

1 Einleitung

1.1 Zur Geschichte des Hodgkin Lymphoms

Im Jahre 1832 beschrieb Thomas Hodgkin nach pathologischer Begutachtung von 7 verstorbenen Patienten erstmalig ein Krankheitsbild¹, das über 30 Jahre später nach ihm benannt werden sollte. Samuel Wilks prägte im Jahre 1865 den Begriff des „Hodgkin`s disease“, heute im Deutschen Sprachraum auch Morbus Hodgkin oder Hodgkin Lymphom und ordnete die Erkrankung damit als eigene Krankheitsentität ein². Das entsprechende histologische Bild wurde von Dorothee Reed und Carl Sternberg charakterisiert^{3;4}. Die folgenden Veränderungen sind beschrieben worden und bis heute gültig:

In ein buntes Bild verschiedenster Zellarten eingebettet befinden sich wenige ein- und mehrkernige Riesenzellen, die sich durch ein auffällig großes, blasiges Zytoplasma und besonders prominente, homogen gefärbte Nukleoli, die bis zu einem Viertel der Kerne einnehmen, von den umgebenden Zellen abheben.

Auf die damals schon beschriebene Buntheit des histologischen Bildes, die auch nach genauerer Untersuchung mittels modernerer Techniken wie z.B. immunhistochemische Färbungen nur bestätigt werden konnte, ist es unter anderem zurückzuführen, daß bis heute viele Fragen ungeklärt geblieben sind und die Erforschung dieser malignen Entartung immer noch im Zentrum des Interesses liegt.

1.2 Klinische Manifestation histologisches Bild und Klassifikation des Hodgkin Lymphoms

Klinisch manifestiert sich das Hodgkin Lymphom typischer Weise durch die sogenannte B-Symptomatik aus undulierendem Fieber, Nachtschweiß, Müdigkeit und Gewichtsverlust. Meist kommt es zu einer derben, schmerzlosen Schwellung der Lymphknoten mit Prädilektion in der Zervikalregion. Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zum Befall der Milz sowie extralymphatischen Organen kommen. Die Erkrankung hat zwei Altersgipfel. Vorzugsweise betroffen sind 15- bis 35-jährige und über 50-jährige. In der jüngeren Altersklasse erkranken etwas häufiger Männer als Frauen. Die Inzidenz der Erkrankung wird mit regionalen Unterschieden zwischen 0,2 bis 5 pro 100 000 Menschen pro Jahr angegeben⁵. Das Hodgkin Lymphom ist damit das häufigste Lymphom des Menschen.

Nach wesentlichen Fortschritten in der Behandlung, die zur Zeit je nach Stadium der Erkrankung mit einer Radiatio oder mit einer kombinierten Chemotherapie durchgeführt wird, hat sich die Prognose mittlerweile auf bis zu über 90% 5-Jahres-Überlebensrate gebessert.

Zur Klassifizierung hat sich seit der Konferenz in Rye, New York, im Jahre 1966 die dort vorgeschlagene Einteilung in vier Subtypen durchgesetzt⁶. Diese Unterscheidung richtet sich vor allem nach der zellulären und azellulären Zusammensetzung des umgebenden Gewebes, sowie nach dem Aussehen der malignen Zellen. In dieser Konferenz wurden die Typen nodulär-sklerosierend, gemischtzellig, lymphozytenprädominant und lymphozytenarm unterschieden. Der lymphozytenprädominante Typ zeigt häufig etwas kleinere Tumorzellen, genannt "popcorn-cells" oder L+H-cells (engl.: lymphocytic and histiocytic cells)⁷. Auch ohne Behandlung hat er die weitaus beste Prognose. Außerdem war seine B-Zell-Natur aufgrund des B-Zell-typischen Antigenmusters nach zahlreichen Untersuchungen bereits seit längerem akzeptiert^{8-10;11}. Ebenso ist beim diesem Typ mittlerweile erwiesen, daß er monoklonalen Ursprungs ist, d.h. von einer einzigen maligne entarteten B-Zelle ausgeht^{12;13}. Auch die neueste Klassifikation, die sogenannte "REAL-Classification" (engl.: revised European-American classification of lymphoid neoplasm) aus dem Jahre 1994 stellt diesen Subtyp heraus, indem sie ihn nunmehr als eigene Entität ansieht. Zusätzlich wurde ein neuer Typ definiert als „lymphozytenreicher Typ“. Er wurde fortan zusammen mit dem nodulär-sklerosierenden, gemischtzelligen und lymphozytenarmen Typ, die auch schon in der älteren Klassifikation als solche benannt waren, unter dem Begriff „klassisches Hodgkin Lymphom“ zusammengefaßt¹⁴. Der Ursprung des klassischen Hodgkin Lymphoms gab im Gegensatz zu dem lymphozytenprädominanten Typ noch lange Zeit Anlaß zu Diskussionen.

