

4. Ergebnisse

Die Rekrutierung der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Signalwege in hämatologischen Tumorentitäten und der Einfluß dieser Signalgebung auf die Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose standen im Mittelpunkt des experimentellen Vorgehens dieser Arbeit. Dabei sollte einerseits die anti-apoptotische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ durch die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges untersucht werden und andererseits sollten Aussagen über den Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ bei der Zytostatika- und Ceramid-induzierten Apoptose gemacht werden. Für diese Fragestellungen wurden Transfektanten der Hodgkin-Zelllinie HD-MyZ verwendet, die durch Blockierung des NF- κ B-Signalweges die Betrachtung der $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung unter Ausschaltung der durch NF- κ B-vermittelten und durch $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Überlebenssignale erlaubten.

4.1. Charakterisierung der HD-MyZ Transfektanten im Hinblick auf die Blockierung des NF- κ B-Signalweges

4.1.1. Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in den HD-MyZ –Transfektanten

Für die vorliegende Arbeit standen stabile Transfektanten der Hodgkin-Zelllinie HD-MyZ zur Verfügung, die entweder mit einem Kontrollkonstrukt (Vektor pcDNA 3.1.) oder mit einem deletierten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$) transfiziert wurden. Die stabile Transfektion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$, des dominant-negativen Inhibitors von NF- κ B, führte in den HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ -Transfektanten im Gegensatz zu den Kontrollklonen zur Expression eines auf 28 kDa am N-Terminus verkürzten Proteins. Da die endogene Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ durch die Transfektion erhalten bleibt, exprimieren sowohl die HD-MyZ mock-Kontrollklone, die Mutterlinie HD-MyZ, als auch die HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ -Transfektanten das Wildtyp-Protein der Größe von 37 kDa. Als Zielgen von NF- κ B wird die Expression des Wildtyp $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ -Transfektanten vermindert (Abb.8).

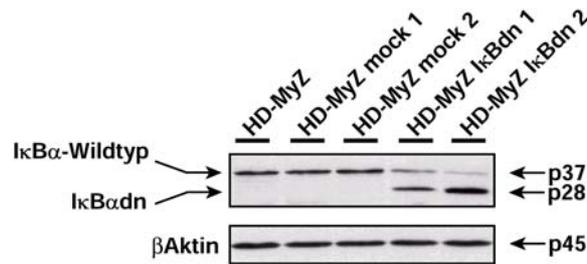


Abb. 8: Nachweis der Expression von $I\kappa B\alpha$ und $I\kappa B\alpha dn$ im Western Blot. 50 μg Gesamtextrakt der Mutterlinie HD-MyZ, zweier stabiler Kontrolltransfektanten (HD-MyZ mock 1 + 2) sowie zweier HD-MyZ $I\kappa Bdn$ -Klone wurden in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt. $I\kappa B\alpha$ und verkürztes $I\kappa B\alpha dn$ sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.1.2. Blockierung des Signalweges zur NF- κB -Aktivierung durch Expression von $I\kappa B\alpha dn$

Dem bereits erfolgten Nachweis der verminderten DNA-Bindung von NF- κB durch die Expression von $I\kappa B\alpha dn$ im EMSA (*electro mobility shift assay*) (212) sollte die Untersuchung der Funktionalität der NF- κB -Blockierung anhand der Expression von Zielgenen angeschlossen werden. Da bereits für andere Zelllinien gezeigt werden konnte, daß für die durch NF- κB vermittelten Überlebenssignale die Expression von anti-apoptotischen Genen der *iap*-Familie eine wesentliche Rolle spielt, wurde die Expression von *hiap-1* und *hiap-2* durch RT-PCR in HD-MyZ mock und HD-MyZ $I\kappa Bdn$ untersucht (Abb. 9 und 10).



Abb. 9: Nachweis spezifischer Transkripte für *IκBαdn* und *hiap-1* in HD-MyZ mock und HD-MyZ $I\kappa Bdn$ in der RT-PCR. 10 μl RNA wurden mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (s. 3.4.4.). Der Nachweis spezifischer Transkripte erfolgte durch Amplifikation mit Primern spezifisch für *hiap-1* (Spur 1 und 4) bzw. $I\kappa B\alpha dn$ (Spur 2 und 5). Die semi-quantitative Auswertung wurde durch Amplifikation eines Transkriptes für $\beta Aktin$ (Spur 3 und 6) ermöglicht. Ein DNA-Standard (Spur S) diente als Größenvergleich.

Da hier unbehandelte Zellen unter nicht-induzierenden Bedingungen untersucht wurden, war die in Abb. 9 nachgewiesene Expression von *hiap-1* als Zielgen von NF- κ B als basale Expression zu bezeichnen. Die RT-PCR zeigte eine verminderte, basale Expression von *hiap-1* in HD-MyZ κ Bdn im Vergleich zu HD-MyZ mock-Zellen. Die Amplifikation des exogen exprimierten κ Bdn-Konstruktes war durch Einschluß von Vektorsequenzen für die Wahl der Primer möglich und nur in den HD-MyZ κ Bdn Transfektanten zu detektieren (Abb. 9). Damit konnte die Expression von κ Bdn in HD-MyZ-Zellen bestätigt werden.

Die κ Bdn-Transfektanten zeigten eine erniedrigte *hiap-1*-Expression auf transkriptioneller Ebene. Im Gegensatz zur Expression von *hiap-1* blieb die in der RT-PCR nachgewiesene Expression eines weiteren Gens der *iap*-Familie, *hiap-2*, von der Expression eines dominant-negativen κ B (κ Bdn) unbeeinflusst (Abb. 10). Ebenso konnte für die Expression von *flip* keine Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor NF- κ B festgestellt werden (Abb. 10).

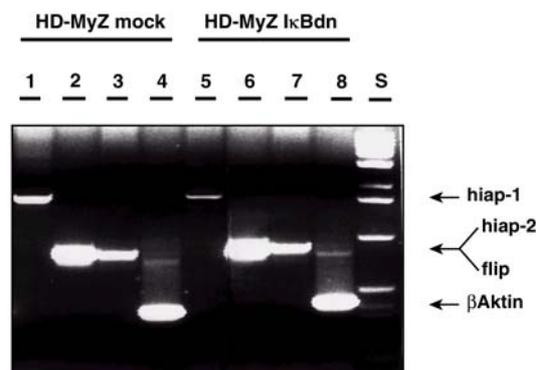


Abb. 10: Nachweis spezifischer Transkripte für *hiap-1*, *hiap-2* sowie *flip* in HD-MyZ mock und HD-MyZ κ Bdn in der RT-PCR. 10 μ l RNA wurden mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (s. 3.4.4.). Der Nachweis spezifischer Transkripte erfolgte durch Amplifikation mit Primer spezifisch für *hiap-1* (Spur 1 und 5), für *hiap-2* (Spur 2 und 6) bzw. für *flip* (Spur 3 und 7). Die semi-quantitative Auswertung wurde durch Amplifikation eines Transkriptes für β Aktin (Spur 4 und 8) ermöglicht. Ein DNA-Standard (Spur S) diente als Größenvergleich.

4.1.3. Expression des NF- κ B-Zielgens *hiap-1* in HD-MyZ, HD-MyZ mock und HD-MyZ κ Bdn unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen

Unter nicht induzierenden Bedingungen zeigten unbehandelte HD-MyZ Zellen in der Northern Blot-Analyse im Vergleich zu den Hodgkin-Zelllinien L428, L540, L591 und HD-MyZ-LM2 eine sehr schwache Expression von *hiap-1*, ähnlich wie sie auch für Sup-HD und

KM-H2 zu detektieren war (Abb. 11). Zusätzlich wurden die Linien SKW 6.4, Jurkat K2 und H9 3D8 in den Vergleich mit einbezogen.

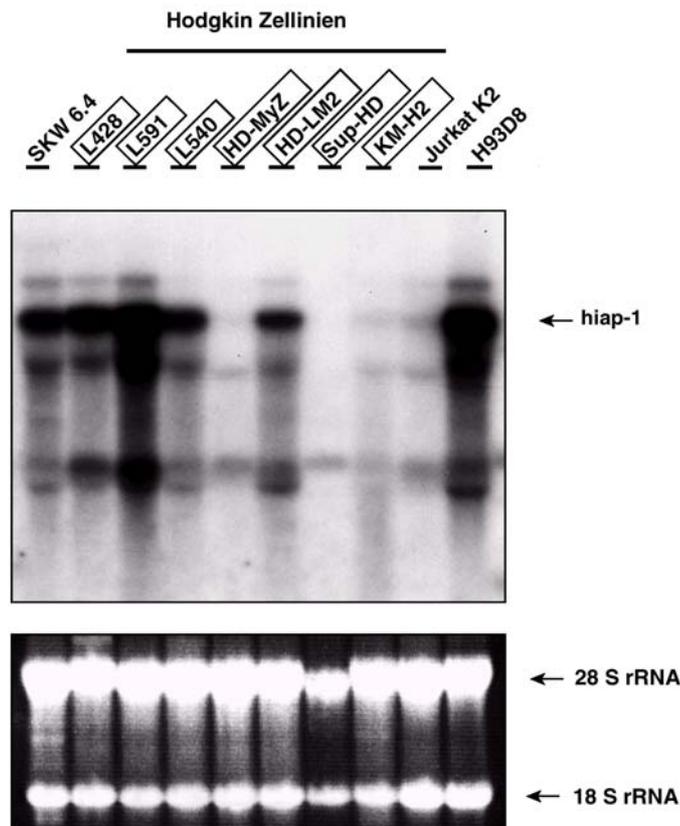


Abb. 11: Northern Blot-Analyse zum Nachweis der transkriptionellen Expression von *hiap-1* in verschiedenen Zelllinien. 20 µg Gesamt-RNA unbehandelter Zellen wurden auf einem 1.5% Agarose-Gel aufgetrennt und per Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Hybridisierung wurde ein *hiap-1*-Fragment in Anwesenheit von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP amplifiziert und als Sonde eingesetzt. Die auf der Membran mit Ethidiumbromid-gefärbte 28 S und 18 S rRNA diente als Ladungskontrolle.

Die Induktion der NF- κ B-Aktivität durch TNF α führte in HD-MyZ und HD-MyZ mock zu einer starken Induktion der Expression von *hiap-1* gegenüber des basalen Expressionsniveaus in Abwesenheit von TNF α (Abb. 12A). Nach 6h und 24h induzierten 20 ng/ml TNF α eine mehrfach stärkere Expression von *hiap-1* in HD-MyZ und HD-MyZ mock gegenüber HD-MyZ I κ Bdn, wobei die Expression von I κ Bdn zu einer deutlichen, aber nicht vollständigen Blockierung der *hiap-1* Expression führte. Zwischen der Mutterlinie HD-MyZ und der Kontrolllinie HD-MyZ mock war kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Da die *hiap-1*-Expression auf transkriptioneller Ebene bereits nach 6h ein Plateau erreicht hatte, wurde die Induktion mit TNF α (20 ng/ml) wiederholt und das Vorhandensein eines *hiap-1*-Transkriptes nach 1.5h und 6h im Northern Blot bestimmt. Abb. 12B zeigt in HD-MyZ

mock bereits nach 1.5h eine *hiap-1*-Expression, die nach 6h ihr Maximum erreicht. Demgegenüber war in HD-MyZ κ Bdn nur eine sehr geringe *hiap-1* Transkription zu detektieren.

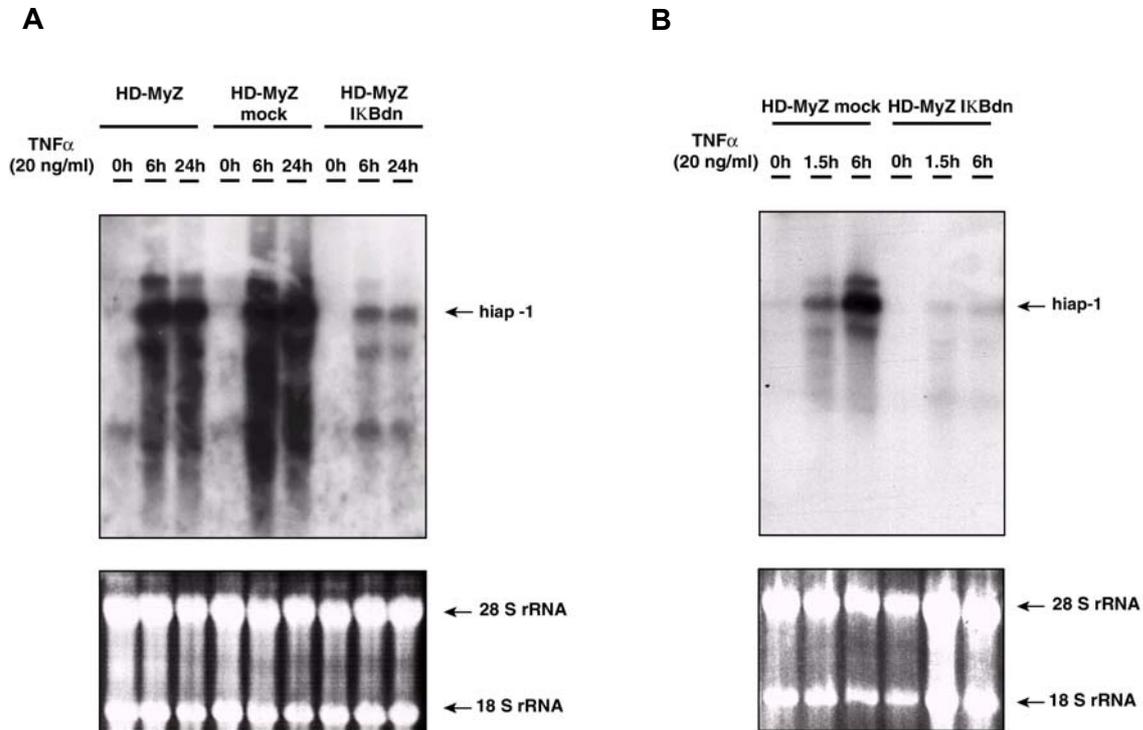


Abb. 12: Northern Blot-Analyse zum Nachweis *hiap-1*-spezifischer Transkripte in HD-MyZ, HD-MyZ mock und HD-MyZ κ Bdn nach Induktion mit TNF α . HD-MyZ-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte unter Induktionsbedingungen inkubiert und nach 6h und 24h (A) bzw. nach 1.5h und 6h (B) geerntet. 20 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem 1.5% Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Hybridisierung wurde ein *hiap-1*-Fragment in Anwesenheit von α^{32} P-dCTP amplifiziert und als Sonde eingesetzt. Die auf der Membran mit Ethidiumbromid-gefärbte 28 S und 18 S rRNA diente als Ladungskontrolle.

4.2. Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Apoptose von HD-MyZ

$\text{TNF}\alpha$ induziert in vielen Zellsystemen sowohl Apoptose, als auch Überlebenssignale durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Auf diesem Hintergrund war die Frage nach dem Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Apoptose beim Hodgkin-Lymphom und bei anderen lymphatischen Erkrankungen von zentralem Interesse für diese Arbeit. Insbesondere wurde das Augenmerk auf die Apoptose gerichtet, die durch Zytostatika induziert wird, die für die Behandlung dieser Erkrankungen eingesetzt werden. Hierbei wurde die Epirubicin- und Etoposid-induzierte Apoptose mit der Sphingolipid-induzierten Apoptose durch C_2 -Ceramid verglichen.

Die nachgewiesene Induktion des anti-apoptotischen *hiap-1*-Gens durch $\text{TNF}\alpha$ gab erste Hinweise darauf, daß $\text{TNF}\alpha$ möglicherweise die Zytostatika-induzierte Apoptose in HD-MyZ vermindern könnte. Da die Transfektion des *I κ B α dn*-Konstruktes die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- κ B und die Expression des Zielgens *hiap-1* blockierte, bestand die Erwartung, daß dieser postulierte, Apoptose-hemmende Effekt von $\text{TNF}\alpha$ in den HD-MyZ *I κ Bdn*-Transfektanten nicht auftreten sollte.

4.2.1. $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose in HD-MyZ mock und HD-MyZ *I κ Bdn*

Zunächst wurde die Empfindlichkeit beider HD-MyZ-Linien, HD-MyZ mock und HD-MyZ *I κ Bdn*, gegenüber $\text{TNF}\alpha$ über einen Zeitraum von 4 Tagen (d) verfolgt (Abb. 13). In Anwesenheit von 10% FKS und ohne zusätzliche Behandlung mit Cycloheximid (CHX) induzierten Konzentrationen von 20, 40 oder 100 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ in beiden Linien keine Apoptose. CHX wird als Proteinsynthese-Hemmer häufig im Zusammenhang mit $\text{TNF}\alpha$ -induzierter Apoptose eingesetzt, um die anti-apoptotischen Signale, z.B. durch Aktivierung von NF- κ B, zu blockieren. Ohne CHX ist für viele Zelllinien $\text{TNF}\alpha$ alleine kein ausreichender Apoptosestimulus (247). Da in dieser Arbeit aber die Diskriminierung zwischen den anti- und pro-apoptotischen Effekten von $\text{TNF}\alpha$ Gegenstand der Untersuchung war, wurde auf die Behandlung mit CHX verzichtet. Zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ *I κ Bdn* war kein Unterschied in der Höhe der induzierten Apoptose zu erkennen, wie die Ergebnisse der modifizierten Zellzyklusanalyse zeigten (Abb. 13A, B). Die Blockierung des NF- κ B-Signalweges führte in HD-MyZ-Zellen nicht zu einer vermehrten Empfindlichkeit gegenüber $\text{TNF}\alpha$. Wie die Darstellung des Histogrammes der FACS-Analyse in Abb. 13C zeigt, konnte auch keine Verschiebung der Zellzyklusphasen bei HD-MyZ festgestellt werden.

