

5. Diskussion

Die Rekrutierung des $\text{TNF}\alpha$ -Signalweges über die beiden TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, kann einerseits zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-2, -8 und -10 und darüber zur Induktion von Apoptose führen (96). Andererseits kann die Signalgebung über die Adaptermoleküle TRAF, RIP und CLAP und über die Kinasen NIK und IKK die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B einleiten (155). Über die transkriptionelle Induktion von anti-apoptotischen Genen durch NF- κ B vermittelt $\text{TNF}\alpha$ Überlebenssignale in der Zelle. Das Überwiegen dieser Überlebenssignale wird in vielen Zellsystemen daran erkennbar, daß erst Bedingungen wie die Überexpression von p53, die Behandlung mit Interferon- γ oder die Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid (CHX) die Zellen empfindlich für die Apoptoseinduktion durch $\text{TNF}\alpha$ werden läßt (256-259). Dagegen konnte bisher nur für wenige Situationen gezeigt werden, daß $\text{TNF}\alpha$ selbst einen sensitivierenden Effekt auf Zellen ausübt. Kimura et al. zeigten, daß die Bestrahlungs-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen durch $\text{TNF}\alpha$ verstärkt wird (260).

In dieser Arbeit sollten die $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Signalwege, die einerseits zur Apoptose-Induktion führen und andererseits der Apoptose durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B entgegenwirken, diskriminiert werden. Es sollte außerdem geklärt werden, welchen Einfluß die durch NF- κ B-vermittelten Überlebenssignale auf die Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose haben. Aufgrund der gezeigten, sensitivierenden Funktion von $\text{TNF}\alpha$ bei der Bestrahlungs-induzierten Apoptose stand an zentraler Stelle der Arbeit die Frage, ob $\text{TNF}\alpha$ auch beim Zytostatika- und Ceramid-induzierten Zelltod als sensitivierende Substanz wirken kann. Dieser Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose wurde an verschiedenen Zelllinien hämatologischen Ursprungs bestätigt. Von besonderem Interesse war daher der Mechanismus der Sensitivierung. Hierzu wurden eine Reihe zellbiologischer Untersuchungen zur Aktivierung von Rezeptor-vermittelter und mitochondrialer Apoptosewege angestellt.

Für diese Untersuchungen standen stabile Transfektanten der Hodgkin-Zelllinie HD-MyZ zur Verfügung. Diese wurden entweder mit einem Kontrollkonstrukt (Vektor) oder mit einem deletierten, dominant-negativen $I\kappa B\alpha$ -Gen ($I\kappa B\alpha$ dn) transfiziert. (212). Dem am N-Terminus verkürzten $I\kappa B\alpha$ fehlen die Aminosäuren Serin-32 und Serin-36. Die dadurch unterbleibende, spezifische Phosphorylierung dieser Serine durch die $I\kappa B\alpha$ -Kinase (IKK) verhindert die Ubiquitinierung und die Degradation des Proteins durch das 26S Proteasom. $I\kappa B\alpha$ dn bleibt dadurch auch in Anwesenheit NF- κ B-aktivierender Signale an den Transkriptionsfaktor gebunden und verhindert so die Translokation zum Nukleus und die Bindung an die DNA. Die fehlende DNA-Bindung von NF- κ B in den $I\kappa B\alpha$ dn-Transfektanten wurde im EMSA

(*electro mobility shift assay*) nachgewiesen (212). Im Western Blot konnte der immunchemische Nachweis des auf 28 kDa verkürzten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ in den HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ -Transfektanten erbracht werden. Da die endogene Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ erhalten bleibt, exprimieren sowohl die Kontrollklone HD-MyZ mock, als auch die HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ -Transfektanten das Wildtyp-Protein $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit einer Größe von 37 kDa.

5.1. Einfluß der NF- κ B-Blockierung durch Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ auf die TNF α -, Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose von HD-MyZ

Zu den zahlreichen Zielgenen von NF- κ B zählt auch *hiap-1* (*human inhibitor of apoptosis protein*) (193). HIAP-1 hemmt Apoptose durch Blockierung der Prozessierung und Aktivierung von Caspase-3, -7 und -9 (185, 186). Die Expression des dominant-negativen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ vermindert in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ die Induktion der *hiap-1*-Expression durch TNF α auf transkriptioneller Ebene und führt zu keinem immunchemisch detektierbaren Signal von HIAP-1 im Vergleich zu den Kontrollklonen. Im Hinblick auf die Empfindlichkeit der HD-MyZ-Zellen gegenüber TNF α hat die Blockierung des NF- κ B-Signalweges durch die Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ keinen Einfluß. Die Behandlung von HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ mit TNF α bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml führt auch nach einem Zeitraum von 4 Tagen in beiden Linien zu keiner Apoptose. Das steht im Gegensatz zur Sensitivierung von Hepatozyten für TNF α -induzierte Apoptose durch die adenovirale Transfektion mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (261). Auch die Blockierung von NF- κ B durch Bindung des Interferon- γ induzierbaren Proteins, p202, verstärkt in Mammakarzinom-Zellen die TNF α -induzierte Apoptose (262). Im Gegensatz zu diesen Zellsystemen ist die Resistenz von HD-MyZ gegenüber TNF α nicht oder nur teilweise durch die NF- κ B-vermittelten Überlebenssignale begründet. Hier müssen zusätzliche Defekte im Rezeptor-vermittelten Signalweg vorliegen. Auch die fehlende Empfindlichkeit für CD95/Fas-induzierte Apoptose in HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ nach 72h ließ einen solchen Defekt vermuten.

Die Behandlung der Zellen mit Etoposid in einer Konzentration von 0.1 – 1 $\mu\text{g/ml}$ und mit C_2 -Ceramid in einer Konzentration von 20 – 80 μM ließ allerdings eine deutliche Verstärkung der Apoptose durch die Blockierung des NF- κ B-Signalweges in HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$ im Vergleich zu HD-MyZ mock erkennen. Diese Sensitivierung in den NF- κ B-blockierten Zellen insbesondere für den Etoposid-induzierten Zelltod entsprach damit der zu erwartenden anti-apoptotischen Funktion des Transkriptionsfaktors, die durch eine Vielzahl von Untersuchungen belegt ist (263-265). $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ -exprimierende embryonale Fibroblasten (HT1080) zeigen sich empfindlicher gegenüber Daunorubicin, TNF α , und Etoposid (209, 266). Erst neuere Arbeiten lassen eine Beteiligung von NF- κ B auch an pro-apoptotischen

Signalen erkennen. Der CD95/Fas-Rezeptor und der CD95/Fas-Ligand, deren Gene in T-Zellen unter NF- κ B-Kontrolle stehen, könnten hierfür verantwortlich sein (267, 268). In Zelllinien, die aus Leberzellkarzinomen generiert wurden, hat der adenovirale Transfer von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ einen verstärkenden Effekt auf die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose, er vermindert aber die Empfindlichkeit gegenüber Adriamycin (269). Eine ähnliche, pro-apoptotische Rolle wird NF- κ B bei der Behandlung von Zelllinien solider Tumore mit Paclitaxel oder der Behandlung von B-Lymphozyten durch Cytokinentzug zugeschrieben (270, 271). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß für die p53-vermittelte Apoptose z.B. nach Sensierung von DNA-Schäden, die Aktivierung von NF- κ B notwendig ist. In p53-Wildtyp-Tumoren könnte die Blockierung von NF- κ B damit für ein schlechteres Ansprechen der Therapie sorgen (272).

