

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Apoptoseinduktion durch Bax und Nbk in Melanomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Nbk in der Apoptoseregulation von humanen Melanomzellen untersucht. Hierbei konnte erstmalig die Rolle des BH3-only-Proteins Nbk in der Apoptose von Melanomzellen charakterisiert werden. Die Apoptose ist ein ubiquitärer Mechanismus zur Induktion des programmierten Zelltodes in multizellulären Organismen. Die kontrollierte Eliminierung von Zellen spielt in der Entwicklung und der Homöostase von Geweben eine zentrale Rolle, vor allem aber beim Schutz des Organismus vor beschädigten und genetisch veränderten Zellen. Der mitochondriale Apoptoseweg stellt hierbei einen zentralen Signalweg des programmierten Zelltodes dar und wird von den Bcl-2-Proteinen reguliert. Mitglieder dieser Proteinfamilie können sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirksam sein. Die pro-apoptotischen Faktoren teilen sich weiter in die Unterfamilien der Multidomänenproteine und der BH3-only-Proteine auf. Proteine dieser Unterfamilien regulieren Apoptose in Organismen von den Nematoden (Egl-1 bei *C. elegans*) bis hin zu den Säugern (17 verschiedene Proteine wurden bis heute in humanen Zellen identifiziert). Multidomänenproteine und BH3-only-Proteine wirken gemeinsam in Richtung Apoptoseinduktion, unterscheiden sich jedoch anhand ihrer spezifischen Funktion und ihres Wirkungsmechanismus innerhalb der Apoptosekaskade. Während die BH3-only-Proteine als spezifische Todessensoren fungieren, ist die Aufgabe der Multidomänenproteine weiter stromabwärts im Apoptosesignalweg als Porenbildner in der mitochondrialen Membran definiert.

#### *Die Expression von Bax und Nbk in humanen Melanomzellen*

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen weisen die pro-apoptotischen Proteine deutliche Expressionsunterschiede in verschiedenen Zelltypen auf. Während das Multidomänenprotein Bax nahezu in allen Zellen exprimiert wird, ist die Expression des BH3-only-Proteins Nbk/Bik in untransformierten Säugerzellen hauptsächlich auf hämatopoetische Zellen, wie aktivierte B- und T-Zellen, Endothel- sowie bestimmte Epithelzellen (Brust, Niere) beschränkt (Jiang und Clark, 2001; Hur *et al*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich sowohl für Bax als auch für Nbk deutliche Expressionsunterschiede zwischen normalen humanen Melanozyten (NHM) und Melanomzellen. Nbk war in den untersuchten NHM-Kulturen weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene nachweisbar, während einige Melanomzellen Nbk-Expression auf niedrigem Niveau aufwiesen. Eine Tendenz zur Hochregulation von Nbk wurde auch für andere humane Tumorzelllinien berichtet, so z.B. beim Kolonkarzinom und Lymphom (Daniel

*et al.*, 1999). Eine basale Expression von pro-apoptotischen Genen in Tumorzellen kann für eine partielle Aktivierung pro-apoptotischer Signalkaskaden sprechen, die aber schließlich, aufgrund von Blockaden, nicht in den programmierten Zelltod resultieren können. Die dauerhafte, schwache Expression eines pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins kann mit einer Resistenz gegenüber dem entsprechenden Signal gekoppelt sein. Dementsprechend zeigte die Melanomzelllinie SK-Mel-19 die stärkste basale Nbk-Expression und gleichzeitig eine geringe Apoptoseinduktion nach exogener Nbk-Transfektion.

In vielen Tumorzellen konnte eine deutliche Korrelation zwischen einer Resistenz gegenüber Apoptosesignalen und dem Expressionsverhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen nachgewiesen werden. Das Modell des so genannten Bax/Bcl-2-Rheostats beschreibt, dass pro-apoptotisches Bax und anti-apoptotisches Bcl-2 ihre Funktionen durch gegenseitige Heterodimerisierung neutralisieren können. Entscheidend für die Induzierbarkeit von Apoptose kann also das molare Verhältnis dieser beiden Proteine sein (Korsmeyer *et al.*, 1993). In Melanomzellen ist das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 auf der Proteinebene deutlich zugunsten von Bcl-2 verschoben (Raisova *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich das Bax/Bcl-2-Expressionsverhältnis von normalen humanen Melanozyten (NHM) zu Melanomzellen untersucht. Es zeigte sich, dass das Bax-Protein in NHM stärker exprimiert wurde als in Melanomzellen, während jedoch auf der mRNA-Ebene kein signifikanter Unterschied zu detektieren war. Dies könnte auf eine translationale Suppression von Bax in Melanomzellen hinweisen. Da das Bcl-2-Protein in Melanomzellen wesentlich stärker exprimiert war als in NHM kommt es zu einem stark verminderten Expressionsverhältnis von Bax zu Bcl-2, was ausschlaggebend für die Apoptosedefizienz von Melanomzellen sein kann.

Die Bedeutung von Bax in Melanomzellen konnte auch durch eine weitere Reduktion der Expression mit Hilfe von DNA-Antisense- bzw. siRNA-Strategien dargestellt werden, die zu einer verminderten Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapeutika sowie gegenüber einer agonistischen CD95-Aktivierung führten. Die Ausbildung von Apoptoseresistenz, wie sie beim malignen Melanom vorliegt, korreliert deutlich mit dem veränderten Bax/Bcl-2-Verhältnis und kann demnach auch über die Manipulation dieses Verhältnisses reguliert werden. Auch in anderen Tumorzellen, z.B. aus Lymphom, Prostata- und Mammakarzinom, konnte bereits durch eine Verminderung der Bax-Expression mit Hilfe von siRNA- und DNA-Antisense-Techniken die Apoptosesensitivität der Zellen herabgesetzt werden (Pepper *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004)

*Doxycyclin-regulierbare Überexpression von Bax und Nbk*

Neben Strategien zur Abschwächung der Expression anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine, die aktuell bei verschiedenen Tumoren untersucht werden (Kim *et al*, 2004), kann die Apoptosedefizienz auch durch eine verstärkte Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine überwunden werden. So konnten Melanomzellen durch Überexpression der Bcl-x<sub>S</sub>-cDNA für Apoptosestimuli sensitiviert werden (Hossini *et al*, 2003). In diversen Tumorzellen, wie Hepatom-, Gliom-, Prostata- und Kolonkarzinomzellen, ließ sich durch eine Bax-Überexpression Apoptose induzieren, wobei sich Bax als starker pro-apoptotischer Effektor der Apoptose erwies (Kobayashi *et al*, 2000; Kaliberov *et al*, 2004; Zheng *et al*, 2005; Lin *et al*, 2005). Auch durch die Überexpression von Nbk konnte in verschiedenen Tumorzelllinien, die vom Lymphom, Gliom, Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinom stammten, Apoptose induziert werden (Daniel *et al*, 1999; Tong *et al*, 2001; Radetzki *et al*, 2002; Theodorakis *et al*, 2002; Naumann *et al*, 2003; Gillissen *et al*, 2003). Demgegenüber konnte der Verlust von Nbk murine hämatopoetische Zellen nicht vor einer Apoptoseinduktion durch verschiedene Apoptosestimuli wie Behandlung mit Chemotherapeutika oder Entzug von Zytokinen schützen. Ebenso wurden die letalen Auswirkungen einer Bcl-2-Deletion in Knockout-Mäusen durch eine Nbk-Defizienz nicht neutralisiert, während die Defizienz des BH3-only-Proteins Bim die Zellen schützen konnte (Bouillet *et al*, 2001; Coultas *et al*, 2004). Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise mit einer Spezifität von Nbk für bestimmte Gewebe und für bestimmte Apoptosestimuli erklären.

