faktors Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien blockieren (Harris und Thompson, 2000).

So wurde durch die vorliegenden Experimente gezeigt, dass das Mengenverhältnis der antiapoptotischen zu den proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie entscheidend ist für die Resistenz bzw. Sensitivität von Melanom-Zellen für Apoptose auslösende Substanzen, deren Wirkung dann über mitochondriale Apoptosewege vermittelt werden könnte.

4.1.2. Suppression der Apoptose durch Bcl-X_L in Melanom-Zellen

Das antiapoptotische Protein Bcl-X_L weist große Funktions- und Strukturhomologien zu Bcl-2 auf und kann den programmierten Zelltod inhibieren (Minn et al., 1997; Krajewska et al.,

1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Bcl-X_L-Proteins bei der Apoptoseregulation in Melanom-Zellen untersucht. In einem ersten Ansatz mit dem induzierbaren Tet-On/Tet-Off-System wurden die Zelllinien SKM13-Tet-On, Bro-Tet-On sowie Mel-2A-Tet-Off transient mit dem bcl-X_L-Gen transfiziert und zeigten tendenziell eine antiapoptotische Wirkung des überexprimierten Bcl-X_L. Auch nach stabiler Transfektion von bcl-X_L in die Zelllinie SKM13-Tet-On wurde eine schwache antiapoptotische Wirkung des überexprimierten Bcl-X_L in den Zellen gezeigt, und die Empfindlichkeit gegenüber dem agonistischen Fas-Antikörper CH-11 reduzierte sich deutlich nach der Induktion des bcl-X_L-Gens. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit anderen Daten: In der Mamakarzinom-Zelllinie MCF-7 hob Bcl-X_L-Überexpression den proapoptotischen Effekt von Fas- und TNF- α -induzierter Apoptose auf (Srinivasan et al., 1998). Eine Überexpression von Bcl-X_L in der Melanom-Zelllinie Mel-juso führte nach Cisplatin-Behandlung zu einer Verdopplung der Chemoresistenz im Vergleich zu mit Vektor transfizierten Klonen (Heer-Ress et al., 2002). Auch in weiteren Mamakarzinom- und in Neuroblastom-Zellen wurde gezeigt, dass die starke Expression von Bcl-X_L für Chemoresistenz und Tumorigenität verantwortlich sein kann (Dole et al., 1995; Olopade et al., 1997).

4.1.3. Bcl-X_S wirkt als positiver Apoptoseregulator in Melanom-Zellen

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, wie sich Melanom-Zelllinien nach Überexpression eines proapoptotischen Proteins der Bcl-2-Familie verhalten. Insbesondere wurde untersucht, ob die Induktion eines proapoptotischen Gens die Zellen auch zur Induktion der Apoptose veranlassen oder sie gegenüber Chemotherapeutika und Apoptose-Stimuli sensibilisieren kann. Hier wurde das proapoptotische Protein Bcl-X_S eingehend untersucht, dessen Bedeutung für die Apoptoseregulation in Melanom-Zellen noch weitgehend unbekannt war. Nach der Amplifizierung des bcl-X_S-Gens aus Melanom-Zellen mit Hilfe der RT-PCR konnten das Transkript durch das Tet-On- bzw. Tet-Off-System induzierbar exprimiert werden. Anfänglich wurden die Zelllinien SKM13-Tet-On, Bro-Tet-On sowie Mel-2A-Tet-Off transient transfiziert und zeigten eine proapoptotische Wirkung des exogenen bcl-X_S. Die Schwankungen in Bezug auf die Expressionsstärke und die daraus resultierenden Apoptoseraten waren jedoch zum Teil groß, so dass die Apoptoseinduktion, beispielsweise im Vergleich zur transienten Transfektion des Fas-Liganden (Eberle et al., 2003), nur gering ausfiel. In PC12 Neuroblastom-Zellen, die transient mit bcl-X_S transfiziert worden waren, zeigte sich die Induktion von Apoptose ebenfalls abhängig von der Menge des transfizierten bcl-X_S-Gens (Lindenboim et al., 2000).