Die Blockierung des NF- κ B-Signalweges hat in Epirubicin-behandelten HD-MyZ-Zellen zwar keine pro-apoptotische Wirkung, sie hat aber anders als auf die Behandlung mit Etoposid oder C_2 -Ceramid auch keinen Apoptose-verstärkenden Einfluß. Diese Beobachtungen wurden auch für $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ und TRAF2dn in transgenen Mäusen gemacht, die für Daunorubicin nicht empfindlicher sind als Kontrollmäuse (273). Als Interpretation dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, daß die Zielgene von NF- κ B für Proteine codieren, die im Hinblick auf verschiedene Apoptose-Stimuli eine unterschiedliche anti-apoptotische Effizienz besitzen. Diese Proteine zeichnen sich als potente Apoptose-Hemmer gegenüber Etoposid und Ceramid aus, haben aber keinen Effekt auf die Epirubicin-induzierte Apoptose.

Aus der Betrachtung des zeitlichen Ablaufs des Epirubicin-induzierten Zelltodes ergibt sich noch eine weitere Erklärung für die Unterschiede zwischen Etoposid und Ceramid sowie Epirubicin, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen. Zelltod wurde in dieser Arbeit einerseits durch die modifizierte Zellzyklusanalyse und andererseits durch die Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand detektiert. Dies ließ den Vergleich zwischen Apoptose-spezifischen Ereignissen wie der DNA-Fragmentierung und nekrotischen Ereignissen zu, die anhand der Freisetzung der LDH aus dem Zytoplasma zu detektieren sind und eine Aussage über die Membranschädigung einer Zelle machen. Unter *in-vitro*-Bedingungen können apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) nicht durch Makrophagen phagozytiert werden. Wenn diese perforieren, kommt es in einer späten Phase der Apoptose ebenfalls zur Freisetzung von LDH im Zuge einer sekundären Nekrose. Mit der Bestimmung der LDH-Aktivität läßt sich also unter *in-vitro* Bedingungen die Höhe von Nekrose und von später, mit sekundärer Nekrose einhergehender Apoptose nachweisen. Bei der Behandlung mit C_2 -Ceramid für 48h zeigten sich kaum Unterschiede zwischen der Höhe der Apoptose und der Höhe der LDH-Aktivität. Nach 72 h übersteigt die Schädigung der Membran durch Epirubicin, die anhand der LDH-Aktivität bestimmt wurde, bereits die Höhe der DNA-Fragmentierung, wohingegen nach 72h-Behandlung mit Etoposid der Anteil der Zellen mit geschädigter Membran wesentlich kleiner ist, als der Anteil der Zellen mit DNA-

Fragmentierung. Epirubicin-induzierte Apoptose verläuft also nach einem anderen zeitlichen Schema als die Etoposid-induzierte Apoptose und umfasst einen höheren Anteil an Nekrose oder sekundärer Nekrose. Möglicherweise erklärt sich daraus, warum die Blockierung des NF- κ B-Signalweges nicht zu einer Verstärkung der Empfindlichkeit führt, da bisher kein Einfluß von NF- κ B auf Nekrosemechanismen nachgewiesen werden konnte.

5.2. TNF α sensitiviert HD-MyZ für Etoposid-, Epirubicin- und Ceramid-induzierte Apoptose unabhängig von NF- κ B

Ungeachtet der Tatsache, daß sich HD-MyZ resistent gegenüber TNF α verhalten, führt die Vorbehandlung der Zellen mit TNF α zu einer erhöhten Empfindlichkeit für Etoposid-, Epirubicin- und Ceramid-induzierte Apoptose. Dieser sensitivierende Effekt von TNF α ist sowohl in HD-MyZ mock als auch in HD-MyZ I κ Bdn zu beobachten, was verdeutlicht, daß die Sensitivierung einem NF- κ B-unabhängigen Mechanismus unterliegt. Die Sensitivierung von Zellen durch TNF α wurde bisher nur in wenigen Arbeiten beschrieben. Bei der Bestrahlung der Prostatakarzinom-Zelllinie LnCaP mit γ -Strahlen resultierte die Vorbehandlung mit TNF α in einem synergistischen, apoptotischen Effekt nach 72h. Die Sensitivierung trat auch in diesem System trotz einer Aktivierung von NF- κ B durch TNF α auf (260). Auch die Rekrutierung des CD95/Fas-Rezeptors durch einen agonistischen CD95/Fas-Antikörper sensitiviert LnCaP-Zellen für Bestrahlung (274). Die Kombinationsbehandlung von TNF α und Bestrahlung von Gliomen in Mäusen führt zu einem verstärkten Antitumoreffekt (275). TNF α sensitiviert ebenfalls HIV-infizierte, aber nicht uninfizierte HUT-78 T-Zellen für Hyperthermie- und Bestrahlungsbehandlung (276). TNF α und Interferon- γ haben jeweils alleine keinen Einfluß auf die Apoptose von murinen Leberzellen, in Kombination induzieren sie allerdings über einen synergistischen Mechanismus Apoptose (277). TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) rekrutiert über die Bindung an die Rezeptoren DR4 und DR5 einen ähnlichen Signalweg wie TNF α und kann hierüber Apoptose induzieren (278). TRAIL verstärkt ebenfalls die Doxorubicin- und 5-Fluorouracil-induzierte Apoptose von Mammakarzinom- Zelllinien (279). In Adriamycin-resistenten Blasenkarzinom-Zellen kann diese Resistenz durch TRAIL teilweise gebrochen werden (280).

