

**Die Rolle von NF- $\kappa$ B für die CD30-vermittelte  
Signaltransduktion beim  
Anaplastischen Großzelligen Lymphom (ALCL)**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Fariba Fouladi**  
aus Zahedan/Iran

Berlin 2008

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Stein unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. M. Hummel am Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Privatdozent Dr. M. Hummel  
Institut für Pathologie  
Campus Benjamin Franklin  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Mutzel  
Institut für Biologie-Mikrobiologie  
Freie Universität Berlin

Disputation am 18.11.2008

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurde.

Fariba Fouladi

Berlin, den



<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Non-Hodgkin-Lymphome .....	1
1.1.1	Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL).....	2
1.2	Die Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie und ihre Liganden .....	4
1.2.1	Tumor Nekrose Faktor (TNF) assoziierte Proteine.....	5
1.2.2	Der Zytokinrezeptor CD30 und CD30 Ligand.....	6
1.2.3	CD30-vermittelte Signalwege .....	7
1.3	Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B; Struktur, Inhibitoren, Signalweg.....	8
1.3.1	Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B Familie .....	8
1.3.2	Die inhibitorischen NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) Proteine.....	10
1.3.3	Der IKK (I $\kappa$ B Kinase) Komplex .....	12
1.3.4	Die zwei NF- $\kappa$ B Aktivierungswege .....	13
1.3.5	Die CD30 vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung.....	15
1.3.6	Bedeutung von NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor .....	16
1.4	Apoptose.....	18
1.4.1	Caspasen.....	19
1.4.1.1	Auswirkungen der Caspaseaktivierung .....	20
1.4.2	Apoptosesignalwege.....	21
1.4.2.1	Der Todesrezeptor-Signalweg.....	21
1.4.2.2	Der mitochondriale Signalweg.....	22
1.4.3	Die Regulierung von Caspasen bzw. Apoptose .....	22
1.5	Die Zelllinie Karpas 299 als Modellsystem .....	24
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit .....	25
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1	Material .....	27
2.1.1	Zelllinien .....	27
2.1.2	Zellkultur.....	28
2.1.3	Chemikalien für die Zellkultur .....	29
2.1.4	Vektorkonstrukte.....	29
2.1.5	Verwendete Oligonukleotide.....	30
2.1.6	Puffer und sonstige Lösungen.....	30
2.1.6.1	Verwendete Elektrophoresepuffer.....	31
2.1.6.2	Reagenzien für SDS-Gel Elektrophorese und Western Blot.....	31
2.1.6.3	Reagenzien für die Immunhistologie .....	33
2.1.7	Gele .....	33
2.1.8	Antikörper .....	34
2.1.8.1	Primärantikörper.....	34
2.1.8.2	Sekundärantikörper .....	35
2.1.8.3	Verwendete Antikörper in der Zellkultur.....	35
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Vervielfältigung, Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren.....	36
2.2.1.1	Retransformation.....	36

2.2.1.2	DNA-Präparation .....	36
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	37
2.2.1.4	Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	37
2.2.1.5	Restriktionsverdau von DNA .....	38
2.2.1.6	Isolierung von genomischer DNA.....	38
2.2.1.7	Isolierung von Gesamt-RNA.....	39
2.2.2	Gelelektrophorese.....	39
2.2.2.1	Agarosegelelektrophorese .....	39
2.2.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese .....	39
2.2.2.3	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE) .	40
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	40
2.2.3.1	Screening der Einzelklone mittels PCR .....	40
2.2.3.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	41
2.2.4	Sequenzierung .....	42
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	43
2.2.6	Herstellung von Zelllysaten .....	43
2.2.7	Western Blot.....	44
2.2.8	Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“). .....	45
2.2.9	Immunhistologie.....	45
2.2.9.1	Paraffineinbettung .....	45
2.2.9.2	Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten.....	45
2.2.9.2.1	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) – Methode.....	46
2.2.10	Zytozentrifugenpräparation.....	47
2.2.10.1	Immunhistologische Färbung von Cytopräparaten .....	47
2.2.11	Durchflusszytometrische Analyse.....	48
2.2.11.1	Apoptose-Nachweis durch Propidiumjodid (PI).....	48
2.2.11.2	Bestimmung der Apoptose mit Hilfe von Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI).....	48
2.2.12	Transfektion .....	49
2.2.12.1	Herstellung stabiler Transfektanten bzw. Einzelklon $\Delta$ N133 .....	50
2.2.13	Zellbiologische Methoden.....	51
2.2.13.1	Zellkulturbedingungen .....	51
2.2.13.1.1	Allgemeine Vorgehensweise beim Behandeln und Stimulieren bzw. bei der Proliferationsbestimmung von Zellen.....	51
2.2.13.2	Bestimmung der Zellzahl .....	52
2.2.13.3	Aufbewahrung eukaryotischer Zellen .....	52
2.2.13.4	Auftauen der eukaryotischen Zellen .....	52
2.2.13.5	Aufbewahren der Bakterienzellkulturen .....	53
2.2.13.6	Selektionstest.....	53
2.2.13.7	Proliferationstest mit Trypanblau.....	53
2.2.13.8	WST-1 Zellvitalitätsassay .....	54
2.2.13.9	CD30 Stimulation der Zellen .....	54
2.2.13.10	Bestimmung der toxischen Wirkung von Etoposid und Arsentrioxid (AS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ).....	55
2.2.13.10.1	Behandlung der Daudi und HL60 Zelllinie mit 4 $\mu$ M Etoposid .....	55
2.2.13.10.2	Induktion der Apoptose durch 10 $\mu$ M Arsentrioxid (AS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) in Karpas 299 Zellen.....	56
2.2.13.11	Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Z-IETD-fmk .....	56
2.2.13.12	Die Blockierung der Apoptose mittels Z-IETD-fmk und Z-VAD-fmk Inhibitoren in $\Delta$ N133 Zellen .....	57