In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die ektopische Expression von Bax und von Nbk in Melanomzellen, sowohl nach transienter als auch nach stabiler Transfektion, Apoptose ausgelöst werden. Im Gegensatz zu Erkenntnissen aus anderen Zellsystemen, in denen Nbk als schwacher oder sogar redundanter Effektor der Apoptose beschrieben worden war (Letai *et al*, 2002; Coultas *et al*, 2004) zeigte sich hier, dass die Nbk-Überexpression in Melanomzellen eine noch stärkere pro-apoptotische Reaktion der Zellen auslöste als die Bax-Überexpression. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in den unterschiedlichen Induktionsfaktoren der exogenen Expression von Bax und Nbk begründet liegen. Aufgrund der relativ hohen basalen Bax-Expression ließ sich durch die Doxycyclin-induzierte Überexpression die Menge an Bax-Protein lediglich um den Faktor zwei bis drei erhöhen, während das Niveau der Nbk-Expression durch die Doxycyclininduktion wesentlich stärker gesteigert wurde im Bezug auf die kaum vorhandene basale Expression.

Auch *in vivo* stellte sich die Überexpression von sowohl Bax als auch von Nbk als starker pro-apoptotischer Stimulus heraus, durch den das Melanomwachstum in Nacktmäusen deutlich verlangsamt werden konnte. Noch effektiver bei der Verhinderung von Melanomen im gleichen Mausmodell zeigte sich allerdings die Überexpression des CD95-Liganden (Eberle *et al*, 2003). Das pro-apoptotische Potential der kontrollierten Expression von Bax

und von Nbk konnte durch die Kombination mit Chemotherapeutika noch weiter gesteigert werden. Die Expression der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine sensitivierte die Melanomzellen, so dass diese durch zusätzliche, schwach apoptotische Stimuli zur Apoptose gebracht werden konnten.

#### 4.2. Die durch Nbk induzierte Apoptose verläuft unabhängig von Caspasen

Der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch ein BH3-only-Protein wie Nbk unterscheidet sich prinzipiell von dem eines pro-apoptotischen Multidomänenproteins wie Bax. Es wird angenommen, dass BH3-only-Proteine in der Apoptosekaskade stromaufwärts der Mitochondrien lokalisiert sind (Daniel *et al*, 2003). Nbk wird durch den Transkriptionsfaktor p53 transaktiviert und bindet, über Interaktion mit seiner BH3-Domäne, an die hydrophobe Tasche anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> oder dem adenoviralen E1B-19K (Boyd *et al*, 1995; Tong *et al*, 2001). Auf diese Weise kann die anti-apoptotische Funktion dieser Proteine neutralisiert werden. Durch die Besetzung der Bindungsstellen des anti-apoptotischen Proteins kann zudem verhindert werden, dass pro-apoptotische Multidomänenproteine inaktiviert werden. Darüber hinaus können auch bereits gebundene pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bak durch Nbk verdrängt und damit ihr pro-apoptotisches Potential freigesetzt werden (Letai *et al*, 2002).

Bax durchläuft bei seiner Aktivierung eine aminoterminal Konformationsänderung und transloziert an die äußere mitochondriale Membran. Durch eigenständige Kanalbildung oder durch Interaktion mit bestehenden Kanalproteinen kann Bax die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und die Freisetzung pro-apoptotischer Signalmoleküle, wie Cytochrom C, in das Zytosol bewirken (Degli und Dive, 2003). Die Funktion von Nbk besteht in diesem Modell darin, Zellen für die Aktivierung von Multidomänenproteinen zu sensitivieren. Tatsächlich konnte in Prostatakarzinomzellen gezeigt werden, dass Nbk seine pro-apoptotische Funktion bei Bax-Defizienz einbüßte (Gillissen *et al*, 2003). Allerdings gab es auch Hinweise für direkte Funktionen von Nbk in der Apoptose. So konnte auch gezeigt werden, dass eine Heterodimerisierung von Nbk mit anti-apoptotischen Proteinen nicht immer für die Apoptoseinduktion notwendig war (Elangovan und Chinnadurai, 1997). Trotz der Klärung vieler Details der molekularen Basis der Apoptoseregulation durch pro- und anti-apoptotische Bcl-2-Proteine ist doch der Mechanismus, über den BH3-only-Proteine Apoptose initiieren, zum großen Teil noch ungeklärt (Fleischer *et al*, 2003).

Auch der Vorgang der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran durch Bax und Bak ist noch nicht abschließend geklärt. Zwar ist das Auftreten von mitochondrialen Intermembranfaktoren im Zytosol nach der Bax-Aktivierung unstrittig, doch bestehen mehrere alternative Hypothesen wie Bax zur Zerstörung der Membranintegrität beitragen

kann. So fand sich in HeLa-Zellen, dass eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials erst nach der Cytochrom C-Freisetzung erfolgte (Bossy-Wetzel *et al*, 1998; Ly *et al*, 2003), während üblicherweise von einem umgekehrten Zusammenhang ausgegangen wird. Die Analyse der apoptotischen Signalwege ist also nach wie vor von großer Wichtigkeit um Strategien für die therapeutische Verwendung dieser Wege erarbeiten zu können. Darüber hinaus ist auch nicht auszuschließen, dass apoptotische Signalwege in verschiedenen Zellen unterschiedlich reguliert sein können (Li *et al*, 1997; Amsterdam und Sasson, 2002).

Bei den hier untersuchten Melanomzellen ließen sich vielfältige Charakteristika der Apoptose nach Überexpression von Nbk detektieren. Die Zellen wiesen Kondensation des chromosomalen Chromatins, hypodiploide Zellkerne, DNA-Fragmentierung und DNA-Einzelstrangbrüche auf. Diese nukleären Veränderungen gelten als typische Kennzeichen der Apoptose (Widlak, 2000). Der Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Nbk-Überexpression variierte etwas mit der Nachweismethode. So fand sich kondensiertes Chromatin (Bisbenzimid) in ca. doppelt so vielen Melanomzellkernen wie DNA-Fragmentierung (TUNEL). Die verschiedenen Werte könnten einerseits aus der unterschiedlichen Sensitivität der Nachweismethoden resultieren, andererseits könnten sie aber auch hinweisend auf die Art des Signalweges sein (Sun *et al*, 1994; Joselin *et al*, 2006). Auch wenn Apoptose einem definierten Ablauf mit charakteristischen Merkmalen folgt, gibt es doch gewisse Unterschiede im Signalweg, die vom initialen Stimulus abhängig sind. So wird Caspase-8 nach Aktivierung von Todesrezeptoren gespalten, spielt aber in der mitochondrialen Apoptose nur eine sekundäre Rolle. Die starke Chromatinkondensation im Vergleich zur DNA-Fragmentierung könnte typisch für den Nbk-induzierten Apoptoseweg sein.