5.3. Einfluß von HIAP-1, HIAP-2 und Bcl-2 auf die Sensitivierung von HD-MyZ durch TNF α

Die Blockierung von Überlebenssignalen durch die I κ B α dn-vermittelte Hemmung der NF- κ B-Aktivität resultierte in HD-MyZ I κ Bdn in einer Verstärkung der Etoposid- und Ceramid-induzierten Apoptose. Ein gegensätzlicher Effekt, also eine Induktion der NF- κ B-Aktivität durch TNF α während oder vor der Behandlung mit Etoposid und C₂-Ceramid hätte eine verminderte Apoptose in HD-MyZ mock und keinen Einfluß auf HD-MyZ I κ Bdn erwarten lassen. Entgegen dieser Erwartung zeigte sich allerdings, daß sich die Zytostatika- und Ceramid-induzierte Apoptose sowohl in HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn durch die Vorbehandlung mit TNF α verstärken läßt.

Obwohl eine TNF α -induzierte Expression von *hiap-1* in Abhängigkeit von NF- κ B im Northern Blot auf transkriptioneller Ebene nachvollzogen werden konnte, war kein hemmender Einfluß von TNF α auf die Zytostatika- oder Ceramid-induzierte Apoptose in Anwesenheit von TNF α festzustellen. Damit im Einklang war nur ein schwaches immunchemisches Signal nach Behandlung von HD-MyZ mock mit TNF α für HIAP-1 im Western Blot zu detektieren. Die gleichzeitige Etoposid-Behandlung verstärkte dieses Signal nicht. Möglicherweise spielt hier die Degradation der IAPs durch das Proteasom eine Rolle, die für die Behandlung mit Etoposid und Dexamethason gezeigt werden konnte (195). HIAP-1 hat also im Kontext der Sensitivierung für die Hemmung der Etoposid-, Epirubicin- oder C₂-Ceramid-induzierten Apoptose in diesem Zellsystem keine Bedeutung, entweder, weil eine pro-apoptotische Wirkung von TNF α die Hemmung überlagert oder weil die intrazelluläre Proteinmenge gering ist. Eine Arbeit von Wang et al. zeigte, daß für die effiziente Blockierung von Etoposid-induzierter Apoptose die simultane Expression von HIAP-1, HIAP-2, TRAF1 und TRAF2 notwendig ist, und HIAP-1 alleine kaum Einfluß hat (205). Es wurde daraufhin die Expression weiterer putativer NF- κ B-Zielgene in HD-MyZ untersucht. In unterschiedlichen Zellsystemen konnte eine NF- κ B-abhängige Expression von *xiap*, *hiap-1*, *hiap-2*, *bcl-2*, *bclx_L*, durch TNF α nachgewiesen werden (193, 253, 254). Für HD-MyZ konnte außer für die Expression von *hiap-1* wie bereits erwähnt, für die Expression von *hiap-2*, *bcl-2* oder *bclx_L* keine Abhängigkeit von NF- κ B detektiert werden. Die Expression von *hiap-2* zeigte weder auf basalem Niveau, unter nicht-induzierenden Bedingungen in der RT-PCR noch nach Induktion mit TNF α im Western Blot eine Abhängigkeit von NF- κ B. Ebenso waren für Bcl-2 und Bclx_L im Westernblot nach Behandlung mit TNF α keine Expressionsunterschiede zwischen HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn bzw. zwischen TNF α -Behandlung und Kontrollen zu erkennen. Auch für Bcl-2 und Bclx_L war also keine NF- κ B-Abhängigkeit in HD-MyZ nachzuweisen. Die NF- κ B-unabhängige Expression von *hiap-2*, *bcl-2*, *bclx_L* kann einem

pro-apoptischen Effekt von $\text{TNF}\alpha$ nicht entgegen wirken; sie steht damit aber auch nicht als Erklärung für die Verstärkung der Apoptose durch die Transfektion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\text{dn}$ zur Verfügung. Der immunchemische Nachweis von XIAP zeigte ebenfalls keine NF- κ B-Abhängigkeit nach Induktion mit $\text{TNF}\alpha$ oder Etoposid, Epirubicin oder C_2 -Ceramid. Allerdings fiel auf, daß nach Behandlung mit Epirubicin oder C_2 -Ceramid in beiden HD-MyZ-Linien neben dem 57 kDa großen XIAP ein 29 kDa-Fragment auftritt. Diese Spaltung von XIAP wurde bereits bei der CD95/Fas- oder Zytostatika-Behandlung bei T-Zellen beobachtet. Sie erfolgt hier zwischen BIR2 (*baculoviral inhibitory repeat*) und BIR3 und resultiert in 2 Fragmenten, die einerseits BIR1 und BIR2 und andererseits BIR3 und die Ring-Domäne umfassen. Obwohl diese beiden Fragmente, BIR1/2 und BIR3/Ring, ihre Caspase-hemmende Wirkung gegenüber Caspase-3 und -7 bzw. gegenüber Caspase-9 unter *in vitro*-Bedingungen behalten, wird die CD95/Fas-induzierte Apoptose bei Überexpression von BIR3/Ring nicht gehemmt, sondern gering erhöht. Die Überexpression von BIR1/2 allerdings hemmt die Bax-vermittelte-Apoptose im selben Maße wie das vollständige XIAP-Protein. Diese bisher widersprüchlichen Befunde zeigen, daß die Bedeutung der Spaltung von XIAP noch unklar ist (281, 282). Es konnte allerdings gezeigt werden, daß für die Fragmentierung von XIAP Caspasen verantwortlich sind (282). Da in HD-MyZ das immunchemische Signal des 29 kDa-Fragmentes in den Behandlungsansätzen zunimmt, die eine stärkere Caspase-Aktivierung aufweisen, kann auch hier eine Caspase-abhängige Spaltung von XIAP vermutet werden.

A1/Bfl-1, A20, TRAF1 und TRAF2 zählen ebenfalls zu den anti-apoptischen Proteinen, deren Expression unter Kontrolle von NF- κ B steht. Diese Proteine sind deshalb als mögliche Kandidaten zu betrachten, die für die Vermittlung des anti-apoptischen Effektes von NF- κ B in HD-MyZ in Frage kommen. A1/Bfl1 hemmt als Mitglied der Bcl-2-Familie die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und den Abfall des mitochondrialen Membranpotentials nach Induktion von Apoptose (255, 283). IEX-1L wird in Abhängigkeit von NF- κ B in Jurkat-Zellen exprimiert und hemmt in diesem Zellsystem CD95/Fas- und $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose. Inwieweit IEX-1L in anderen Zellsystemen exprimiert wird, ist allerdings umstritten (284, 285). Neben den Adaptermolekülen des $\text{TNF}\alpha$ -Signalweges TRAF1 und TRAF2, steht auch A20 unter Kontrolle von NF- κ B (205, 286). A20 wirkt rückwirkend hemmend im Sinne eines *feed back loops* auf die Aktivierung von NF- κ B und die Induktion von Apoptose durch $\text{TNF}\alpha$ (174). Die Bindung von A20 an TRAF-Proteine reguliert möglicherweise die apoptotische Schwelle einer Zelle, weil sie die Verfügbarkeit der TRAF-Proteine für den anti-apoptischen Schenkel des $\text{TNF}\alpha$ -Signalweges beeinflusst (287). A1/Bfl-1, A20, TRAF1 und TRAF2 sind also wichtige Mediatoren der proliferativen Funktion von NF- κ B; inwieweit sie die Apoptose in HD-MyZ beeinflussen, ist jedoch nicht bekannt, da ihre Expression in diesen Zellen bisher nicht untersucht wurde.