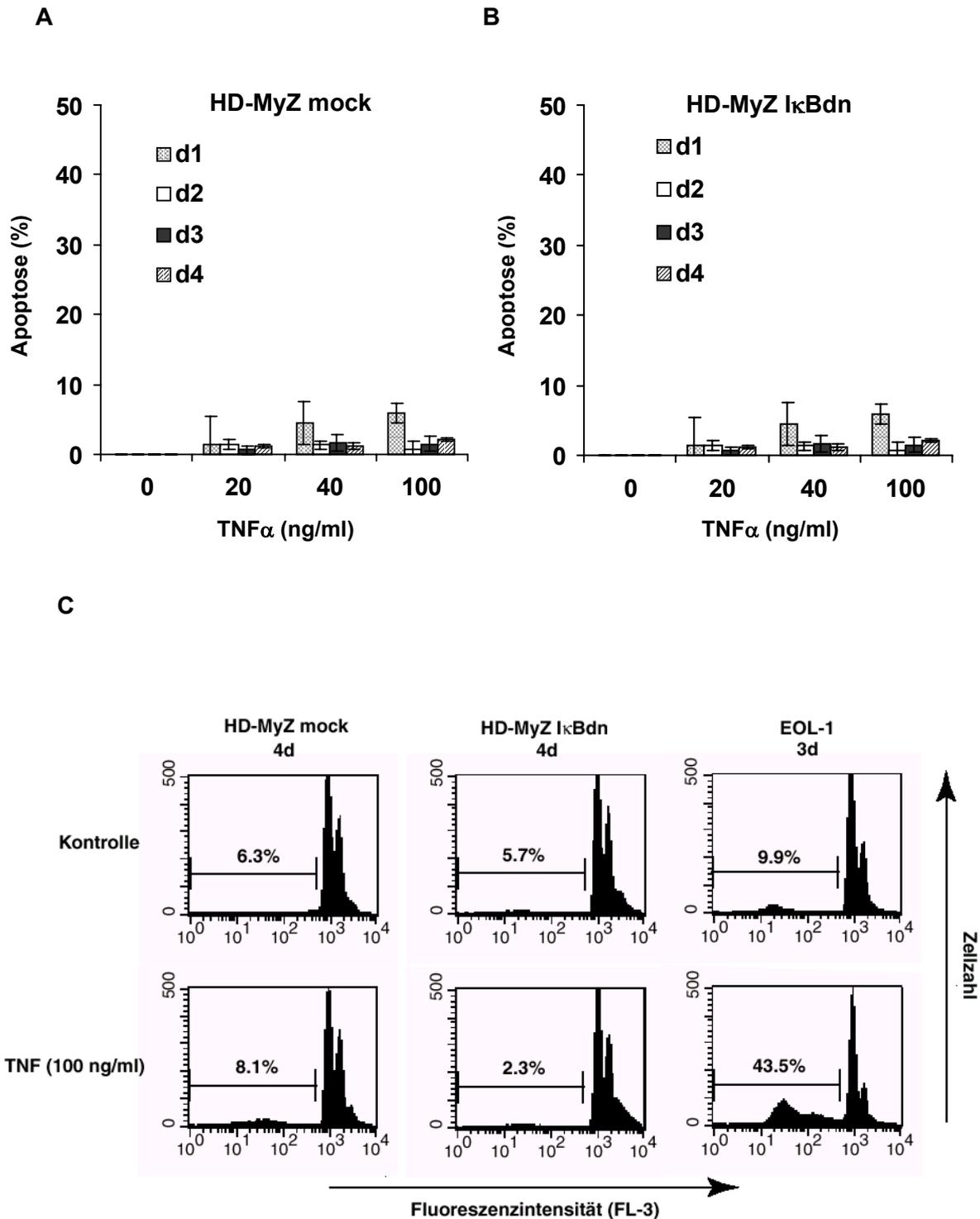


Abb. 13: TNF α -induzierte Apoptose von HD-MyZ mock (A) und HD-MyZ κ Bdn (B) über einen Zeitraum von 4 Tagen (d1 - d4). TNF α wurde in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt, um Apoptose nach unterschiedlicher Inkubationszeit als DNA-Fragmentierung mithilfe der modifizierten Zellzyklusmethode nachzuweisen. Angegeben sind die Mittelwerte in % +/- S.D. für n = 3. Darstellung repräsentativer Histogramme der FACS-Analyse unter Angabe der hypodiploiden Zellen in % von HD-MyZ im Vergleich zur Kontrollzelllinie EOL-1(C).

4.2.2. CD95/Fas-induzierte Apoptose in HD-MyZ

Trotz nachgewiesener geringer Expression des Todesrezeptors CD95/Fas auf der Oberfläche der HD-MyZ-Zellen (P. Daniel, persönliche Mitteilung) induzierten 1 $\mu\text{g/ml}$ des agonistischen Antikörpers gegen CD95/Fas (αFas) auch nach 72h weder in HD-MyZ mock noch in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ Zelltod, wie in der FACS-Analyse bestimmt werden konnte (Abb. 14A). Bei dem eingesetzten αFas handelte es sich um einen agonistischen IgG_1 -Antikörper (APO-1). Als Positivkontrolle für die biologische Aktivität des Fas-Antikörpers wurden BJAB-Zellen für 72h behandelt. Zum Nachweis toter Zellen diente neben einer Färbung mit Trypanblau (Abb. 14B) die modifizierte Zellzyklusanalyse (Abb. 14A).

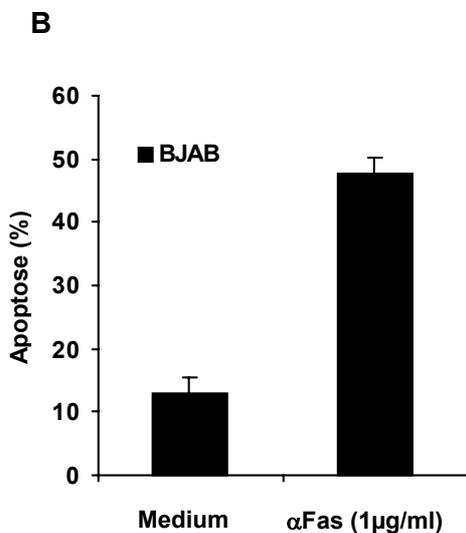
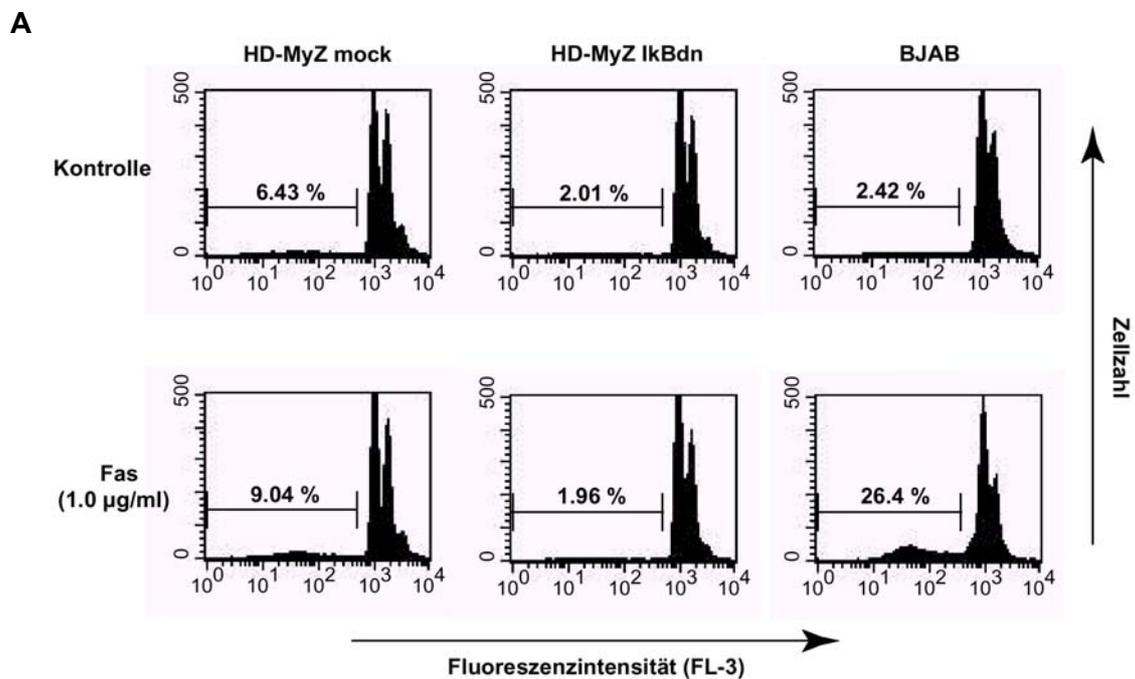


Abb. 14: CD95/Fas-induzierte Apoptose in HD-MyZ und BJAB. HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ wurden im Vergleich zu BJAB für 72h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ αFas (agonistischer IgG_1 -Antikörper) behandelt. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme der FACS-Analyse unter Angabe der hypodiploiden Zellen in % (A). Bestimmung von Zelltod mittels Trypanblaufärbung von BJAB. Dargestellt sind % tote Zellen +/- S.D. (n=3) (B).

4.2.3. Etoposid-, Epirubicin- und C₂-Ceramid-induzierte Apoptose von HD-MyZ nach Vorbehandlung mit TNF α

Nachdem gezeigt werden konnte, daß TNF α keine Apoptose in HD-MyZ mock oder HD-MyZ I κ Bdn induzierte, wurde nun der Frage nachgegangen, inwieweit TNF α über eine Aktivierung von NF- κ B und einer daraus resultierenden Induktion anti-apoptotischer Gene Einfluß auf die Etoposid-, Epirubicin- und C₂-Ceramid-induzierte Apoptose nehmen könnte. Hierzu wurden HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn für 6h mit 20 ng/ml TNF α vorbehandelt bzw. unbehandelt belassen. Anschließend wurde die Apoptose durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid ausgelöst. Zur Detektion toter Zellen kamen zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. (I) Zur Bestimmung der Apoptose wurde die bereits erwähnte modifizierte Zellzyklusanalyse verwandt, die in fixierten und Propidiumiodid-gefärbten Zellen den DNA-Gehalt darstellen kann. Sie ermöglichte damit die Detektion Apoptose-spezifischer DNA-Fragmentierung, die in der FACS-Analyse neben den Zellpopulationen der G₁ und G₂/M-Zyklusphase als Sub-G₁-Population mit hypodiploidem DNA-Gehalt sichtbar wird. (II) Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Medien-Überstand behandelter bzw. unbehandelter Zellen dagegen gibt Aufschluß über die Schädigung der Zytoplasmamembran. Diese Schädigung kann als Folge von Nekrose oder von später, in die Nekrose übergehender Apoptose entstehen. Die durch Behandlung induzierte Freisetzung von LDH ins Medium ermöglichte deshalb die Bestimmung von Zelltod und ist nicht spezifisch für Apoptose. Für beide Methoden wurden die angegebenen Zelltodraten um den Wert unbehandelter Zellen (Hintergrundapoptose bzw. -zelltod) bereinigt, sie geben also spezifische Werte an. Hintergrundapoptose bzw. -zelltod lagen dabei unter 15% der Zellen.

4.2.3.1. Etoposid-induzierte Apoptose in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α

Die Bestimmung der DNA-Fragmentierung nach 72h Etoposid-Behandlung (Abb. 15A) zeigte eine klare Konzentrationsabhängigkeit der Apoptose in HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn für einen Konzentrationsbereich von 0.1 μ g/ml bis 1.0 μ g/ml Etoposid. In HD-MyZ I κ Bdn induzierte Etoposid in einer Konzentration von 0.75 μ g/ml und 1.0 μ g/ml in 38% bzw. in 47% der Zellen Apoptose, wohingegen unter gleichen Bedingungen nur 11% bzw. 17% der Zellen in HD-MyZ mock starben (Abb. 15A, offene Symbole).

Überraschenderweise führte die Vorbehandlung mit TNF α also nicht zu einer Verminderung der Apoptose, sondern TNF α verstärkte vielmehr die Etoposid-induzierte Apoptose in beiden Zelllinien (Abb. 15A). In HD-MyZ mock betrug die Apoptose bei gleichzeitiger Anwesenheit von TNF α und 0.75 μ g/ml Etoposid 21% gegenüber 11% in Abwesenheit von TNF α . In HD-

MyZ I κ Bdn stieg die Etoposid-induzierte Apoptose bei 0.75 μ g/ml mit TNF α von 37% auf 50 % der Zellen (Abb. 15A; geschlossene Symbole im Vergleich zu offenen).

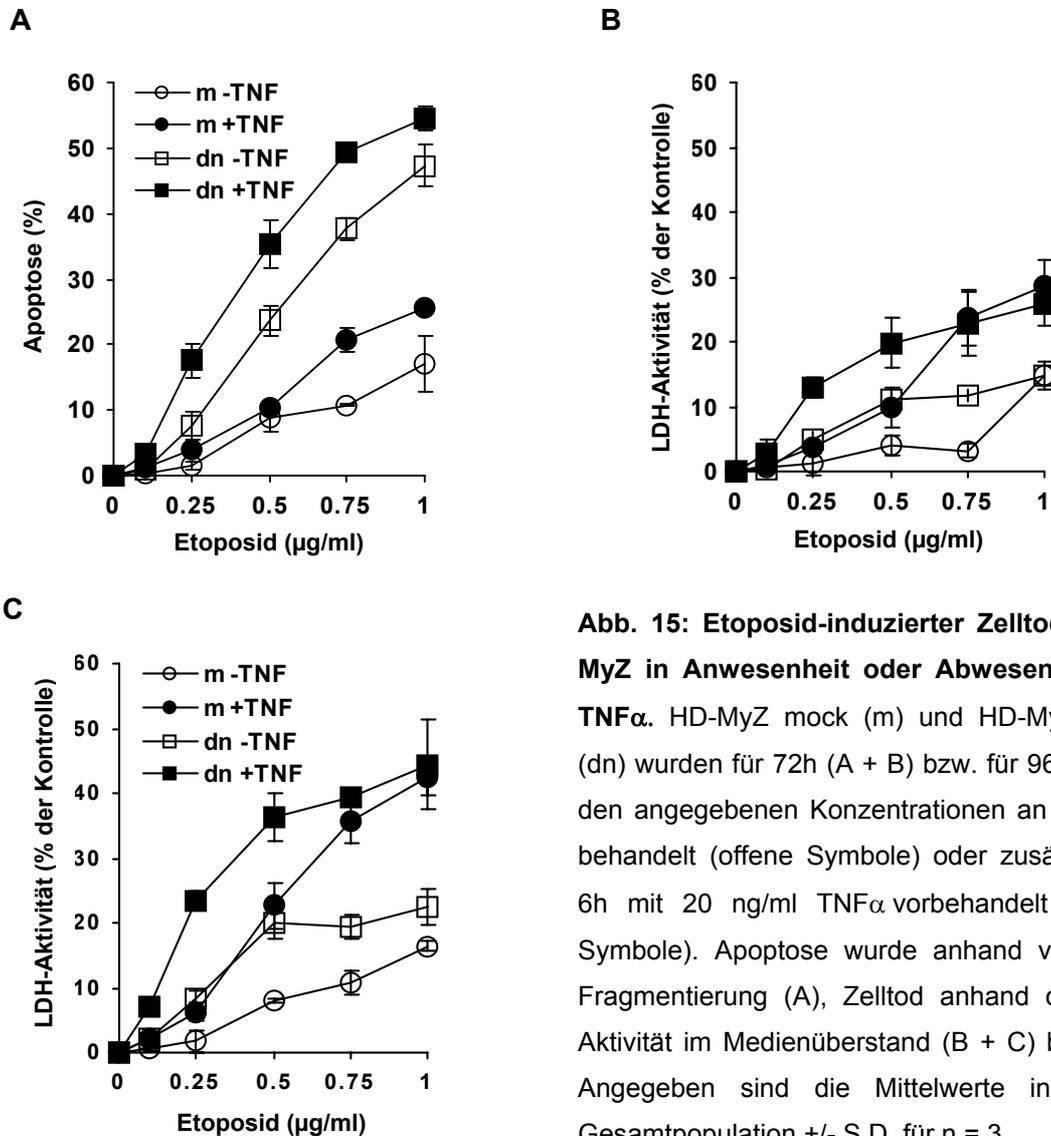


Abb. 15: Etoposid-induzierter Zelltod in HD-MyZ in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α . HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ I κ Bdn (dn) wurden für 72h (A + B) bzw. für 96h (C) mit den angegebenen Konzentrationen an Etoposid behandelt (offene Symbole) oder zusätzlich für 6h mit 20 ng/ml TNF α vorbehandelt (gefüllte Symbole). Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung (A), Zelltod anhand der LDH-Aktivität im Medienüberstand (B + C) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte in % der Gesamtpopulation +/- S.D. für n = 3.

Nach 72h ergab die Bestimmung der LDH-Aktivität (Abb. 15B) für mittlere Konzentrationsbereiche von Etoposid ähnliche Ergebnisse wie der Nachweis der DNA-Fragmentierung. Eine Konzentration von 0.5 μ g/ml Etoposid führte in HD-MyZ I κ Bdn zu einer höheren LDH-Aktivität als in HD-MyZ mock. In beiden Zelllinien kam es durch Vorbehandlung mit TNF α zu einer Verstärkung der LDH-Freisetzung. Insgesamt überstieg die zu diesem Zeitpunkt in der FACS-Analyse bestimmte Apoptose (Abb. 15A) die Höhe der durch LDH-Aktivität gemessenen Membranschädigung (Abb. 15B). Erst nach 96h (Abb. 15C) erreichten die durch Etoposid-induzierten LDH-Aktivitäten eine ähnliche Höhe wie die nach 72h induzierte Apoptose. Dies ist ein Hinweis auf sekundäre Nekrose.

4.2.3.2. Epirubicin-induzierte Apoptose in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α

Konzentrationen von Epirubicin in einem Bereich von 0.1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1.0 $\mu\text{g/ml}$ induzierten nach 72h sowohl in HD-MyZ mock als auch in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ eine Apoptose in Höhe von 18% bis 25% (Abb. 16A; offene Symbole). Interessanterweise zeigten sich damit keine Unterschiede zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ in der Epirubicin-induzierten Apoptose. Es war außerdem eine geringere Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Bereits geringe Konzentrationen von Epirubicin (0.25 $\mu\text{g/ml}$) ergaben eine Apoptoserate von ca. 20%, die bei höheren Konzentrationen (1.0 $\mu\text{g/ml}$) nur wenig anstieg. Die gleichzeitige Anwesenheit von TNF α verdoppelte die durch 0.75 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin-induzierte Apoptose von ca. 20% auf annähernd 40% (Abb. 16A).

Der durch LDH-Freisetzung detektierte Zelltod (Abb. 17B) verhielt sich nach Epirubicinbehandlung anders als nach Etoposidbehandlung. Bereits nach 72h zeigte die LDH-Aktivität in Abwesenheit von TNF α gleich hohe, in Anwesenheit von TNF α sogar höhere Werte als für die Apoptoserate bestimmt wurde. Eine Epirubicinkonzentration von 0.5 $\mu\text{g/ml}$ führte in 15% bzw. in 48% der HD-MyZ-Zellen zur Freisetzung der LDH (Abb. 16B). Die Tatsache, daß Epirubicin nach 72h zwar weniger Apoptose induziert als Etoposid, aber zum selben Zeitpunkt mehr Zelltod insgesamt auslöst, sprach für eine stärkere Beteiligung von Nekrose am Epirubicin-induzierten Zelltod.

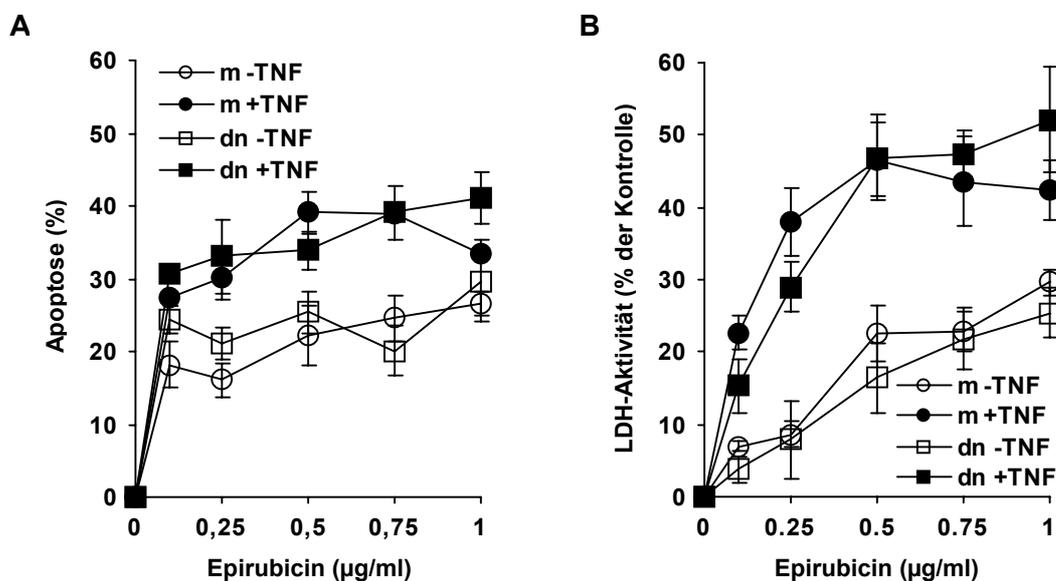


Abb. 16: Epirubicin-induzierter Zelltod in HD-MyZ in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α .

HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ (dn) wurden für 72h mit den angegebenen Konzentrationen an Epirubicin behandelt (offene Symbole) oder zusätzlich für 6h mit 20 ng/ml TNF α vorbehandelt (gefüllte Symbole). Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung (A), Zelltod anhand der LDH-Aktivität im Medienüberstand (B) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte in % der Kontrolle \pm S.D. für n = 3.

4.2.3.3. C₂-Ceramid -induzierte Apoptose in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α

In Abb. 17A ist die C₂-Ceramid-induzierte Apoptose nach 48h für einen Konzentrationsbereich von 20 μ M bis 80 μ M dargestellt. Für die Behandlung mit Ceramid zeigten sich Unterschiede zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn; 60 μ M C₂-Ceramid induzierten 6% Apoptose in HD-MyZ mock gegenüber 35% in den NF- κ B-blockierten HD-MyZ I κ Bdn-Zellen. TNF α verstärkte die bei 60 μ M C₂-Ceramid-induzierte Apoptose in HD-MyZ mock von 6% auf 29% und von 35% auf 51% in HD-MyZ I κ Bdn. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Bestimmung der LDH-Freisetzung nach 48h wie in Abb. 17B zu sehen ist, wobei die absoluten Werte für Zelltod im mittleren Konzentrationsbereich ca. 10 - 20% höher lagen als die Werte der Apoptose.

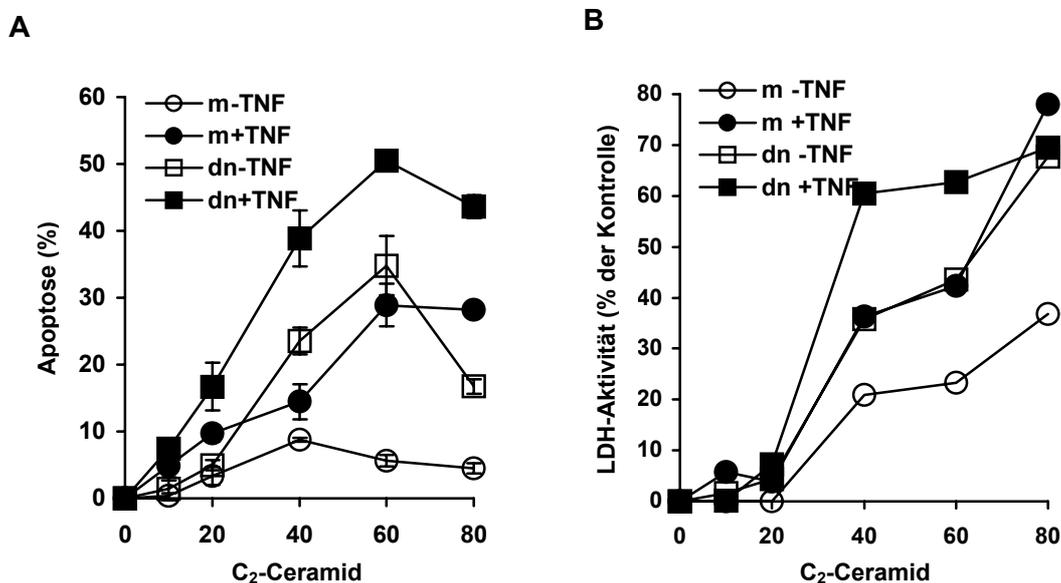


Abb.17: Ceramid-induzierter Zelltod in HD-MyZ in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α .

HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ I κ Bdn (dn) wurden für 48h mit den angegebenen Konzentrationen an C₂-Ceramid behandelt (offene Symbole) oder zusätzlich für 6h mit 20 ng/ml TNF α vorbehandelt (gefüllte Symbole). Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung (A), Zelltod anhand von LDH-Aktivität im Medienüberstand (B) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte in % der Gesamtpopulation +/- S.D. für n = 3.

Trotz der gezeigten Aktivierung von NF- κ B sensitiviert TNF α sowohl HD-MyZ mock als auch HD-MyZ I κ Bdn für Apoptose induziert durch Etoposid, Epirubicin und C₂-Ceramid. Die Verstärkung der Apoptose durch TNF α unterliegt damit einem NF- κ B-unabhängigen Mechanismus. Die Blockierung des NF- κ B-Signalweges, wie sie in HD-MyZ I κ Bdn besteht, erhöht, unabhängig von TNF α , die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Etoposid und C₂-Ceramid, sie hatte allerdings keinen Einfluß auf die Epirubicin-induzierte Apoptose.

4.3. Verstärkung der Apoptose durch TNF α in malignen, hämatologischen Zelllinien

Um der Frage nachzugehen, ob der sensitivierende Einfluß von TNF α auf die Zytostatika-induzierte Apoptose neben HD-MyZ auch in anderen Tumorentitäten eine Rolle spielen könnte, wurde die Arbeit auf eine Reihe von chronisch myeloischen (CML) und akuten myeloischen (AML) Leukämien ausgedehnt. Darüberhinaus wurden weitere Hodgkin Zelllinien und eine Burkitt Lymphom Zelllinie untersucht. Die Fokussierung auf myeloische Zellen ergab sich aus der für Hodgkin-Lymphome uncharakteristischen Immunologie von HD-MyZ. HD-MyZ zeigen erstaunlicherweise keine lymphatischen Oberflächenmarker, sondern vielmehr myelo-monozytäre Marker wie CD13 und CD68. Die verschiedenen Zelllinien wurden auf einen sensitivierenden Effekt von TNF α , also eine synergistische Verstärkung der Apoptose, untersucht. Um bloße Addition von Apoptose auszuschließen, fanden nur die Zelllinien Eingang in die Untersuchung, die keine Empfindlichkeit gegenüber TNF α bezüglich der Auslösung von Zelltod zeigten. Die durch 20 ng/ml, 40 ng/ml oder 100 ng/ml TNF α induzierte Apoptose wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von 72h anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt. In Tab. 4 sind die verwendeten Zelllinien, ihre Identität und ihre Empfindlichkeit gegenüber TNF α gezeigt.

Tab. 4: Empfindlichkeit verschiedener Zelllinien gegenüber TNF α . Verschiedene Zelllinien angegebener Herkunft wurden mithilfe der Bestimmung der DNA-Fragmentierung hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber TNF α -Konzentrationen von 0, 20, 40 und 100 ng/ml über einen Zeitraum von 72h untersucht.

Zelllinie	Zelltyp	Empfindlichkeit gegenüber TNF α
L540	Hodgkin	nein
L1236	Hodgkin	nein
BJAB	Burkitt Lymphom	nein
U937	Histiozytäres Lymphom	ja
EOL-1	eosinophile AML	ja
CTV-1	AML	nein
KG-1	AML	gering (11% bei 100 ng/ml TNF α)
PLB-985	AML	gering (30% bei 100 ng/ml TNF α)
KASUMI-1	AML	gering (30% bei 100 ng/ml TNF α)
OCI-AML2	AML	nein
Lama-87	CML in Blastenkrise	nein
K562	CML in Blastenkrise	nein
EM-3	CML in Blastenkrise	nein
KU-812	CML in Blastenkrise	gering (13% bei 100 ng/ml TNF α)

In Zelllinien, die keine bzw. eine geringe durch $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose zeigten, wurden Versuche hinsichtlich der Etoposid- und Epirubicin-induzierten Apoptose in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ durchgeführt. Für beide Zytostatika wurde in Vorversuchen zunächst die geeignete Methode zur Bestimmung der Apoptoserate, der relevante Konzentrationsbereich sowie der geeignete Zeitraum der Behandlung festgelegt. Weiterhin kamen 40 ng/ml oder 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ zum Einsatz; für den Fall, daß eine Sensitivierung zu beobachten war, waren 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ ausreichend.

In einer ganzen Reihe von Zelllinien konnte die in HD-MyZ beobachtete Sensitivierung ebenfalls für Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose festgestellt werden. Dabei beschränkte sich der Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ nicht auf CML (Abb. 21), sondern war ebenfalls in AML- (Abb. 19 und Abb. 20) oder Burkitt-Lymphom-Zellen (Abb. 18) zu beobachten. Für letztere Zelllinien wurde nur die Epirubicin-induzierte Apoptose betrachtet. Im Fall der Hodgkin-Zelllinie L540 und L1236 war keine $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Sensitivierung nachzuweisen (Abb. 18).

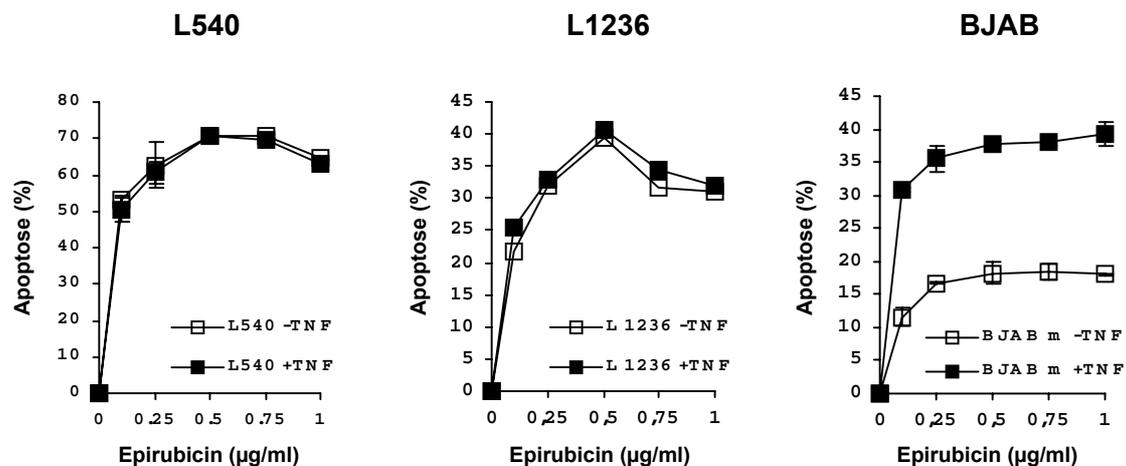


Abb. 18: Sensitivierender Effekt von $\text{TNF}\alpha$ in L540, L1236 und BJAB auf die Epirubicin-induzierte Apoptose. L540 und L1236 wurden für 48h in Abwesenheit (-TNF) oder in Anwesenheit von 40 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ (+ TNF) mit den angezeigten Konzentrationen an Epirubicin behandelt. BJAB wurden für 72h mit Epirubicin in Kombination mit 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ (+ TNF) oder ohne $\text{TNF}\alpha$ behandelt bzw. unbehandelt belassen. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt und wird als Mittelwert in % der Gesamtpopulation +/- S.D. (n=3) angegeben.

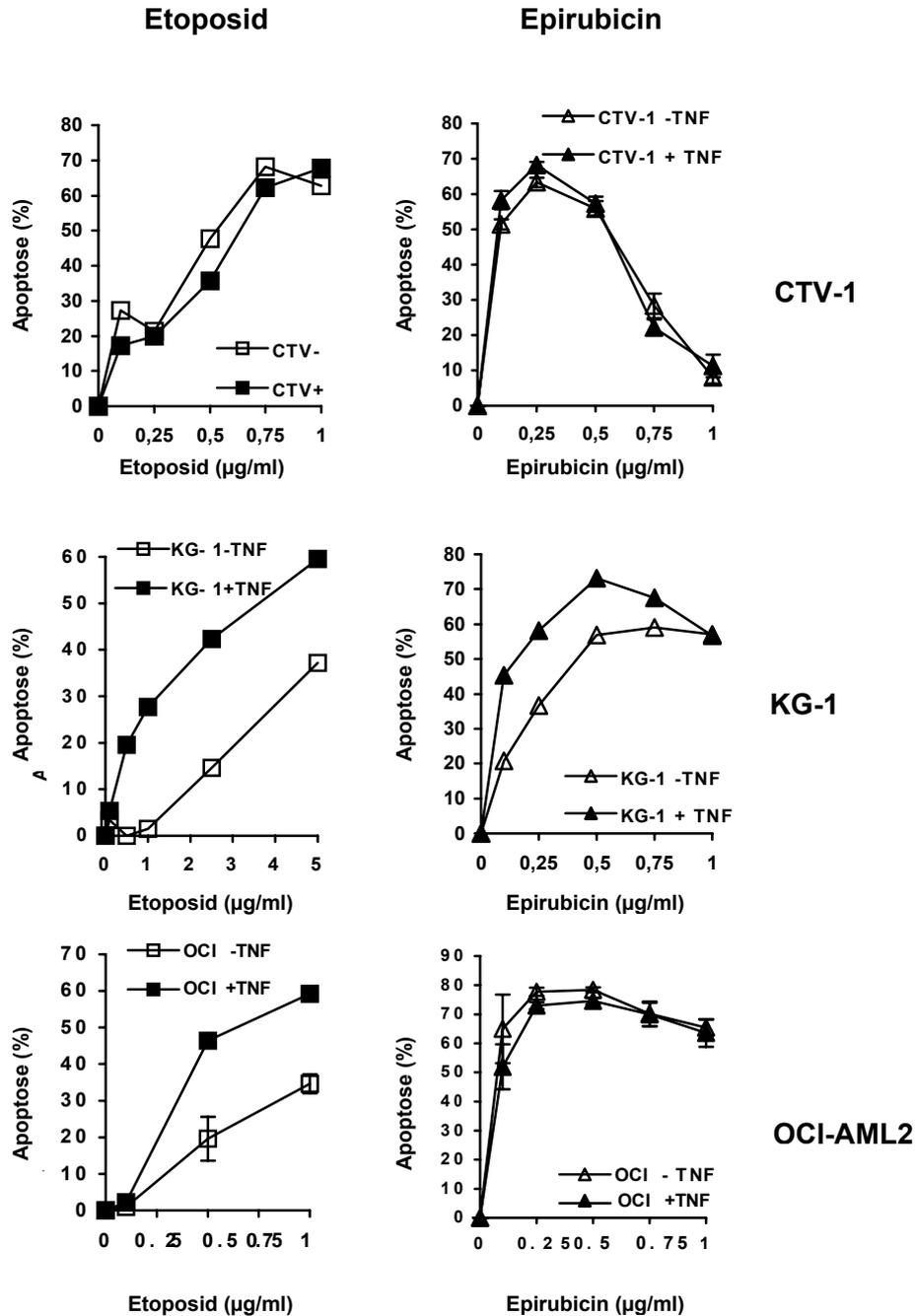


Abb. 19: Sensitivierung der AML-Zelllinien CTV-1, KG-1 und OCI-AML2 durch TNF α für Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose. CTV-1, KG-1 und OCI-AML2 wurden für 72h in Abwesenheit (-TNF α) oder in Anwesenheit von 20 ng/ml TNF α (+ TNF α) mit den angezeigten Konzentrationen an Etoposid (links) oder Epirubicin (rechts) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt und wird als Mittelwert in % der Gesamtpopulation +/- S.D. (n=3) angegeben bzw. stellt ein repräsentatives Experiment dar.

In den beiden AML-Zelllinien PLB-985 und Kasumi-1 induzierte 20 ng/ml $TNF\alpha$ bereits 30 % Apoptose nach 72h. Die Kombination zwischen Etoposid oder Epirubicin mit $TNF\alpha$ führte zwar zu einer Erhöhung der Apoptose, diese überstieg aber nicht den durch $TNF\alpha$ alleine induzierten Zelltod von durchschnittlich 35%. Für die Darstellung der Apoptose in Abb. 20 werden deshalb absolute Apoptosewerte angegeben, die nicht um den Betrag der Hintergrundapoptose bereinigt wurden. In PBL-985 und Kasumi-1 handelte sich also nicht um sensitivierenden, sondern lediglich um einen additiven Effekt von $TNF\alpha$.

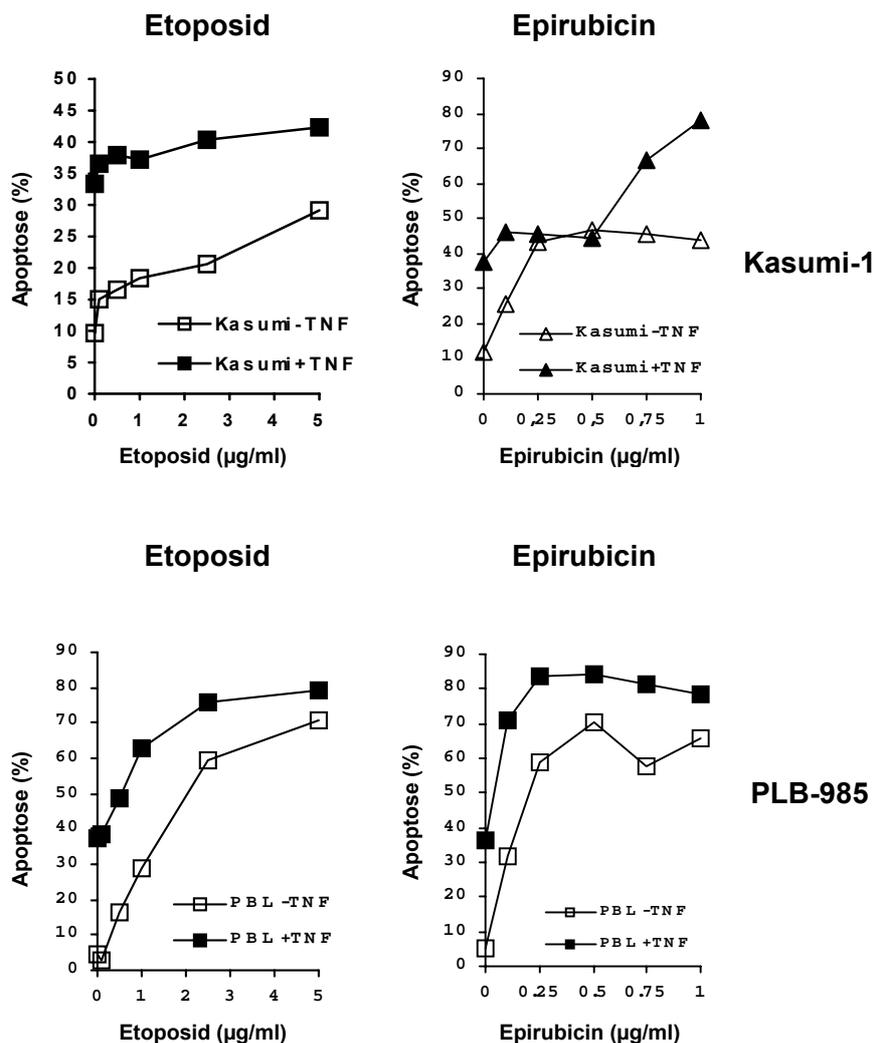


Abb. 20: Additiver Effekt von $TNF\alpha$ der AML-Zelllinien Kasumi-1 und PLB-985 durch $TNF\alpha$ für Etoposid - und Epirubicin-induzierte Apoptose. Kasumi-1 und PLB-985 wurden für 72h in Abwesenheit (- $TNF\alpha$) oder in Anwesenheit von 20 ng/ml $TNF\alpha$ (+ $TNF\alpha$) mit den angezeigten Konzentrationen an Etoposid (links) oder Epirubicin (rechts) behandelt bzw. unbehandelt belassen. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt.