So wurde versucht, die Apoptoseunterschiede in stabil mit bcl-X_S transfizierten Zellklonen deutlicher herauszustellen. Bei stabilen Klonen entfallen zwei veränderliche Parameter, nämlich die durch das Transfektionsprotokoll selber induzierte Apoptose sowie die von Experiment zu Experiment veränderliche Transfektionseffizienz. Nach stabiler Transfektion der Melanom-Zelllinie SKM13-Tet-On konnte bcl-X_S mit Hilfe des Tet-On-Systems induzierbar exprimiert werden. Induzierbare Expressionsvektoren sind vorteilhaft für die Untersuchung der Apoptoseinduktion, da so die Zellproliferation im Laufe der stabilen Transfektion erst einmal nicht gestört wird. Bcl-X_S-Überexpression erhöhte die Apoptoserate signifikant, wobei das Maximum der durch Bcl-X_S ausgelösten Apoptose 36 Stunden nach der Induktion erreicht wurde. Diese Ergebnisse wurden hier erstmals in Melanom-Zellen (SK-Mel-13) erzielt und bestätigen die proapoptotische Wirkung von Bcl-X_S in Tumorzellen, die bisher schon für Neuroblastom-, Mammakarzinom-, Kolonkarzinom-, Ovarialkarzinom- und Kaposi's Sarkom-Zellen beschrieben wurde. In diese Tumorzellen wurde das humane bcl-X_S-Gen jedoch mittels viraler Vektoren eingeschleust, die effizienter sind, aber die Nachteile einer viralen Infektion mit sich bringen (Clarke et al., 1995; Dole et al., 1996; Ealovega et al., 1996; Baba et al., 2001; Übersicht in Han et al., 1998). Somit erwies sich hier der Einsatz des induzierbaren Tet-On-Systems als sehr vorteilhaft, um das bcl-X_S-Gen trotz seines hohen apoptotischen Potenzials wirkungsvoll zur Expression zu bringen. Damit wurde gleichzeitig nachgewiesen, dass dieser Apoptoseweg auch in Melanom-Zellen prinzipiell noch intakt ist.

4.2. Mechanismen der Bcl-X_S-vermittelten Apoptose

Von Bcl-X_S ist bekannt, dass es eine Transmembran-Domäne zur Lokalisierung in der Mitochondrien-Membran besitzt und dort an mitochondrialen Apoptosewegen beteiligt ist (Lindenboim et al., 2001). Diese laufen „downstream“ weiter z.B. über Cytochrom C-Freisetzung, Caspasen oder die Freisetzung des AIF (Apoptosis Inducing Factor) (siehe Abb.47). In verschiedenen Zellen wurde der Mechanismus der Bcl-X_S-induzierten Apoptose schon untersucht, doch ist der genaue Ablauf bisher nicht bekannt. In humanen PC-12 Nervenzellen induzierte die Überexpression von Bcl-X_S Apoptose in Caspasen-abhängiger Form. Der proapoptotische Effekt konnte durch Überexpression antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-X_L sowie durch den Wachstumsfaktor NGF aufgehoben werden (Lindenboim et al., 2000). Die Induktion der Apoptose nach Überexpression von Bcl-X_S in 3T3 Maus-Fibroblasten wurde jedoch als Caspasen-unabhängiger Weg dargestellt (Fridman et al., 2001). Auch schien der induzierte Apoptoseweg in 3T3-Zellen nicht von Cytochrom C abhängig zu sein, da keine Cytochrom C-Freisetzung nachgewiesen wurde. In

der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der Bcl-X_S-vermittelten Apoptose in humanen Melanom-Zellen genauer untersucht.

