



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Untersuchungen zur Apoptose-Signaltransduktion in
chemosensitiven und chemoresistenten Melanomzelllinien**

Autor: Kristina Renz
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Doktorvater: Prof. Dr. D. Schadendorf

Das maligne Melanom ist gekennzeichnet durch steigende Inzidenz und in fortgeschrittenem Stadium extrem schlechte Therapierbarkeit. Diese ist unter anderem auf die ausgeprägte Chemoresistenz der Melanomzellen zurückzuführen. Eine Verbesserung der Therapie des malignen Melanoms könnte erreicht werden durch die Identifikation von Chemoresistenzmechanismen. Mit diesem Ziel wurden in einem Zellkultursystem die sensitive Melanomzelllinie MeWo und von ihr abgeleitete chemoresistente Sublinien vergleichend untersucht. Es ist bekannt, daß viele Zytostatika ihre Wirkung über die Induktion von Apoptose erzielen. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob die in der Klinik angewandten Zytostatika Cisplatin, Etoposid, Fotemustin und Vindesin in der sensitiven Melanomzelllinie MeWo sowie in den chemoresistenten Sublinien über die Auslösung von Apoptose zum Zelltod führen. Dazu wurde mit Hilfe eines ELISA die für Apoptose spezifische DNA-Fragmentierung der Zellen nach Zytostatikaexposition bestimmt. Anschließend wurde die Expression Apoptose-relevanter Proteine in sensitiven und chemoresistenten MeWo-Zellen sowohl vor als auch nach Zytostatikaexposition im Western Blot vergleichend untersucht. Ziel hierbei war es, Unterschiede im Expressionslevel dieser Proteine in sensitiven und resistenten Zellen zu suchen, die die Chemoresistenz der resistenten Zelllinien erklären. Die Untersuchung der DNA-Fragmentierung ergab, daß Cisplatin, Etoposid und Vindesin in sensitiven MeWo-Zellen DNA-Fragmentierung auslösen. Es konnte somit gezeigt werden, daß diese Zytostatika Apoptose induzieren. Dasselbe konnte für Cisplatin- und Vindesin-resistente Zellen nachgewiesen werden. Etoposid-induzierter Zelltod in Etoposid-resistenten Zellen war nicht mit DNA-Fragmentierung assoziiert. Es läßt sich daraus schließen, daß Etoposid-resistente Zellen einen Chemoresistenzmechanismus entwickelt haben, der zu Apoptose-Defizienz führt. In Fotemustin-exponierten sensitiven sowie resistenten MeWo-Zellen konnte nur geringe DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. Hier müssen weitere Apoptose-spezifische Untersuchungen zeigen, welche Art des Zelltods Fotemustin induziert, Apoptose oder Nekrose oder eine noch nicht näher charakterisierte Art des Zelltods. Bei der vergleichenden Untersuchung der Proteinexpression von sensitiven MeWo-Zellen und Cisplatin-resistenten Zellen zeigt sich in Cisplatin-resistenten Zellen eine höhere konstitutive Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und eine verminderte konstitutive Expression des proapoptotischen Proteins Bax; desweiteren war hier im Vergleich zu sensitiven MeWo-Zellen niedrigere Bax-Expression nach Cisplatinexposition detektierbar. Der konstitutiv höhere Bcl-2/Bax-Quotient in Cisplatin-resistenten Zellen könnte einen Resistenzmechanismus darstellen. In der Untersuchung der Etoposid-resistenten Zellen konnte als möglicher Resistenzmechanismus die im Vergleich zu sensitiven MeWo-Zellen erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 identifiziert werden. Weiterhin stellte sich heraus, daß Etoposid-resistente Zellen das antiapoptotische Protein Bcl-X_L in geringerem Maß exprimieren als sensitive MeWo-Zellen. Es bleibt zu klären, ob Bcl-X_L in Etoposid-exponierten Zellen tatsächlich antiapoptotische Funktion hat. Für Fotemustin-resistente Zellen fand sich im Vergleich zu sensitiven MeWo-Zellen eine vor und nach Fotemustinexposition geringere Expression des proapoptotischen Proteins Bax sowie eine unverändert hohe Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 nach Fotemustin-Exposition. Wie oben erwähnt ist es fraglich, ob Fotemustin über die Auslösung von Apoptose zum Zelltod führt. Die Bedeutung der Proteine Bcl-2 und Bax muß also eventuell auch im Kontext eines nicht apoptotischen Zelltodes gesehen werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, daß die Proteine der Bcl-2-Familie von Bedeutung sind für die Weiterleitung des Zytostatika-induzierten apoptotischen Signals und eventuell für die in den untersuchten Zellen vorliegenden Chemoresistenzmechanismen.

Das antiapoptotische Protein IAP-2 und das proapoptotische Protein Apaf-1 werden in sensitiven und chemoresistenten Zellen vor und nach Zytostatikaexposition in gleichem Maß exprimiert. Es konnte kein Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und möglichen Chemoresistenzmechanismen hergestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise der Zytostatika Cisplatin, Etoposid, Fotemustin und Vindesin beim Melanom. Es wurden mögliche Ursachen für die verminderte Sensibilität resistenter Zelllinien gegenüber den Kultivierungszytostatika und für Zytostatika-induzierte Veränderungen in der sensitiven Zelllinie MeWo aufgezeigt. Um die Relevanz der aufgeführten Mechanismen für die Chemoresistenz und den Zusammenhang mit der schlechten Therapierbarkeit des malignen Melanoms zu ergründen, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.