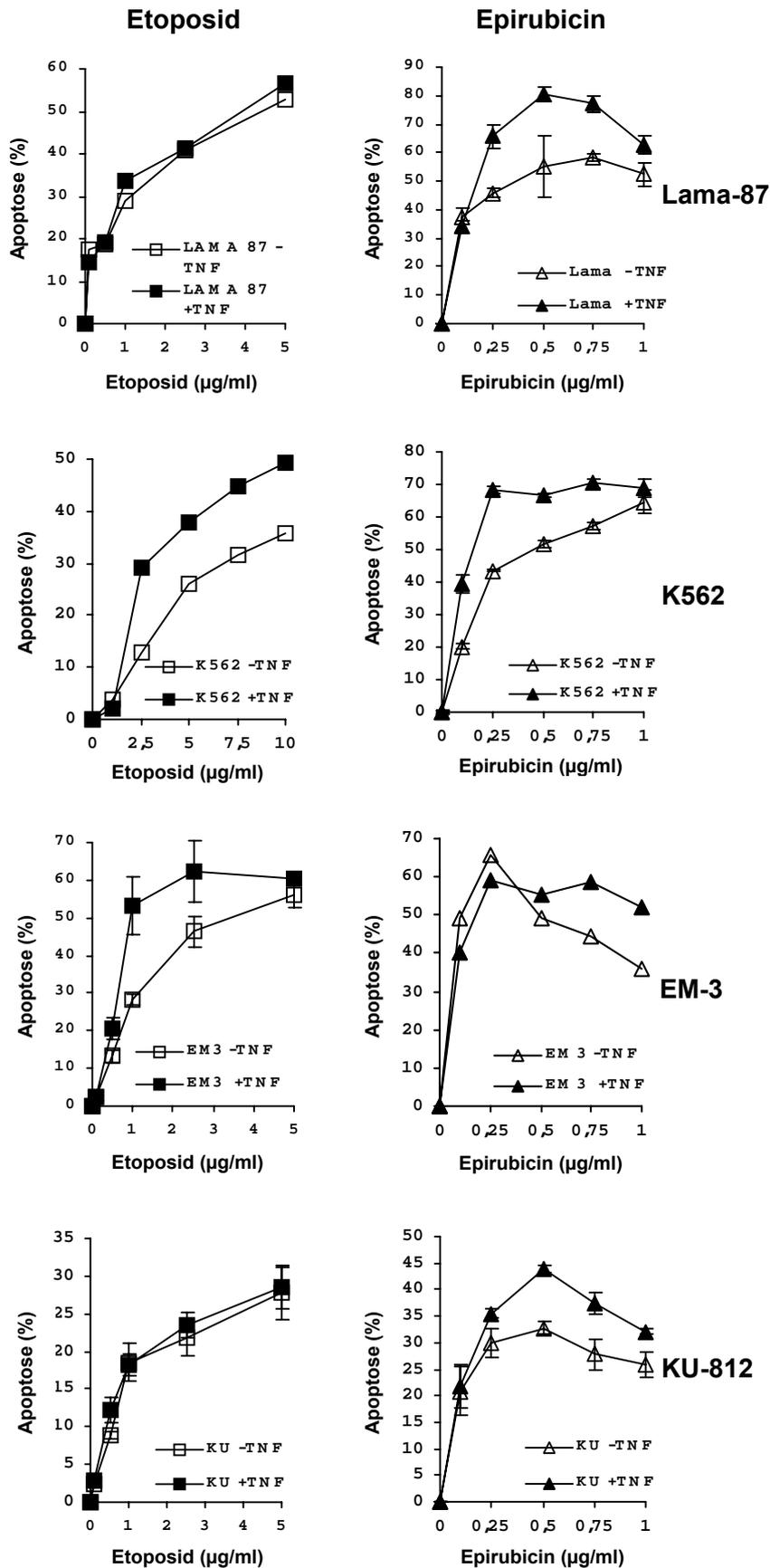


Abb. 21: Sensitivierung der CML-Zelllinien Lama-87, K562, EM-3 und KU 812 durch TNF α für Etoposid - und Epirubicin-induzierte Apoptose. Lama-87, K562, EM-3 und KU 812 wurden für 72h in Abwesenheit oder in Anwesenheit von 20 ng/ml TNF α mit den angezeigten Konzentrationen an Etoposid oder Epirubicin behandelt bzw. unbehandelt belassen. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt und wird als Mittelwert in % der Kontrolle +/- S.D. (n=3) angegeben bzw. stellt ein repräsentatives Experiment dar.

Die Sensitivierung von Zelllinien maligner Leukämien und Lymphome für Etoposid- oder Epirubicin-induzierten Zelltod durch $\text{TNF}\alpha$ demonstrierte den allgemeinen, nicht auf Hodgkin-Zellen beschränkten Charakter der Sensitivierung. Tabelle 5 faßt die Ergebnisse zusammen.

Tab. 5: Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ von verschiedenen Zelllinien gegenüber Etoposid und Epirubicin. Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abb. 18 bis 21; n.b. = nicht bestimmt.

Zelllinie	Zelltyp	Sensitivierung bei	
		Etoposid-ind. Apoptose	Epirubicin-ind. Apoptose
L540	Hodgkin	n.b.	nein
L1236	Hodgkin	n.b.	nein
BJAB	Burkitt Lymphom	n.b.	ja
CTV-1	AML	nein	nein
KG-1	AML	ja	ja
PLB-985	AML	nein	nein
KASUMI-1	AML	nein	nein
OCI-AML2	AML	ja	nein
Lama-87	CML	nein	ja
K562	CML	ja	ja
EM-3	CML	ja	nein
KU-812	CML	nein	ja

4.4. Aktivierung von Caspasen in HD-MyZ nach Behandlung mit TNF α und Zytostatika oder C₂-Ceramid

Die Aktivierung von Caspasen stellt ein zentrales Ereignis der Apoptose dar, wobei die Induktion von unterschiedlichen Signalwegen zur Aktivierung bestimmter Caspasen führt. Um der Frage nach dem Mechanismus der Sensitivierung durch TNF α nachzugehen, war es deshalb von Interesse, welche Caspasen an der Apoptose von HD-MyZ beteiligt waren. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung von Caspase-3, Caspase-2 und Caspase-8 mittels Western-Blot-Analyse und Bestimmung der Caspase-Aktivitäten in Zytostatika- und C₂-Ceramid behandelten Zellen mit oder ohne TNF α untersucht. Da für die Aktivierung von Caspasen einerseits mitochondriale Vorgänge oder andererseits rezeptorvermittelte Signale notwendig sind, wurde in die Untersuchungen zur Aktivierung der Caspasekaskade auch die Expressionsanalyse von Mitgliedern der Bcl-2-Familie, Bax und Bcl-2, und des Adaptermolekül des TNF α -Signalweges, FADD, miteingeschlossen.

4.4.1. Prozessierung und Aktivierung der Caspase-3

4.4.1.1. Caspase-3-Prozessierung und –Aktivität in Etoposid-behandelten HD-MyZ-Zellen

Die Behandlung mit Etoposid für 72h führte zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von Caspase-3 (C3) in Anwesenheit von TNF α (Abb. 22B) oder ohne TNF α (Abb. 22A). Mithilfe eines polyklonalen Antikörpers, der sowohl gegen die unprozessierte Form von Caspase-3 (Zymogen) als auch gegen die große Untereinheit gerichtet ist, konnte die Aktivierung von Caspase-3 im Vergleich zu Kontrollzellextrakten dargestellt werden. Wie auch in unbehandelten Zellen war keine Aktivierung der Caspase-3 in Zellen zu erkennen, die ausschließlich mit TNF α behandelt wurden.

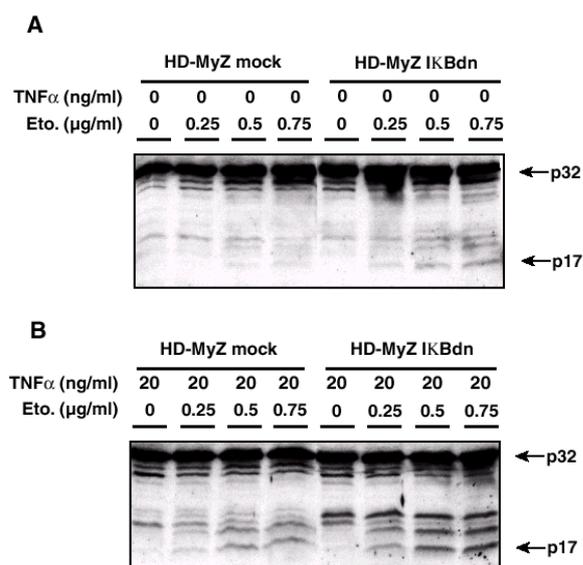


Abb. 22: Caspase-3-Aktivierung nach Behandlung von HD-MyZ mit Etoposid.

HD-MyZ wurden für 72h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Etoposid in Gegenwart von TNF α (B) oder in Abwesenheit von TNF α (A) behandelt. 50 μ g Protein wurden in einem 16% SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot auf Caspase-3-Spaltung untersucht. Die Position des Zymogens (p32) und der aktiven, großen Untereinheit (p17) sind mit Pfeilen markiert.

Die Detektion der aktiven, 17 kDa großen Untereinheit (p17-Fragment) in Abb. 23A verdeutlichte ebenfalls die Etoposid-induzierte schwache Prozessierung und Aktivierung des Zymogens der Caspase-3. Diese Aktivierung von Caspase-3 wurde durch $\text{TNF}\alpha$ verstärkt. Der sensitivierende Effekt von $\text{TNF}\alpha$ war auch hinsichtlich der Caspase-3 Spaltung unabhängig von NF- κ B und deshalb sowohl in HD-MyZ mock als auch in HD-MyZ $\text{I}\kappa$ Bdn zu beobachten.

Bereits zu einem früheren Zeitpunkt, 48h nach Behandlung, konnten diese Befunde durch Bestimmung der Caspase-3-Aktivität in hypotonen Extrakten von HD-MyZ unter Verwendung eines photometrisch nachweisbaren und für Caspase-3 spezifischen Substrates bestätigt werden (Abb. 23B). $\text{TNF}\alpha$ erhöhte in HD-MyZ mock die Etoposid-induzierte Caspase-3-Aktivität um mehr als das Doppelte, in HD-MyZ $\text{I}\kappa$ Bdn auf das Dreifache.

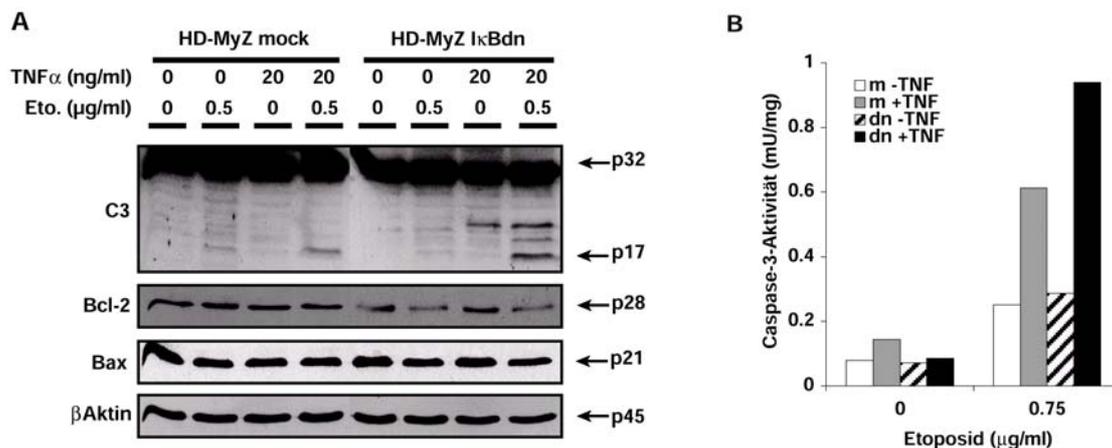


Abb. 23: Western Blot-Analyse für Caspase-3, Bcl-2, Bax sowie β Aktin und Caspase-3-Aktivität nach Behandlung mit Etoposid. HD-MyZ-Zellen wurden wie angezeigt mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid (Eto) und $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Die Expression von Caspase-3 (C3), Bcl-2 und Bax wurde im Western Blot nach 72h detektiert. Die Position des Zymogens (p32) und der aktiven Untereinheit (p17) sind mit Pfeilen markiert. Gleiche Proteinbeladung wurde durch den Nachweis von β Aktin kontrolliert (A). Die Caspase-3-Aktivität wurde 48h nach Behandlung mit 0.75 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ in zellfreien Extrakten von HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ $\text{I}\kappa$ Bdn (dn) anhand der Spaltung von Ac-DEVD-pNA bestimmt (B).

4.4.1.2. Caspase-3 Prozessierung und -Aktivität in Epirubicin-behandelten HD-MyZ-Zellen

Die Behandlung mit Epirubicin in einer Konzentration von 0.25 $\mu\text{g/ml}$ ließen in der Western Blot-Analyse von HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa$ Bdn nach 72h ein für beide Zelllinien

vergleichbares Signal für das aktive p17-Fragment der Caspase-3 erkennen (Abb. 24A). Diese Aktivierung der Caspase-3 konnte durch Vorbehandlung mit 20 ng/ml $TNF\alpha$ deutlich verstärkt werden. Damit war nachzuweisen, daß auch für die Aktivierung der Caspase-3 durch Epirubicin die Blockierung des NF- κ B-Signalweges zu keinem Unterschied zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ $I\kappa$ Bdn führte. Im Einklang damit stand die nach 48h gemessene Caspase-3-Aktivität (Abb. 24B). Die durch Epirubicin-induzierte Caspase-3-Aktivität in HD-MyZ mock und HD-MyZ $I\kappa$ Bdn konnte durch $TNF\alpha$ annähernd verdoppelt werden.

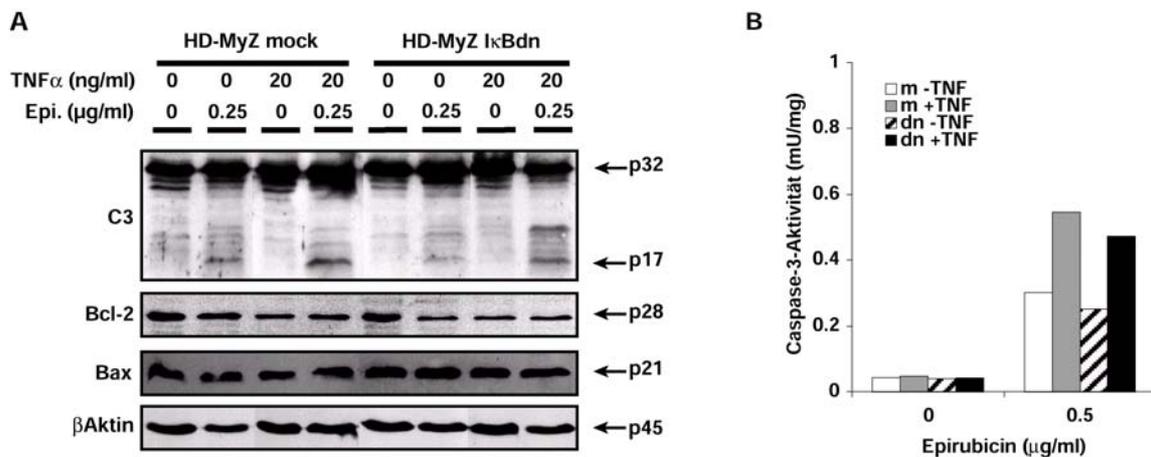


Abb. 24: Western Blot-Analyse für Caspase-3, Bcl-2, Bax sowie β Aktin und Caspase-3-Aktivität nach Behandlung mit Epirubicin. HD-MyZ-Zellen wurden wie angezeigt mit 0.25 μ g/ml Epirubicin (Epi) und $TNF\alpha$ behandelt. Die Expression von Caspase-3 (C3), Bcl-2 und Bax wurde im Western Blot nach 72h detektiert. Die Position des Zymogens (p32) und der aktiven Untereinheit (p17) sind mit Pfeilen markiert. Gleiche Proteinbeladung wurde durch den Nachweis von β Aktin kontrolliert (A). Die Caspase-3-Aktivität wurde nach 48h nach Behandlung mit 0.5 mg/ml Epirubicin mit oder ohne $TNF\alpha$ in zellfreien Extrakten von HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ $I\kappa$ Bdn (dn) bestimmt (B).

4.4.1.3. Caspase-3-Prozessierung und -Aktivität in C_2 -Ceramid-behandelten HD-MyZ-Zellen

HD-MyZ mock zeigten nach 48-stündiger Behandlung mit C_2 -Ceramid in der in Abb. 25A angezeigten Konzentration von 40 μ M keine detektierbare Aktivierung von Caspase-3. Im Gegensatz dazu konnte nach Ceramid-Exposition die Prozessierung von Caspase-3 in HD-MyZ $I\kappa$ Bdn auch in Abwesenheit von $TNF\alpha$ nachgewiesen werden, wobei in Gegenwart von $TNF\alpha$ eine Verstärkung der Aktivierung festzustellen war. Diese Ergebnisse der Western

Blot-Analyse konnten durch Bestimmung der Caspase-3 Aktivität nach 22h Behandlung mit 60 μ M C₂-Ceramid bestätigt werden (Abb. 25B).

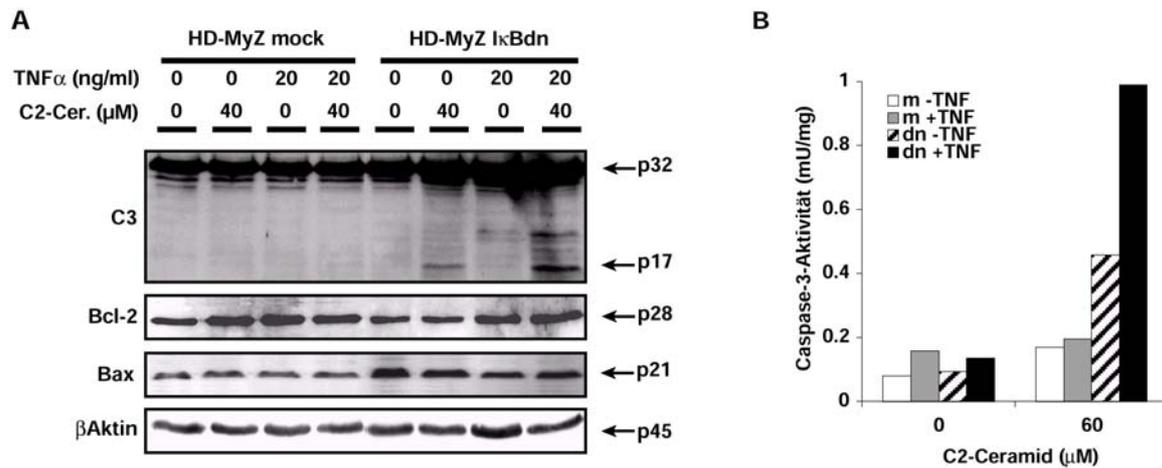


Abb. 25: Western Blot-Analyse für Caspase-3, Bcl-2, Bax sowie β Aktin und Caspase-3-Aktivität nach Behandlung mit C₂-Ceramid. HD-MyZ-Zellen wurden wie angezeigt mit 40 μ M C₂-Ceramid (C₂-Cer) und TNF α behandelt. Die Expression von Caspase-3 (C3), Bcl-2 und Bax wurde im Western Blot nach 48h detektiert. Die Position des Zymogens (p32) und der aktiven Untereinheit (p17) sind mit Pfeilen markiert. Gleiche Proteinbeladung wurde durch den Nachweis von β Aktin kontrolliert (A). Die Caspase-3-Aktivität wurde nach 22h nach Behandlung mit 60 μ M C₂-Ceramid mit oder ohne TNF α in löslichen Extrakten von HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ IκBdn (dn) bestimmt (B).

Wie in den Abb.23-25 gezeigt ist, ergaben sich keine Unterschiede im Expressionsniveau von Bcl-2 oder Bax nach Behandlung von HD-MyZ mit Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid.