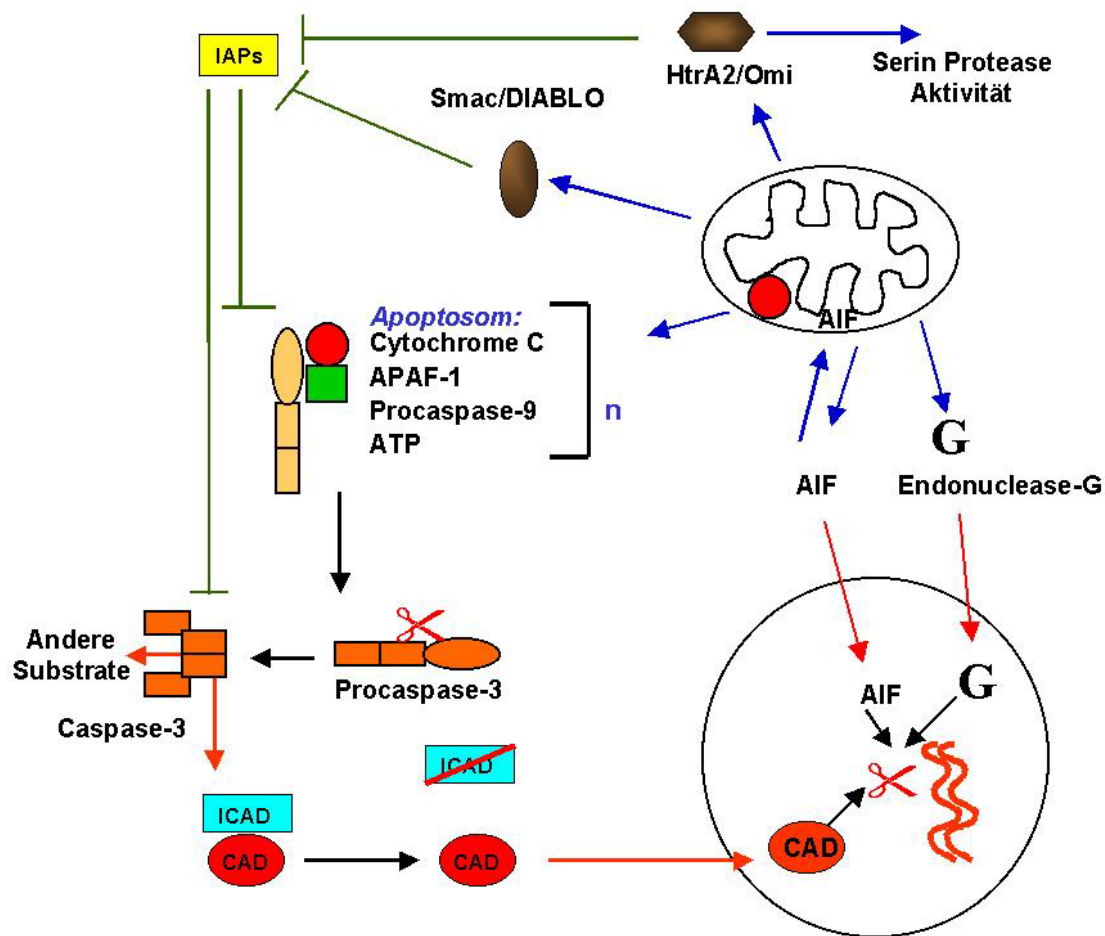


Abb.47: Apoptose (modifiziert nach Ravagnan et al., 2002)

Freisetzung proapoptischer Moleküle aus dem Intermembranraum der Mitochondrien

Bei der mitochondrial vermittelten Apoptose können Cytochrom C, Smac/DIABLO, HtrA2, AIF und Endonuclease G freigesetzt werden. Smac/DIABLO und HtrA2/Omi wirken als Inhibitoren von IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), dabei besitzt HtrA2 zusätzlich Serinprotease-Aktivität. AIF und Endonuclease G können im Nucleus die Fragmentierung der DNA verursachen. Freigesetztes Cytochrom C führt unter Verbrauch von ATP zur Oligomerisierung von Apaf-1, welches Caspase-9 im Apoptosom aktiviert. Aktive Caspase-9 kann Caspase-3 aktivieren. Caspase-3 kann dann wichtige Todessubstrate aktivieren wie z.B. ICAD-CAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease). Caspase-3 führt zur Spaltung von ICAD-CAD und veranlasst damit die Translokation von CAD in den Nucleus. CAD-Aktivität führt zur Fragmentierung der DNA. IAPs wiederum können durch Bindung an verschiedenen Caspasen die Bildung des Apoptosoms und die Caspase-3-Aktivierung hemmen.