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1	Herstellung und Charakterisierung einer I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N produzierenden ALCL (Anaplastische großzellige Lymphom)-Zelllinie .....	58
3.1.1	Überprüfung des Vektorkonstrukts .....	58
3.1.2	Selektion (Screening) von I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-exprimierenden ALCL-Zelllinien .....	58
3.1.3	Die I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-Expression und ihr Einfluss auf das Wachstum der $\Delta$ N133 Zellen .....	61
3.2	Die Stimulation vom Zytokinrezeptor CD30 in I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-exprimierender ALCL Zelllinie ( $\Delta$ N133).....	63
3.2.1	Nachweis der Apoptose der CD30 stimulierten $\Delta$ N133 Zellen mittels Propidiumjodid (PI).....	65
3.3	Aktivierung des Zytokinrezeptors CD30 führt zum Todesrezeptor-signalweg in $\Delta$ N133 Zellen.....	69
3.3.1	Nachweis der Aktivierung bzw. Inhibition von Caspase-8 mittels Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) .....	69
3.3.2	CD30 Signalweg führt zu Prozessierung der Caspase-8 in $\Delta$ N133 Zellen .....	72
3.4	Nachweis der Mitochondrien-abhängigen Apoptose in I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-exprimierenden ALCL Zellen ( $\Delta$ N133) .....	74
3.5	CD30-Stimulation führt zur Aktivierung der Caspase-3 in I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N produzierenden ALCL-Zelllinie ( $\Delta$ N133).....	79
3.5.1	Caspase-3 Prozessierung nach CD30-Stimulation in $\Delta$ N133 Zellen (Western Blot) .....	79
3.5.2	Nachweis der Prozessierung von Caspase-3 mittels Immunhistologie (APAAP-Methode) in I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N transfizierten Karpas 299 Zellen ( $\Delta$ N133).....	81
3.6	Herstellung der Positivkontrolle für den Apoptosenachweis .....	83
3.6.1	Apoptoseinduktion durch Etoposid bzw. Arsentrioxid in Zelllinien .....	83
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>86</b>
4.1	Blockierung der NF- $\kappa$ B Aktivität durch I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-Expression in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 .....	87
4.2	Der CD30 Signalweg .....	88
4.2.1	Die CD30-Stimulation in der ALCL-Zelllinie Karpas 299.....	88
4.2.2	Der CD30-Signalweg induziert die Apoptose in den I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen.....	93
4.3	Die Apoptose-Induktion in den Daudi und Karpas 299 Zelllinien durch Zytostatika (Positivkontrollen).....	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>117</b>



# 1 Einleitung

Die lymphatischen Gewebe mit zirkulierenden Lymphozyten bilden das lymphatische System, das als Schutzmechanismus der Organismus gegen Bakterien, Viren, Parasiten und Toxine dient [1]. Man unterscheidet zwei Immunantworten: (i) die angeborene Immunantwort, die unspezifisch ist und als erste Abwehrreaktion gegen Infektionen dient und (ii) die erworbene Immunantwort, die spezifisch auf bestimmte Pathogene reagiert. Bei letzterer spielen die Lymphozyten eine zentrale Rolle [2]. Die Lymphozyten, wie alle Zellen des Blutes, entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese Stammzellen befinden sich in der fötalen Leber bzw. dem Knochenmark des Erwachsenen. Die Lymphozyten entwickeln sich aus ihren Vorläuferzellen in den primären lymphoiden Organen, während sich T-Lymphozyten im Thymus entwickeln. Die B-Zell-Entwicklung findet im Knochenmark des Erwachsenen bzw. in der fötalen Leber statt. T- und B-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben (Milz, Lymphknoten, lymphoides Gewebe des Magen-Darm-Trakts, Atemwege und Haut) reagieren auf fremde Antigene, indem sie proliferieren bzw. sich differenzieren [3]. Aktivierte B-Zellen entwickeln sich über die Keimzentrumsreaktion zu Gedächtnis-B-Zellen und zu langlebigen Antikörperproduzierenden Plasmazellen [1]. Die aktivierten T-Zellen sezernieren eine Vielzahl von Botenstoffen wie Lymphokine, Interleukine oder Zytokine. T-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich [3].