Für die histologische Diagnose der Erkrankung sind das Auftreten von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) in entsprechend dieser Untertypen definierten zellulären Umgebung entscheidend. Hierbei kommen in verschiedener Zusammensetzung Plasmazellen, lymphoide Zellen mit- oder ohne Irregularitäten, Histiozyten, sowie Entzündungszellen einschließlich eosinophiler Granulozyten und polymorphkerniger Leukozyten vor^{15;16}. Die vereinzelt liegenden Tumorzellen machen in diesem Zellbild nur 1-2% aus. Zusätzlich zu diesen morphologischen Aspekten werden heute auch immunhistochemische Eigenschaften der Tumorzellen und ihrer Umgebung herangezogen¹⁷.

Jahrzehntlang war der zelluläre Ursprung des malignen Zellklons unbekannt. Sowohl Makrophagen als auch Megakaryozyten, Endothelzellen, myeloide Zellen, folliculäre dendritische Zellen, Interdigitalzellen und aktivierte B- und T-Lymphozyten sind als Vorläuferzellen der krankheitstypischen Tumorzellen postuliert worden^{10;18-20;20;21;22;23}.

Die Entdeckung des Oberflächenmoleküls CD30 mit Hilfe hochspezifischer Antikörper wie z.B. des Ber-H2²⁴⁻²⁶, gab erstmalig deutliche Hinweise auf eine lymphozytäre Abstammung der Tumorzellen. Nach einigen widersprüchlichen Studien stellte sich nämlich heraus, daß dieses Antigen im gesunden Gewebe am häufigsten auf perifollikulären und intrafollikulären Lymphblasten nachzuweisen war. In zahlreichen anschließenden Untersuchungen wurden, zur eindeutigen Klärung der Frage nach der Abstammung, HRS-Zellen auf das Vorhandensein von Immunglobulinen (Ig)-Umlagerungen bzw. T-Zell-Rezeptorgen-Umlagerungen untersucht. Zunächst wurden Versuche mit DNA aus Zellextrakten von Zelllinien durchgeführt. Die sichersten Ergebnisse lieferten jedoch Untersuchungen an einzelnen Zellen aus Gewebeschnitten. Die Methode erlaubte es, aus zellmorphologieerhaltenden Gefrierschnitten die Tumorzellen nach ihrer Morphologie, ihrem Antigenprofil und ihrer Lokalisation auszuwählen und sie mittels eines hydraulischen Micromanipulationsgerätes sorgfältig zu isolieren²⁷. Die so untersuchten Zellen zeigten in dieser Untersuchung in ca 98% der Fällen klonale Ig-Kettenumlagerungen^{12;13} als Beweis für die Abstammung von Keimzentrums-B-Zellen. In den übrigen Fällen ließ sich eine T-Zell-Rezeptor-Umlagerung nachweisen als Zeichen der Abstammung von T-Zellen²⁸.

1.3 Der Transkriptionsfaktor NfkappaB

Im letzten Jahrzehnt rief ein Transkriptionsfaktor sehr großes Interesse hervor: der Nukleäre-Faktor-kappa-B (NfkappaB). Erstmals wurde dieses Protein 1986 von Sen und Baltimore als Transkriptionsfaktor, der an die Decamerstruktur 5`-GGGACTTTCC-3` im Enhancer der Immunglobulin-kappa-Leichtkette muriner B-Zellen und Plasmazellen bindet, beschrieben²⁹. Mittlerweile hat man das Protein als Homo- oder Heterodimer aus verschiedenen strukturverwandten Proteinen in nahezu allen Geweben und Zelltypen nachgewiesen.

1996 gelang es Bargou et al., dieses Molekül in Zusammenhang mit dem Hodgkin-Lymphom zu stellen. Es wurde der Nachweis erbracht, dass dieses Protein sowohl in allen untersuchten Hodgkin-Zelllinien, als auch in den Zellen eines tumorzellhaltigen Perikardergusses eines Patienten konstitutiv aktiv ist. Diese Besonderheit im

Transkriptionsapparat der Zellen wurde als erstes gemeinsames Kennzeichen aller Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms postuliert³⁰.