Die Kombination jeweils aller drei eingesetzten, Apoptose-induzierenden Stimuli mit TNF α resultierte in einer vermehrten Caspase-3 Aktivierung. Der sensitivierende Effekt von TNF α war dabei auch im Hinblick auf die Caspase-3-Aktivierung unabhängig von der Blockierung des NF- κ B-Signalweges. Mit dieser Kongruenz zwischen Apoptoseinduktion und Caspase-3-Aktivierung stand die Caspase-3 erwartungsgemäß an zentraler Stelle für die Vermittlung des Etoposid-, Epirubicin- und C₂-Ceramid-induzierten Zelltodes.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die Sensitivierung durch TNF α für verschiedene Apoptoseformen durch Rezeptor-vermittelte Signalwege über assoziierte Initiator-Caspasen oder über den mitochondrialen Signalweg erfolgt.

4.4.2. Prozessierung und Aktivierung der Initiator-Caspasen, Caspase-2 und Caspase-8

Um den Mechanismus der verstärkten Caspase-3-Aktivierung durch $\text{TNF}\alpha$ zu untersuchen, wurde die Rolle der Initiator-Caspasen (Caspase-2 und Caspase-8) der Todesrezeptor-vermittelten Signalwege untersucht. Die Aktivierung von Caspase-8 kann durch Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an $\text{TNFR1} + 2$ über die Assemblierung des DISCs (*death inducing signaling complex*) unter Beteiligung der Adaptermoleküle TRADD und FADD induziert werden (106). Es handelt sich um eine autokatalytische Prozessierung, bei der vom 55 kDa Zymogen die kleine Untereinheit p11 an zwei Spaltstellen abgetrennt werden kann, es entsteht sowohl ein p43- als auch ein p44-Fragment. Die Abspaltung der amino-terminalen Prodomäne beendet die Prozessierung mit der Freisetzung der großen p18 Untereinheit. Der hier verwendete monoklonale Antikörper erkennt Zymogen, p43/44-Fragment und die aktive, große p18-Untereinheit. In HD-MyZ-Zellen konnte nach Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ keine Aktivierung von Caspase-8 (C8) festgestellt werden. Darüberhinaus war in HD-MyZ mock und in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ -Zellen sowohl nach 72h-Behandlung mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid (Abb. 26A) als auch nach 48h-Behandlung mit 40 μM C_2 -Ceramid (Abb. 26C) keine Caspase-8-Aktivierung zu detektieren. Auch die Vorbehandlung mit 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ für 6h führte nicht zum Nachweis eines p18-Fragmentes. Einzig die Behandlung mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin für 72h ließ eine geringfügige Prozessierung der Caspase-8 anhand des p43-Fragmentes erkennen. Die Bestimmung der Caspase-8-Aktivität in hypotonen Extrakten bestätigte diese Resultate (Abb. 26D-F). Nach 48h Etoposid- und nach 22h C_2 -Ceramid-Behandlung war keine Aktivität nachweisbar. Die Behandlung mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin für 48h resultierte in einem sehr geringen Anstieg der Aktivität gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 26E).

Für Caspase-2, die über die Adaptermoleküle RIP und RAIDD an der Rezeptor-vermittelten Apoptose beteiligt sein kann, wurden ähnliche Daten erhoben. Wie auch für Caspase-3 und Caspase-8 gezeigt werden konnte, induzierte $\text{TNF}\alpha$ alleine keine Aktivierung der Caspase-2 (Abb. 26A-C). Zwar war durch Detektion des aktiven p14-Fragmentes der großen Untereinheit von Caspase-2 deren Aktivierung durch Etoposid mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ (Abb. 26A) und durch Epirubicin in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ (Abb. 26B) nachzuweisen. Hinsichtlich der C_2 -Ceramid-Behandlung zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen behandelten oder unbehandelten HD-MyZ-Zellen (Abb. 26C). Auch die Sensitivierung der Ceramid-behandelten Zellen durch $\text{TNF}\alpha$, die anhand der Apoptose und der Caspase-3-Aktivierung erkennbar war, geht nicht mit einer vermehrten Caspase-2-Aktivierung einher. Daraus war für Caspase-2 der Schluß zu ziehen, daß die bei Etoposid- und Epirubicin-Behandlung induzierte Caspase-2-Aktivität zwar an der Apoptoseinduktion beteiligt sein mag, daß aber Caspase-2-Aktivität für den sensitivierenden Effekt von $\text{TNF}\alpha$ nicht notwendig war.

Das Expressionsniveau des Adaptermoleküls FADD blieb sowohl von der Art der Behandlung als auch von der Blockierung des NF- κ B-Signalweges unbeeinflusst wie in Abb. 26A-C zu erkennen ist.

Diese Ergebnisse gaben den ersten Hinweis auf einen Caspase-8-unabhängigen Mechanismus für die Sensitivierung durch TNF α . Insbesondere für die Verstärkung der Etoposid- und C₂-Ceramid-induzierten Apoptose durch TNF α schien eine Beteiligung von Caspase-8 nicht notwendig zu sein.

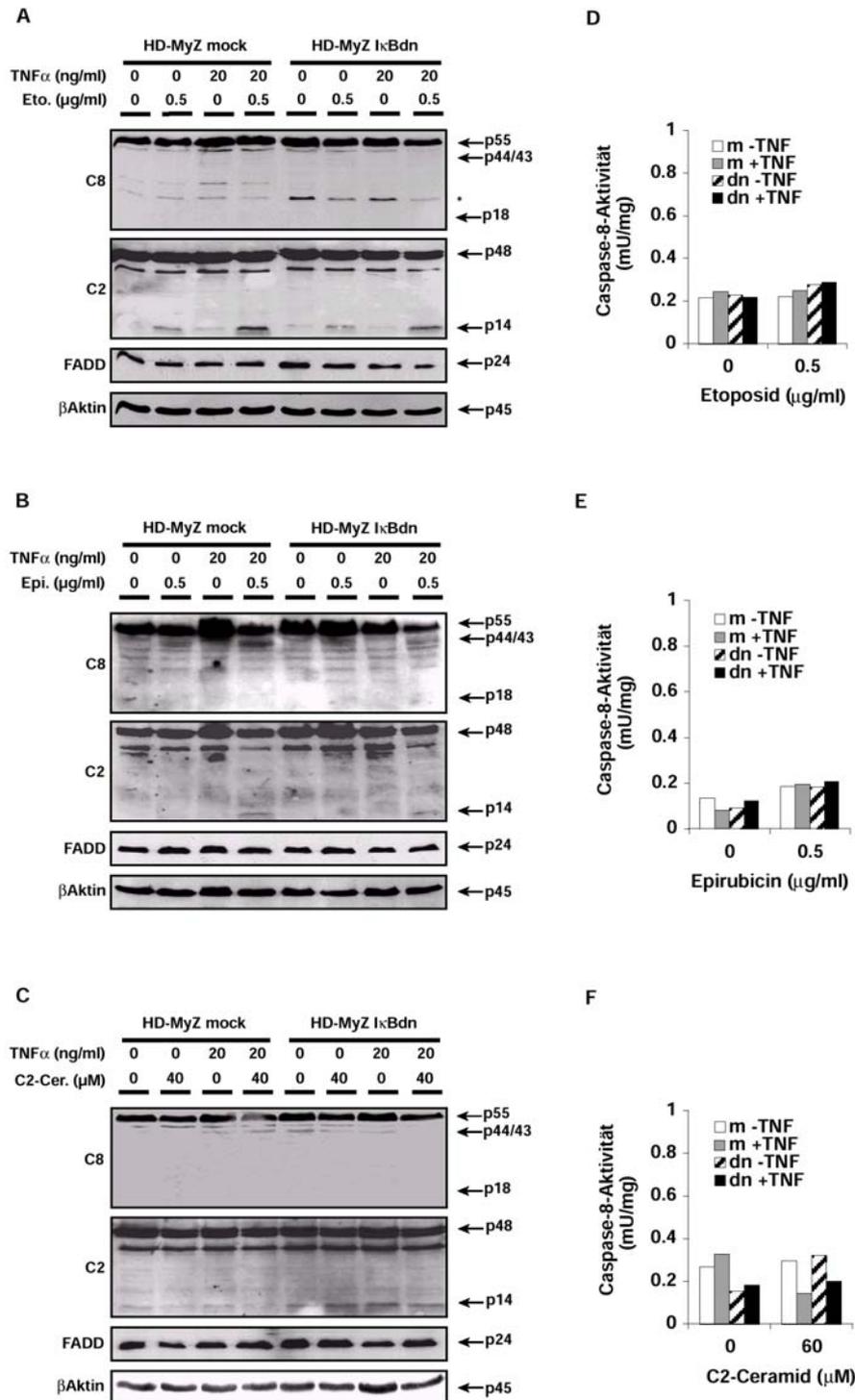


Abb. 26: Aktivierung und Prozessierung von Caspase-8 und -2 und Expression von FADD nach Behandlung mit Etoposid, Epirubicin oder Ceramid. HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ I κ Bdn (dn) wurden mit TNF α oder Medium und anschließend mit Etoposid (A,D), Epirubicin (B,E) oder C₂-Ceramid (C, F) behandelt. Western Blot-Analyse für Caspase-8 und -2, FADD und β Aktin erfolgte nach 72h (Zytostatika) bzw. nach 48h (C₂-Ceramid). Prozessierte und unprozessierte Form der Caspasen, sowie unspezifische Signale (*) sind markiert (A, B, C). Bestimmung der Caspase-8-Aktivität in löslichen Extrakten anhand der Spaltung von Ac-IETD-pNA erfolgte wie in Abb. 23-25 beschrieben nach 48h bzw. 22h (D-F).

4.4.3. *In-Vitro*-Aktivierung von Caspase-8 in unbehandelten HD-MyZ-Zellen

Da in HD-MyZ nach Behandlung mit Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid keine signifikante Caspase-8-Aktivierung anhand des Auftretens des aktiven p18-Fragmentes zu detektieren war, sollte im Folgenden untersucht werden, ob ein Defekt der Caspase-8 selbst oder ein anderes zellspezifisches Phänomen diese Aktivierung verhinderte. Hierzu wurden hypotone Extrakte aus unbehandelten HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn-Zellen gewonnen, um deren Aktivierbarkeit in Anwesenheit von dATP und Cytochrom C mithilfe eines *In-Vitro*-Versuchsansatzes zu untersuchen. Die Caspase-Aktivierung wird hier durch den Komplex aus dATP, Cytochrom C und Apaf-1 (Apoptosom) über die Aktivierung von Caspase-9 induziert und simuliert somit in einem zellfreien System den endogen in der Zelle stattfindenden Prozeß der Apoptoseinduktion nach mitochondrialer Schädigung. Nach *In-Vitro*-Aktivierung wurden Zellextrakte von HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn auf Caspase-8-Aktivierung anhand der photometrisch detektierbaren Spaltung des Caspase-8 Substrates Ac-IETD-pNA und anhand einer Western Blot-Analyse untersucht. In Abb. 27A + B ist nach *In-Vitro*-Aktivierung in HD-MyZ-Zellextrakten sowohl Caspase-8 als auch Caspase-3-Aktivität nachweisbar. Auch der immunchemische Nachweis der Caspase-8-Aktivierung konnte anhand der Detektion des p18-Fragmentes in der Western Blot-Analyse erbracht werden (Abb. 27C).

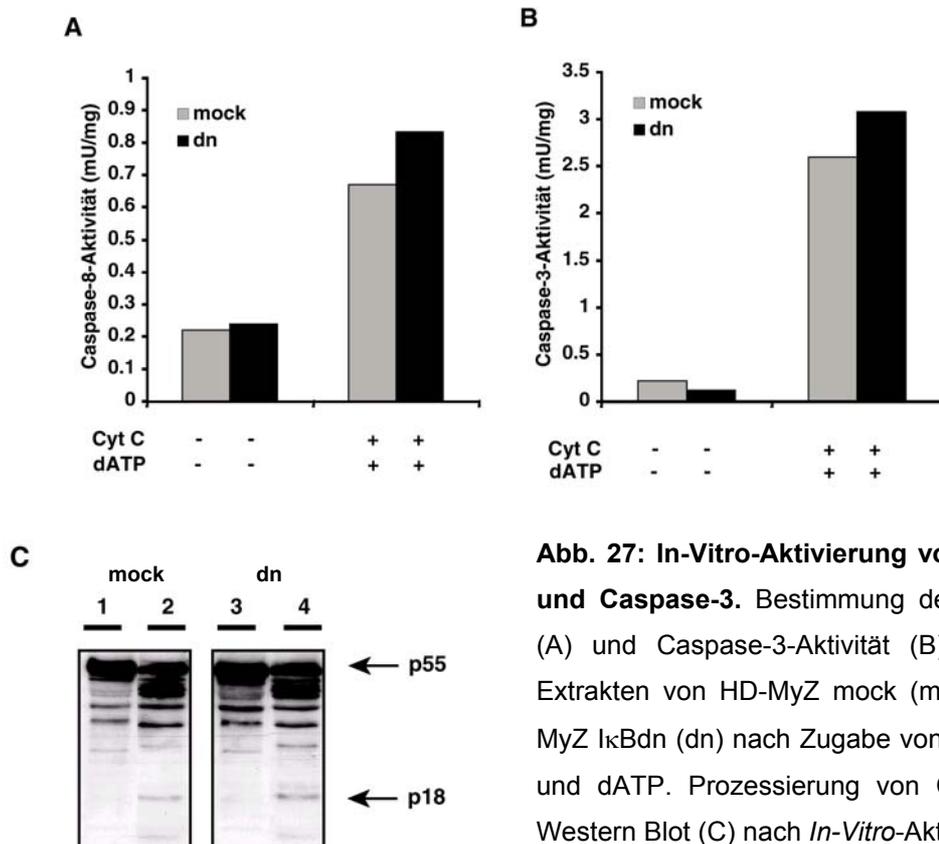


Abb. 27: *In-Vitro*-Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3. Bestimmung der Caspase-8- (A) und Caspase-3-Aktivität (B) in löslichen Extrakten von HD-MyZ mock (mock) und HD-MyZ I κ Bdn (dn) nach Zugabe von Cytochrom C und dATP. Prozessierung von Caspase-8 im Western Blot (C) nach *In-Vitro*-Aktivierung (Spur 2, 4) bzw. in Kontrollextrakten (Spur 1, 3). Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen mit einer Abweichung < 10%

4.4.4. Epirubicin-induzierte Apoptose in HD-MyZ bei gleichzeitiger Inhibition von Caspase-8

Um weitere Beweise für die Unabhängigkeit des sensitivierenden $\text{TNF}\alpha$ -Effektes von einer Caspase-8-Aktivierung zu erbringen, wurde der Einfluß von Caspase-8 auf die Epirubicin-induzierte Apoptose untersucht. Für die Behandlung mit Etoposid oder C_2 -Ceramid war eine Prozessierung von Caspase-8 mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ weder anhand eines p43- noch anhand eines p18-Fragmentes nachzuweisen, wohingegen Epirubicin-behandelte Zellen diese Prozessierung schwach erkennen ließen. In HD-MyZ mock wurde deshalb die Epirubicin-induzierte Apoptose mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ in Anwesenheit eines zellpermeablen Caspase-8-Inhibitors, Z-IETD-fmk, bestimmt (Abb. 28B). Die Spezifität des Inhibitors konnte durch Hemmung der CD95/Fas-induzierten Apoptose in Jurkat belegt werden. In Jurkat-Zellen ist die CD95/Fas-induzierte Apoptose ein Prozeß unter Beteiligung der Caspase-8 innerhalb des DISCs (248). Die Vorinkubation mit 20 μM und 50 μM Z-IETD-fmk für 2h blockierte die durch einen agonistischen Fas-Antikörper induzierte Apoptose von 20% auf 6%, was der Hintergrundapoptose un behandelter Zellen entsprach und nach 24h anhand der Annexin-V-FITC-Methode in der FACS-Analyse nachzuweisen war. HD-MyZ mock wurden ebenfalls für 2h mit 20 μM Z-IETD-fmk vorbehandelt, anschließend für 72h mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin in Anwesenheit oder Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ behandelt bzw. un behandelt belassen (Abb. 28B).

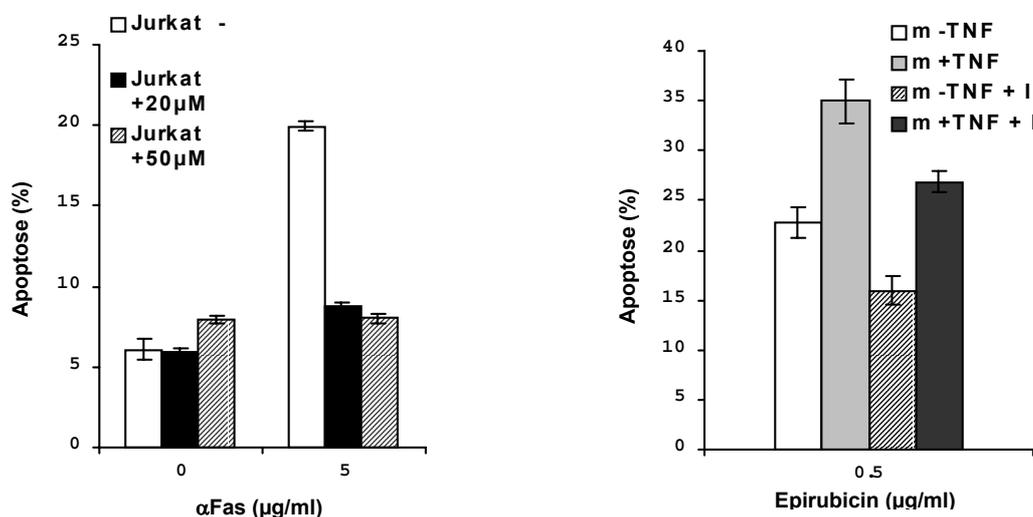


Abb. 28: CD95/Fas- und Epirubicin-induzierte Apoptose in Gegenwart eines Caspase-8-Inhibitors, Z-IETD-fmk. HD-MyZ mock (m) wurden mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin für 72h nach oder ohne Vorbehandlung mit $\text{TNF}\alpha$ in Gegenwart (+) oder in Abwesenheit (-) von 20 μM Z-IETD behandelt. Apoptose wurde mittels modifizierter Zellzyklusanalyse bestimmt (B). Jurkat-Zellen wurden mit 5 $\mu\text{g/ml}$ immobilisierten anti-CD95/Fas Antikörper nach Vorbehandlung mit Medium (-), 20 μM (+20 μM) oder 50 μM (+50 μM) Z-IETD-fmk inkubiert. Nach 24h wurde Apoptose durch Färbung mit Annexin-V-FITC im FACS bestimmt (A).

Die spezifische Blockierung der Caspase-8 führte zu einer geringen Verminderung der Epirubicin-induzierten Apoptose von 23% auf 16% in Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ und von 35% auf 27% in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$. Die Erhöhung der Apoptoserate in Epirubicin behandelten Zellen durch $\text{TNF}\alpha$ blieb damit auch in Anwesenheit des Caspase-8-Inhibitors erhalten. Einzig die Epirubicin-induzierte Apoptose wurde durch Z-IETD-fmk erniedrigt. Das deutete daraufhin, daß die im Western Blot erkennbare, schwache Prozessierung durch Epirubicin tatsächlich mit einer geringen Caspase-8-Aktivität einhergeht und an der Epirubicin-induzierten Apoptose beteiligt ist.

Für die Sensitivierung von HD-MyZ durch $\text{TNF}\alpha$ allerdings konnte der postulierte Caspase-8-unabhängige Mechanismus klar bestätigt werden, da zwar eine schwache Inhibition der Epirubicin-induzierten Apoptose zu beobachten war, der Effekt der Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ aber von der Anwesenheit des Inhibitors unbeeinflusst blieb.

Die Untersuchungen zur Aktivierung und Blockierung der Initiator-Caspase-8 zeigten damit, daß Caspase-8 in HD-MyZ prinzipiell über das mitochondriale Apoptosom unter *in-vitro* Bedingungen aktivierbar ist, daß diese Caspase-8-Aktivierung aber für die Sensitivierung in HD-MyZ keine Bedeutung hat.