Eine Spaltung der Todessubstrate DFF45 und PARP konnte nur auf sehr geringem Niveau nachgewiesen werden. Da beide Proteine als klassische Caspase-3-Substrate gelten (Tang und Kidd, 1998; Decker *et al*, 2000), ließ sich somit nicht auf eine große Bedeutung der Caspase-3 im Nbk-induzierten Signalweg der Apoptose schließen.

#### *Caspasen-unabhängige Apoptose durch Nbk-Expression, Caspasenaktivität durch CD95L*

Während die CD95L-induzierte Apoptose hinsichtlich der DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation keine großen Unterschiede zur Apoptose durch Nbk zeigte, unterschieden sich beide Signalwege deutlich anhand der Caspasenaktivität. Nach Überexpression von CD95L in Melanomzellen zeigte sich hier die Prozessierung und Aktivierung der Caspasenkaskade über Caspase-8 auf Caspase-3. Ebenso zeigten sich deutliche Spaltprodukte von PARP und von DFF45 nach CD95L-Induktion. In

Übereinstimmung mit diesen Resultaten war die durch CD95L ausgelöste Apoptose durch selektive Inhibition von Caspase-3, -8 und -9 blockierbar.

Im Gegensatz dazu zeigte sich nach moderater Überexpression von Nbk (ohne DMSO-Verstärkung) eine weitgehende Unabhängigkeit von einer Caspasenaktivierung. Es wurden weder Caspasen prozessiert, noch ließ sich eine enzymatische Aktivität für Caspase-3 nachweisen. Auch der Initiationsfaktor der intrinsischen Caspasenkaskade Cytochrom C war zu keinem Zeitpunkt nach Nbk-Überexpression aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzt. Darüber hinaus erwies sich die Nbk-induzierte Apoptose als unempfindlich gegenüber der Applikation von selektiven Caspaseinhibitoren. Lediglich die Pancaspaseninhibitoren zVAD-fmk und QVD-OPh zeigten in hohen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung auf die Apoptose nach Nbk-Überexpression. Im Vergleich mit ihrer Wirksamkeit in der durch CD95L induzierten Apoptose war ihre Fähigkeit zur Inhibition der Apoptose durch Nbk allerdings um eine Zehnerpotenz erniedrigt. Eine Caspasenabhängigkeit der durch Nbk induzierten Apoptose war demnach nicht zu beobachten, da die Pancaspaseninhibitoren erst in Konzentrationen wirksam wurden, in denen eine spezifische Inhibition ausschließlich der Caspasen nicht mehr gewährleistet war (Schotte *et al*, 1999).

In Übereinstimmung mit meinen Befunden in Melanomzellen, wurde auch nach Nbk-Überexpression in Gliomzellen eine Unabhängigkeit von Caspasen berichtet. Auch dort ließ sich die Nbk-induzierte Apoptose nur mit Hilfe von hohen zVAD-fmk-Konzentrationen inhibieren, und weder Caspasenprozessierung noch Cytochrom C-Freisetzung waren detektierbar (Naumann *et al*, 2003). Im Gegensatz dazu wurde sowohl eine Cytochrom C-Freisetzung als auch eine Aktivierung von Caspase-3 und -9 in Prostata- und Kolonkarzinomzellen nach Nbk-Überexpression berichtet (Tong *et al*, 2001; Gillissen *et al*, 2003). Diese Ergebnisse weisen auf zwei verschiedene, zellspezifische Signalwege der durch Nbk induzierten Apoptose hin: Ein klassischer Signalweg über Caspasenaktivität, und ein von Caspasen unabhängiger Zelltod, der möglicherweise in neuroektodermalen Zellen (Melanom- und Gliomzellen) von dominierender Bedeutung ist.

Während die Caspasenaktivierung über lange Zeit als unabdingbares Charakteristikum des programmierten Zelltodes galt, häufen sich in den letzten Jahren die Hinweise auf alternative, Caspasen-unabhängige Wege der Apoptose (Lockshin und Zakeri, 2004; Kroemer und Martin, 2005). So konnten weder eine pharmakologische Caspaseninhibition in transformierten Fibroblasten, noch eine Caspase-8-Deletion in Jurkat-Zellen die Apoptose nach Aktivierung von Todesrezeptoren verhindern (Holler *et al*, 2000; Foghsgaard *et al*, 2001). Eine Erklärung für diese Ergebnisse wäre das Vorhandensein von alternativen Caspasen-unabhängigen Signalwegen des programmierten Zelltodes, die neben der Apoptose mit Caspasenaktivität existieren (Leist und Jaattela, 2001; Broker *et al*, 2005).

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

Da im Verlauf des programmierten Zelltodes eine Vielzahl von Proteinen gespalten werden müssen, stellt die Aktivität von Proteasen eine essentielle Bedeutung für jeden apoptotischen Signalweg dar. Der Befund, dass hoch konzentrierte Pancaspaseninhibitoren die Nbk-induzierte Apoptose hemmen konnten, während selektive Caspaseinhibitoren wirkungslos waren, gab Anlass zu der Annahme, dass andere Proteasen als die Caspasen aktiviert waren, die unspezifisch über diese breit wirkenden Inhibitoren gebunden wurden. Tatsächlich konnte eine unspezifische Bindung von zVAD-fmk an Cathepsin B, Cathepsin H und an Proteasen der Calpainfamilie bereits gezeigt werden (Schotte *et al*, 1999). Auch der Pancaspaseninhibitor QVD-OPh bindet an Cathepsine (Cathepsin L) und hemmt konzentrationsabhängig die Aktivität der Protease (Bang *et al*, 2004; Zheng *et al*, 2004).

Die meisten Cathepsine, und alle Caspasen, gehören zur Klasse der Cysteinproteasen. Cathepsine weisen große Ähnlichkeiten mit den Caspasen auf, so dass sie diese direkt prozessieren können (Schotte *et al*, 1998; Vancompernelle *et al*, 1998). Sie sind lysosomal lokalisierte Proteasen, die bei der Proteindegradierung mitwirken. Ähnlich den Caspasen werden Cathepsine zunächst als inaktive Zymogene synthetisiert, die durch Spaltung aktiviert und durch Phosphorylierung und Glykosylierung reguliert werden können (Berdowska, 2004). Durch einen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor werden die inaktiven Cathepsine vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert. Erst nach Import in die Lysosomen erfolgt ihre Aktivierung durch Abspaltung einer Pro-Domäne (Bohley und Seglen, 1992; De Ceuninck *et al*, 1995; Gacko *et al*, 1997).

