

## 4. Diskussion

Das CD30-Antigen gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNFR) und wird auf Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms (HL), des ALCL, des diffusen großzelligen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphoms der anaplastischen Variante und des embryonalen Karzinoms überexprimiert. Kennzeichnend ist die restriktive Expression von CD30, das nur auf wenigen normalen, nicht-neoplastischen Zellen, wie aktivierten peripheren Blutlymphozyten und Zellen der Dezidua, gering exprimiert wird. Diese Konstellation wirft die Frage der Regulation der Expression des CD30-Antigens auf. Nur CD30-exprimierende Zellen weisen auch CD30-mRNA auf<sup>42</sup>. Es ist daher anzunehmen, daß eine Regulation der CD30-Expression auf Transkriptionsebene stattfindet. Diese Arbeit klärt durch Sequenzierung des *cd30*-Gens seine Struktur auf und legt durch die Miteinbeziehung der Promoterregion in die Sequenzanalyse die Grundlagen für das Verständnis der CD30-Regulation.

### 4.1. Analyse von Genbanken

Bei der Analyse der Cosmid- und Phagenbanken ergibt sich ein spezifisches Problem aus deren Herstellungsweise. Hierbei wird genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* partiell verdaut. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente werden nach Größenfraktionierung in den *Bam*HI geschnittenen Vektor (Cosmid oder Phage) ligiert. Bei dieser Konstruktion der Genbanken können sich verschiedene *Sau3A* geschnittene DNA-Fragmente hintereinander lagern, so daß nach jeder *Sau3A* Schnittstelle theoretisch ein DNA-Fragment eines anderen Gens liegen kann. Dies muß bei der Analyse der Klone bedacht werden. Hat man zwei verschiedene Klone desselben Genabschnitts, oder aber umfaßt ein Klon mehrere Exone des Gens, läßt sich ein solches Artefakt nahezu ausschließen. Es war deshalb wichtig, verschiedene überlappende Klone zu finden, die das *cd30*-Gen abdecken. Bei der Sequenzierung der Klone konnten, abgesehen von den in den Klonen M1 und H160 enthaltenen Mikrosatelliten, keine Sequenzabweichungen festgestellt werden.

## 4.2. Genstruktur des CD30

Das *cd30*-Gen besteht aus 8 Exonen und 7 Intronen. Die strukturellen Domänen des CD30-Peptids lassen sich gut einzelnen Exonen des *cd30*-Gens zuweisen. So ist das 1. Exon mit der Sequenz für das hydrophobe Leitpeptid für die Schritte des Protein-Targeting zuständig, 2. und 3. Exon beinhalten die extrazelluläre Domäne des CD30. Das 4. Exon bildet die Transmembrandomäne des Rezeptors, Exon 8 ist für die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade verantwortlich und enthält den längeren nicht translatierten Bereich. Spezifische Funktionen für die Exone 5 bis 7 können bisher nicht postuliert werden, allerdings gibt es Hinweise für einen weiteren Signaltransduktionsmechanismus, der unabhängig von TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs) NF $\kappa$ B induzieren kann<sup>43</sup>. Diese Signaltransduktionsdomäne befindet sich zwischen den Aminosäureresten 410 – 531 proximal der Zellmembran, dies entspricht einem Bereich, der hauptsächlich vom 5. bis 7. Exon codiert wird.

Die extrazelluläre Domäne des CD30 ist, wie bei allen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie, aus cysteinreichen Domänen aufgebaut. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren ist die extrazelluläre Domäne von CD30 jedoch aus 6 und nicht aus 3 bis 4 cysteinreichen Motiven aufgebaut. Dieser Unterschied ist auch anhand der Genstruktur erkennbar. Die hier aufgezeigte Exon-/Intronstruktur des *cd30*-Gens weist deutliche Unterschiede im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie auf. Bei den meisten anderen Rezeptoren der TNFR Superfamilie wird die kodierende Sequenz für jedes cysteinreiche Motiv an gut konservierten Stellen durch ein Intron unterbrochen. Beim *cd30*-Gen befindet sich nur eine Splice Stelle (d.h. 1 Intron) innerhalb der cysteinreichen extrazellulären Motive, und zwar genau zwischen den beiden zueinander homologen Abschnitten (entsprechend der Exone 3 und 4) die jeweils aus drei dieser Motive bestehen. Dieses bedeutet, daß nur zwei Exone die 6 extrazellulären cysteinreichen Motive des CD30 codieren. Im Vergleich dazu werden bei den anderen Mitgliedern der TNFR-Superfamilie die 3 bis 4 cysteinreichen Motive durch 4 bis 5 Exone codiert. Ein möglicher Entstehungsmechanismus für diese Genstruktur wäre ein Verlust von zwei Intronen während der Evolution des humanen CD30 aus Vorläufer-Genen und Bildung der langen extrazellulären Domäne des CD30 durch anschließende Duplikation eines Exon. Da das murine CD30 nur