4.5. Verstärkung der mitochondrialen Aktivierung durch $\text{TNF}\alpha$ bei der Zytostatika- und Ceramid-induzierten Apoptose von HD-MyZ

4.5.1. Spaltung von Bid

In neueren Untersuchungen konnte ein Mitglied der Bcl-2-Familie, Bid, als Verbindungsglied zwischen Rezeptor-vermittelter und Mitochondrien-vermittelter Apoptose charakterisiert werden (72). Neben anderen Todesliganden kann $\text{TNF}\alpha$ über die Rekrutierung des DISCs die Aktivierung von Caspase-8 induzieren, die dann wiederum Bid N-terminal spaltet. Das C-terminale Bid-Fragment transloziert zum Mitochondrium und gibt das apoptotische Signal durch Induktion der Integration von Bax in die mitochondriale Membran an das Mitochondrium weiter (70). Abb. 29 A-C zeigt die Western Blot-Analyse von HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ nach Behandlung mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid und 0.25 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin für 72h, bzw. mit 40 μM C_2 -Ceramid für 48h in Anwesenheit oder Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ hinsichtlich der Spaltung von Bid. Wie der immunchemische Nachweis von Bid mit einem gegen das vollständige Protein gerichteten Antikörper zeigt, kam es unter Berücksichtigung der Proteinbeladung (β Aktin) zur keiner Abnahme von Bid. Weder Zytostatika noch Ceramid mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ induzieren eine signifikante Spaltung von Bid in diesem Zellsystem. Damit konnte ein weiterer Nachweis dafür geliefert werden, daß die Aktivierung von

Caspase-8 und der Caspase-8-vermittelten Bid-Spaltung für den sensitivierenden Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Apoptose in HD-MyZ nicht notwendig ist.

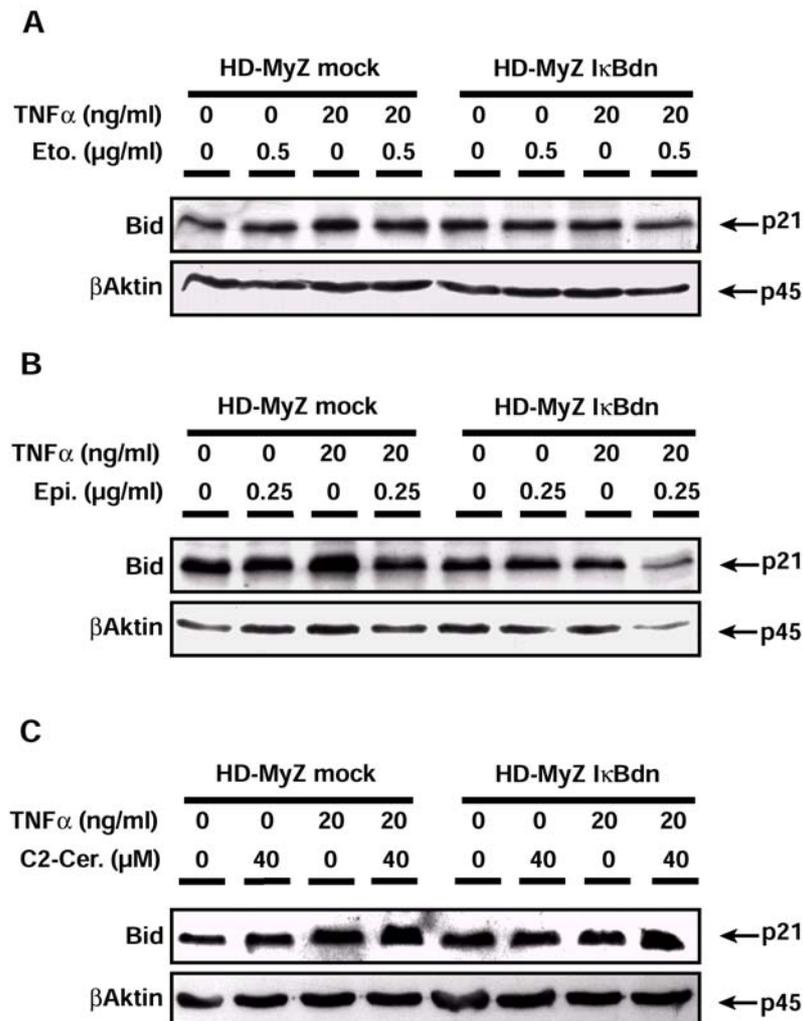


Abb. 29: Expression von Bid in HD-MyZ nach Behandlung mit Etoposid, Epirubicin oder Ceramid. HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn wurden mit $\text{TNF}\alpha$ oder Medium und anschließend mit Etoposid (A), Epirubicin (B) oder C₂-Ceramid (C) behandelt. Western Blot-Analyse für Bid und β Aktin erfolgte nach 72h (Zytostatika) bzw. nach 48h (C₂-Ceramid) unter Verwendung eines Antikörpers, der das 21 kDa Bid-Protein, aber keine Spaltprodukte erkennt.

4.5.2. Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials durch Etoposid, Epirubicin und Ceramid in Gegenwart von TNF α

Die Beteiligung der Mitochondrien an der Zytostatika- und Ceramid-induzierten Apoptose ist durch eine Reihe von Arbeiten für andere Zellsysteme belegt worden (249, 250). Ein wichtiges mitochondriales Ereignis ist dabei die Freisetzung von Cytochrom C, was über die Formierung des Apaf-1-Komplexes zur Aktivierung von Caspase-9 führt. Obwohl der genaue Mechanismus der Cytochrom C-Freisetzung noch strittig ist, wird die Bildung von mitochondrialen Permeabilitätsporen (MPT) und der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) als Voraussetzung für die Cytochrom C-Freisetzung angesehen (59). Inwieweit Mitochondrien für den sensitivierenden Effekt von TNF α eine Rolle spielten, war unbekannt. Da allerdings der für viele Zellsysteme beschriebene Weg der Rezeptor-vermittelten Caspase-8-Aktivierung durch TNF α in dem hier verwendeten Zellsystem offensichtlich keine Rolle spielte, waren andere Mechanismen, u.a. die Aktivierung der Mitochondrien, zu postulieren. Die Verwendung eines kationischen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-Benzimidazolyl-carbo-cyaniniodid), der sich Potential-abhängig im Mitochondrium anreichert, ermöglichte die Detektion des Abfalls des mitochondrialen Membranpotentials in HD-MyZ nach Behandlung mit Etoposid, Epirubicin und C₂-Ceramid in Gegenwart oder Abwesenheit von TNF α . Die Vorbehandlung mit TNF α verstärkte den Abfall des mitochondrialen Membranabfalls ausgelöst durch Etoposid (Abb. 30A), Epirubicin (Abb. 30C) oder C₂-Ceramid (Abb. 30E), wobei TNF α alleine keinen Einfluß hatte. Die Behandlung mit Etoposid für 40h führte in HD-MyZ I κ Bdn in Anwesenheit von TNF α zu einem Abfall des Membranpotentials in 21% der Zellen gegenüber 10% in Abwesenheit von TNF α . In HD-MyZ mock erhöhte die zusätzliche Behandlung mit TNF α den Abfall von $\Delta\Psi_m$ von 4% auf 14% der Zellen (Abb. 30A). Ähnlich konnte der durch Epirubicin nach 40h induzierte Abfall von $\Delta\Psi_m$ durch TNF α von 2% auf 29% (HD-MyZ mock) bzw. von 2% auf 19% (HD-MyZ I κ Bdn) erhöht werden (Abb. 30C). 22h nach Ceramid-Behandlung wurde in HD-MyZ I κ Bdn in 15% der Zellen ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials gegenüber 33% bei gleichzeitiger TNF α -Behandlung ausgelöst, wohingegen in HD-MyZ mock unter diesen Bedingungen kein Effekt auf das Membranpotential zu detektieren war (Abb. 30E). In allen drei Fällen war die Schädigung der Mitochondrien durch die Behandlung dem Einsetzen der Apoptose zeitlich vorgeschaltet, was anhand der parallel bestimmten DNA-Fragmentierung (Abb. 30B, D, F) zu erkennen war. Damit war ein unspezifischer Abfall des Membranpotentials als Folge einer allgemeinen Zellschädigung weitestgehend ausgeschlossen, vielmehr war der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials als notwendige Voraussetzung für die Induktion der Apoptose und die Sensitivierung durch TNF α anzusehen. Der protektive Einfluß von NF- κ B auf die Etoposid

und Ceramid-induzierte Apoptose resultierte in einem geringeren Abfall des $\Delta\Psi_m$ wie der Vergleich zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn erkennen ließ. Wie sich bereits in vorhergehenden Versuchen zur Caspase-Aktivierung zeigte, hat die Blockierung des NF- κ B-Signalweges aber auch für den durch Epirubicin-induzierten Abfalls von $\Delta\Psi_m$ keinen Einfluß.

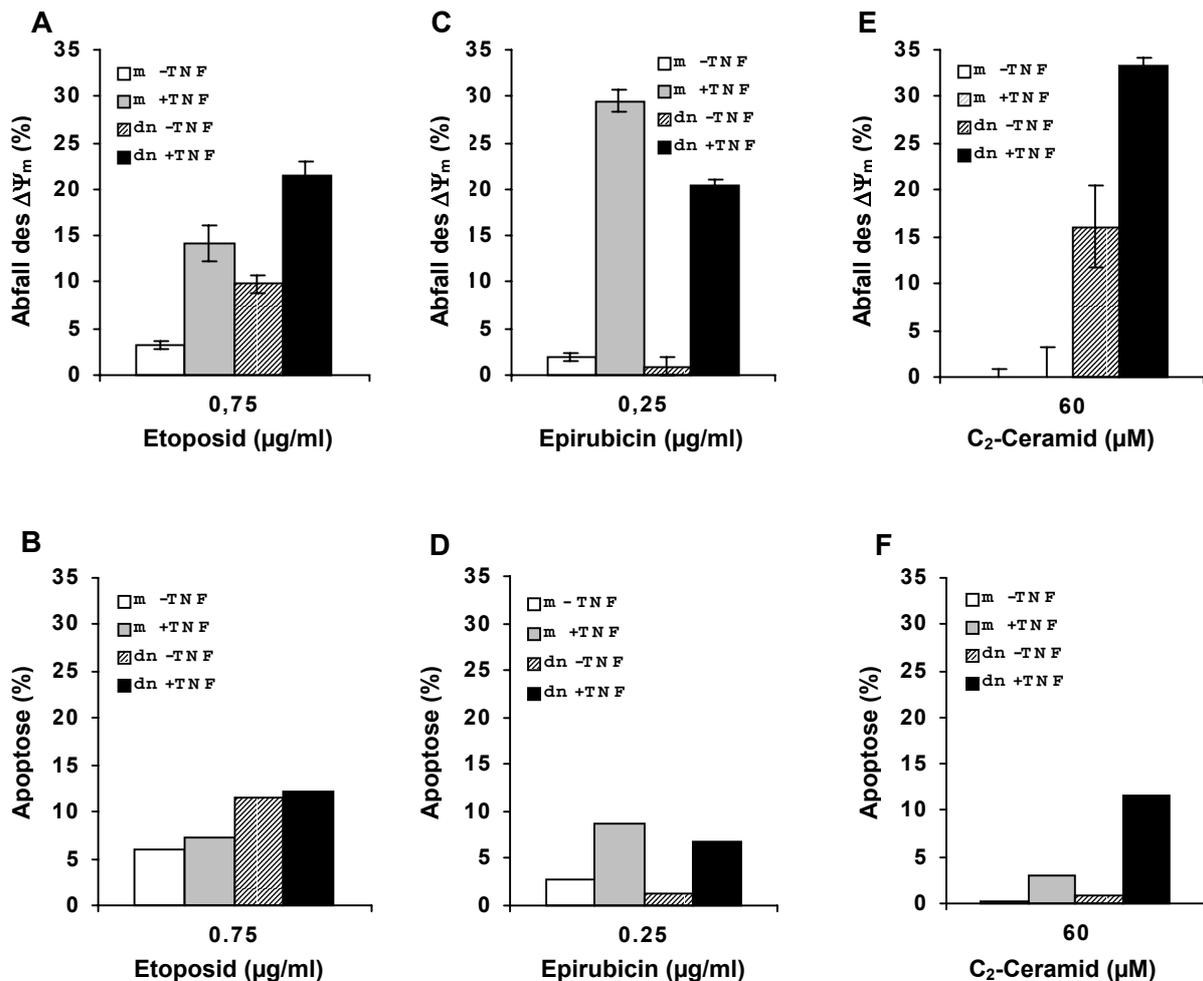


Abb. 30: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in HD-MyZ nach Behandlung mit Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid in Gegenwart von TNF α . HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn wurden mit oder ohne TNF α vorinkubiert und nachfolgend mit den angegebenen Konzentrationen an Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid behandelt. 40h nach Zytostatika- und 22h nach C₂-Ceramid-Behandlung wurden die Zellen mit dem Potential-sensitiven JC-1-Farbstoff gefärbt und im FACS analysiert. (A, C, D). Parallel dazu wurde die Apoptose anhand von DNA-Fragmentierung zu einem frühen Zeitpunkt detektiert (B, D, F). Die Werte stellen den Mittelwert aus 3 Experimenten +/- S.D. dar.

4.5.3. Freisetzung von Cytochrom C

Die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Bereich zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran in das Zytoplasma wurde in löslichen Extrakten von HD-MyZ nach einer Behandlung mit Zytostatika (für 40h) oder mit Ceramid (für 20h) in Gegenwart von 20 ng/ml TNF α im Western Blot verfolgt (Abb. 31 A-C). Die durch 0.75 μ g/ml Etoposid bzw. durch 0.25 μ g/ml Epirubicin oder durch 60 μ M C₂-Ceramid induzierte Cytochrom C Freisetzung wurde sowohl in HD-MyZ mock als auch in HD-MyZ I κ Bdn durch TNF α deutlich verstärkt. Die durch TNF α vermittelte Sensitivierung von HD-MyZ für Zytostatika- und C₂-Ceramid-induzierten Zelltod ließ sich also anhand einer Verstärkung des Abfalls des mitochondrialen Membranpotentials und auch anhand einer vermehrten Cytochrom C Freisetzung festmachen. Interessanterweise ging der durch NF- κ B-vermittelte Schutz gegenüber Etoposid- und Ceramid-induzierter Apoptose nicht mit einer verringerten Cytochrom C-Freisetzung in HD-MyZ mock-Zellen einher.

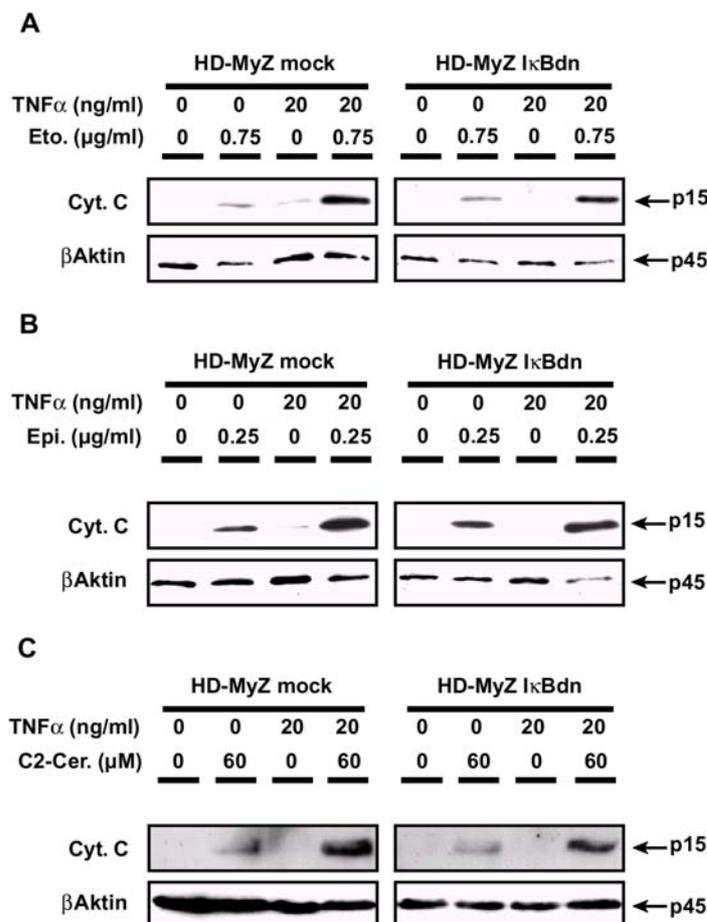


Abb. 31: Freisetzung von Cytochrom C in HD-MyZ nach Behandlung mit Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid in Gegenwart von TNF α . HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn wurden zunächst mit TNF α oder Medium und anschließend mit Etoposid (A), Epirubicin (B) oder C₂-Ceramid (C) behandelt. Nach 40h Zytostatika- bzw. nach 20h Ceramid-Behandlung wurden lösliche Extrakte durch Permeabilisierung der Zytoplasmamembran mit 0.75 mg/ml Digitonin und anschließender Subfraktionierung hergestellt. Für die Western Blot-Analyse wurden 50 μ g Protein im SDS-Gel aufgetrennt und unter Verwendung eines Antikörpers gegen Cytochrom C auf das Vorhandensein von Cytochrom C im Zytosol untersucht. Gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch Nachweis von β Aktin kontrolliert.

4.5.4. Prozessierung und Aktivierung von Caspase-9 nach Behandlung mit Epirubicin und Ceramid

Als Bestandteil des Apoptosoms spielt Caspase-9 eine zentrale Rolle in der Weiterleitung des apoptotischen Signales zwischen Mitochondrien und nachfolgenden Ereignissen wie der Aktivierung von Effektor-Caspasen. Nach Behandlung von HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ mit Epirubicin und C_2 -Ceramid wurde deshalb die Aktivierung und Prozessierung von Caspase-9 im Western Blot bzw. in der enzymatischen Aktivitätsbestimmung untersucht. Nach Behandlung mit C_2 -Ceramid für 22h war eine signifikante Prozessierung von Caspase-9, wie in Abb. 32B anhand der Spaltung des Zymogens gezeigt, nur in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ zu detektieren. Übereinstimmend dazu war auch nur unter diesen Bedingungen eine deutliche Caspase-9-Aktivität nachzuweisen (Abb. 32D). Die Vorinkubation mit $\text{TNF}\alpha$ erbrachte in HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ hinsichtlich der Epirubicin-Behandlung für 40h sowohl verstärkte Prozessierung von Caspase-9 (Abb. 32A), als auch eine erhöhte Aktivität (Abb. 32C). Dies war sowohl für Epirubicin als auch für Ceramid nachweisbar.