Bereits andere Arbeiten konnten zeigen, dass nach bestimmten Apoptosestimuli, wie nach Todesligand-Bindung, p53-Aktivierung, Behandlung mit Mikrotubuli-stabilisierenden Agenzien und dem Auftreten von oxidativem Stress, aktive Cathepsine in das Zytosol freigesetzt werden können (Brunk und Svensson, 1999; Guicciardi *et al*, 2000; Yuan *et al*, 2002; Broker *et al*, 2004). Obwohl Cathepsine ihre höchste enzymatische Aktivität bei saurem pH-Wert entfalten, können sie auch unter neutralen Bedingungen, sowohl im Zytosol als auch extrazellulär, Proteine degradieren (Mort *et al*, 1984; Athauda und Takahashi, 2002; Ruzza *et al*, 2006). Tumorzellen zeigen häufig eine erhöhte Expression von Cathepsinen. Zusätzlich wurde bei Zellen im äußeren Bereich maligner Tumore eine veränderte intrazelluläre Verteilung der Lysosomen beschrieben. Durch Exozytose ihrer lysosomalen Enzyme können diese Zellen zur Degradierung der extrazellulären Matrix beitragen, wodurch sie die Invasivität des Tumors erhöhen (Zajc *et al*, 2002; Yan und Sloane, 2003; Talieri *et al*, 2004). Während die Rolle der Cathepsine als wichtiger Faktor bei der Metastasierung seit Jahren akzeptiert ist, wird ihre Bedeutung für die Apoptose noch kontrovers diskutiert (Linder und Shoshan, 2005). In den letzten Jahren wurden vor allem den Cysteinproteasen

Cathepsin B und L, die verstärkt in Melanomzellen exprimiert werden (Frohlich *et al*, 2001), sowie der Aspartatprotease Cathepsin D, eine Apoptoserelevanz zugesprochen (Liaudet-Coopman *et al*, 2005). Die genaue Funktion der Cathepsine innerhalb der Apoptosesignalwege ist jedoch noch relativ unklar. Möglicherweise können Cathepsine Zell- und Stimulus-spezifisch, unabhängig von Caspasen, als Effektorproteasen selbstständig Todessubstrate spalten (Roberts *et al*, 1999; Foghsgaard *et al*, 2001) oder sie können über die Spaltung des BH3-only-Proteins Bid die intrinsische Apoptosekaskade mit anschließender Caspasenaktivität initiieren (Boya *et al*, 2003).

#### *Freisetzung von Cathepsinen aus den Lysosomen nach Expression von Nbk*

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich klare Hinweise auf eine Beteiligung der Lysosomen an apoptotischen Signalwegen in Melanomzellen. Während mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelte Melanomzellen keine Veränderungen des lysosomalen pH-Wertes aufwiesen, kam es nach Nbk-Überexpression zur Aufhebung des pH-Gradienten zwischen den Lysosomen und dem Zytosol. Diese Angleichung des pH-Wertes auf das zytosolische Niveau lässt auf eine Permeabilisierung der Lysosomenmembran schließen (Brunk *et al*, 1997; Chen *et al*, 2005). Der kritische Schritt für die Aktivierung eines lysosomalen Signalweges wäre schließlich die Freisetzung aktivierter Cathepsine in das Zytosol, wo sie Todessubstrate degradieren und Signalproteine katalytisch aktivieren können. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass bereits sehr früh nach Nbk-Überexpression (4-10 h nach Doxycyclin-Gabe) eine Freisetzung der lysosomalen Cathepsine B, L und H in das Zytosol erfolgte.

Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Effekte wäre eine Translokation von Nbk an die Lysosomenmembranen. Dort könnte Nbk direkt oder indirekt über Aktivierung pro-apoptotischer Multidomänenproteine der Bcl-2-Familie eine Porenbildung induzieren, ähnlich der Wirkungsweise von Bax an den Mitochondrien. So konnte bereits gezeigt werden, dass Bcl-2-Proteine auch an der lysosomalen Membran lokalisiert sind und dass Bax in einem zellfreien System an isolierten Lysosomen eine Membranpermeabilisierung induzieren kann (Kagedal *et al*, 2005). Auch nach pro-apoptotischer Behandlung mit Staurosporin und Palmitat translozierte Bax in humanen Hepatozyten und Fibroblasten sowohl an die Mitochondrien als auch an die Lysosomen und die Inhibition von Bax konnte die Permeabilisierung lysosomaler Membranen verhindern (Feldstein *et al*, 2006). Darüber hinaus zeigte sich, dass Bcl-2 durch Stabilisierung der lysosomalen Membranintegrität eine Apoptoseinduktion durch oxidativen Stress in murinen Lymphomzellen verhindern konnte (Zhao *et al*, 2000). Für die Funktionalität von Lysosomen ist zu beachten, dass sie im Gegensatz zu Mitochondrien nur von einer einfachen Membran umgeben sind, bei deren

Permeabilisierung es zu einer sofortigen Freisetzung der eingeschlossenen Proteasen kommt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass aktive Cathepsine, ähnlich aktiven Caspasen, die proteolytische Spaltung diverser Proteine im Zytosol induzieren können und damit den programmierten Zelltod über DNA-Fragmentierung und der Ausbildung apoptotischer Körperchen auslösen (Foghsgaard *et al*, 2001; Gobeil *et al*, 2001). In Übereinstimmung mit einer Funktion der Cathepsine in der durch Nbk induzierten Apoptose in Melanomzellen wurde durch selektive Inhibition von jeweils Cathepsin H, Cathepsin L und Cathepsin K die Apoptose nach Nbk-Expression vermindert, während selektive Caspaseinhibitoren keinen anti-apoptotischen Effekt aufwiesen. Durch Hemmung der Aktivität von Cathepsin B und L über den Inhibitor zFA-fmk konnte zudem die durch Nbk induzierte Apoptose komplett blockiert werden. Die anti-apoptotischen Effekte der Pancaspaseninhibitoren zVAD-fmk und QVD-OPh lassen sich durch unspezifische Inhibierung von Caspasen und Cathepsinen erklären. Der Inhibitor zFa-fmk hat dagegen keinen unspezifischen Nebeneffekt auf die Aktivität von Caspasen wie sich in Melanomzellen zeigte. Die Prozessierung von Caspase-3 und Caspase-8 durch CD95L-Expression in Melanomzellen wurde durch eine gleichzeitige Behandlung mit zFA-fmk nicht verhindert, während eine Behandlung mit dem Inhibitor zVAD-fmk die Spaltung der Caspasen blockierte. Auch in Fibrosarkomzellen konnte die enzymatische Aktivität von Caspasen unter Behandlung mit zFA-fmk nachgewiesen werden (Foghsgaard *et al*, 2001).

Den Proteasen der Calpainfamilie, die ebenfalls durch zVAD-fmk inhibiert werden können, wird eine Bedeutung in Apoptosewegen, die durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) kontrolliert werden, zugesprochen (Lu *et al*, 2002). In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine mögliche Rolle der Calpaine im Nbk-induzierten Apoptosesignalweg. So zeigte die Verwendung von Calpaininhibitoren in Melanomzellen keinen protektiven Effekt nach Induktion von Nbk und wurde deswegen nicht weiter untersucht.