Eine Dysregulation dieses zentralen und potenten Transkriptionsfaktors, wie sie bei den Hodgkin- bzw. Reed-Sternberg-Zellen offensichtlich vorliegt, könnte das Auftreten vieler Phänomene beim Hodgkin-Lymphom erklären. Auffällig ist bei der Erkrankung beispielsweise das Zytokinexpressionsmuster, wobei viele der irregulär exprimierten Zytokine von NfkappaB reguliert werden. Eine Gemeinsamkeit auf zellulärer, molekularer Ebene könnte außerdem wichtige Hinweise auf die Krankheitsentstehung geben.

1.4 Struktur und Funktionen des Proteins NfkappaB

Hinter dem Begriff NfkappaB verbirgt sich nicht ein einzelnes Molekül, sondern eine Gruppe strukturverwandter Proteine, deren Verwandtschaft am Vorhandensein einer hochkonservierten gemeinsamen Domäne, der sogenannten RHD (engl.: "Rel homology domain") festgemacht wird³¹⁻³⁴.

Im humanen Organismus finden sich als Mitglieder dieser Familie p50 (NfkappaB-1) und sein Vorläufermolekül p105; p52 (NfkappaB-2) und sein Vorläufer p100; p65 (RelA); c-rel (REL) sowie RelB³⁴. In niedriger entwickelten Organismen findet man außerdem v-Rel, Dorsal, DIF und Relish als Angehörige der Rel-Familie^{35;36}.

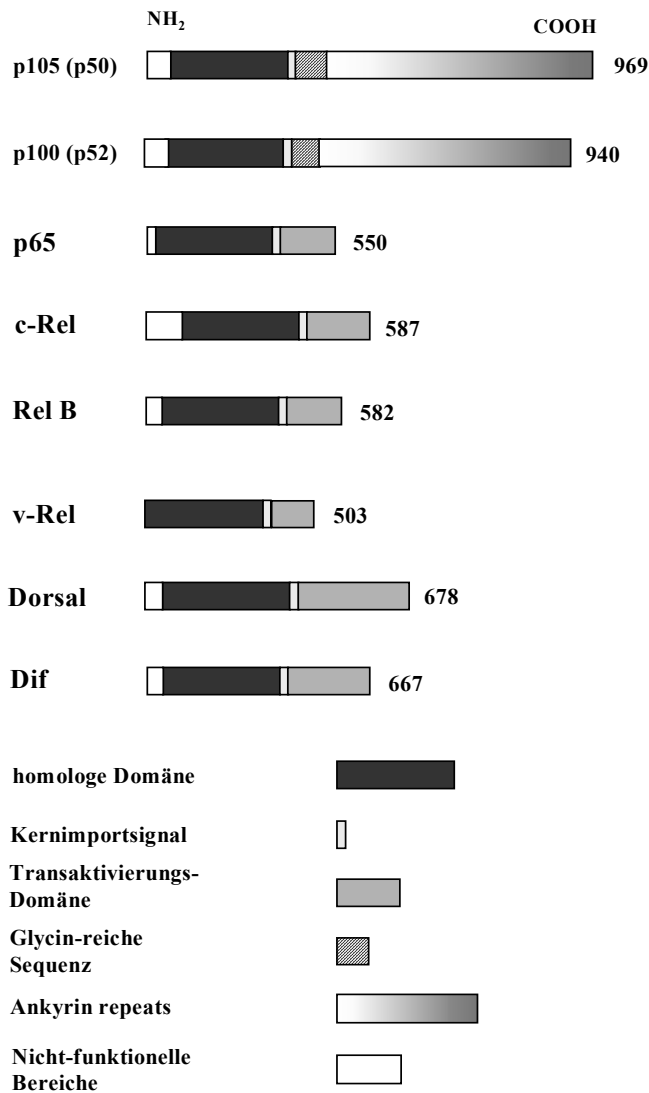


Abb.1: Familie der NfκappaB-Proteine

Die gemeinsame ca. 350 Aminosäuren lange RHD-Sequenz ist verantwortlich für die Bildung von Dimeren zwischen den verschiedenen NfκappaB-Proteinen, sowie durch ein Kern-Lokalisations-Signal (engl.: „nuclear localication signal“, NLS) für den Transport des Proteins in den Zellkern. Diesem Vorgang folgt die Bindung an die DNA im Zellkern. Ist die RHD im N-terminalen Bereich mutiert, so kann zwar eine Dimerisation zweier Moleküle stattfinden, die Bindung an die Ziel-DNA ist jedoch nicht mehr möglich. Diese Beobachtungen machten eine recht genaue Lokalisierung der verschiedenen Funktionen möglich: N-terminal befindet sich die DNA-Bindungssequenz, wohingegen die Dimerisationsdomäne im C-terminalen Bereich liegt. Am C-terminalen Ende befindet sich auch das Kern-Import-Signal³⁷⁻³⁹. Je nach Zelltyp und Funktion liegen die Proteine als Homodimere oder Heterodimere in verschiedenster Zusammensetzung vor, z.B. als p65-