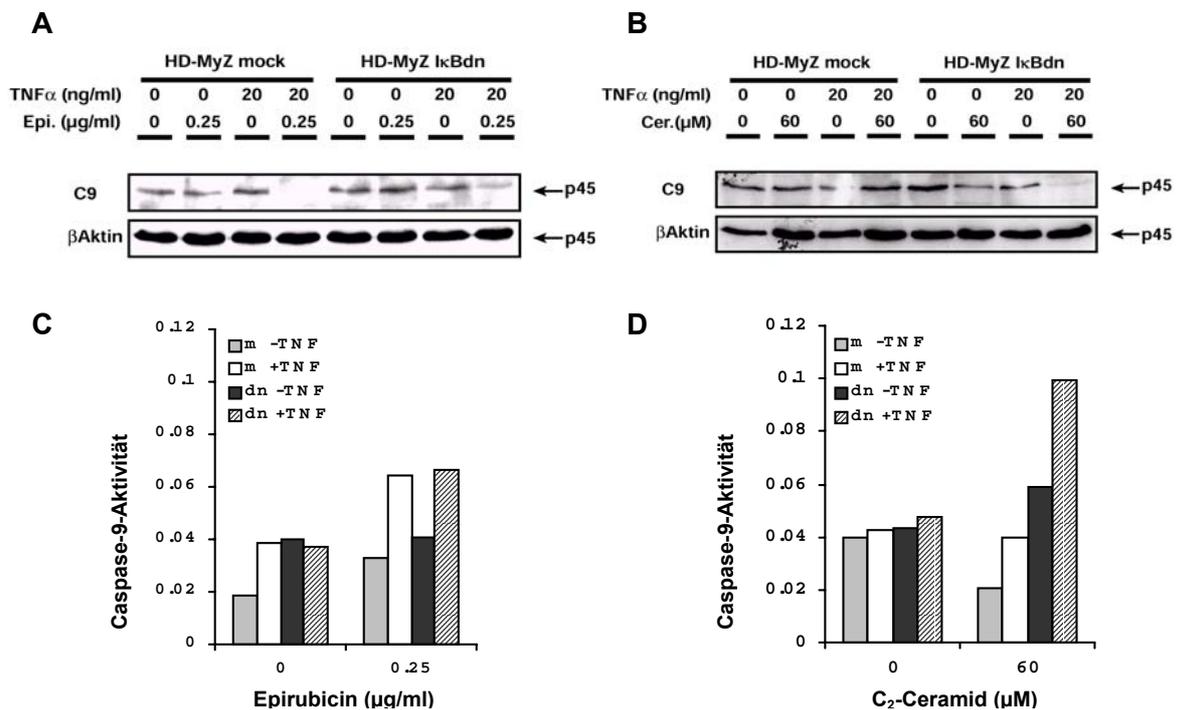


Abb. 32: Prozessierung und Aktivierung von Caspase-9 nach Behandlung mit Ceramid oder Epirubicin. Nach Behandlung von HD-MyZ mock (m) und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ (dn) für 40h mit Epirubicin oder 22h mit C_2 -Ceramid in Gegenwart oder Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ wurden einerseits Gesamtzellextrakte zur Detektion von Caspase-9 (Zymogen) im Western Blot (A, B) hergestellt und andererseits in löslichen Extrakten die Caspase-9-Aktivität anhand der Spaltung des Substrates, Ac-LEHD-pNA, verfolgt (C, D). Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen mit einer Abweichung < 10%.

4.6. Aktivierung der Caspasen und der Mitochondrien bei der Sensitivierung von K562 durch TNF α

Die Sensitivierung von HD-MyZ durch TNF α war auch vor dem Hintergrund der fehlenden Caspase-8-Aktivierung zu beobachten. Für dieses Zellsystem führte die Vorbehandlung mit TNF α zu einer verstärkten Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges unabhängig von einer Caspase-8-Aktivierung. In ersten Experimenten wurde der Mechanismus der Sensitivierung in einem weiteren Zellsystem untersucht. Hierzu wurde die Zelllinie K562 ausgewählt, um deren Caspase-3- und Caspase-8-Prozessierung sowie deren mitochondriale Aktivierung unter sensitivierenden Bedingungen zu bestimmen.

4.6.1. Caspase-3- und Caspase-8-Aktivierung von K562 unter sensitivierenden Bedingungen

K562 wurden für 48h mit 0.5 μ g/ml Epirubicin oder 5.0 μ g/ml Etoposid nach Vorinkubation mit Medium oder mit 20 ng/ml TNF α behandelt. Anschließend wurden aus den geernteten Zellen Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Detektion der Caspase-3 nach Epirubicin-Behandlung zeigte im Western Blot eine deutliche Aktivierung auch ohne Vorbehandlung mit TNF α , TNF α führte aber zu einer vermehrten Prozessierung von Caspase-3, was durch das Auftreten des p17-Fragmentes gekennzeichnet war (Abb. 33). Nach Etoposid-Behandlung war eine signifikante Aktivierung erst in Gegenwart von TNF α zu erkennen. Die Prozessierung der Caspase-8 konnte nach alleiniger Behandlung mit Epirubicin anhand des p18-Fragmentes detektiert werden; in Gegenwart von TNF α nahm die Stärke des Signales zu. Für Etoposid war ähnlich wie für Caspase-3 erst nach Kombination von Etoposid und TNF α eine Spaltung des Caspase-8 Proenzymes nachzuweisen. Hinsichtlich der Prozessierung beider Caspasen zeigte sich, daß TNF α alleine keine Aktivierung induzierte.

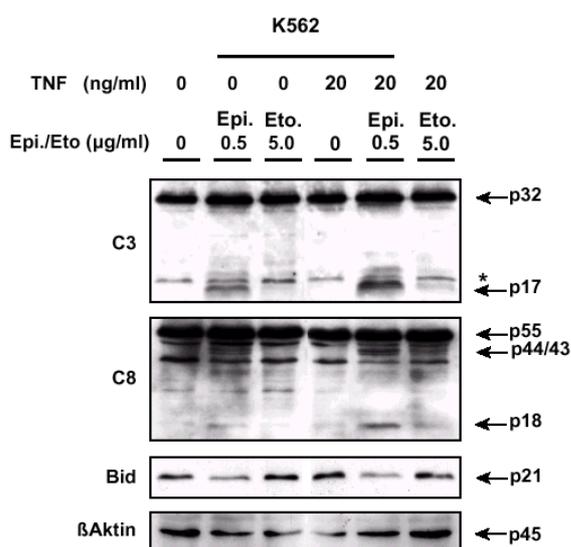


Abb. 33: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Prozessierung von Caspase-3 und -8, sowie der Spaltung von Bid. K562 wurden wie angezeigt für 48h mit 0.5 μ g/ml Epirubicin (Epi) oder 5 μ g/ml Etoposid (Eto) nach Vorinkubation mit 20 ng/ml TNF α behandelt. 50 μ g Gesamtzellextrakt wurden im Western Blot untersucht. Die Position der Proenzyme (p32, p55) und der prozessierten Untereinheiten (p17 für Caspase-3, p44/43 und p18 für Caspase-8) sind mit Pfeilen markiert. Der Stern kennzeichnet eine unspezifische Bande. Der Nachweis von β Aktin diente der Ladungskontrolle.

Abb. 33 zeigt den immunchemischen Nachweis von Bid mithilfe eines Antikörpers, der gegen das ungespaltene Protein gerichtet ist. Die Abnahme des Bid-Signals nach Behandlung mit Epirubicin wies deshalb auf eine Spaltung von Bid hin. Bid-Spaltung trat damit parallel zur Prozessierung der Caspase-8 in Epirubicin-behandelten und nicht in Etoposid-behandelten Zellen auf. Die detektierte Caspase-8-Spaltung in Verbindung mit der Spaltung von Bid kann als Hinweis auf eine Caspase-8-Abhängigkeit der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Sensitivierung betrachtet werden. Allerdings ist es ebenfalls denkbar, die Caspase-8-Aktivierung als Ereignis zu betrachten, das der mitochondrialen Aktivierung und der Aktivierung von Caspase-3 nachgeordnet ist. Ob für die Sensitivierung von K562 die Rezeptor-vermittelte Caspase-8-Aktivierung notwendig ist oder wie in HD-MyZ unabhängig davon erfolgt, konnte noch nicht abschließend beantwortet werden.

4.6.2. Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach Behandlung von K562 und EM-3 mit Zytostatika in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$

Da die Sensitivierung von HD-MyZ durch $\text{TNF}\alpha$ unter Beteiligung der Mitochondrien erfolgte, war für K562 und EM-3 die Frage von Interesse, ob auch hier $\text{TNF}\alpha$ zu einer Verstärkung des Abfalls des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) führt. Nach 6h und 12h Behandlung mit Zytostatika war keine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials zu bestimmen (nicht gezeigt). Erst nach 24h war in K562-Zellen nach Behandlung mit Epirubicin und in EM-3-Zellen nach Behandlung mit Etoposid in Anwesenheit oder Abwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ eine Verminderung des Potentials zu detektieren (Abb. 34 A, C). $\text{TNF}\alpha$ verstärkte den Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in EM-3 nach Behandlung mit Etoposid. Etoposid alleine induzierte in 61.3 % der Zellen ein vermindertes Membranpotential, wohingegen die Kombination von Etoposid und 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ in 90.9% der Zellen zu einem Abfall des Potentials führte. Die Epirubicin-Behandlung führte in 29.6% der Zellen zu einem Abfall von $\Delta\Psi_m$, $\text{TNF}\alpha$ erhöhte diesen Abfall auf 46.2% der Zellen. Für beide Zelllinien hatte $\text{TNF}\alpha$ alleine keinen Einfluß auf des Membranpotential. Die parallel bestimmte Apoptoserate nach 24h lag unter 30% und lag damit deutlich unterhalb der Schädigung der Mitochondrienmembran (Abb. 34 B, D). Dies läßt darauf schließen, daß die Schädigung der Mitochondrienmembran ein frühes Ereignis im Apoptoseablauf in K562 und EM-3 darstellt und am Mechanismus der Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ beteiligt ist.

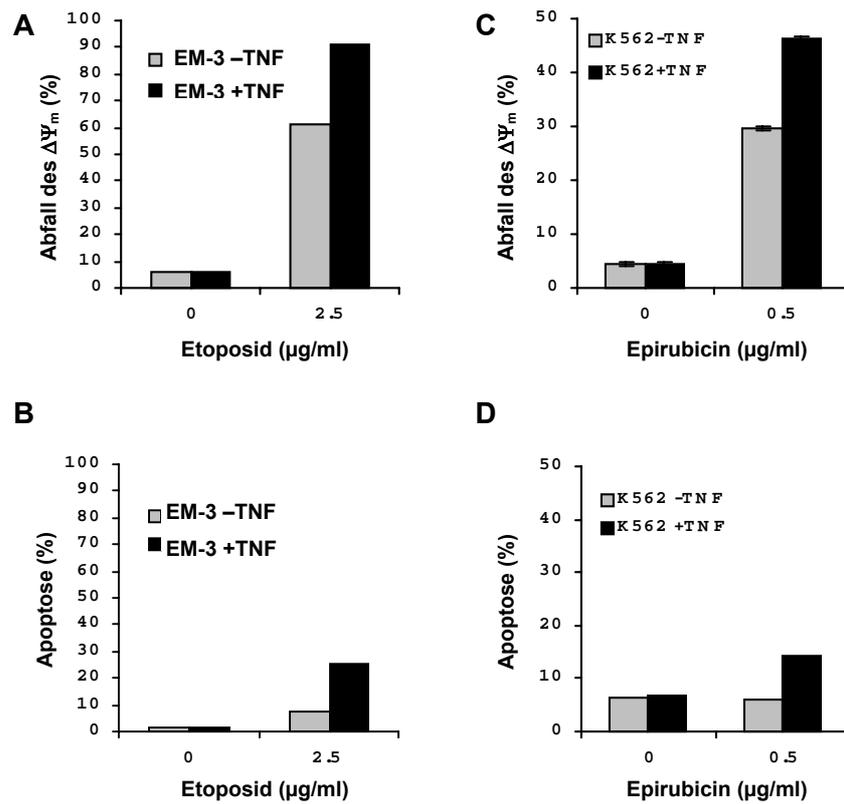


Abb. 34: Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in EM-3 und K562 nach Behandlung mit Etoposid oder Epirubicin in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$. Die Zellen wurden mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ vorinkubiert und nachfolgend mit den angegebenen Konzentrationen an Etoposid oder Epirubicin behandelt. 24h nach Behandlung wurden die Zellen mit dem potential-sensitiven JC-1-Farbstoff gefärbt und im FACS analysiert. (A, C). Parallel dazu wurde Apoptose anhand von DNA-Fragmentierung detektiert (B, D). Die Werte stellen den Mittelwert \pm S.D. ($n = 3$) dar.

4.7. Einfluß von Ceramid auf die Sensitivierung von HD-MyZ durch $\text{TNF}\alpha$

Eine Reihe von extrazellulären Substanzen und Streßfaktoren, darunter auch $\text{TNF}\alpha$, induzieren eine Akkumulation von Ceramid in der Zelle. Diesem intrazellulären Ceramid wird die Fähigkeit zugeschrieben, als „Second Messenger“ oder durch Auslösen von Caspase-Aktivierung die Induktion von Apoptose zu beeinflussen. (133). Einige Arbeiten zeigen darüberhinaus, daß das Fehlen bzw. der Mangel an intrazellulärem, freien Ceramid einen Mechanismus der Resistenzentstehung von Zellen gegenüber Zytostatika darstellen kann (251). Vor diesem Hintergrund war es denkbar, in einem durch $\text{TNF}\alpha$ induzierten, intrazellulären Konzentrationsanstieg an Ceramid eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der Sensitivierung von HD-MyZ durch $\text{TNF}\alpha$ zu finden. Hierzu wurde einerseits in HD-MyZ die Induktion der Bildung von Ceramid durch $\text{TNF}\alpha$ untersucht und andererseits der Versuch unternommen, $\text{TNF}\alpha$ als sensitivierende Substanz durch exogenes, membrangängiges C_2 -Ceramid zu ersetzen.

4.7.1. Aktivierung des Sphingomyelin-Zyklus in HD-MyZ durch $\text{TNF}\alpha$

Ceramid entsteht in der Zelle entweder durch *de novo*-Synthese oder durch die Hydrolyse des Sphingolipids, Sphingomyelin. $\text{TNF}\alpha$ kann die Synthese durch Aktivierung zweier Sphingomyelinasen (neutrale und saure) induzieren, die in der Lage sind, Sphingomyelin an der Phosphorylcholkopfgruppe zu spalten und dadurch Ceramid und Phosphorylcholin freizusetzen. In einem indirekten Versuchsansatz wurde in radioaktiv-markierten Zellen zunächst durch Aktivierung der Sphingomyelinase durch $\text{TNF}\alpha$ die Hydrolyse von Sphingomyelin im Vergleich zu unbehandelten Zellen induziert. In Zellen, die ein $\text{TNF}\alpha$ -induziertes Ceramid-Signaling aufweisen, wird hierbei Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert. In einem sich anschließenden zweiten Ansatz wurden Totallipidextrakte $\text{TNF}\alpha$ -induzierter und nicht-induzierter Zellen für die Sphingomyelinhydrolyse durch eine bakterielle Sphingomyelinase eingesetzt. Eine verminderte Sphingomyelinkonzentration in $\text{TNF}\alpha$ -behandelten Zellen konnte anhand der geringeren Konzentration von radioaktivem Phosphorylcholin im Szintillationszähler nachgewiesen werden. Aus der bestimmten (erniedrigten) Phosphorylcholkonzentration ließ sich auf eine $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Hydrolyse von Sphingomyelin und damit auf eine Ceramid-Bildung schließen.

In einer Konzentration von 20 ng/ml induzierte $\text{TNF}\alpha$ eine transiente Hydrolyse von Sphingomyelin nach 15 min in HD-MyZ mock und nach 30 min in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$, wie anhand der Bestimmung der Sphingomyelinkonzentration zu erkennen war (Abb. 35). Zu diesen Zeitpunkten waren ungefähr 30% des zellulären Sphingomyelin hydrolysiert ohne

signifikante Unterschiede zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn. Diese Befunde zeigten, daß TNF α eine schnelle Bildung von Ceramid unabhängig von NF- κ B induziert.

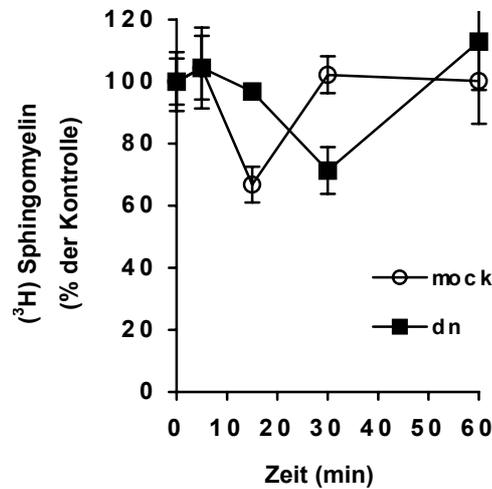


Abb. 35: TNF α -induzierte Hydrolyse von Sphingomyelin in HD-MyZ. Die Hydrolyse von Sphingomyelin wurde wie im Methodenteil beschrieben anhand der Phosphorylcholkonzentration im Szintillationszähler bestimmt. HD-MyZ mock- und HD-MyZ I κ Bdn-Zellen wurden für 72h mit Methyl-³H-Cholin inkubiert, gewaschen und für die angegebenen Zeiträume mit 20 ng/ml TNF α behandelt. Die Werte stellen den Mittelwert des Sphingomyelingehaltes dreier unabhängiger Messungen als % der Kontrolle +/- S.D. dar.

4.7.2. Sensitivierung von HD-MyZ für Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose durch C₂-Ceramid

Im folgenden Ansatz sollte die Frage geklärt werden, ob der sensitivierende Effekt von TNF α zumindestens teilweise auf einem Anstieg der intrazellulären Ceramidkonzentration beruhte. Der Ersatz von TNF α durch zellpermeables C₂-Ceramid könnte in diesem Fall die Sensitivierung durch TNF α imitieren und müßte ebenfalls zu einer Erhöhung der Apoptose führen. HD-MyZ mock (Abb. 36A) und HD-MyZ I κ Bdn (Abb. 36B) wurden mit 0.5 μ g/ml Etoposid behandelt; entweder ausschließlich oder nach Inkubation für 6h mit 20 ng/ml TNF α bzw. nach 6h Vorbehandlung mit 20 μ M C₂-Ceramid. Für Epirubicin-induzierte Apoptose wurde die gleiche Vorgehensweise gewählt. Abb. 36 zeigt, daß C₂-Ceramid im Gegensatz zu TNF α nicht in der Lage war, die durch Zytostatika induzierte Apoptose zu verstärken.

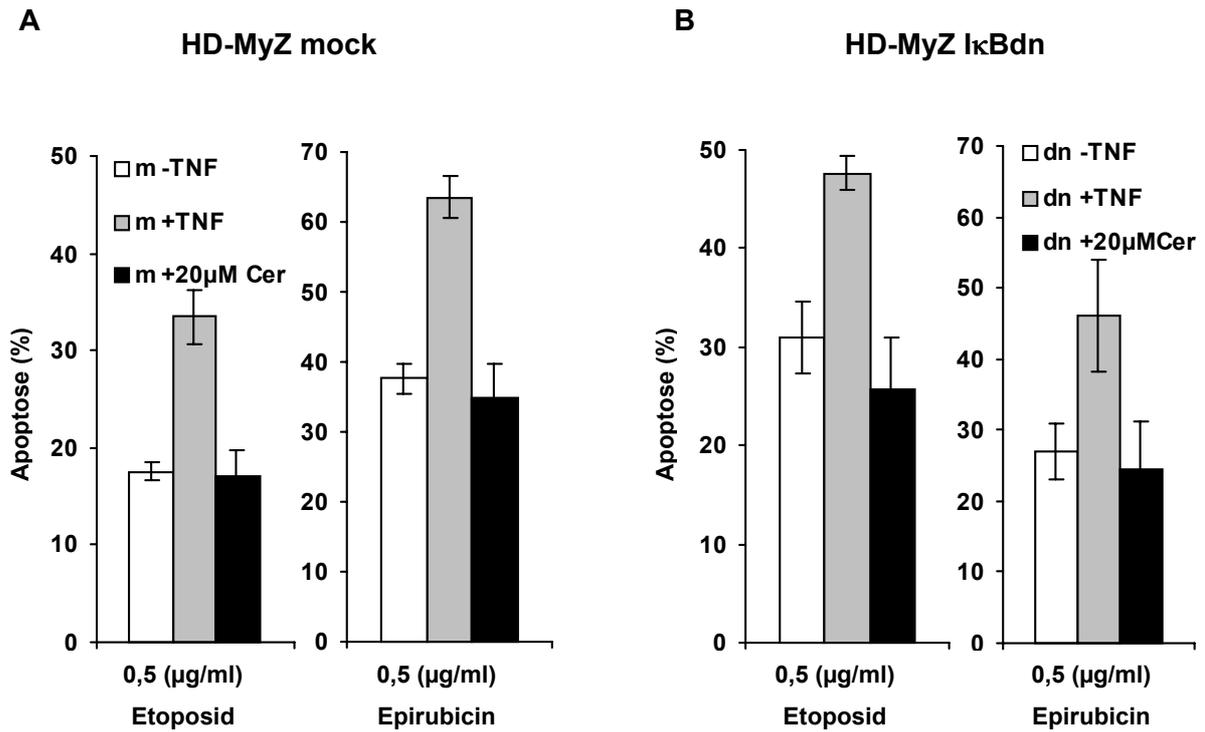


Abb. 36: Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose von HD-MyZ in Anwesenheit von $TNF\alpha$ oder C_2 -Ceramid. HD-MyZ mock (A) und HD-MyZ I κ Bdn-Zellen (B) wurden nach 6h Vorinkubation entweder mit 20 ng/ml $TNF\alpha$, 20 μ M C_2 -Ceramid oder Medium für 72h mit 0.5 μ g/ml Etoposid oder Epirubicin behandelt. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Messungen als % der Kontrolle +/- S.D. dar.