*Durch massive Verstärkung der Nbk-Überexpression mit DMSO werden sekundär auch Caspasen aktiviert*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass DMSO die Doxycyclin-abhängige Expression in Tet-On-Zellen signifikant verstärken kann. Diese Verstärkung der Genexpression war auf Tet-On-Promotoren beschränkt und hatte keinen Einfluss auf die endogene Expression anderer Proteine. Der synergistische Verstärkungseffekt zwischen Doxycyclin und DMSO, dessen Mechanismus hier noch nicht abschließend geklärt werden konnte, stellte sich als ein viel versprechendes Werkzeug zur Erhöhung der Doxycyclin-induzierten Proteinexpression dar. Die Funktionalität der exprimierten Proteine war nicht

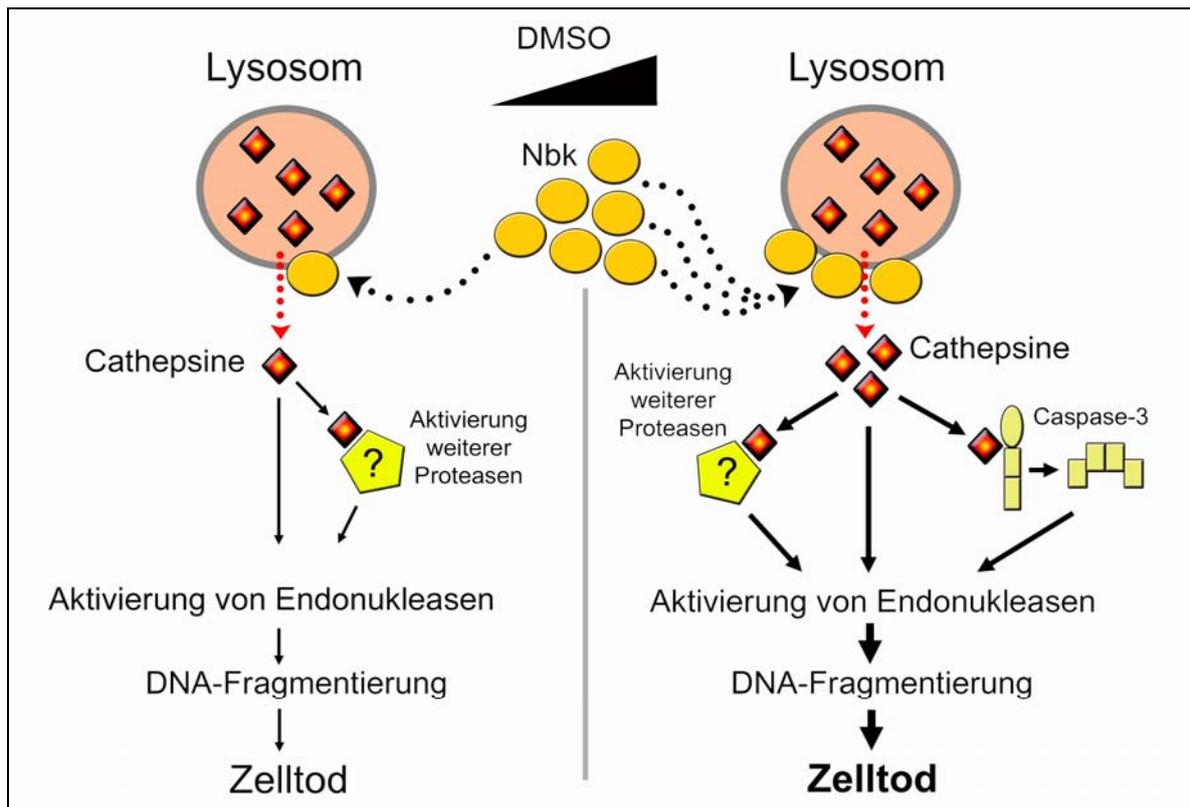
beeinträchtigt. Sowohl die Nbk- als auch die CD95L-induzierte Apoptose ließ sich konzentrationsabhängig durch DMSO verstärken. Weiterhin war der Effekt auch nicht auf einen einzelnen Zellklon beschränkt, sondern zeigte sich bei mehreren SK-Mel-13-Zellklonen, sowie bei den transient transfizierten Tet-On-Zellen der Melanomzelllinien Bro und SK-Mel-13.

Die solchermaßen erhöhte Nbk-Expression führte nun in Melanomzellen, im Gegensatz zu den DMSO-freien Bedingungen, erstmalig zu einer Prozessierung von Caspase-3, -8 und -9. Die Freisetzung von Cathepsin B, L und H wurde allerdings nach DMSO-Behandlung ebenfalls verstärkt, so dass anzunehmen ist, dass die Caspasenprozessierung einen sekundären Effekt in Folge einer stark erhöhten Cathepsinfreisetzung in das Zytosol darstellte. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ergab sich aus der Zeitkinetik der Cathepsinfreisetzung und der Caspasenaktivierung, dass die Cathepsine schon 6 h nach Doxycyclin-Behandlung ins Zytosol freigesetzt wurden, während Caspase-3 und -9 erst nach weiteren 6 h erstmals aktiviert waren. Außerdem wurde Cytochrom C auch nach DMSO-Verstärkung nicht aus den Mitochondrien freigesetzt, was jedoch ein notwendiges Kriterium der klassischen Prozessierung der Caspase-9 darstellt.

Diese Daten geben Grund zu der Annahme, dass die durch DMSO verstärkte Nbk-Überexpression zur Prozessierung von Caspase-3 und -9 durch Cathepsine geführt hatte, zumal die Fähigkeit der Cathepsine zur Caspasenspaltung, zumindest für Cathepsin B, bereits gezeigt werden konnte (Vancompernelle *et al*, 1998). In Melanomzellen scheinen Cathepsine nach der durch DMSO verstärkten Nbk-Überexpression bei der Prozessierung von Caspase-3 beteiligt zu sein, da sich nach Inhibition von Cathepsin B und L durch zFA-fmk ein verändertes Bild der Caspase-3-Spaltprodukte zeigte. In der Literatur wurde für Caspase-3 eine zweistufige Prozessierung ihrer Proform beschrieben: Zunächst wird die 32 kDa Proform in ein 12 kDa und ein 20 kDa Protein gespalten. Anschließend erfolgt die weitere Prozessierung des 20 kDa Proteins zu einem 17 kDa Spaltprodukt (Han *et al*, 1997). In Melanomzellen zeigte sich hier, nach DMSO-Verstärkung der Nbk-Überexpression, eine Prozessierung von Caspase-3 zu zwei Spaltprodukten mit 15 und 17 kDa Größe. Bei Behandlung mit zFA-fmk wurde zwar das 17 kDa große Spaltprodukt induziert, nicht aber die 15 kDa Form. Bei einer Inhibition der Cathepsine verlief die Spaltung der Caspase-3 also nur teilweise. Im Gegensatz dazu zeigte zFA-fmk in den gleichen Zellen keinen Effekt auf die Caspase-3-Spaltprodukte, sobald diese durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin, also klassisch durch Caspasenaktivität, induziert worden waren.