4.2.1. Exogen exprimiertes Bcl-X_S ist vorwiegend in den Mitochondrien lokalisiert

In Melanom-Zellen konnte exogenes Bcl-X_S in Übereinstimmung mit den Befunden an PC12 Neuroblastom-Zellen (Lindenboim et al., 2001) und IL-3-abhängigen FL2.12-Zellen (Minn et al., 1996) hauptsächlich in Mitochondrien nachgewiesen werden. Für endogenes Bcl-X_S wird

dahingegen angenommen, dass es sich unter nicht apoptotischen Bedingungen im Zytosol befindet und dort durch Chaperon-Moleküle in inaktiver Form festgehalten wird (Jia et al., 1999; Lindenboim et al., 2000). Durch Todessignale wird Bcl-X_S freigesetzt und transloziert nach einer Konformationsänderung in die Mitochondrien. Bei einer Überexpression von Bcl-X_S reicht aber die Anzahl der Chaperone nicht aus, so dass ein hoher Anteil dieser Proteine in die Mitochondrien wandern kann (Lindenboim et al., 2000). Die Translokation von Bcl-X_S in die Mitochondrien scheint essentiell für dessen Aktivität zu sein, denn durch Einführung einer Serie von Mutationen in die carboxyterminal gelegene Transmembrane-Domäne konnte die Lokalisierung von Bcl-X_S in den Mitochondrien verhindert und daraufhin eine Inhibition der Apoptose in PC12-Zellen erreicht werden (Lindenboim et al., 2001). Insofern ist anzunehmen, dass der Großteil des in den transfizierten Melanom-Zellen produzierten Bcl-X_S auch aktiv war.

4.2.2. Bcl-X_S-Überexpression führt zum Verlust von mitochondrialem Cytochrom C

Zur Beantwortung der Frage, wie Bcl-X_S in den Mitochondrien Apoptose vermittelt, wurde untersucht, ob die Apoptose mit einer Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol in Verbindung gebracht werden kann. Weder 6, 24 noch 48 Stunden nach Induktion des bcl-X_S-Gens konnte eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C festgestellt werden. Interessanterweise wurde aber ein signifikanter Verlust von Cytochrom C in den Mitochondrien gegenüber den nicht induzierten Kontrollen registriert. Ein solcher Verlust wurde auch in 3T3 Zellen nach Überexpression von Bcl-X_S gefunden (Fridman et al., 2001). Es lässt sich annehmen, dass Cytochrom C nach Überexpression von Bcl-X_S entweder rasch abgebaut oder sehr schnell von den Zellen sezerniert wird, so dass eine Beteiligung von Cytochrom C an Bcl-X_S-vermittelter Apoptose damit eher unwahrscheinlich ist. Eine Abnahme des zellulären Cytochrom C-Gehaltes nach Überexpression anderer Bcl-2-Familienmitglieder wurde bisher nicht beschrieben. Ein eigener Mechanismus bei der Bcl-X_S-induzierten Apoptose ist daher anzunehmen.

4.2.3. Die Aktivierung der Caspasen-8 und -3 nach Bcl-X_S-Überexpression ist transient

Eine Aktivierung von Caspasen nach Bcl-X_S-Überexpression wird bisher widersprüchlich diskutiert. Hier wurde nach 24 und 48 Stunden Bcl-X_S-Induktion mit Doxycyclin eine leichte Aktivierung der Initiator-Caspase-8 sowie der Effektor-Caspase-3, aber weder eine Spaltung des Caspase-8-Substrates Bid noch der Caspase-3-Substrate PARP und ICAD-CAD

festgestellt. Derzeit ist nicht geklärt, ob die Aktivierung sowohl von Caspase-8 als auch von Caspase-3 direkt auf die Bcl-X_S-Überexpression zurückzuführen oder als Sekundäreffekt einzustufen ist.