p50, p50-c-Rel, p52-RelB. In der nicht aktivierten Zelle liegen die Dimere zytoplasmatisch in inaktiver Form im Komplex mit einem Inhibitor (IkappaB) vor. Dieser Inhibitor maskiert die für den Kernimport verantwortliche Aminosäuresequenz am Protein NfkappaB, so daß sie für die Einleitung des Transkriptionsvorganges nicht zugänglich ist⁴⁰.

Eine von extrazellulären Stimuli ausgehende Aktivierung führt zu einer Kaskade von Reaktionen, deren Ziel der Abbau des Inhibitors und damit das Freisetzen des Transkriptionsfaktors ist. So kann NfkappaB in den Zellkern translozieren und dort seine Zielgene aktivieren.

Über 200 Stimuli unterschiedlichster Art sind mittlerweile bekannt. Zu ihnen gehören Bakterien, bakterielle Produkte, Viren oder deren Produkte, Zytokine und Wachstumsfaktoren, verschiedene Arten von Stress (z.B. physischer, Sauerstoffentzug), Homöostasestörungen wie Hyperglycämie oder Hämorrhagien, Medikamente, modifizierte Proteine, Apoptose-Mediatoren, Mitogene, Hormone, physiologische Mediatoren und Chemikalien⁴¹.

Tab.1: Induktoren des Transkriptionsfaktors NfkappaB

Klasse der Induktoren	Induktor
Zytokine und Wachstumsfaktoren	Interleukin (IL) 1 α und β IL2, IL12, IL15, IL17, IL18 Tumor-Nekrose-Faktor α und β Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) Leukotrien B4 PDGF
Pro-apoptotische/ Nekrotisierende Stimuli	Wasserstoffperoxid Hypoxie Tumor-Nekrose-Faktor α Wachstumsfaktor-/Serum-Entzug
Bakterien und bakterielle Produkte	Lipopolysaccharide Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin1 Exotoxin B Muramylpeptide Sphingomyelinase
Virale Stimuli	HIV-1 Humanes-T-Zell-Leukämie-Virus Typ1 (HTLV-1) Hepatitis-B-Virus (HBV) Herpes simplex-Virus 1 (HSV 1), humanes Herpesvirus 6 (HSV 6) Newcastle disease-Virus Humanes Herpesvirus Epstein-Barr-Virus (EBV), seine Produkte LMP und EBNA-2 Influenza-Virus Doppelstrang-RNA Sendai-Virus
andere	γ -Irradiation UVA, UVB- und UVC-Licht Antigenerkennung (T- und B-Lymphozyten) CD2, CD28, CD40, CD30-Ligandenbindung Phorbolster (z.B. PMA) Ozone Zigarettenrauch Phenobarbital, Daunomycin, Cisplatin, Tamoxifen Kobald Chlorid Hitzeschockprotein 60 (HSP 60)

Wegen der fast ebenso großen Anzahl der Zielgene von NfkappaB ist an dieser Stelle in tabellarischer Form nur eine Auswahl getroffen:

Tab.2: Zielgene des Transkriptionsfaktors NfkappaB

Genklasse	NfkappaB- abhängiges Gen
Zytokine, Wachstumsfaktoren und Kontrollfaktoren	IL1 α und β IL2, IL3, IL6, IL8, IL12 und IL2 -Rezeptor α Tumor-Nekrose-Faktor α Lymphotoxin α Interferon β Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) p53 Ras
Enzyme	Kollagenase 1 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Lysozyme Transglutaminase
Stressproteine	Serumamyloid-A-Protein (SAA) Komplementfaktoren B, C3 und C4 α_1 -Säure Glycoprotein
Leukozyten-Adhäsions- Moleküle	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 Mucosal addressin cell-Adhäsionsmolekül E-Selektin
Transkriptionsfaktoren	c-myb c-myc IRF-1 und 2 p100 und p105 junB
Immunregulierende Moleküle und Rezeptoren	Immunglobulin κ -Leichtkette und λ -Schwerkette MHC Klassen-I IkappaB α TCR α und β -Kette β_2 -Mikroglobulin CD 48 IL2-Rezeptor- α -Kette