Doxorubicin inhibiert das Enzym Topoisomerase-II und induziert damit DNA-Strangbrüche, die über p53-Aktivierung den klassischen intrinsischen Apoptosesignalweg aktivieren (Kasahara *et al*, 1992). In der durch Doxorubicin induzierten Apoptose in Melanomzellen spielten die Cathepsine somit keine entscheidende Rolle. Zum einen ließ sich die Apoptose

durch Doxorubicin nicht durch zFA-fmk inhibieren, zum anderen zeigten sich keine Veränderungen an den mit Acridin-Orange gefärbten Lysosomen nach Doxorubicin-Behandlung. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in immortalisierten Fibroblasten nach Topoisomerase-II-Inhibition durch das Chemotherapeutikum Etoposid keine Beeinflussung der Apoptose durch verschiedene Cathepsininhibitoren (Demoz *et al*, 2002). Für die durch Nbk induzierte Apoptose in Melanomzellen schlage ich aufgrund der erhobenen Daten folgendes Modell vor:



**Abb. 44: Nbk induziert Apoptose durch die Freisetzung lysosomaler Cathepsine**

Abhängig von der DMSO-Konzentration nimmt die durch Doxycyclin kontrollierte Nbk-Expression zu. Links: Ohne DMSO ist die Nbk-Expression schwach. Wenig Nbk transloziert an lysosomale Membranen und führt dort zu einer Permeabilisierung und zum Anstieg des lysosomalen pH-Wertes. Unmittelbar nach Induktion der Nbk-Expression werden aktives Cathepsin B, L und H aus den Lysosomen in das Zytosol freigesetzt. Durch direkte Interaktion oder durch Aktivierung noch nicht identifizierter Proteine induzieren Cathepsine Endonukleasenaktivität. Die DNA wird fragmentiert und die Zelle stirbt. Rechts: Durch DMSO wird die Nbk-Expression massiv verstärkt. Viel Nbk transloziert an die Lysosomen und führt dort zur Membranpermeabilisierung. Cathepsin B, L und H werden verstärkt freigesetzt und Caspasen werden sekundär über Cathepsine prozessiert. Durch die Aktivierung weiterer Proteasen, durch Caspasen oder durch alleinige Cathepsinaktivität werden Endonukleasen aktiviert, die wiederum starke DNA-Fragmentierung und massiven Zelltod induzieren.

#### Caspasen- und Cathepsin-abhängige Apoptoseinduktion durch CD95L

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch Todesliganden aktiviert. Hier wurden die Auswirkungen der Überexpression des CD95-Todesliganden (CD95L) auf Melanomzellen untersucht. In einer vorausgegangenen Arbeit wurde festgestellt, dass der Signalweg der

CD95L-induzierten Apoptose in Melanomzellen eindeutig Caspasen-abhängig verläuft (Eberle *et al*, 2003). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten sich deutliche Hinweise auf Caspasenaktivität. So fanden sich nach CD95L-Expression Caspase-3- und Caspase-8-Spaltprodukte sowie eine Erhöhung der Caspase-3-Enzymaktivität. Außerdem ließ sich durch selektive Inhibition von Caspase-3, -8 und -9 die Apoptose durch CD95L hemmen. Ebenso zeigte eine generelle Caspaseninhibition unter Verwendung geringer zVAD-fmk-Konzentrationen (1  $\mu$ M) bereits eine weitgehende Blockierung der pro-apoptischen Aktivität von CD95L. Im Gegensatz zur Nbk-induzierten Apoptose, wo hohe zVAD-fmk-Konzentrationen (100  $\mu$ M) zur Blockierung benötigt wurden.

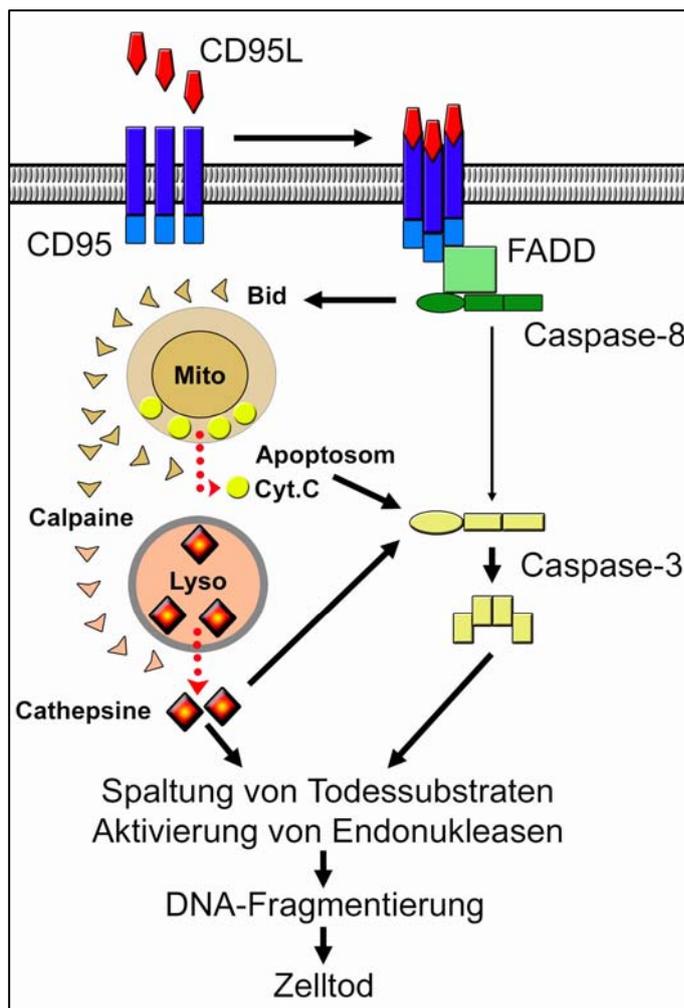
Trotzdem waren in der durch CD95L-induzierten Apoptose auch Lysosomen und Cathepsine beteiligt, was durch Acridin-Orange-Färbungen und Cathepsininhibitionen durch zFA-fmk eindeutig belegt werden konnte. Im Gegensatz zur Nbk-induzierten Apoptose aber schienen die Veränderungen an der lysosomalen Membran hier von sekundärer Natur zu sein, da die Cathepsine B, D, H und L erst 24 h nach CD95L-Überexpression und damit deutlich nach der Caspase-3- und Caspase-8-Prozessierung freigesetzt wurden. Diese Zeitkinetik schließt eine Caspasenspaltung durch Cathepsine, wie sie in der Nbk-induzierten Apoptose nahe liegt, weitgehend aus. Auch konnte der Inhibitor von Cathepsin B und L, zFA-fmk, die Spaltung der Caspase-3 und -8 nach Induktion von CD95L nicht beeinflussen, im Gegensatz zur Caspasenspaltung nach DMSO-verstärkter Überexpression von Nbk.

Dennoch ließ sich die durch CD95L induzierte Apoptose auch durch Applikation von zFA-fmk hemmen. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte auch in der Apoptose durch einen anderen Todesliganden wie TNF $\alpha$  eine Beteiligung von Cathepsinen in mehreren Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Guicciardi *et al*, 2000; Werneburg *et al*, 2004). Demzufolge sind sowohl Caspasen als auch Cathepsine für den CD95L-abhängigen Apoptoseweg in Melanomzellen von Bedeutung. Zuerst werden Caspasen aktiviert, die dann direkt oder indirekt die Freisetzung der Cathepsine aus den Lysosomen induzieren. Die Interaktion verschiedener Organellen wie Mitochondrien, Lysosomen und ER in der Apoptose wurde bereits verschiedentlich dokumentiert (Lemasters, 2005). Eine Möglichkeit zur Freisetzung der Cathepsine aus den Lysosomen besteht durch die Aktivierung von Calpainen im mitochondrialen Signalweg (Yamashima *et al*, 2003). Zytosolische Cathepsine könnten dann wiederum, ähnlich des mitochondrialen Verstärkungskreislaufes, über Spaltung des BH3-only-Proteins Bid oder über Caspasenprozessierung die CD95L-induzierte Apoptose verstärken (Reiners, Jr. *et al*, 2002).