5.4. Aktivierung von Caspasen in HD-MyZ nach Behandlung mit TNF α und Etoposid, Epirubicin oder Ceramid

Die Aktivierung der Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen, der Caspasen, stellt für die Induktion der Apoptose in der Zelle ein kritisches Ereignis dar. Verschiedene Signalwege führen zur Aktivierung der Caspasen, was direkt oder indirekt mit der Ausprägung der Apoptose-typischen, morphologischen Veränderungen der Zelle, wie Fragmentierung von DNA und Kern, Degradation des Zytoskelettes und Blockierung von DNA-Reparaturmechanismen, einhergeht (13). Um den Mechanismus der Sensitivierung von HD-MyZ durch TNF α näher zu beschreiben, wurde die Beteiligung der verschiedenen Signalwege der Apoptose zunächst anhand der dafür charakteristischen Caspase-Kaskade untersucht. Neben Caspase-6 und -7 kann Caspase-3 als eine der wichtigsten Effektor-Caspasen angesehen werden, da ihre Aktivierung nach Rekrutierung unterschiedlicher Signalwege und damit durch diverse Apoptose-induzierende Signale ausgelöst wird (41). Bei der Behandlung von HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn mit Etoposid, Epirubicin und Ceramid war eine Aktivierung von Caspase-3 zu beobachten, sie trat nicht auf nach Behandlung mit TNF α alleine oder in unbehandelten Zellen. Die Detektion der Caspase-3-Aktivierung erfolgte im Western Blot durch Nachweis der aktiven 17 kDa großen Untereinheit. Wie auch für die Induktion der Apoptose zeigte sich auch für die Caspase-Aktivierung eine Konzentrationsabhängigkeit. Der immunchemische Nachweis der Caspase-3-Aktivierung wurde nach 72h Zytostatika- und nach 48h Ceramid-Behandlung erhoben. Der Nachweis der enzymatischen Aktivität anhand der photometrisch detektierbaren Spaltung eines Caspase-3-spezifischen Substrates, Ac-DEVD-pNA, bestätigte diese Ergebnisse bereits für einen früheren Zeitpunkt. Caspase-3 ist also in HD-MyZ an der Etoposid-, Epirubicin- und Ceramid-induzierten Apoptose beteiligt, was in Übereinstimmung mit einer Reihe von Arbeiten in anderen Zellsystemen steht (33, 288-291).

Die Verstärkung der Apoptose durch TNF α geht mit einer vermehrten Caspase-3-Aktivierung einher. Der Sensitivierungsmechanismus von TNF α erfolgt also über Apoptosewege, die in der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 resultieren und steht im Kontrast zur sensitivierenden Wirkung von TNF α auf Bestrahlungs-induzierten Zelltod in Prostatakarzinom-Zellen, die die Aktivierung von Serin-spezifischen Proteasen einschließt (260).

Unklar war allerdings, wie TNF α diesen Caspase-3-abhängigen Mechanismus reguliert. Durch Bestimmung der Aktivierung der Initiator-Caspasen des Rezeptor-vermittelten Apoptoseweges sollte geklärt werden, welche Signalwege für die Sensitivierung durch TNF α verantwortlich sind.

Die Aktivierung der Initiator-Caspasen-2 und -8 steht im engen Zusammenhang mit der Rezeptor-vermittelten Induktion der Apoptose. Caspase-2 kann über die Adaptermoleküle

RIP und RAIDD in die Rezeptor-vermittelten Signalwege eingebunden sein und kann durch Ligation von anti-CD95/Fas und $\text{TNF}\alpha$ an deren Todesrezeptoren rekrutiert und als direkte Folge aktiviert werden (292). Die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 erfolgt durch die Rekrutierung durch FADD nach Interaktion von $\text{TNF}\alpha$ und $\alpha\text{CD95/Fas}$ mit ihren Rezeptoren. Man nimmt an, daß dadurch mehrere Caspase-8 Zymogene in räumliche Nähe gebracht werden, die sich dann gegenseitig und ohne Beteiligung anderer Caspasen aktivieren können (96, 293). Untersuchungen von embryonalen Fibroblasten aus Caspase-8-defizienten Mäusen demonstrierten, daß Caspase-8 für $\text{TNF}\alpha$ -, CD95/Fas- oder TRAIL-induzierten Zelltod notwendig ist, daß Caspase-8 jedoch für die Apoptose, die durch Serumentzug, Ceramid oder Zytostatika induziert wird, keine Bedeutung hat (26).

Die Aktivierung von Caspase-2 wurde wie auch für Caspase-3 in HD-MyZ im Western Blot durch Detektion der aktiven, großen Untereinheit untersucht. Etoposid und Epirubicin induzierten eine Prozessierung der Caspase-2, die bei gleichzeitiger Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ verstärkt wurde. Diese Verstärkung der Prozessierung durch $\text{TNF}\alpha$ tritt nach C_2 -Ceramid-Behandlung nicht auf, vielmehr konnten in diesem Fall keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten HD-MyZ-Zellen festgestellt werden. Caspase-2-Prozessierung wurde zwar in HD-MyZ durch Zytostatika eingeleitet, für die Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ ist Caspase-2 aber nicht notwendig.

Weder im Western Blot noch im enzymatischen Nachweis der Spaltung des Caspase-8-spezifischen Substrates, Ac-IETD-pNA, war nach Behandlung mit Etoposid oder C_2 -Ceramid eine Caspase-8-Aktivität zu detektieren. Es traten dabei keine Unterschiede zwischen den NF- κ B-blockierten HD-MyZ I κ Bdn-Zellen und den Kontrollzellen HD-MyZ mock auf. Auch die Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ führte nicht zu einer Caspase-8-Aktivierung, weder alleine noch in Kombination mit Etoposid oder Ceramid. Nach Behandlung mit Epirubicin konnte ebenfalls kein aktives 18 kDa-Fragment nachgewiesen werden, allerdings war im Western Blot ein schwaches Signal für die Prozessierung der Caspase-8 anhand eines p43-Fragmentes zu erkennen, die mit einem sehr geringen Anstieg der enzymatischen Aktivität von Caspase-8 einherging. Die fehlende Aktivierung von Caspase-8 insbesondere nach Behandlung mit Etoposid und C_2 -Ceramid legten den ersten Verdacht für einen Caspase-8-unabhängigen Mechanismus der Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ nahe.

