

**TNF α -vermittelte Sensitivierung von malignen
hämatologischen Zellen für Zytostatika- und
Ceramid-induzierte Apoptose**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
-Dr. rer. nat.-

vorgelegt von
Dipl. Biol. Karin Schmelz

eingereicht beim
Fachbereich Biologie, Pharmazie und Chemie
Freie Universität zu Berlin

2002

Diese Arbeit wurde angefertigt an der

Robert-Rössle-Klinik

Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie

Ärztlicher Direktor Prof. Dr. B. Dörken

Charité, Campus Berlin-Buch

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. B. Dörken

2. Herr Prof. Dr. F. Rathjen

Tag der Disputation

3. April 2003

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Apoptose: ein Programm zur geregelten Selbstzerstörung	1
1.2. Caspasen: ausführende Proteine der Apoptose-Maschinerie	2
1.3. Signalwege der Apoptose	5
1.3.1. Mitochondriale Induktion von Apoptose	5
1.3.2. Rezeptor-vermittelte Induktion von Apoptose	10
1.4. Apoptose-Induktion durch die Zytostatika Etoposid und Epirubicin	13
1.4.1. Etoposid	14
1.4.2. Epirubicin	14
1.5. Apoptose-Induktion durch Ceramide	14
1.6. TNF α -induzierte Aktivierung von NF- κ B: Vermittlung von Überlebenssignalen	17
1.6.1. IAPs: Anti-apoptotische Proteine, deren Expression unter Kontrolle von NF- κ B steht	21
1.6.2 Die NF- κ B-Aktivierung als onkogenes Potential und Angriffspunkt für die Tumortherapie	23
1.7. Ziele der vorliegenden Arbeit	24
2. Material	25
2.1. Chemikalien	25
2.2. Enzyme, Proteine und Peptide	26
2.3. Antikörper	26
2.4. Kits	27
2.5. Radioaktive Substanzen	27
2.6. Membranen	27
2.7. Zelllinien	28
2.8. Oligonukleotide zur Verwendung als Primer	29
3. Methoden	30
3.1. Methoden der Zellkultur	30
3.1.1. Kulturbedingungen	30
3.1.2. Aufbereitung von Zellen aus Vollblut	30
3.1.3. Konservieren von Zellen durch Einfrieren	30
3.2. Induktion von Apoptose und Zelltod	31
3.2.1. Behandlung von Zellen mit Zytostatika oder C2-Ceramid	31
3.2.2. Induktion von Apoptose in HD-MyZ in Gegenwart von Fumonisin B1	31
3.2.3. Induktion von Apoptose in HD-MyZ in Gegenwart von Caspase-8-Inhibitor	31
3.3. Quantifizierung von Zelltod	32
3.3.1. Trypanblaufärbung	32

3.3.2. Bestimmung von Apoptose durch Annexin-V-FITC-Färbung	32
3.3.3. Bestimmung von Apoptose mithilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse	33
3.3.4. Bestimmung der LDH-Aktivität	33
3.4. Proteinchemische Methoden	34
3.4.1. Herstellen von Gesamtzellextrakten	34
3.4.2. Herstellung von löslichen Extrakten durch Subfraktionierung von Zellen	35
3.4.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	35
3.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	36
3.4.5. Western Immunoblot-Analyse	37
3.4.6. Caspase-Aktivitätsmessung	38
3.4.7. <i>In-Vitro</i> -Aktivierung von Caspasen	39
3.4.8. Bestimmung der Sphingomyelin-Hydrolyse	39
3.4.9. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$	40
3.5. Molekularbiologische Methoden	41
3.5.1. DNA-Standard-Methoden	41
3.5.2. Isolierung von Gesamt-RNA	41
3.5.3. Northern Blot-Analyse	41
3.5.4. Herstellung von cDNA durch RT-PCR	44
3.5.5. PCR zum Nachweis spezifischer Transkripte	45
3.5.6. Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten	45
4. Ergebnisse	46
4.1. Charakterisierung der HD-MyZ Transfektanten im Hinblick auf die Blockierung des NF- κ B-Signalweges	46
4.1.1. Expression von I κ B α in den HD-MyZ –Transfektanten	46
4.1.2. Blockierung des Signalweges zur NF- κ B-Aktivierung durch Expression von I κ B α dn	47
4.1.3. Expression des NF- κ B-Zielgens <i>hiap-1</i> in HD-MyZ, HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen	
4.2. Einfluß von TNF α auf die Apoptose von HD-MyZ	51
4.2.1. TNF α -induzierte Apoptose in HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn	51
4.2.2. CD95/Fas-induzierte Apoptose in HD-MyZ	53
4.2.3. Etoposid-, Epirubicin- und C2-Ceramid-induzierte Apoptose von HD-MyZ nach Vorbehandlung mit TNF α	54
4.3. Verstärkung der Apoptose durch TNF α in malignen, hämatologischen Zelllinien	58
4.4. Aktivierung von Caspasen in HD-MyZ nach Behandlung mit TNF α und Zytostatika oder C2-Ceramid	64
4.4.1. Prozessierung und Aktivierung der Caspase-3	64
4.4.2. Prozessierung und Aktivierung der Initiator-Caspasen, Caspase-2 und Caspase-8	68
4.4.3. <i>In-Vitro</i> -Aktivierung von Caspase-8 in unbehandelten HD-MyZ-Zellen	71
4.4.4. Epirubicin-induzierte Apoptose in HD-MyZ bei gleichzeitiger Inhibition von Caspase-8	72