Dieses Modell für einen gleichzeitigen Verlauf von Cathepsin- und von Caspasenaktivität wurde für die durch TNF $\alpha$  induzierte Apoptose in primären embryonalen Fibroblasten der Maus bereits postuliert. Dort zeigte sich, dass über die alleinige Inhibition der Caspasen durch zVAD-fmk in geringer Konzentration Apoptose nicht gehemmt werden konnte. Ebenso

wurde die durch TNF $\alpha$  induzierte Apoptose über alleinige Inhibition der Cathepsine durch zFA-fmk nicht beeinflusst. Nur durch die kombinierte Inhibition von Caspasen und Cathepsinen durch eine hohe zVAD-fmk-Konzentration oder durch Kombination von zVAD-fmk mit zFA-fmk konnte die durch TNF $\alpha$  induzierte Apoptose effektiv blockiert werden (Dietrich *et al*, 2004).

Auch das Vorhandensein verschiedener Cathepsin-kontrollierter Signalwege, die Stimulus-spezifisch aktiviert werden, wurde für andere Zellen bereits beschrieben. So zeigte sich in immortalisierten humanen Fibroblasten, dass die Defizienz von Cathepsin B oder Cathepsin L den durch TNF $\alpha$  induzierten Zelltod verhindern konnte, während die gleichen Defizienzen keinen protektiven Effekt bei Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin aufwiesen. Die durch Staurosporin induzierte Apoptose konnte wiederum durch eine Cathepsin D-Defizienz blockiert werden, während Cathepsin D allerdings keine Rolle in der Apoptose durch TNF $\alpha$  spielte (Fehrenbacher *et al*, 2004). Aufgrund der gewonnenen Daten wurde für die durch CD95L induzierte Apoptose in Melanomzellen das folgende Model vorgeschlagen:



**Abb. 45: Durch CD95L wird ein sowohl Caspasen- als auch Cathepsin-abhängiger Weg der Apoptose induziert**

Durch Bindung von CD95L wird über die Trimerisierung von CD95 und die Rekrutierung von FADD Caspase-8 aktiviert. Über die Spaltung des BH3-only-Proteins Bid kann das Apoptosesignal an den Mitochondrien (Mito) amplifiziert werden. Nach der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran erfolgt erst die Freisetzung von Cytochrom C (Cyt.C) und dann über die Bildung des Apoptosoms die Prozessierung von Caspase-3. Durch die Permeabilisierung der Mitochondrien kann es auch Kalzium-abhängig zur Aktivierung von Calpainen kommen, die wiederum zur Permeabilisierung der lysosomalen Membran beitragen können. Aus den Lysosomen (Lyso) erfolgt daraufhin die Freisetzung der Cathepsine B, D, L und H. Die Anwesenheit aktiver Cathepsine im Zytosol führt zur weiteren Amplifikation des Apoptosesignals durch Prozessierung von Caspase-3 über Cathepsine. Durch Caspasen- und möglicherweise auch Cathepsinaktivität werden Todessubstrate degradiert und Endonukleasen aktiviert. Die DNA wird fragmentiert und der finale Zelltod eingeleitet.

#### 4.4. Die Bedeutung alternativer Signalwege in der Apoptose

Verschiedene Signalwege des programmierten Zelltodes können in Zellen gleichzeitig ablaufen oder alternativ induziert werden (Unal-Cevik *et al*, 2004). Neben dem klassischen Caspasensignalweg können auch andere Proteasen wie Cathepsine und Calpaine sowie Endonukleasen wie AIF zur Ausführung des programmierten Zelltodes beitragen (Johnson, 2000). An der Regulation dieser unterschiedlichen Signalwege können wiederum verschiedene Organellen beteiligt sein. Sowohl Mitochondrien als auch Lysosomen und das Endoplasmatische Retikulum (ER) können unabhängig voneinander oder im Zusammenspiel apoptotische Signalkaskaden kontrollieren (Ferri und Kroemer, 2001). Für einen multizellulären Organismus ergibt sich aus der Parallelität mehrerer Proteasenkaskaden in der Apoptose ein breiteres Spektrum, um auf Todessignale reagieren zu können. Der evolutionäre Vorteil verschiedener Apoptosewege ist ein besserer Schutz vor diversen Apoptoseresistenzen wie sie z.B. nach Virusinfektion oder in maligne transformierten Zellen vorkommen können (Igney und Krammer, 2002). Während der Tumorgenese proliferieren vor allem Zellen mit Defekten in der klassischen Caspasen-abhängigen Apoptosemaschinerie. Die Fähigkeit von Tumorzellen trotzdem Apoptose auslösen zu können, lässt auf das Vorhandensein alternativer Signalwege schließen (Jaattela, 2002). Vor der Entwicklung zur Tumorzelle durchlaufen Zellen Stadien der Immortalisierung und der Transformation, wodurch die Zellen gleichzeitig gegenüber dem lysosomalen Zelltod sensitiviert werden können. Diese Sensitivierung hinsichtlich des lysosomalen Signalweges kann als Selbstschutzmechanismus der Zellen betrachtet werden, weil ihnen dadurch alternative Möglichkeiten zur Induktion von Apoptose geschaffen werden (Fehrenbacher und Jaattela, 2005).

Das Volumen von Lysosomen kann während der Zell-Replikation zunehmen. Tumorzellen, für die eine hohe Proliferationsrate charakteristisch ist, weisen dementsprechend größere Lysosomen auf. Da andererseits die Membranintegrität der Lysosomen mit zunehmender Größe abnimmt, sind die Lysosomenmembranen in Tumorzellen instabiler und für eine Permeabilisierung anfälliger als in normalen Zellen (Ono *et al*, 2003). Darüber hinaus weisen Tumorzellen einen höheren Proteinumsatz als normale Zellen auf, was zu einer Akkumulation von Eisen in den Lysosomen und damit zu verstärktem oxidativen Stress durch die Fenton-Reaktion führen kann (Brunk *et al*, 2001). Möglicherweise kommt es deshalb zu einer erhöhten Sensitivität von transformierten Zellen gegenüber dem lysosomalen Zelltod, wie z.B. bei immortalisierten murinen Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten der Maus festgestellt wurde (Fehrenbacher *et al*, 2004).

Lysosomale Cathepsine werden in verschiedenen maligne transformierten Zellen verstärkt exprimiert, was auf eine hohe Bedeutung des bisher eher unterschätzten lysosomalen

Signalapparates in der Apoptose von Tumorzellen schließen lässt (Jedezsko und Sloane, 2004). In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigte sich kürzlich eine große Bedeutung der Lysosomen in der p53-unabhängigen Apoptose von Tumorzellen. Bei der Untersuchung von 15 verschiedenen Substanzen, die in Kolonkarzinomzellen Apoptose unabhängig von p53 auslösen konnten, wurde von sieben dieser Substanzen der lysosomalen Signalweg über eine Permeabilisierung der Lysosomenmembran induziert (Erdal *et al*, 2005). Möglicherweise stellt der lysosomal kontrollierte Zelltod einen generellen Mechanismus zur Induktion des p53-unabhängigen programmierten Zelltodes dar. Da p53 in ca. 50% der humanen Tumoren inaktiv vorliegt (Beroud und Soussi, 1998), ergibt sich aus dieser Annahme eine große Bedeutung für den lysosomalen Signalweg. Dies könnte auch für Melanomzellen zutreffen, in denen p53 zwar nur selten mutiert ist, der Signalweg aber trotzdem blockiert zu sein scheint (Satyamoorthy *et al*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Apoptoseinduktion, sowohl durch Todesliganden als auch durch pro-apoptotische Bcl-2-Proteine, die Lysosomen eine essentielle Rolle bei der Realisierung der Apoptose einnehmen. Die Aufklärung dieser Signalwege ermöglicht es Einsicht in die Reorganisation und Regeneration von Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu nehmen. Die Analyse Caspasen-unabhängiger Signalwege des programmierten Zelltodes kann für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Überwindung von Apoptosedefizienz von hoher Wichtigkeit sein, da sie neue Möglichkeiten zur kombinierten Induktion von Apoptose über mehrere Todeswege in Tumorzellen darstellen könnten.