Aufgrund des Fehlens eines aktiven p18-Fragmentes der großen Untereinheit von Caspase-8 stellte sich die Frage, ob ein Defekt des Enzymes selbst oder anderer Beteiligter die Prozessierung von Caspase-8 verhinderte. Die Aktivierbarkeit von Caspase-8 wurde deshalb in einem zellfreien System mit Extrakten unbehandelter HD-MyZ mock- und HD-MyZ I κ Bdn-Zellen getestet. Die Zugabe von dATP und Cytochrom C induziert die Rekrutierung des „Apoptosoms“, eines hochmolekularen Komplexes aus Apaf-1, Caspase-9-Zymogen, dATP und Cytochrom C und nachfolgend die Prozessierung von Caspase-9 (39). Damit wird unter

zellfreien *in-vitro*-Bedingungen die mitochondriale Apoptoseinduktion simuliert, unter der Voraussetzung, daß Caspase-9 wiederum Effektor-Caspasen wie Caspase-3 oder Caspase-6 aktiviert und über diesen Weg letztlich Caspase-8 prozessiert und aktiviert wird (294). Die Aktivierbarkeit von Caspase-8 konnte durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität anhand der enzymatischen Spaltung des spezifischen Substrates, Ac-IETD-pNA, und der Detektion des p18-Fragmentes im Western Blot unter diesen *in-vitro*-Bedingungen nachgewiesen werden. Diese Experimente zeigten, daß sowohl HD-MyZ mock als auch HD-MyZ κ Bdn über ein funktionelles Enzym verfügen.

Die fehlende Caspase-8-Aktivierung nach Behandlung mit Etoposid und C₂-Ceramid gab einen starken Hinweis auf die Caspase-8-Unabhängigkeit der Sensitivierung durch TNF α . Diese Unabhängigkeit sollte insbesondere im Hinblick auf die Epirubicin-induzierte Apoptose weiter überprüft werden. Hierzu wurde ein zellpermeabler Caspase-8-Inhibitor, Z-IETD-fmk, verwendet, dessen Caspase-8-Spezifität in einer Konzentration von 20 μ M anhand der Hemmung der anti-CD95/Fas-induzierten Apoptose von Jurkat-Zellen verifiziert wurde. Die spezifische Blockierung der Caspase-8-Aktivierung resultierte in HD-MyZ mock in einer geringen Verminderung der Epirubicin-induzierten Apoptose in Abwesenheit und in Anwesenheit von TNF α . Der Apoptose-verstärkende Effekt von TNF α blieb auch in Gegenwart des Caspase-8-Inhibitors erhalten. Daraus kann zwar die Erkenntnis abgeleitet werden, daß die Epirubicin-induzierte Apoptose unter Beteiligung von Caspase-8 erfolgt; die Sensitivierung von HD-MyZ durch TNF α unterliegt aber dennoch einem Caspase-8-unabhängigen Mechanismus.

Der Signalweg zwischen Zytostatika-induzierter Zellschädigung und der Aktivierung von Caspasen wird gegenwärtig noch diskutiert. Für die Doxorubicin-induzierte Apoptose wurde eine Beteiligung der CD95L/FasL-vermittelten Assemblierung des DISCs (*death inducing signaling cascade*) aus CD95/Fas, FADD und Caspase-8 postuliert, was in der Aktivierung von Caspase-8 und nachfolgend von Caspase-3 resultiert (295). Wie wichtig die Aktivierung von Caspase-8 für die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber Zytostatika ist, zeigen Befunde an Neuroblastomen bei Kindern. Die durch Methylierung oder Deletion ausgelöste Defizienz von Caspase-8 bewirkt die Resistenz der Neuroblastomzellen gegenüber Doxorubicin (296). Die geringe oder fehlende Aktivität von Caspase-8 in HD-MyZ nach Behandlung könnte also im Einklang mit der geringen Empfindlichkeit für Etoposid, Epirubicin und auch für C₂-Ceramid besonders ohne Blockierung der NF- κ B-Aktivität und in Abwesenheit von TNF α stehen. Demgegenüber stehen Studien an embryonalen Fibroblasten von Caspase-8-defizienten Mäusen, die in ihrer Empfindlichkeit für Zytostatika nicht beeinträchtigt sind (26). Die Aktivierung von Caspase-8 scheint also nicht in allen Zellsystemen für Zytostatika-vermittelte Apoptose notwendig zu sein, wenngleich Zytostatika-induzierter Zelltod in vielen Fällen mit einer Aktivierung von Caspase-8 einhergeht (205, 297, 298). Eine Reihe von

Befunden läßt die Beteiligung des CD95L/CD95-Rezeptor-vermittelten Signalweges bei der Aktivierung von Caspase-8 nach Behandlung mit Zytostatika als unwahrscheinlich erscheinen. In Jurkat-Zellen bleibt die Daunorubicin, Doxorubicin und Etoposid induzierte Caspase-8-Aktivierung auch dann erhalten, wenn der Rezeptor-vermittelte Signalweg durch Überexpression von FLIP und FADD_{dn} blockiert wird (294, 298-300). *In-vitro*-Versuche mit zellfreien Extrakten, in denen die mitochondrial-vermittelte Aktivierung der Caspasen durch Zugabe von Cytochrom C und dATP simuliert wird, konnten wichtige Erkenntnisse zur Hierarchie der Caspase-Kaskade liefern. Apaf-1 aktiviert dabei Caspase-9, die wiederum Caspase-3 und Caspase-7 aktiviert. Caspase-3 kann dann die Aktivierung von Caspase-2 und Caspase-6 induzieren. Die Aktivierung von Caspase-6 ist wiederum die Voraussetzung für die Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-10 (41).

Die Unabhängigkeit der Sensitivierung von HD-MyZ durch TNF α von einer Caspase-8-Aktivierung muß im Hinblick auf den TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptoseinduktionsweg als überraschend bewertet werden (301). Das pro-apoptotische Signal, das von TNF α alleine ausgeht, löst in HD-MyZ mock und in HD-MyZ I κ B_{dn} keine Apoptose und keine Caspase-8-Aktivierung aus. In Kombination mit anderen Apoptose-induzierenden Substanzen wie Etoposid, Epirubicin oder C₂-Ceramid kann dieses Signal eine Verstärkung der Apoptose bewirken, aber auch hier ohne notwendigerweise Caspase-8 zu aktivieren. Die Sensitivierung, die TNF α in Prostatakarzinomzellen im Hinblick auf γ -Bestrahlung erzielt, unterliegt ebenfalls einem Caspase-8-unabhängigen Mechanismus, da die Blockierung von Caspase-8 keinen Einfluß auf die Apoptose von TNF α in Kombination mit Bestrahlung hat (260). Der zytotoxische Effekt von TNF α kann durch Blockierung des TNF α -Rezeptor-vermittelten Signalweges durch Expression eines dominant-negativen FADD wie auch durch Hemmung von Caspasen sogar verstärkt werden (302, 303). Das deutet daraufhin, daß TNF α neben der Rezeptor-vermittelten Induktion von Apoptose noch andere Wege zur Verfügung stehen, die auch für die Sensitivierung durch TNF α eine Rolle spielen könnten.