1.5 NfkappaB in B-Lymphozyten und HRS-Zellen

Die Ergebnisse von Bargou et al., daß NfkappaB in Hodgkin-Zelllinien konstitutiv aktiv ist, stellten insofern eine Besonderheit dar, als daß aus Untersuchungen an Prä-B-Zell-Linien (70Z/3) und reifen B-Zell-Linien bekannt war, daß zwar die Vorläuferzellen hauptsächlich das Heterodimer p50-p65 exprimieren, dies jedoch bei ruhenden Zellen in inaktiver Form. Zur Aktivierung bedarf es eines Stimuli. In murinen B-Zellen hingegen fand man bisher in konstitutiv aktiver Form zum allergrößten Teil das p50/c-Rel-Dimer, in nur sehr geringem Maße die Zusammensetzung p50-p65.

Wurden die unreifen Zellen mit dem B-Zell-Mitogen Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, womit man eine Reifung bis hin zur Expression des Igg-Gens nachahmte, so exprimierten diese stimulierten unreifen Zellen 24 Stunden später auch das Protein c-Rel; im Northern-Blot konnte eine Transkription der c-Rel-RNA sogar schon eine Stunde nach Stimulation nachgewiesen werden. Diese Untersuchung gab eindeutige Hinweise darauf, daß während der B-Zell-Reifung ein Wechsel in der Zusammensetzung des NfkappaB-Dimers stattfindet. Hiermit übereinstimmend ist die Beobachtung, daß die c-rel-Promotorregion reifer B-Zellen eine funktionelle κ B-Bindungsstelle enthält. Für die Expression des Igg-Gens zeigte sich entsprechend die Zusammensetzung p50-c-rel in 20fach stärkerer Form als p50/p65 verantwortlich^{42;43}. Zahlreiche Veröffentlichungen wiesen bisher auch bei anderen malignen Entartungen auf Auffälligkeiten im NfkappaB/IkappaB-System hin. So fand man, um nur einige Beispiele zu nennen, in diffusen großzelligen Lymphomen eine Überexpression bzw. Amplifikation von c-rel und p65⁴⁴, in akuten lymphatischen Leukämien ein Gen-Rearrangement von p50, gleiches im p52-Gen in Non-Hodgkin-Lymphomen vom B-Zell-Typ^{45;46}. In soliden, großzelligen Tumoren der Lunge fielen Splicing-Varianten von p65 auf⁴⁷. Im gleichen Tumor und davon abstammenden Zelllinien wurde zudem eine Überexpression von p50 nachgewiesen^{48;49}.

Um eine Relevanz der konstitutiven NfkappaB-Aktivität für das Hodgkin Lymphom zu erfassen, wurden von Bargou und Emmerich et al. funktionelle Versuche an Zelllinien vorgenommen. Für diese Versuche wurde eine N-terminal trunke Deletionsmutante des Inhibitors IkappaB α in die Zelllinie HD-MyZ und L540 eingebracht. Hierdurch wurde erreicht, daß in der transfizierten Zelllinie ein Inhibitorprotein hergestellt wurde, das NfkappaB bindet und damit seine Aktivität inhibiert, jedoch selbst nicht mehr abgebaut werden kann, da ihm die hierfür notwendigen Sequenzen fehlen. Folglich kann NfkappaB nicht freierwerden um seine Zielgene zu aktivieren. Es zeigte sich, daß diese Zelllinien mit

herunterregulierter Aktivität von NfkappaB im Vergleich zur nicht transfizierten Zelllinie eine wesentlich geringere Apoptosetoleranz aufwies⁵⁰.

Es wurde nun aufgrund der vorliegenden Ergebnisse Ziel des Interesses, den Grund der konstitutiven Aktivität von NfkappaB/p50-p65 zu erforschen.

Aus den bisher erwähnten Daten wird ersichtlich, daß es sich im NfkappaB/IkappaB-System um ein äußerst kompliziertes und von vielen extra- und intrazellulären Ereignissen abhängiges Zusammenspiel einer Reihe von Faktoren handelt. Die verschiedenen Mechanismen treffen sich an einem Punkt, nämlich in der Phosphorylierung und Degradation des Inhibormoleküls, dem damit die zentrale Funktion in der Zellregulation zukommt.