Eine Überexpression von Bcl-X_S in stabil transfizierten 3T3-Mausfibroblasten induzierte Apoptose, wobei auch hier Caspasen nicht beteiligt zu sein schienen. Interessanterweise konnte eine Degradierung des Caspase-3-Substrates PARP nur durch die Abnahme der Proform im Western Blot gezeigt werden, aber das Spaltprodukt war nicht detektierbar (Fridman et al., 1999). Es wurde dabei vermutet, dass nach Überexpression von Bcl-X_S andere Proteasen als Caspase-3, die keine Substratspezifität wie Caspasen besitzen, den Abbau von PARP verursachen. Es gibt auch weitere Studien, die diese Art der PARP-Degradierung während der Apoptose in Anwesenheit von Caspasen-Inhibitoren wie z-VAD-fmk zeigen (Bojes et al., 1999). Von der Effektorcaspase-6 zeigte sich ein konstitutiver Level des aktivierten Spaltprodukts vor wie nach Bcl-X_S-Induktion. Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression des Spaltprodukts des Caspase-6-Substrates Lamin A nach Bcl-X_S-Überexpression. Eine Aktivierung der Effektor-Caspase-7 wurde ebenfalls nicht detektiert. Caspase-3, -6 und -7 stellen die häufigsten Effektor-Caspasen dar, so dass eine Aktivierung von Caspasen für die Bcl-X_S-vermittelte Apoptose in Melanom-Zellen nicht ausschlaggebend zu sein scheint. Das lässt darauf schließen, dass Todessignale durch mitochondriales Bcl-X_S nicht über Caspasewege, sondern über alternative Apoptosetransmitter weitergeleitet werden.

4.2.4. Bcl-X_S-Überexpression stimuliert AIF-vermittelte Apoptose

Im weiteren wurde die Lokalisierung des AIF-Proteins untersucht. Der „Apoptosis Inducing Factor“ verursacht nach seiner Freisetzung aus den Mitochondrien in das Zytosol und der folgenden Translokation in den Kern eine Kondensierung des Chromatins und DNA-Fragmentierung, wobei dieser Apoptoseweg unabhängig von Caspasen ist (Susin et al., 2000). AIF-Freisetzung wurde beschrieben in Rat-1-Zellen, die nach der Behandlung mit verschiedenen Apoptose-Stimuli wie Etoposid, Staurosporin und Ceramid dem programmierten Zelltod unterlagen. Dabei konnte die Freisetzung von AIF nach Überexpression von Bcl-2 blockiert werden (Daugas et al., 2000). In einer anderen Studie konnte die durch p53-Expression induzierte Apoptose in Nerven-Zellen ebenfalls mit der Freisetzung von AIF auf Caspasen-unabhängigem Wege in Verbindung gebracht werden (Cregan et al., 2002). Eine Verbreitung des AIF im Zytosol wurde in 3T3-Zellen nach Überexpression von Bcl-X_S mit Hilfe konfokaler Mikroskopie festgestellt (Fridmann et al.,

2001). Hier wurde eine Freisetzung des AIF in das Zytosol 6 und 48 Stunden nach Bcl-X_S-Induktion in den untersuchten Melanom-Zellen registriert. Dies wurde in dieser Arbeit erstmals in Melanom-Zellen gezeigt.

4.3. Bcl-X_S wirkt additiv, Bcl-X_L inhibitorisch in Kombination mit weiteren Apoptose-Stimuli

Da Melanom-Zellen nur unzureichend auf die Behandlung mit Chemotherapeutika oder anderen Apoptose-Stimuli ansprechen, wurde hier untersucht, ob sich Melanom-Zellen durch Bcl-X_S-Überexpression für die proapoptotischen Effekte anderer Stimuli sensibilisieren lassen. Der relativ hohe proapoptotische Effekt des agonistischen Fas-Antikörpers CH-11 konnte in den CH-11 sensitiven SK-Mel-13-Zellen nur wenig gesteigert werden. Demgegenüber konnte die relativ geringe apoptotische Wirkung der Zytostatika VP-16 (Etoposid) und DTIC (Dacarbazin) und der Apoptose-Stimuli Ceramid und Pamidronat jedoch mehr als verdoppelt werden.

Parallel zu Bcl-X_S wurden stabil mit Bcl-X_L transfizierte Klone auf ihre Sensibilität gegenüber CH-11 getestet. Überexpression von Bcl-X_L führte zu einer Reduktion der basalen Apoptoserate. Darüberhinaus verlieh die Überexpression von Bcl-X_L den SK-Mel-13-Klonen Resistenz gegenüber CH-11. Damit wurde auch die Möglichkeit ausgeschlossen, dass die proapoptotische Wirkung des exogenen Bcl-X_S in den Zellen allein auf der Expression hoher Proteinmengen beruhen könnte. Die Zytotoxizität war in den Experimenten auch vergleichsweise gering.