## 1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Die malignen Lymphome umfassen eine heterogene Gruppe von bösartigen Tumoren des lymphatischen Systems. Sie werden nach morphologischen Kriterien in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome eingeteilt [1;4]. Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) leiten sich in den meisten Fällen von reifen B-Zellen (85 %) und weniger häufig von T-Zellen ab [1;5]. Die Häufigkeit steigt mit dem Alter und liegt bei Männern ~ 50 % höher als bei Frauen. NHL kommen in Nord-Amerika und West-Europa häufiger vor als in Asien und Ost-Europa [6]. Viele NHL zeigen charakteristische genetische Veränderungen – vor allem rekurrente Translokationen –, die eine Aktivierung von Protoonkogenen (z. B. *c-MYC*, *BCL-6*, *BCL-2*) oder eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z. B. *p53*, *p16*, *ATM*) [engl. ataxia

telangiectasia mutated]) zur Folge haben [1]. Diese Translokationen entstehen häufig im Zusammenhang mit den Veränderungen der DNA, wie dies im Rahmen der Antigenrezeptor-Umlagerung oder des Klassenwechsels bei den Immunglobulinen der Fall ist. Auch die Einführung von somatischen Mutationen in den Immunglobulinen, die sich im Rahmen der Keimzentrumsreaktion der B-Zellen physiologischerweise abspielt, bewirkt Veränderungen in anderen Genen (z. B. *BCL-6*, *FAS*) [7]. Unkontrollierte oder fehlgeleitete somatische Hypermutationen können über diesen Weg ebenfalls zur Lymphomentstehung beitragen.

Bei den T-NHL (NHL vom T-Zell-Typ) sind im Vergleich zu den B-NHL (NHL vom B-Zell-Typ) weit weniger charakteristische chromosomale Veränderungen bekannt. Eine Ausnahme bildet das anaplastische großzellige T-Zell Lymphom (ALCL), das in etwa der Hälfte der Fälle mit einer sehr charakteristischen Translokation zwischen den Chromosomen 2 und 5 assoziiert ist [8;9].

**Tabelle 1-1: Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) Subtypen [1]**

- 
- Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL)
  - Lymphoplasmazytische Lymphom
  - Mantelzell-Lymphom
  - Follikuläres Lymphom
  - MALT (engl. mucosa-associated lymphoid tissue)-Lymphom
  - Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)
  - Burkitt-Lymphom
  - Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL)
- 

### **1.1.1 Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL)**

Das anaplastische großzellige T-Zell Lymphom (engl. Anaplastic Large Cell Lymphoma, ALCL) wurde von Stein et al. 1985 [10] als neue Lymphomentität beschrieben. Die großen pleomorphen Blasten breiten sich im Lymphknotensinus aus und zeigen eine konstante Expression des Zytokinrezeptors CD30 (früher auch als Ki-1 bezeichnet) [8-10]. Das ALCL wurde in der „Revised European American Lymphoma“ (R.E.A.L)-Klassifikation [4] und später in der „World Health Organization“ (WHO)-Klassifikation [5] als eigene Lymphomentität aufgenommen. Unter histologischen Kriterien wird die Heterogenität dieses

Lymphoms verdeutlicht. Der klassische Typ (70 % der Fälle) ist durch große pleomorphe Tumor-Zellen mit reichlich Zytoplasma und zahlreiche Vakuolen, chromatinarme hufeisenförmige oder nierenförmige Kerne und zahlreiche Nukleoli charakterisiert [8;9]. Die Zellen mit diesem zytologischen Charakteristikum, benannt als „hallmark“-Zellen, zeigen sich auch in weiteren morphologischen Varianten, wie die kleinzellige und lymphohistiozytische Varianten [8;9] (siehe Tabelle 1-2). Das anaplastische großzellige Lymphom leitet sich praktisch immer von T-Zellen ab [8;9], welche die Expression der ε-Kette des CD3 Komplexes des T-Zell Rezeptors (TCR) bzw. die wenigen Fälle der Expression von CD4 oder CD8 zeigen [8]. Die meisten ALCL Fälle mit einem Null-Zellphänotyp zeigen einen T-Zellgenotyp mit einer klonalen Umlagerung der TCR-γ und -β Gene [8;11] und exprimieren zytotoxische Moleküle wie Perforin, Granzyme B und TIA-1 (engl. T-cell-restricted intracellular antigen-1).