1.6 Das Inhibormolekül IkappaB alpha

Wie bei NfkappaB verbirgt sich hinter der Bezeichnung IkappaB nicht ein einzelnes, sondern eine Familie von mehreren Molekülen. Bekannt sind mittlerweile

1. IkappaB α ,
2. IkappaB β ,
3. IkappaB ϵ ,
4. Bcl 3,
5. p100 und p105, welche nach Abspaltung ihres N-terminalen Anteiles zu den Transkriptionsfaktoren p50 bzw. p52 werden³⁷.

Die Verwandtschaft der Inhibormoleküle zeigt sich in sechs übereinstimmenden, hochkonservierten Domänen, den sogenannten "ankyrin-repeats". Bisher wurde dem Molekül IkappaB*alpha* (IkappaB α) in der Familie der Inhibitoren die größte Beachtung geschenkt und es ist daher das am besten charakterisierte. Unter anderem ist gezeigt worden, daß IkappaB α die weitaus höchste inhibitorische Aktivität für NfkappaB zeigt, 6-fach gegenüber IkappaB β ⁵¹. Außerdem ist es hauptverantwortlich für die Hemmung des Dimers p50-p65, welches in Hodgkin-Zellen unphysiologisch konstitutiv aktiv vorliegt. Aus diesem Grund beschäftigen sich die vorliegenden Untersuchungen vor allem mit dem Inhibitorprotein IkappaB α .

Das IkappaB α -Gen selbst besitzt in seinem Promotor eine NfkappaB-Bindungsstelle. Folglich wird nach Eindringen von NfkappaB aus dem Zytoplasma in den Zellkern auch sein eigener Inhibitor induziert^{52;53}. Das neusynthetisierte IkappaB α -Protein transloziert durch bisher nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen in den Kern- ein klassisches

Kernimportsignal im IkappaB α -Protein findet sich nicht. Versuche weisen darauf hin, daß der Kernimport des Moleküls durch hydrophobe Cluster im zweiten Ankyrin-Repeat vermittelt ist⁵⁴. Der Nachweis von IkappaB α im Kern korreliert mit der Beendigung der NfkappaB-Transkriptionsaktivität⁵⁵, so daß angenommen werden kann, daß im Kern durch Bindung an NfkappaB dessen Konformation geändert wird, was eine Lösung des Proteins aus dem DNA-Komplex zur Folge hat. Zusammen mit IkappaB α verläßt NfkappaB, gesteuert von einem Kernexportsignal, den Ort seiner Aktivität.