drei Cystein-reiche Domänen besitzt, könnte ein solches Duplikationsereignis während der Evolution zum Menschen aufgetreten sein.

Der intrazelluläre Teil von CD30 beinhaltet die PEQET, EEGKE und EPPLGSC Aminosäuresequenzen, die für die Signaltransduktion wichtig sind. Diese konservierten Domänen sind auch bei anderen TNFR erhalten (TNFR2, CD40)<sup>44,45</sup>.

In dieser Arbeit konnte das Ergebnis der Untersuchungen von Horie et al.<sup>46</sup> bestätigt werden, daß eine Intron/Exon-Grenze im Beginn des kodierenden Bereichs der Transmembrandomäne vorhanden ist. Dieses 3. Intron beinhaltet einen zusätzlichen Promoter und Transkriptionsstartpunkt, der die Expression eines an der Transmembrandomäne abgeschnittenen, nur den intrazellulären Teil beinhaltenden, CD30-Moleküls induzieren kann.

#### **4.3. Promoterregion des *cd30*-Gens**

Die Sequenzanalyse der Promoterregion zeigt, daß das *cd30*-Gen einen GC-reichen Promoter ohne TATA-Box besitzt. Auch auf dieser Ebene ist, abgesehen von den strukturellen molekularen Gemeinsamkeiten und ähnlichen Signaltransduktionselementen auf Proteinebene, die Zugehörigkeit von CD30 zur TNFR Superfamilie erkennbar. Bei vielen Mitgliedern der TNFR Superfamilie wurde ebenfalls ein GC-reicher Promoter ohne TATA-Box nachgewiesen<sup>41,47-52</sup>.

Gene mit Promoter ohne TATA-Box können verschiedene Transkriptionsstartpunkte beinhalten. Dies ließ sich auch in weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe für das *cd30*-Gen zeigen. Durch Primer-Extensionsanalysen konnten 3 Transkriptionsstartpunkte definiert werden. In den ergänzend durchgeführten RNase-Protektions-Analysen konnte die Haupttranskriptionsstartstelle 270 bp vor dem Translationsstartkodon in HL-Zelllinien bestätigt werden. In der Promotersequenz konnte eine Initiator-Sequenz identifiziert werden. Für eine Transkription bei Promotoren ohne TATA-Box ist ein solches Inr-Element ausreichend<sup>53</sup>. Die Initiator-Konsensussequenz im Promoter des *cd30*-Gens befindet sich an einem Transkriptionsstartpunkt (302 bp vor dem Translationsstartkodon), der in den Untersuchungen von Croager et al. in Jurkat-Zellen den Haupttranskriptionsstart darstellt. Nach diesen Ergebnissen ist die Initiator-Sequenz bei Zelllinien, die dem Phänotyp aktivierter T-Zellen ähneln<sup>54</sup>, für die Wahl des Transkriptionsstarts entscheidend. Bei der Auswahl

des Transkriptionsstartpunkts in HRS-Zellen ist die Inr-Sequenz interessanterweise anscheinend nicht ausschlaggebend. Diese Untersuchungen belegen, daß die Transkription des *cd30*-Gens in T-Zellen und Hodgkin-Sternberg-Reed-Zellen (HRS-Zellen) an verschiedenen Stellen begonnen wird.

Um den Minimal-Promoter zu definieren, wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe<sup>55</sup> verschiedene Deletions-Konstrukte der Promoterregion in Reporter-Gen-Analysen auf ihre Aktivität hin untersucht. Hierbei wurde eine 250 bp lange Sequenz identifiziert, die zwar nicht die maximale Reporter-genaktivität erreicht, aber für eine CD30-Expression ausreichend ist.