#### **4.5. Apoptoseinduktion durch Bcl-2-Proteine als therapeutischer Ansatz**

Die Bcl-2-Proteine besitzen eine übergeordnete Stellung in den Organellen-regulierten Apoptosekaskaden verschiedener Todessignalwege. Die Expression anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine wird in vielen humanen Tumoren hochreguliert und korreliert oftmals mit einer schlechten Prognose der Patienten (Piro, 2004). Beim Melanom zeigte sich, dass die Abschwächung der Expression der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bax und Bak mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Fecker *et al*, 2006). In Übereinstimmung mit diesen Befunden kann die anti-tumorale Wirkung vieler Chemotherapeutika unter anderem durch die Aktivität pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine vermittelt werden (Raffo *et al*, 2000). Aus diesem Grund stellen Bcl-2-Proteine viel versprechende Ziele therapeutischer Ansätze zur Apoptoseinduktion in Tumorzellen dar. Eine mögliche Strategie zur Behandlung von Tumoren auf der Ebene der Bcl-2-Proteine ist die Reduzierung der Expression anti-apoptotischer Proteine mit Hilfe von Antisense-Technologie. Durch Verwendung eines Antisense-Konstruktes, das gegen die mRNA von Bcl-2 gerichtet war (Oblimersen,

Genasense), konnte die Bcl-2-Expression in Tumorzellen deutlich reduziert werden (Reed *et al*, 1990). In einer klinischen Überprüfung, die unter anderem an Melanompatienten durchgeführt wurde, ließ sich allerdings keine signifikante Verlängerung der Überlebensdauer durch Behandlung mit dem Bcl-2-Antisense-Medikament feststellen (Kim *et al*, 2004). Eine Möglichkeit zur Optimierung der Antisense-Therapie wäre die Verwendung eines Oligonukleotids, das die mRNA-Sequenzen mehrerer anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine gleichzeitig erkennen kann. So konnte bereits durch die Verwendung einer bispezifischen Antisense-DNA, die gegen Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> gerichtet war, in mehreren Tumorzelllinien signifikant Apoptose induziert werden (Zangemeister-Wittke *et al*, 2000). Einen direkteren Ansatz zur Überwindung von Apoptosedefizienz in Tumorzellen stellt dagegen die Verwendung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Kombination der Expression pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine wie Nbk und Bax mit Chemotherapeutika die Apoptoseresistenz von Melanomzellen zum Teil überwunden werden. Mit Hinblick auf eine mögliche therapeutische Verwendbarkeit pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine wäre ihr Einsatz vor allem in Kombination mit bestehenden Chemo- oder Immuntherapien denkbar. Gängige Chemotherapien könnten zudem, bei Überexpression von Nbk oder Bax in den Tumorzellen, in geringerer Konzentration und damit schonender für normale Zellen angewendet werden. So konnte kürzlich an Mäusen, denen humane Ovarialkarzinomzellen transplantiert wurden, gezeigt werden, dass die Kombination aus Chemotherapie und Behandlung mit synthetischen BH3-Peptiden zu einer erhöhten Apoptoseinduktion in den Tumorzellen führte (Dharap *et al*, 2006). Anhand der hier erhobenen Daten könnte sich zudem ein Behandlungsschema für Melanomzellen anbieten, das auf der Kombination von BH3-only-Proteinexpression mit Agentien beruht, die zur Permeabilisierung der lysosomalen Membran beitragen. Solche Agentien, so genannte lysosomotrophe Substanzen, zeigten bereits in Leukämie- und in Neuroblastomzellen pro-apoptotisches Potential (Dai *et al*, 1999; Yu *et al*, 2004) und könnten möglicherweise auch in Melanomzellen zusammen mit BH3-Peptiden erfolgreich zur Apoptoseinduktion eingesetzt werden.

Als eine Therapieoption, die auf Induktion von Apoptose in Tumorzellen basiert, wird gegenwärtig die Verwendbarkeit von BH3-Peptiden pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine präklinisch überprüft (Fischer und Schulze-Osthoff, 2005). Die Wirksamkeit von BH3-Peptiden wird dabei allerdings durch ihre geringe Zellpermeabilität und durch ihre schnelle proteolytische Degradierung beeinträchtigt. Über die Konjugation von Fettsäuren oder von Transduktionsdomänen viraler Proteine an diese Peptide könnten diese Probleme in Zukunft überwunden werden. Ein solchermaßen modifiziertes BH3-Peptid des BH3-only-Proteins Bad, zeigte bereits in Lymphomzellen die Fähigkeit zur starken Apoptoseinduktion, während normale Lymphozyten nicht beeinträchtigt wurden (Wang *et al*, 2000). Ein weiteres Problem

bei der Behandlung von Tumorzellen mit BH3-Peptiden stellt die besondere Spezifität der BH-Domänen dar. Während Bax-BH3-Peptide vor allem in Tumorzellen mit Bcl-2-Überexpression Apoptose induzierten, zeigten sie sich relativ ineffektiv in Zellen mit Bcl-x<sub>L</sub>-Überexpression (Yang *et al*, 1995). Durch eine geringe Veränderung der BH3-Sequenz über Aminosäuresubstitution oder durch die Verwendung synthetischer Moleküle, so genannter „small molecules“, die die BH3-Domäne nachahmen (BH3-Mimetika), lässt sich allerdings ihre Spezifität erniedrigen und damit ihre Wirkungsbreite deutlich erhöhen (Walensky *et al*, 2004).

Die zunehmende Zahl der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine, die aktuell als Therapieansätze untersucht werden, unterstreicht die große Bedeutung von Proteinen wie Bax und Nbk für therapeutische anti-tumorale Konzepte. Diese Proteine verfügen über das Potential in der Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt zu werden, um bestehende Therapieformen zu ergänzen oder zu verbessern. Durch die genauere Aufklärung ihrer zellspezifischen Wirkungsmechanismen könnten sich weitere Möglichkeiten ergeben, um Tumore mit starken Apoptoseresistenzen, wie z.B. das maligne Melanom, in Zukunft effektiver therapieren zu können. Die Besonderheit beim Melanom könnte in der Caspasenunabhängigkeit der durch Bcl-2-Proteine ausgelösten Apoptose bestehen. Die Entschlüsselung dieser alternativen Apoptosewege könnte einen entscheidenden Beitrag zur Entwicklung von Tumorspezifischen Behandlungsschemata leisten, die auf der Induktion von Apoptose in Tumorzellen basieren.