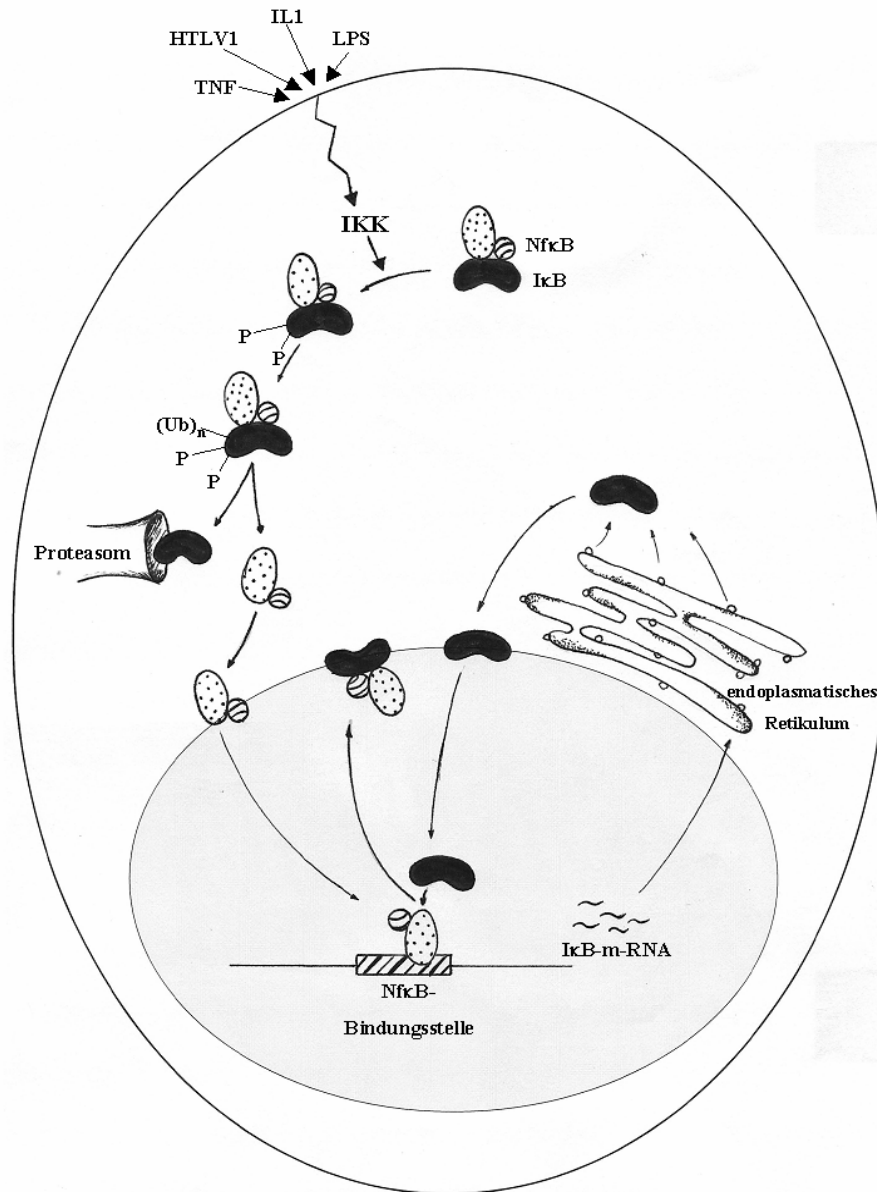


Abb.2: Nach extrazellulärer Stimulation und Auslösung unterschiedlicher komplexer Signalkaskaden wird durch die Aktivierung der Kinase IKK IκappaB phosphoryliert. Konsekutiv folgt die Ubiquitination des Proteins sowie sein Abbau durch das Proteasom. Hierdurch kann NfkappaB in den Zellkern eindringen und seine Zielgene aktivieren. Unter diesen ist auch sein eigener Inhibitor IκappaBα. Nach Transkription verläßt die mRNA den Zellkern, um im endoplasmatischen Retikulum translatiert zu werden. Das neusynthetisierte IκappaBα-Protein steht wieder zur Inhibierung zur Verfügung. Zum Zwecke der Beendigung der Transkriptionsaktivität transloziert des neugebildete IκappaBα in den Zellkern, löst NfkappaB von der DNA durch Bindung und verläßt zusammen mit ihm den Zellkern. Zytoplasmatisch liegt der Komplex dann vor, bis ein erneuter Stimulus den Vorgang von neuem beginnen läßt

Die genaue Intron-/Exonstruktur des IkappaB α wurde von Ito et al. beschrieben⁵⁶. Die in der hier vorliegenden Untersuchung benötigten Daten wurden aus der genannten Veröffentlichung nach Vergleich mit der in Datenbanken veröffentlichten mRNA-Sequenz bezogen. Das Gen besteht aus 4561 Basenpaaren, wovon 1275 zum Promotor gehören, die übrigen verteilen sich auf insgesamt sechs zwischen 108 und 549 Basenpaare lange Exons und entsprechend 5 Introns. Die kodierende Sequenz besteht insgesamt aus 1550 Basenpaaren, das Translationsprodukt umfaßt 317 Aminosäuren. Von N-terminal nach C-terminal betrachtet, lassen sich folgenden funktionellen Abschnitten beschreiben:

Im Promotorbereich finden sich die drei NfkappaB-Bindungsstellen für die Aktivierung der Transkription, die dafür verantwortlich sind, daß NfkappaB seine Aktivität selbst steuert bzw. limitiert⁵⁷.

Im N-terminalen Bereich des Proteins werden die vier Aminosäuren kodiert, die für den Abbau des Moleküls wichtig sind (Serin 32 und 34, Lysin 21 und 22). Der Abbauvorgang wird nach einer komplexen Signalkaskade durch die Phosphorylierung der beiden Serine durch eine hochspezifische IkappaB-Kinase (IKK) eingeleitet. Diese ist variabel aus zwei bis drei Untereinheiten zusammengesetzt. IKK α , IKK β und IKK γ . Die eigentlich katalytischen Einheiten sind dabei IKK α und IKK β ⁵⁸⁻⁶⁰, wohingegen IKK γ vorwiegend regulatorische Funktion zu haben scheint^{61;62}. Die Aktivierung der IKK erfolgt wie bei IkappaB über Phosphorylierungen von Serinen im N-terminalen Bereich der Untereinheit IKK β . Dies führt zu einer Freisetzung der katalytischen Proteinsequenz, die an der Phosphorylierung von IkappaB α mitwirkt. Eine Termination erfährt diese Reaktion, wenn am C-terminalen Ende der Kinasenuntereinheit IKK β eine Autophosphorylierung von mindestens 9 Aminosäuren stattfindet. Dieser Vorgang macht das Molekül sensitiv für die Wirkung einer Phosphatase und damit für die Aktivitätsbeendigung.