Konzentrationen von 10 μM oder 20 μM C_2 -Ceramid erbrachten ebenfalls nicht die sensitivierende Wirkung hinsichtlich der Apoptose induziert durch 0.25 und 0.75 $\mu\text{g/ml}$ Epirubicin (Abb. 37A) oder Etoposid (Abb. 37B).

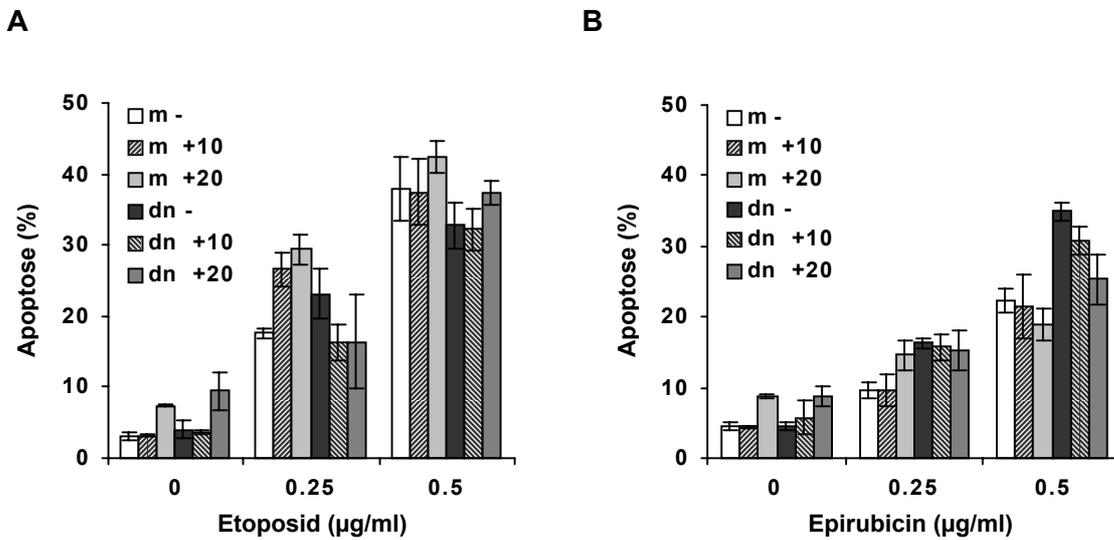


Abb. 37: Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose von HD-MyZ in Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ oder C_2 -Ceramid. HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ -Zellen wurden nach 6h Vorinkubation mit 10 μM oder 20 μM C_2 -Ceramid oder Medium für 72h mit den angegebenen Konzentrationen an Epirubicin (A) oder Etoposid (B) behandelt. Apoptose wurde anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt. Die Werte stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Messungen als % der Kontrolle \pm S.D. dar.

Damit konnte gezeigt werden, daß $\text{TNF}\alpha$ zwar, wie in vielen anderen Zellsystemen, zu einer Hydrolyse des intrazellulären Sphingomyelins führte, daß aber C_2 -Ceramid keinen Ersatz für $\text{TNF}\alpha$ hinsichtlich seiner sensitivierenden Wirkung darstellte.

4.7.3. Etoposid-induzierte Apoptose in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ und des Ceramid-Synthase-Blockers Fumonisin B_1

Neben der Hydrolyse von Sphingomyelin durch neutrale oder saure Sphingomyelinasen kann Ceramid in der Zelle auch *de novo* durch die Ceramid-Synthase gebildet werden. Die Hemmung der Ceramid-Synthase durch das Mycotoxin Fumonisin B_1 reduziert die Fähigkeit von Daunorubicin zur Induktion von Ceramid-Bildung und Apoptose (252). Um zu klären, ob $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung möglicherweise über eine Aktivierung der Ceramid-Synthase zu einem intrazellulären Anstieg an Ceramid und daraus resultierend zu einer Sensitivierung führen könnte, wurde das Toxin Fumonisin B_1 verwendet. HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ wurden mit oder ohne Vorinkubation mit $\text{TNF}\alpha$ für 72h mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid behandelt. Diese Ansätze wurden in Gegenwart von 0, 20 oder 50 μM Fumonisin B_1 durchgeführt. Abb. 38

verdeutlicht, daß in HD-MyZ die Hemmung der Ceramid-Synthase keinen Einfluß hat auf die Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ oder die Etoposid-induzierte Apoptose.

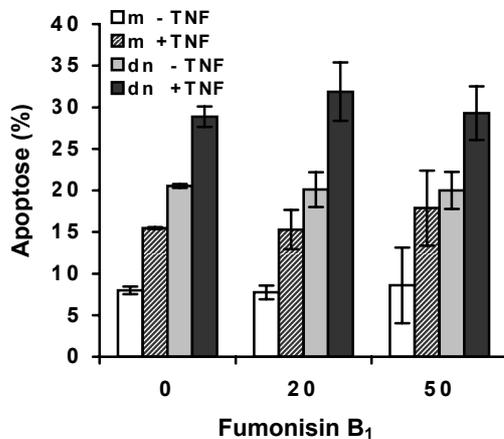


Abb. 38: Sensitivierung von HD-MyZ für 0.5 µg/ml Etoposid in Gegenwart von Fumonisin B₁. Die Zellen wurden für 2h mit 0, 20 oder 50 µM Fumonisin B₁ vorinkubiert, um anschließend mit 0.5 µg/ml Etoposid in Kombination mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ behandelt zu werden. Apoptose wurde nach 72h anhand von DNA-Fragmentierung bestimmt.

4.8. Einfluß von Proteinen, deren Gene unter transkriptioneller Kontrolle von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ stehen, auf die Apoptose in HD-MyZ

Die bisher dargestellten Daten wiesen auf einen interessanten Mechanismus der Steuerung der Apoptose von HD-MyZ-Zellen hin. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ vermittelt in diesen Zellen Überlebenssignale, die bei Wegnahme durch Blockierung des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweges zu einer Verstärkung der Apoptose in den HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ führen. Andererseits ist $\text{TNF}\alpha$ in der Lage, trotz Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$, also trotz Induktion von Überlebenssignalen, in HD-MyZ Apoptose zu verstärken. Daraus ergab sich die Frage, welche anti-apoptotischen Gene tatsächlich durch die $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ angeschaltet werden und ob sie einen Einfluß auf die Apoptose in HD-MyZ haben könnten. Aus diesem Grund wurde die Expression einer Reihe von Proteinen untersucht, für deren Gene eine transkriptionelle $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Abhängigkeit postuliert wird.

4.8.1. Mitglieder der IAP-Familie: HIAP-1, HIAP-2 und XIAP

Arbeiten von Chu et al (193) hatten für *hiap-1* die Abhängigkeit der Expression von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ gezeigt; für *hiap-2* war dies in HT1080 Zellen nachgewiesen (205) und für *xiap* in Endothelzellen (253).

Für HD-MyZ konnten diese Ergebnisse nur teilweise bestätigt werden. Wie bereits die für *hiap-2* spezifische RT-PCR in Abschnitt 3.1.2. andeutete, war auch mit immunchemischen Methoden keine Abhängigkeit der Expression von *hiap-2* vom Transkriptionsfaktor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zu erkennen (Abb. 39). HIAP-2 war in beiden Zelllinien zu detektieren, es zeigten sich außerdem

nach 24h keine Unterschiede im Expressionsniveau zwischen Behandlung mit 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ und unbehandelten Zellen. Ein Einfluß auf die Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ war für HIAP-2 auszuschließen.

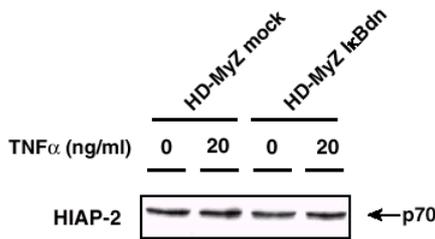


Abb. 39: Expression von HIAP-2 in HD-MyZ nach Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$. HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn wurden für 24h mit 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ behandelt bzw. unbehandelt belassen. Die Expression von HIAP-1 wurde in 50 μg Gesamtzellextrakt im Western Blot nachgewiesen.

Ähnliche Befunde waren für die Expression von XIAP in HD-MyZ zu erheben (Abb. 40). HD-MyZ-Zellen wurden für 40h mit Zytostatika, bzw. für 22h mit C_2 -Ceramid in angegebener Konzentration mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Schon in unbehandelten HD-MyZ mock- und HD-MyZ I κ Bdn-Zellen konnte eine Expression von XIAP festgestellt werden. 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ hatte in beiden Linien keinen Einfluß auf das Expressionsniveau von XIAP. Wie schon für andere Zellsysteme beschrieben, ergab allerdings die Behandlung mit Epirubicin und Ceramid eine Spaltung von XIAP (Abb. 40B + C).

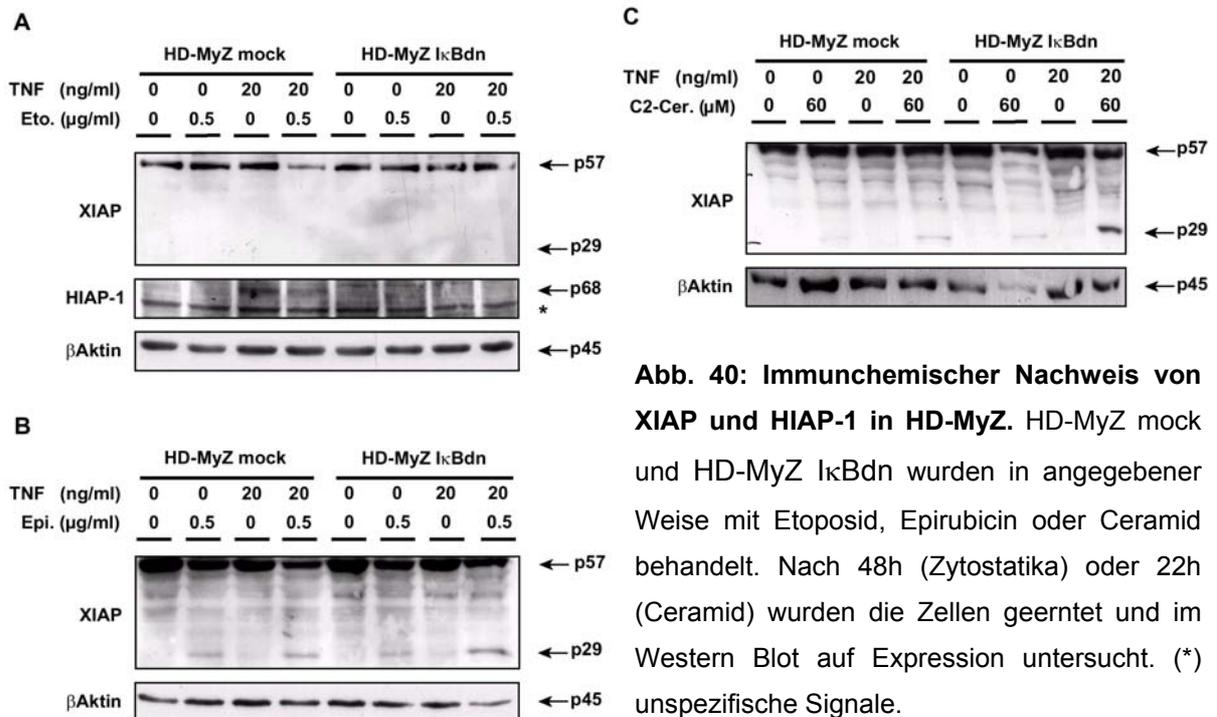


Abb. 40: Immunchemischer Nachweis von XIAP und HIAP-1 in HD-MyZ. HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn wurden in angegebener Weise mit Etoposid, Epirubicin oder Ceramid behandelt. Nach 48h (Zytostatika) oder 22h (Ceramid) wurden die Zellen geerntet und im Western Blot auf Expression untersucht. (*) unspezifische Signale.

Für *hiap-1* hatten RT-PCR und Northern Blot bereits eine Kontrolle durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B nachgewiesen (Abb. 9 + 12). Diese transkriptionelle Abhängigkeit von NF- κ B konnte auch anhand des immunchemischen Nachweises bestätigt werden (Abb. 40A). In der Western Blot-Analyse war ein schwaches Signal für HIAP-1 ausschließlich in HD-MyZ mock nach Inkubation mit 20 ng/ml TNF α zu erkennen. Diese Expression fehlte vollständig in HD-MyZ I κ Bdn. Die Kombination von TNF α und Etoposid hatte keinen verstärkenden Einfluß auf die Expression.

Auf transkriptioneller Ebene konnte auch nach Ceramid-Behandlung im Northern Blot nur eine sehr geringe Induktion festgestellt werden (Abb. 41). 20 ng/ml TNF α induzierten in HD-MyZ mock, aber nicht in HD-MyZ I κ Bdn nach 24h und nach 48h eine *hiap-1* Expression. Ceramid-Behandlung führte erst nach 48h zu einer sehr geringen Expression und hatte auf die Induktion durch TNF α einen eher verminderten Einfluß. Die NF- κ B-vermittelte Induktion der *hiap-1* Expression durch Ceramid war also im Vergleich zur Induktion durch TNF α zu vernachlässigen.

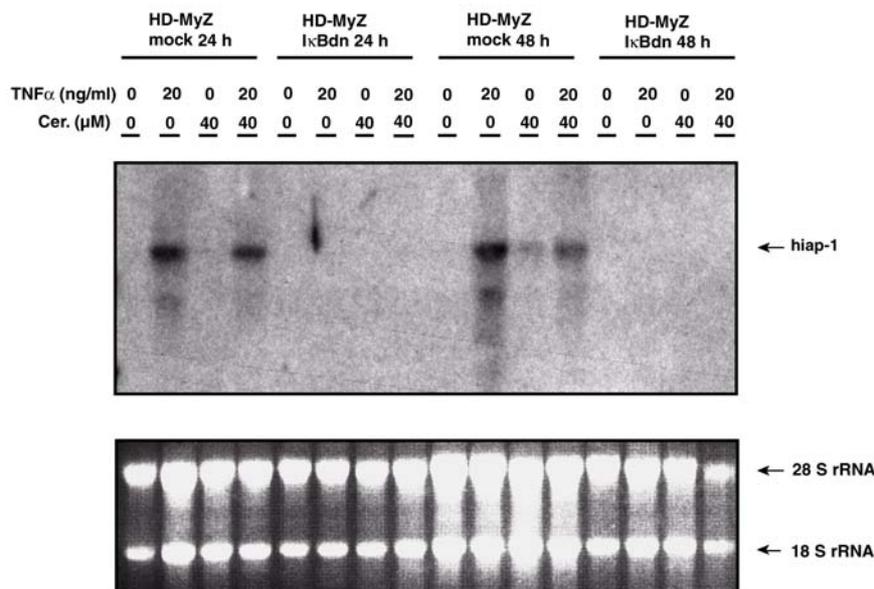


Abb. 41: Northern Blot zum Nachweis *hiap-1*-spezifischer Transkripte in HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn nach Behandlung mit C₂-Ceramid und TNF α . HD-MyZ-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit TNF α , C₂-Ceramid oder TNF α plus C₂-Ceramid inkubiert und anschließend geerntet. 15 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem 1.5% Agarose-Gel aufgetrennt und per Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Hybridisierung wurde ein 1.8 kb *hiap-1*-Fragment in Anwesenheit von ³²P-dCTP amplifiziert und eingesetzt. Die auf der Membran mit Ethidiumbromid gefärbte 28 S und 18 S rRNA diente als Ladungskontrolle.

4.8.2. Mitglieder der Bcl-2-Familie: Bcl-x_L und Bid

Wie für primäre Hippocampus-Neuronen gezeigt werden konnte (254), induziert TNF α über einen NF- κ B –abhängigen Mechanismus die Expression von *bcl-x_L*. Die Expression von *bcl-x_L* wurden deshalb in HD-MyZ-Zellen untersucht, die mit 20 ng/ml, 40 ng/ml oder 100 ng/ml TNF α für 48h behandelt wurden bzw. unbehandelt blieben. Abb. 41 zeigt den immunchemischen Nachweis von Bcl-x_L, dessen Expressionshöhe weder von der Konzentration von TNF α noch von der Blockierung des NF- κ B-Signalweg in HD-MyZ I κ Bdn abhängig war. Auch für Bcl-2 gab es Hinweise auf eine NF- κ B-abhängige Expression (255). Wie bereits in Abschnitt 4.3. erwähnt, blieb die Expression von Bcl-2, genauso wie die Expression von Bax unbeeinflusst von der Anwesenheit von TNF α . Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn.

Für Bid zeigte sich ebenfalls keine Abhängigkeit von der TNF α -Konzentration, sowohl hinsichtlich des Expressionsniveaus als auch hinsichtlich einer TNF α -induzierten Spaltung von Bid (Abb. 42). Für die Sensitivierung durch TNF α spielt weder die Expression von Bid eine verstärkende Rolle, noch hat Bcl-x_L einen entgegengesetzten Einfluß auf die Apoptoseverstärkung.

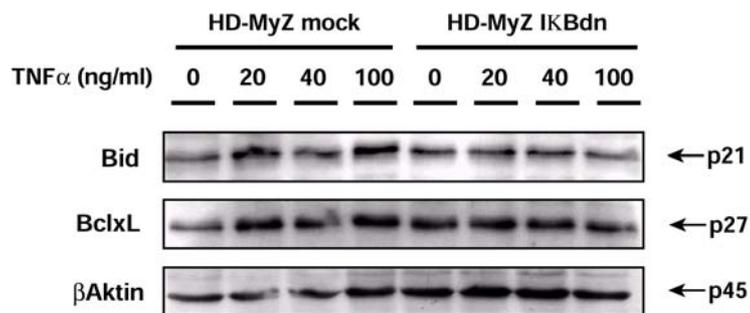


Abb. 42: Immunchemischer Nachweis von Bid und Bcl-x_L in HD-MyZ nach Behandlung mit TNF α . HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn wurden mit 20 ng/ml, 40 ng/ml oder 100 ng/ml TNF α für 48h behandelt. 50 μ g Gesamtzelleextrakt wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot auf Expression von Bcl-x_L und Bid untersucht. Als Ladungskontrolle diente β Aktin.