Die vorliegenden Experimente zeigen erstmals einen synergistischen Effekt der Bcl-X_S-Überexpression mit Chemotherapeutika und anderen Apoptose-Stimuli in Melanom-Zellen. Eine Sensibilisierung für Chemotherapeutika durch Bcl-X_S-Überexpression wurde bislang nur für die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 beschrieben. Hier konnte keine Induktion der Apoptose aufgrund der Bcl-X_S-Überexpression allein festgestellt werden, sondern erst nach der Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen von Etoposid bzw. Taxol (Sumantran et al., 1995). In einer anderen Studie konnten MCF-7-Zellen aber durch bcl-X_S-adenovirale Infektion auch in Abwesenheit von Chemotherapeutika in die Apoptose getrieben werden (Ealovega et al., 1996), möglicherweise durch die höhere Effizienz des Transfers bei adenoviraler Infektion.

4.3.1. Bcl-X_S hemmt das Tumorwachstum *in vivo*

Da Bcl-X_S im Zellkultur-Modell Apoptose auslösen konnte, wurde sein Einfluss auf die Tumorigenität von Melanom-Zellen im Nacktmaus-Modell untersucht. Immundefiziente Balb-C-Mäuse (nu/nu) entwickelten nach der Injektion von SKM-13-Tet-On/bcl-X_S-Zellen und Induktion des Gens Tumore, die fünf- bis sechsfach kleiner waren als die Tumore der Kontrollmäuse ohne Bcl-X_S-Induktion. Im Gegensatz zum steilen Anstieg des Tumorwachstums in den Kontrollmäusen wuchsen die Tumore mit Bcl-X_S nur langsam in den ersten 54 Tagen, nahmen danach aber schnell an Größe zu. Somit kam es durch die Bcl-X_S-Überexpression zu einer deutlich verzögerten Entwicklung von Melanomen im Nacktmaus-Modell. Möglicherweise sprachen die CMV-Promotoren nach etwa zwei Monaten nicht mehr auf die Doxycyclin-Induktion an, oder es bildeten sich Resistenzen, so dass dann keine Hemmung des Tumorwachstums mehr erzielt werden konnte. Bisher wurde nur eine Arbeit veröffentlicht, in der eine Hemmung des Tumorwachstums *in vivo* durch Bcl-X_S erreicht wurde. Dabei führte der mehrfache adenovirale Transfer von bcl-X_S in Mammakarzinom-Zellen zu einer Reduktion der Tumorgöße um etwa 50%, was 20 Tage nach der Tumorzellen-Injektion bestimmt wurde (Ealovega et al., 1996). Das geringere Ansprechen lag möglicherweise daran, dass mit dieser Methode nur ein Teil der Tumorzellen infiziert wurde, während in der vorliegenden Arbeit alle Melanom-Zellen auch das bcl-X_S-Gen trugen.

4.4. Identifizierung einer neuen Spleissvariante von bcl-X

Bisher wurden neben Bcl-X_S und Bcl-X_L nur zwei weitere Bcl-X-Spleissvarianten, bcl-X_{ΔTM} und bcl-X_β, identifiziert, über deren Funktion aber nichts genaues bekannt ist (Shiraiwa et al., 1996; Grillot et al., 1997). Beim Screening der mittels RT-PCR klonierten cDNA-Sequenzen wurde hier eine neue Sequenz identifiziert, die mit 141 Aminosäuren um 30 Aminosäuren kürzer ist als die von bcl-X_S. Sie könnte eine neue, bisher unbekannte Spleissvariante von bcl-X darstellen. Die Sequenz enthält die BH2- und BH4-Domäne, nicht aber die BH3-Domäne von Bcl-X_S und wurde nach dem Molekulargewicht des Proteins bcl-X_{S18} genannt. Die mRNA der neuen Form von bcl-X wurde mittels RT-PCR in den Melanom-Zelllinien SK-Mel-13 und M5 nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch mit bcl-X_{S18} stabil transfizierte Einzelklone der Melanom-Zelllinie SKM-13-Tet-On hergestellt, die nach Doxycyclin-Zugabe induzierbar das neue Protein Bcl-X_{S18} exprimierten. Die Existenz dieser Spleissvariante war bisher nicht bekannt. Dementsprechend ist auch seine Funktion noch unklar.