5.5. Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges in HD-MyZ bei der Zytostatika- und C₂-Ceramid-induzierten Apoptose

Mitochondrien spielen für die Induktion von Apoptose durch Zytostatika- und C₂-Ceramid eine zentrale Rolle (70). Der genaue Mechanismus der Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien ist jedoch noch unklar. Ob pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie direkt Kanäle in der Mitochondrienmembran bilden oder ob Kanäle wie VDAC (*voltage dependent anion channel*) die Freisetzung von Cytochrom C vermitteln, wird noch diskutiert (59). Fraglich ist auch, ob der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials als Folge der Cytochrom C Freisetzung auftritt, oder ob er vielmehr eine Voraussetzung dafür darstellt.

Ungeachtet des zeitlichen Ablaufes zeigen Ereignisse wie der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$, die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Caspase-9 die Beteiligung des mitochondrialen Signalweges an der Induktion der Apoptose an. Anhand dieser Parameter wurde die Beteiligung der Mitochondrien an der Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ in HD-MyZ untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der Apoptoseverstärkende Effekt von $\text{TNF}\alpha$ mit einem vermehrten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$, einer vermehrten Freisetzung von Cytochrom C und einer verstärkten Aktivierung der Caspase-9 einhergeht. Diese Befunde wurden nach Behandlung mit Zytostatika nach 40h und mit C_2 -Ceramid nach 22h erhoben. Zu diesen Zeitpunkten war die zu detektierende, Etoposid-, Epirubicin- und C_2 -Ceramid-induzierte Apoptose in beiden Linien, HD-MyZ mock und HD-MyZ $\text{I}\kappa\text{Bdn}$, auch in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ gering (<15%). Es handelte sich also um mitochondriale Ereignisse, die in einer frühen Phase der Apoptoseinduktion stattfinden und damit als Voraussetzung für den Zelltod zu sehen sind. Damit konnte gezeigt werden, daß $\text{TNF}\alpha$ HD-MyZ-Zellen nicht durch Rekrutierung des Rezeptor-vermittelten Signalweges, sondern durch Aktivierung der Mitochondrien für Etoposid-, Epirubicin- und C_2 -Ceramid-induzierte Apoptose sensitiviert.

Die Beteiligung der Mitochondrien an der Etoposid-induzierten Apoptose wurde auch in anderen Zellsystemen beschrieben. Etoposid führt in Gliomazellen aus Ratten zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und zur Aktivierung der Caspase-9 (304). In der akuten myeloischen Leukämie-Linie HL60 ist die Behandlung mit Etoposid und anderen Zytostatika wie Taxol ebenfalls mit der Freisetzung von Cytochrom C und dem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ assoziiert (305). Die beobachtete Aktivierung von Caspase-8 wird als Amplifikationsschleife angesehen. Caspase-8 wird als Folge der mitochondrialen Aktivierung über die Prozessierung von Caspase-9 und Caspase-3 aktiviert. Caspase-8-Aktivierung ist dabei für den Zytostatika-induzierten Zelltod nicht notwendig, kann Apoptose aber in Abhängigkeit vom Zelltyp verstärken. Diese Amplifikationsschleife wird an der Beobachtung deutlich, daß die Expression einer dominant-negativen Caspase-9 sowohl die Aktivierung von Caspase-8 als auch Apoptose blockiert (305). Ein weiteres Indiz für diese Amplifikationsschleife stellt die Blockierung der Taxol- und Epirubicin-vermittelten Caspase-8-Prozessierung durch den Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-fmk dar (294). Für den Mechanismus der Mitochondrien-vermittelten Apoptose durch Zytostatika ist bisher wenig bekannt. Für Jurkat-Zellen und isolierte Leber-Mitochondrien wurden zwei Möglichkeiten der Apoptose-Induktion vorgeschlagen. Niedrige Etoposidkonzentrationen schädigen den Zellkern und führen zur Freisetzung von Faktoren, die wiederum die Mitochondrien schädigen. Hohe Etoposidkonzentrationen greifen die Mitochondrien direkt an und induzieren die Freisetzung von Cytochrom C (306). Andere Arbeiten konnten die Freisetzung von geringen Mengen von Cytochrom C aus den

Mitochondrien nach Behandlung mit Etoposid oder Bestrahlung als frühes Ereignis beschreiben, das zur Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 führt. In einer späteren Phase kommt es nach Caspase-3-Aktivierung zu einer Amplifikation der Apoptose und zur vermehrten Freisetzung von Cytochrom C, die dann mit dem Abfall des Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) einhergeht (307). Für Epirubicin konnten Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, daß die anhand von DNA-Fragmentierung detektierte Apoptose über einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials induziert wird. Das erfolgt in Burkitt Lymphom-Zellen auch nach Ausschaltung der Rezeptor-vermittelten Apoptose bei Überexpression eines dominant-negativen FADD (294). Auch zellpermeables C_2 -Ceramid induziert in Neuroblastom-Zellen die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Caspase-9 (291).