#### 4.3.1. *Genetischer Polymorphismus*

Teile der Promotersequenz von CD30 sowie erste funktionelle Studien wurden kürzlich von Coager et al.<sup>56</sup> publiziert. Ein Sequenzvergleich zeigt, daß die eigene und die von Croager et al. veröffentlichte Sequenz im Kern-Promoterbereich übereinstimmen, Abweichungen befinden sich in einem im 5'-Bereich gelegenen ATCC-Mikrosatelliten. Croager et al. haben die Mikrosatellitenregion im Promoterbereich des *cd30*-Gens in CD30<sup>-</sup> Zelllinien und gesunden Individuen untersucht und konnten einen Längenpolymorphismus von 40 bp nachweisen. Die eigene Analyse der Mikrosatelliten-Region in CD30<sup>+</sup> Zelllinien und normalem Gewebe ergab einen Längenpolymorphismus von mehr als 550 bp. Damit konnte gezeigt werden, daß der Polymorphismus im CD30-Promoter in CD30<sup>+</sup> Zelllinien weit stärker ausgebildet ist als in CD30<sup>-</sup> Zelllinien. Eine solche Mikrosatelliteninstabilität wird als mögliches Schlüsselereignis bei der Onkogenese von Tumoren diskutiert und entsteht zumindest teilweise durch Defekte in der DNA-Reparatur bei malignen Tumoren. Bei HL und ALCL konnten Defekte in der DNA-Reparatur identifiziert werden<sup>57,58</sup>. Möglicherweise kommt die hier beschriebene Mikrosatelliteninstabilität durch Defekte der Reparaturenzyme in HL- und ALCL-Zelllinien zustande.

Die Experimente zum Nachweis der Mikrosatelliteninstabilität zeigten in der Langstrecken-PCR unerwarteterweise nur ein Produkt. Bei den CD30<sup>+</sup> Zelllinien ist dies möglicherweise noch durch den Verlust eines Allels zu erklären, bei den Untersuchungen des normalen Gewebes würde man gerade bei nachgewiesenem Längenpolymorphismus des Mikrosatelliten zwei verschiedene PCR-Produkte als Zei-

chen der Heterozygotie mit zwei verschiedenen Allelen erwarten. Um die Wahrscheinlichkeit einer PCR-bedingten Selektion eines Allels zu vermindern, wurden sowohl unterschiedliche Primer, als auch die PCR-Bedingungen wie Anlagerungstemperatur und Synthesezeiten verändert sowie die benutzte Polymerase (Taq/Pwo) durch eine andere (Tth) ersetzt. Es konnte jedoch bei allen durchgeführten Modifikationen kein zweites Produkt detektiert werden. Im Zusammenhang mit der Beobachtung, daß Mikrosatelliten komplexe Sekundärstrukturen (Abweichung von der Doppelhelix nach Watson-Crick) ausbilden können<sup>59</sup>, die die DNA-Polymerasefunktion hemmen können, erscheint die Möglichkeit einer selektiven Darstellung des leichter amplifizierbaren Gens erklärbar zu sein.

In weiterführenden Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde anhand von Reportergen-Analysen der Einfluß des Polymorphismus der Mikrosatellitensequenz auf die CD30-Promoter-Aktivität untersucht. Von Croager et al. wurde kürzlich eine ähnliche Untersuchung veröffentlicht, die eine Veränderung der Promoteraktivität des *cd30*-Gens um das zweieinhalbfache zeigte. Hierbei wurden die oben bereits erwähnten Mikrosatellitensequenzen aus CD30<sup>-</sup> Zelllinien bzw. gesunden Individuen benutzt. Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit Material aus CD30<sup>+</sup> Zelllinien zeigten eine Veränderung der Promoter-Aktivität um das achtfache durch diesen polymorphen Mikrosatelliten (zur Publikation eingereicht, Dürkop, Oberbarnscheidt et al.). Die polymorphen Sequenzen von CD30<sup>+</sup> Zelllinien erhöhten die Transkription stärker als die Sequenzen aus normalem Gewebe. Dies kann als Hinweis dafür gelten, daß die Mikrosatelliteninstabilität zur CD30-Überexpression bei HL und ALCL beiträgt. Weiterhin war eine Korrelation zwischen Länge des Polymorphismus und CD30-Promoter-Aktivität vorhanden, die bei normalem Gewebe stärker ausgeprägt war als bei CD30<sup>+</sup> Zelllinien.