Die Phosphorylierung von IkappaB α durch die IKK führt zu einer Konformationsänderung des Inhibitors, so daß die zwei Lysine L21 und L22 zugänglich werden und anschließend einer konsekutiven Ubiquitinierung unterliegen. Die Ubiquitinierung erfolgt konstitutiv im Gegensatz zur vorhergegangenen Phosphorylierung, die hochspezifisch ist⁶³. Das Molekül wird polyubiquitiniert dem 26S Proteasom zum Abbau zugeführt.

Untersuchungen mit verschiedensten Deletionsmutanten machten es möglich, auch die Funktionen des C-terminalen Bereichs sehr gut zu charakterisieren. Dem Bereich ab etwa dem Basenpaar 3613, entsprechend der Aminosäure 288, scheint in den beschriebenen Prozessen keine wichtige Rolle zu spielen⁶⁴. N-terminal von dieser Sequenz befindet sich

die sogenannte PEST-Domäne, benannt nach den neben Aspartat häufig auftretenden sauren Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T).

In dieser Domäne und dem übrigen C-terminalen Bereich befinden sich einige Phosphorylierungsstellen, die von der Caseinkinase II (CKII) erkannt werden. Von dieser ist bekannt, daß sie Transkriptionsfaktoren und zellzyklus-abhängige Proteine phosphoryliert und damit deren intrinsische Stabilität verringert⁶⁵. Diese Funktion konnte für das IkappaB α -Molekül bestätigt werden, indem gezeigt wurde, daß eine hypophosphorylierte Form einen niedrigeren „turnover“ hat. Da die Phosphorylierung durch die CKII konstitutiv erfolgt, scheint diese Reaktion jedoch nicht zur Steuerung der Degradation von IkappaB α nach Stimulation mitverantwortlich zu sein^{66;67}. Es liegen hierzu jedoch unterschiedliche Daten vor, so daß an dieser Stelle keine gültige Aussage gemacht werden kann.

Tab.3: Funktionsbereiche des IkappaB α -Gens

Bereich	Basenpaare	Funktionen	Protein
Promotor	1 -1275	3 NfkappaB Bindungsstellen	
Transkriptionsstart	1276 (GGC)		
translatierender Bereich			
Translationsstart	1407 (ATG)		
Serinkodierende Triplets	1500-02; 1512-14	Phosphorylierungsstellen für die Einleitung des Proteinabbaus	Serin 32 und 35
Lysinkodierende Triplets	1466-68 1469-71	Ubiquitinationsstellen für den Proteinabbau	
Ankyrin- repeats		Bindung von NfkB und Bindungsspezifität zwischen verschiedenen Unterformen	
C-terminaler Bereich	ab ca. 3557 (ab 3613 laut Lit. entbehrlich für die Funktion)		AS 251- 317
		(schneller) Protein-turnover	PEST-Domäne (AS 264-314)
		Bindungsstelle für CKII für Lösung der NfkappaB- DNA-Bindung von Bedeutung NES (Kernexport-Signal)	SEDE (AS 283-86): E284, D285, E286 IQQQLGQLTLENL: (AS 265-277)
nicht translatierender Bereich			
ATTTA- Motive	4147ff, 4358ff, 4537ff	schneller -RNA-turnover	

1.7 Fragestellung

Seit einigen Jahren wird mit großem Interesse der Frage nach der Abstammung der Tumorzellen beim Hodgkin Lymphom sowie der Ursache für deren maligne Entartung nachgegangen. Verschiedene Untersuchungen haben dabei gezeigt, daß in HRS-Zellen der zentrale und potente Transkriptionsfaktor NfkappaB unphysiologischer Weise einer konstitutiven Aktivität unterliegt und daher keines extrazellulären Stimulus bedarf, um seine Zielgene zu aktivieren. Als Ursache hierfür kommt ein Defekt der Inhibitormoleküle in Betracht, die die Aktivität von NfkappaB regulieren. Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich deswegen mit dem effektivsten der Inhibitoren, dem Inhibitormolekül IkappaB α . Die Zielsetzung ist herauszufinden, ob die zuvor nachgewiesene Dysregulation von NfkappaB in HRS-Zellen auf einen Defekt des Inhibitormoleküls zurückzuführen ist. Zu diesem Zwecke wurde das Inhibitormolekül auf DNA-, RNA- und Proteinebene sowohl in Zelllinien als auch in Primärmaterial von Hodgkin-Patienten untersucht.