Die Sensitivierung der HD-MyZ-Zellen durch $TNF\alpha$ verstärkt die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges, der durch Etoposid, Epirubicin und C_2 -Ceramid induziert wird. Eine Rezeptor-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-8 ist dabei nicht notwendig. Dies steht im Gegensatz zu einer Vielzahl von Arbeiten, die $TNF\alpha$ -induzierte Apoptose als DISC (*death inducing signaling cascade*)- oder Rezeptor-vermittelte Apoptose unter Beteiligung von Caspase-8 beschrieben haben (26, 103, 115). Allerdings konnte auch für einige Zellsysteme, wie z.B. die Mäusefibroblastenlinie L929, gezeigt werden, daß $TNF\alpha$ zur Freisetzung von Cytochrom C, zum Abfall von $\Delta\Psi_m$ und zum Zelltod führen kann (308-310). L929 behalten ihre Sensibilität gegenüber $TNF\alpha$ auch in Gegenwart des Caspase-8-Inhibitors Z-IETD-fmk (309). Der $TNF\alpha$ -induzierte Zelltod in Hepatozyten geht mit einer Freisetzung von Cytochrom C einher und wird durch die Expression eines dominant-negativen FADD zwar vermindert, aber nicht vollständig blockiert (261). In diesem Zusammenhang ist die Frage von Interesse, ob die Aktivierung der Mitochondrien die Spaltung von Bid als Verbindungsglied zwischen Todesrezeptoren und Mitochondrien erfordert (248). In HD-MyZ war die Bid-Spaltung nicht notwendig für die Sensitivierung durch $TNF\alpha$. Nach keinem Behandlungsschema war eine Bid-Spaltung zu detektieren. Dies stand in Übereinstimmung mit der fehlenden bzw. nach Behandlung mit Epirubicin geringen Aktivierung der Caspase-8. Die Spaltung von Bid erfolgt einerseits über die Rezeptor-vermittelte Caspase-8-Aktivierung. Bid-Spaltung steht andererseits am Ende der Amplifikationsschleife, die nach Aktivierung der Mitochondrien unter Beteiligung von Caspase-9 und Caspase-3 zur nachfolgenden Aktivierung von Caspase-8 führt. Die Verstärkung der Etoposid- und Bestrahlungs-induzierten Apoptose durch Bid-Spaltung distal der Mitochondrien wurde in Jurkat-Zellen beobachtet. Diese Arbeit zeigt außerdem, daß Bid ein Substrat der Caspase-3 darstellen kann (311). Dieser Befund konnte in HD-MyZ allerdings nicht erhoben werden.

5.6. C₂-Ceramid kann TNF α im Hinblick auf die Sensitivierung von HD-MyZ nicht ersetzen

Da die Sensitivierung von HD-MyZ durch TNF α unabhängig von NF- κ B und Caspase-8 erfolgt, stellte sich die Frage, wie das durch TNF α -ausgelöste, apoptotische Signal zum Mitochondrium weitergeleitet wird. Ceramid vermittelt in einigen Zellsystemen die zelluläre Antwort auf Apoptose-induzierende Stimuli wie Bestrahlung, anti-CD95/Fas oder auch TNF α (130, 133). Ein Mangel an intrazellulärem Ceramid kann deshalb für die Resistenz gegenüber Bestrahlungs-induziertem Zelltod verantwortlich sein (139, 312). Ceramid kam deshalb als Vermittler der TNF α -induzierten Sensitivierung zunächst in Frage. TNF α kann durch Aktivierung von saurer oder auch neutraler Sphingomyelinase unter Beteiligung der TNF-Rezeptoren und der Adapter FADD und TRADD die Akkumulation von intrazellulärem Ceramid induzieren (128, 143). In HD-MyZ konnte die Aktivierung der Sphingomyelinase durch TNF α anhand der schnellen und transienten Hydrolyse von Sphingomyelin nach 15 – 30 min nachgewiesen werden. Der Sphingomyelin-Zyklus wurde dabei unabhängig von NF- κ B in HD-MyZ mock und HD-MyZ I κ Bdn induziert. Anschließend wurde untersucht, ob dieses durch TNF α induzierte, intrazelluläre Ceramid den sensitivierenden Mechanismus von TNF α vermitteln könnte. Dazu wurde die Kombinationsbehandlung von TNF α mit Etoposid oder Epirubicin durch die Kombination von C₂-Ceramid mit Zytostatika ersetzt. Es zeigte sich, daß zellpermeables C₂-Ceramid TNF α als sensitivierende Substanz im Hinblick auf den Zytostatika-induzierten Zelltod nicht ersetzen kann. Auch die Hemmung der Ceramid-Bildung durch den Ceramid-Synthase-Hemmstoff Fumonisin B₁ hatte auf die Zytostatika-induzierte Apoptose keinen vermindernden Effekt. Damit stellt sich ein interessanter Unterschied zwischen dem sensitivierenden Effekt, den TNF α auf die Bestrahlungs-induzierte Apoptose in Prostata-Karzinomzellen hatte und der Sensitivierung von HD-MyZ für Zytostatika und Ceramid dar. Kimura et al. zeigten, daß für die Sensitivierung der Prostata-Karzinomzellen der intrazelluläre Ceramidanstieg notwendig ist und exogenes, zellpermeables C₂-Ceramid den Effekt von TNF α ersetzen kann (260).

5.7. Weitere mögliche Mechanismen der TNF α -vermittelten Sensitivierung

Verschiedene weitere Mechanismen können für die Erklärung der Sensitivierung durch TNF α herangezogen werden. Hierzu zählt die Induktion von oxidativem Stress durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI, *radical oxygen intermediates*). In Fibroblasten ebenso wie in Hepatozyten sind ROIs am TNF α -induzierten Zelltod beteiligt (313, 314). Die Zytotoxizität von TNF α kann durch Blockierung des Elektronentransportes der Atmungskette auf der Stufe der Cytochrom C Reduktase (Komplex III) verstärkt aber durch Antioxidantien

vermindert werden. Der direkte Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf den Elektronentransport führt zur Bildung von ROIs in den Mitochondrien und zwar bevor irreversibler Zellschaden detektiert werden kann (314-317). Durch Gottlieb et al. wurde gezeigt, daß ROIs im Zuge der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Apoptose produziert werden. Antioxidantien blockieren die Bildung von ROIs und verzögern Apoptose (318). Die Bildung von ROIs wurde auch in Zellen, die FADDn exprimieren, beobachtet. Die Blockierung eines FADD und Caspase-abhängigen Weges führte bei Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ sogar zu einer Verstärkung der ROI-Bildung und zum Zelltod. Der unter diesen Bedingungen zu detektierende Zelltod zeigte Nekrosezeichen (319). In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, daß auch in HD-MyZ die Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ unter Bildung von ROIs erfolgt. Die Bildung von ROIs war in diesem Zellsystem bisher jedoch nicht zu detektieren, sollte aber ein Ziel zukünftiger Arbeiten darstellen. Zytostatika und C_2 -Ceramid können ebenfalls die Bildung von ROIs induzieren (249, 320, 321). Es wäre daher denkbar, daß $\text{TNF}\alpha$ in HD-MyZ-Zellen ROIs in einer Konzentration generiert, die per se nicht zytotoxisch sind, aber in Kombination mit der Behandlung von C_2 -Ceramid und Zytostatika zur Induktion des Zelltods führen.