#### 4.3.2. *Transkriptionsfaktorbindungsstellen und Transkriptionsstartpunkt*

Die Computeranalyse der Promoterregion auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen ergab eine große Anzahl verschiedener möglicher Bindungsstellen. Auffallend war hierbei das Vorhandensein von mehreren GC-reichen Konsensusbindungsstellen. Die computergestützte Analyse möglicher Bindungsstellen im Promoterbereich kann allenfalls Hinweise für die funktionelle Bedeutung dieser Bindungs-

stellen geben, so daß eine weitere Analyse der Transkriptionsbindungs-faktoren auf funktioneller Ebene notwendig ist. Bei der später in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Analyse auf funktioneller Ebene stellten sich viele der möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen als funktionell nicht relevant heraus.

Die in der Computeranalyse gefundenen GC-reichen Konsensus-Bindungsstellen, die sich auch funktionell bestätigten, sind tandemartig organisiert, wie es bei anderen Promotoren ohne TATA-Box und im speziellen auch beim *fas-Gen*<sup>52</sup> und *tnfr1-Gen*<sup>49</sup> beschrieben wurde<sup>60,61</sup>. In der Nähe solcher Transkriptionsfaktorbindungsstellen liegt häufig der Transkriptionsstartpunkt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten von Emami et al., die zeigen, daß SP1-Bindungsstellen bei Genen ohne TATA Box für die Initiierung einer Transkription mitverantwortlich sein können<sup>62,63</sup>.

Durch weitere Charakterisierung dieser Konsensusbindungsstellen durch unserer Arbeitsgruppe<sup>55</sup> mit Hilfe von Elektromobilitäts-Verschiebungs-Untersuchungen (EMSA), spezifischen Antiseren gegen Transkriptionsfaktoren und Reporter-gen-Analysen nach Punktmutation der Konsensusbindungsstellen konnten drei Sp1-Bindungsstellen bei Position -76, -126 und -237, eine Sp3-Bindungsstelle bei Position -367, eine Ets-Konsensusbindungsstelle (-269) und eine LVc-Bindungsstelle (-154) verifiziert werden. Für die Sp1-Bindungsstellen konnte gezeigt werden, daß eine Mutation der -76 bp Bindungsstelle in einer nur noch 40%igen Reporter-genaktivität resultierte. Croager et al. konnten in ähnlichen Experimenten ebenfalls das funktionelle Vorhandensein der Sp1-Bindungsstelle bei -76 bp nachweisen. Diese Daten zeigen die besondere Bedeutung der Sp1-Bindungsstellen im Promoter für die Transkription des *cd30*-Gens.

Die Rolle des Transkriptionsfaktors Sp3 als negativer Regulator Sp1-gesteuerter Transkription ist bekannt<sup>64-66</sup> und konnte durch erhöhte Reporter-genaktivität nach Mutation der Sp3-Bindungsstelle in Co-Zellen nachgewiesen werden, in anderen Zelllinien war der Repressoreffekt der Sp3 Bindungsstelle dagegen nicht erkennbar. Die Daten von Lania et al. zeigen, daß der Effekt der Negativregulation durch Sp3 von dem intrazellulären Sp1/Sp3 Verhältnis abhängen kann<sup>66</sup>, welches zelltypspezifisch ist<sup>67</sup>.

Die Bedeutung der Ets-Konsensusbindungsstelle im CD30-Promoter ist noch nicht geklärt, es ist jedoch bekannt, daß Ets-Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der differentiellen Genexpression in haematopoietischen Zellen beteiligt sind<sup>68,69</sup>. In weiteren Experimenten sollte daher die Ausstattung der CD30<sup>+</sup> Zellen mit Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu CD30<sup>-</sup> Zellen untersucht werden.

Der sehr restriktiv regulierte Promoter des *cd30*-Gens<sup>55</sup> könnte möglicherweise ein geeignetes Werkzeug für gentherapeutische Ansätze zur Therapie der CD30<sup>+</sup> Malignome sein. Vorstellbar könnte ein Vektor mit einem Selbstmordgen unter Kontrolle des CD30-Promoters sein. Weitere Experimente müssen die Möglichkeit einer solchen Therapie evaluieren.