

## 6. Zusammenfassung

Apoptose stellt den zentralen Mechanismus des Zelltodes von malignen Zellen bei der Zytostatikatherapie dar. Das Verständnis der molekularen Abläufe der Zytostatika-induzierten Apoptose hat im Hinblick auf häufig auftretende Resistenzen von Tumorzellen gegenüber Zytostatika eine besondere Bedeutung. Es ist außerdem für die Therapie von Neoplasien von Interesse, Möglichkeiten zu untersuchen, die dieser Resistenz entgegenwirken und Tumorzellen wieder empfindlich werden lassen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß  $\text{TNF}\alpha$  maligne, hämatologische Zellen für Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose sensitiviert. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand dabei der molekulare Mechanismus der Sensitivierung durch  $\text{TNF}\alpha$ .

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der Sensitivierung von Zytostatika-induzierten Zelltod aufzuklären, wurde die gut charakterisierte Hodgkin-Zelllinie HD-MyZ auf die Beteiligung der bekannten  $\text{TNF}\alpha$ -regulierten Signalwege an der Sensitivierung untersucht. Ungeachtet der vollständigen Resistenz von HD-MyZ gegenüber  $\text{TNF}\alpha$ , führte die Vorbehandlung der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Verstärkung der Etoposid-, Epirubicin und  $\text{C}_2$ -Ceramid-induzierten Apoptose. Die Expression eines N-terminal verkürzten, dominant-negativen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ ) führte in HD-MyZ  $\text{I}\kappa\text{Bdn}$  zur Blockierung des Signalweges zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und verhinderte die Expression von *hiap-1*, eines anti-apoptotischen Zielgens von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . HD-MyZ  $\text{I}\kappa\text{Bdn}$  zeigten im Vergleich zu den Kontroll-zellen (HD-MyZ mock) eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Etoposid und zellpermeablem  $\text{C}_2$ -Ceramid, aber nicht gegenüber Epirubicin. Die Blockierung des  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweges hatte jedoch keinen Einfluß auf den sensitivierenden Effekt von  $\text{TNF}\alpha$ .

Die Verstärkung der Etoposid-, Epirubicin- und Ceramid-induzierten Apoptose durch  $\text{TNF}\alpha$  ging mit einer vermehrten Aktivierung von Caspase-3 einher. Erstaunlicherweise unterlag die Sensitivierung von HD-MyZ durch  $\text{TNF}\alpha$  aber einem Caspase-8-unabhängigen Mechanismus. Hierfür sprach die fehlende Aktivierung von Caspase-8; obwohl Caspase-8 sich in einem zellfreien *in-vitro* System als prinzipiell aktivierbar erwies. Auch die Blockierung der Caspase-8-Aktivität in Anwesenheit des Caspase-8-spezifischen Inhibitors Z-IETD-fmk verhinderte die Sensitivierung der Zellen durch  $\text{TNF}\alpha$  nicht. Es kam außerdem zu keiner Spaltung von Bid unter sensitivierenden Bedingungen. Diese funktionellen Experimente schloßen eine Beteiligung von Rezeptor-vermittelten Signalwegen und von verbindenden Signalwegen zwischen Rezeptor- und mitochondrialen Apoptosewegen aus.

Der Mechanismus der Sensitivierung durch  $\text{TNF}\alpha$  ging vielmehr mit einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges einher. Der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien sowie die Aktivierung der

Caspase-9 gingen der Apoptose in HD-MyZ zeitlich voraus und wurden durch  $\text{TNF}\alpha$  verstärkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch der Ceramid-Signalweg nicht für die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptoseverstärkung verantwortlich ist.

Der sensitivierende Effekt von  $\text{TNF}\alpha$  beschränkte sich nicht auf die Hodgkin-Linie HD-MyZ, sondern konnte auch für die Zytostatika-induzierte Apoptose diverser chronisch myeloischer und akuter myeloischer Leukämie-Linien, sowie für eine B-Zell-Lymphom-Linie nachgewiesen werden.  $\text{TNF}\alpha$  könnte somit möglicherweise als Adjuvanz bei der Zytostatikatherapie von malignen, hämatologischen Erkrankungen hilfreich sein und außerdem neue Ansätze für das Design therapeutischer Substanzen liefern.