Da $\text{TNF}\alpha$ über die Aktivierung des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Weges die Empfindlichkeit gegenüber Zelltod beeinflussen kann, spielt dieser Signalweg möglicherweise auch für den sensitivierenden Effekt in HD-MyZ eine Rolle. Zur MAP-Kinase-Superfamilie zählen ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun-N-terminal kinase*) und p38-MAPK (259). Innerhalb des $\text{TNF}\alpha$ -Signalweges stellen TRAF2 und ASK-1 (*apoptosis stimulating kinase*) die Verbindung zum MAP-Kinase-Weg her, der in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun/AP-1 resultiert (322, 323). Inwiefern MAP-Kinasen den Prozeß der Apoptose regulieren, wird kontrovers diskutiert (89). Die Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten p38-MAP-Kinase-Aktivierung durch synthetische Inhibitoren wie SB 203580 kann die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Apoptose verstärken. Hieraus läßt sich ein anti-apoptotischer Einfluß der p38-MAP-Kinase ableiten (324). Bei der durch UV-Bestrahlung-induzierten Apoptose konnte der p38-MAP-Kinase eine pro-apoptotische Funktion zugesprochen werden, da die Blockierung der Kinase sowohl Cytochrom-C-Freisetzung als auch Apoptose hemmt (325). Erste Befunde hinsichtlich der Rolle von p38-MAPK in HD-MyZ zeigten allerdings, daß deren Hemmung durch den Inhibitor SB 202190 die Sensitivierung durch $\text{TNF}\alpha$ nicht beeinflußt. Für eine abschließende Beurteilung der Bedeutung von p38-MAPK in diesem System müssen weitere Untersuchungen folgen.

5.8. Relevanz des sensitivierenden TNF α -Effektes für die Therapie von hämatologischen Erkrankungen

Um zu zeigen, daß sich der sensitivierende Einfluß von TNF α auf die Zytostatika-induzierte Apoptose nicht auf die Hodgkin-Linie, HD-MyZ, beschränkt, sondern einen generellen Effekt darstellt, wurden 12 weitere Linien hämatologischen Ursprungs untersucht. Es handelte sich hierbei in der Mehrzahl um akute (5) oder chronische (4) myeloische Leukämien; außerdem 2 weitere Hodgkinlinien und eine Burkitt-Lymphomlinie. Eine Sensitivierung durch TNF α wurde im Hinblick auf die Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose in ungefähr der Hälfte der Fälle, entweder gegenüber einem Zytostatikum oder gegenüber beiden festgestellt. Die Hodgkin-Linien L1236 und L540 zeigten keine Sensitivierung durch TNF α . Die AML-Linien CTV-1, PLB-985 und KASUMI-1 konnten durch TNF α weder für Etoposid- noch für Epirubicin-induzierten Zelltod sensitiviert werden. PLB-985 und KASUMI-1 wiesen lediglich einen durch TNF α -vermittelten additiven Apoptoseeffekt auf. Sie zeigten sich empfindlich gegenüber TNF α . Die Höhe dieser Apoptose addierte sich zur Etoposid- und Epirubicin-induzierten Apoptose, es handelte sich also nicht um eine Sensitivierung. Die AML-Linie KG-1 und die CML-Linie K562 ließen sich durch TNF α für Etoposid- und Epirubicin-induzierte Apoptose sensitivieren. Diese Sensitivierung trat in der AML-Linie OCI-AML2 und den CML-Linien Lama-87, EM-3 und KU-812 gegenüber jeweils einem Zytostatikum auf. Um der Frage nachzugehen, ob diese beobachtete Sensitivierung einem ähnlichen Mechanismus wie die Sensitivierung der Hodgkin-Linie HD-MyZ unterliegt, wurden die CML-Linien K562 und EM-3 näher untersucht. TNF α alleine löst in K562 wie auch in HD-MyZ keine Apoptose aus und induziert weder Caspase-3 noch Caspase-8 Prozessierung wie im Western Blot nachzuweisen war. Die Sensitivierung durch TNF α geht aber mit einer verstärkten Aktivierung der Caspase-3 nach Behandlung mit Etoposid und Epirubicin einher. Insbesondere Etoposid-behandelte Zellen ließen erst nach Vorbehandlung mit TNF α eine Prozessierung von Caspase-3 und -8 erkennen. Die deutliche Spaltung von Caspase-8, die nach Behandlung von K562 mit Epirubicin zu detektieren war, wurde durch TNF α nochmals verstärkt. In K562 war also im Gegensatz zu HD-MyZ eine Caspase-8-Aktivierung im Zuge der Sensitivierung durch TNF α zu detektieren. Nach Epirubicin-Behandlung ging die Caspase-8-Aktivität mit einer Spaltung von Bid einher. Die Caspase-8-Aktivierung und die Spaltung von Bid in K562 kann als Folge einer Rezeptor-vermittelten Apoptoseinduktion auftreten, oder im Zuge einer Amplifikation nach mitochondrialer Aktivierung über Caspase-9 und -3 erfolgen. Inwieweit die Caspase-8-Aktivierung notwendig für die Sensitivierung in K562 ist, sollte durch Apoptoseversuche in Anwesenheit eines Caspase-8-Inhibitors untersucht werden. Die Beteiligung der Mitochondrien an der Sensitivierung von K562 und EM-3 durch TNF α für Epirubicin- bzw. Etoposid-induzierte Apoptose konnte anhand der

Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von $\text{TNF}\alpha$ verstärkte den Abfall des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$. Die Tatsache, daß sich der sensitivierende Effekt von $\text{TNF}\alpha$ nicht auf Hodgkinzellen beschränkt, sondern auch für Zellen chronisch myeloischer und akut myeloischer Leukämien zu beobachten ist, zeigt eine mögliche generelle Bedeutung von $\text{TNF}\alpha$ und des entsprechenden Signalweges für die Therapie dieser Erkrankungen auf. Da die Prognose von Patienten mit rezidivierenden myeloischen Leukämien wie auch die Prognose fortgeschrittener Stadien des Hodgkin-Lymphoms schlecht ist, sind Substanzen, die Tumorzellen für Zytostatika sensitivieren, von großem therapeutischen Nutzen (326). In diesem Sinne könnte $\text{TNF}\alpha$ als Adjuvanz bei der Zytostatikatherapie von hämatologischen Erkrankungen einsetzbar sein. Die Toxizität von $\text{TNF}\alpha$ schließt allerdings eine systemische Anwendung aufgrund der zu erwartenden Schädigung der Leber und des Auftretens von Symptomen eines septischen Schocks aus. Es ist aber denkbar, daß $\text{TNF}\alpha$ bei der *ex vivo* Behandlung von Knochenmark Anwendung findet. Dieses als „*purging*“ bezeichnete Verfahren wird bei der autologen Knochenmarkstransplantation bei der Therapie des Hodgkin-Lymphoms und myeloischer Leukämien eingesetzt, um einer Rezidivbildung durch Reinfusion von leukämischen Zellen entgegenzuwirken (326). Zudem könnte die Aufklärung des sensibilisierenden Effektes von $\text{TNF}\alpha$ beim Zytostatika-induzierten Zelltod zur Entwicklung neuer Therapiestrategien, z.B. mit niedermolekularen Substanzen, führen.