4.5. Verstärkung der mitochondrialen Aktivierung durch $TNF\alpha$ bei der Zytostatika- und Ceramid-induzierten Apoptose von HD-MyZ	73
4.5.1. Spaltung von Bid	73
4.5.2. Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials durch Etoposid, Epirubicin und Ceramid in Gegenwart von $TNF\alpha$	75
4.5.3. Freisetzung von Cytochrom C	77
4.5.4. Prozessierung und Aktivierung von Caspase-9 nach Behandlung mit Epirubicin und Ceramid	78
4.6. Aktivierung der Caspasen und der Mitochondrien bei der Sensitivierung von K562 durch $TNF\alpha$	79
4.6.1. Caspase-3- und Caspase-8-Aktivierung von K562 unter sensitivierenden Bedingungen	79
4.6.2. Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach Behandlung von K562 und EM-3 mit Zytostatika in Gegenwart von $TNF\alpha$	80
4.7. Einfluß von Ceramid auf die Sensitivierung von HD-MyZ durch $TNF\alpha$	82
4.7.1. Aktivierung des Sphingomyelin-Zyklus in HD-MyZ durch $TNF\alpha$	82
4.7.2. Sensitivierung von HD-MyZ für Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose durch C2-Ceramid	83
4.7.3. Etoposid-induzierte Apoptose in Gegenwart von $TNF\alpha$ und des Ceramid-Synthase-Blockers Fumonisin B1	85
4.8. Einfluß von Proteinen, deren Gene unter transkriptioneller Kontrolle von $NF-\kappa B$ stehen, auf die Apoptose in HD-MyZ	86
4.8.1. Mitglieder der IAP-Familie: HIAP-1, HIAP-2 und XIAP	86
4.8.2. Mitglieder der Bcl-2-Familie: Bcl-xL und Bid	89
5. Diskussion	90
5.1. Einfluß der $NF-\kappa B$ -Blockierung durch Expression von $I\kappa B\alpha^{dn}$ auf die $TNF\alpha$ -, Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose von HD-MyZ	91
5.2. $TNF\alpha$ sensitiviert HD-MyZ für Etoposid-, Epirubicin- und Ceramid-induzierte Apoptose unabhängig von $NF-\kappa B$	93
5.3. Einfluß von HIAP-1, HIAP-2 und Bcl-2 auf die Sensitivierung von HD-MyZ durch $TNF\alpha$	94
5.4. Aktivierung von Caspasen in HD-MyZ nach Behandlung mit $TNF\alpha$ und Etoposid, Epirubicin oder Ceramid	96
5.5. Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges in HD-MyZ bei der Zytostatika- und C2-Ceramid-induzierten Apoptose	99
5.6. C2-Ceramid kann $TNF\alpha$ im Hinblick auf die Sensitivierung von HD-MyZ nicht ersetzen	102
5.7. Weitere mögliche Mechanismen der $TNF\alpha$ -vermittelten Sensitivierung	102
5.8. Relevanz des sensitivierenden $TNF\alpha$ -Effektes für die Therapie von hämatologischen Erkrankungen	104
6. Zusammenfassung	106

7. Literaturverzeichnis	108
8. Anhang	137
8.1. Abkürzungsverzeichnis	137
8.2. Lebenslauf	140
8.3. Publikationen	141
8.4. Danksagung	142

Abstract

Apoptosis is the central mechanism of cell death mediating the killing of malignant cells upon chemotherapy. Resistance of tumor cells against cytostatic drugs is frequent and this underlines the necessity to understand the underlying molecular events. That is the basis to develop strategies which are able to overcome these resistance mechanisms and to achieve susceptibility of tumor cells to cancer treatment. In the present study, $\text{TNF}\alpha$ was characterized as a sensitizer of malignant hematological cells for cytostatic drug- and ceramide-induced apoptosis. The molecular mechanisms mediating this sensitizing effect were the focus of this study.

The sensitizing effect of $\text{TNF}\alpha$ and the implicated signaling pathways were investigated in the well characterized Hodgkin-derived cell line HD-MyZ. Despite the complete resistance of HD-MyZ cells to $\text{TNF}\alpha$ itself, $\text{TNF}\alpha$ sensitized for cell death triggered by etoposide, epirubicin and C_2 -ceramide. The expression of a dominant-negative $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$) resulted in the disruption of the NF- κ B-signaling pathway and blocked the expression of the anti-apoptotic gene, *hiap-1*. While HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ cells were more sensitive for drug-induced apoptosis, the sensitizing effect of $\text{TNF}\alpha$ was not effected upon blocking of the NF- κ B-signaling.

The sensitization by $\text{TNF}\alpha$ led to a better activation of the mitochondrial apoptosome and the downstream caspase cascade, i.e. caspase-3.

Functional experiments showed that interconnecting signaling pathways which link the death receptor signaling to the mitochondrial pathway of apoptosis are not the underlying mechanism in the cell line model of HD-MyZ since no caspase-8 or bid cleavage was observed. Furthermore, caspase-8 inhibition could not prevent the sensitizing effect of $\text{TNF}\alpha$. Additionally, the activation of the sphingomyelin second messenger pathway as cause for the sensitizing by $\text{TNF}\alpha$ was excluded. The sensitizing effect of $\text{TNF}\alpha$ was not restricted to the Hodgkin cell line HD-MyZ as $\text{TNF}\alpha$ also augmented the drug-induced apoptosis of different chronic and acute leukemia-derived cell lines and the Burkitt-like lymphoma line BJAB. Therefore, activators of this sensitizing pathway could represent a useful strategy to improve chemotherapy of hematological malignancies and could also be the basis for novel drug design.