4.5. Weiterführende Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein signifikanter apoptotischer Effekt von exogenem Bcl-X_S in Melanom-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, so dass sich dieses Protein als ein vielversprechender Faktor für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei Melanom darstellt. Hier ist insbesondere auch die Steigerung des Effekts durch Kombination mit Chemotherapeutika hervorzuheben. Ob die Anwendung von Bcl-X_S auch Nebenwirkungen für umgebende Gewebe mit sich bringt, ist nicht bekannt, gleichwohl aber als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Daher sollten mit Hinblick auf eine therapeutische Anwendung Systeme entwickelt werden, mit deren Hilfe das Apoptosegen selektiv in Melanom-Zellen exprimiert werden kann. Dazu könnten Pigmentgen-Promotoren wie der Tyrosinase-Promotor eingesetzt werden, die gewebespezifisch nur in melanozytären Zellen aktiv sind.

Es war bislang unklar, auf welche Weise Bcl-X_S Apoptose auslöst. Nach den hier vorgelegten Untersuchungen scheinen weder Cytochrom C noch Caspasen an der Bcl-X_S-vermittelten Apoptose in Melanom-Zelllinien maßgeblichen Anteil zu haben. Es ist aber unter Berücksichtigung der Kinetik noch die Frage zu beantworten, wie es nach Bcl-X_S-Überexpression zum Verlust des Cytochrom C in den Mitochondrien kommen kann. Als besonders wichtig wird die weitere Untersuchung des AIF-vermittelten Apoptoseweges erachtet, da der Einsatz des exogenen Bcl-X_S, wie hier gezeigt wurde, eine Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien zur Folge hatte. Außerdem sollte untersucht werden, wie AIF durch die äußere Mitochondrienmembran geschleust wird, da die Mechanismen der AIF-Freisetzung bisher kaum erforscht wurden. Mittlerweile wurde auch von zwei weiteren proapoptischen Proteinen berichtet, die bei mitochondrialen apoptotischen Vorgängen aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt werden können, HtrA2/Omi als Inhibitor von IAPs (Inhibitors of Apoptosis Proteins) mit Serinprotease-Aktivität (Martins et al., 2002; Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2002) und Endonuklease G, die direkt an der Fragmentierung der DNA mitwirkt (Li et al., 2001). Deren mögliche Beteiligung an der Bcl-X_S-induzierten Apoptose in Melanom-Zellen ist noch zu überprüfen, insbesondere Endonuklease G ist ein interessanter Kandidat, da sie auch Caspasen-unabhängig wirken kann. Um eine Beteiligung von Caspasen an Bcl-X_S-vermittelter Apoptose ganz ausschließen zu können, sollten Experimente mit Caspasen-Inhibitoren erfolgen.

Es wurde beschrieben, dass die BH4-Domänen von Bcl-2 und Bcl-X_L essentiell sind für die Öffnung bzw. Schließung der VDAC-(Voltage Dependent Anion Channel-)Poren in der äußeren mitochondrialen Membran (Shimizu et al., 2000a). Da Bcl-X_S eines der wenigen

proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie ist, das eine BH-4-Domäne besitzt (Boise et al., 1993), ist es möglich, dass es diese Kanäle öffnen kann. Dies könnte durch den Einsatz von VDAC-Inhibitoren geklärt werden. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zur AIF-Freisetzung. Auch die neue Spleissform von Bcl-X, Bcl-X_{S18} sollte auf ihre Funktion hinsichtlich der Apoptoseregulation in Melanom-Zellen weiter untersucht werden. Die bereits hergestellten stabil transfizierten, induzierbaren Klone der Melanom-Zellen stellen ein geeignetes Hilfsmittel hierfür dar.