**Tabelle 1-2:** Morphologische Subformen von ALCL [8]

Histologische Subformen	CD30 Expression	EMA <sup>+</sup> Fälle
<b>Klassischer Typ</b>	positiv	Majorität
Riesenzellreiche Form	positiv	Minorität
<b>Kleinzellige Variante *</b>	positiv (hauptsächlich große Zellen)	Majorität **
<b>Lymphohistiozytische Form *</b>	positiv	Majorität **
Hodgkin-ähnliche Variante	positiv	Minorität
Seltene Subformen		
Sarkomatoide Form	positiv	NDA
Neutrophilen-reiche Form		
Eosinophilen-reiche Form		
Siegelringzellige Variante		

NDA zeigt keine verfügbaren Daten

\* Die kleinzellige Variante ist eine Mischung aus kleinen, mittel-großen und großen Lymphoid-Zellen [8]. Die lymphohistiozytische Variante besteht aus kleinen neoplastische Zellen gemischt mit großen „hallmark“-Tumorzellen und reaktiven Histiozyten [9].

\*\* gewöhnlich detektierbar auf den größeren Zellen

*Translokation (2;5) (p23;q35) beim Anaplastischen großzelligen Lymphom:*

Im Gegensatz zu anderen chromosomalen Translokationen (t), welche eine Aktivierung von Protoonkogenen zur Folge haben, führt die chromosomale Translokation (2;5) (p23;q35) zur

Expression eines Fusionsproteins aus NPM (engl. nucleophosmin) und ALK (engl. anaplastic lymphoma kinase). Dieses Fusionsprotein besteht aus der 80 kDa großen N-terminalen Oligomerisierungs-Domäne des NPM und der C-terminalen intrazellulären Domäne des ALK [8;9;12;13]. Während das Kernprotein NPM ubiquitär exprimiert vorkommt, ist die Expression des ALK-Proteins (Wildtyp) auf Zellen in der Entwicklung und Reifung des zentralen und peripheren Nervensystems beschränkt [9]. Zusätzlich zur t(2;5) gibt es bei den ALCL variante Translokationen, bei denen es zur Entstehung von anderen Fusionsproteinen (X-ALK) kommt, die als Folge einer Translokation des *ALK* Gens mit alternativen chromosomalen Partnern („X“) entstehen [8;9;13].

#### *Klinische Eigenschaft von ALCL:*

Die ALCL können in zwei klinische Formen, das primär systemische und das primär kutane ALCL, unterteilt werden. Die primäre systemische ALCL macht bei Erwachsenen 2%-8% der Non-Hodgkin-Lymphome, bei Kindern ca. 20% - 30% der großzelligen Lymphome aus [8]. Innerhalb der systemischen ALCL wird darüber hinaus in die Fälle unterschieden, die mit einer chromosomalen Translokation (2;5) oder (2;X [X: alternativen chromosomal Partner]) bzw. mit der Expression des ALK-Proteins assoziiert sind. Die primäre kutane ALCL bildet ca. 10% aller Hautlymphome, welche vor allem ältere Menschen betreffen (Altersdurchschnitt ~ 60 Jahre) [9]. Die primären kutanen ALCL gehen nicht oder extrem selten mit einer t(2;5) bzw. ALK-Expression einher [8;9].

## **1.2 Die Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie und ihre Liganden**

#### *Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor Superfamilie:*

Zytokine übermitteln durch die Wechselwirkungen mit den spezifischen hochaffinen Zelloberflächen-Rezeptoren ihre biologischen Signale an die Zielzellen [14]. Durch die Klonierung der Rezeptoren wurden sie als drei große Rezeptorfamilien identifiziert: Hämatoopoietin Wachstumsfaktor Rezeptor (HGFR) Familie, Immunglobulin (Ig)-Supergen Familie und die Mitglieder der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor Familie [14]. Für die TNF-Rezeptor Familie wurden bisher 29 Mitglieder beschrieben [15]. Die TNF-Rezeptor

Familie umfasst bei Säugetieren Typ 1-Membranproteine und sie werden durch eine unterschiedliche Anzahl von Cystein-reichen Domänen in ihren extrazellulären Regionen gekennzeichnet [16]. Die zytoplasmatischen Domänen enthalten keine intrinsischen Tyrosin- oder Serin/Threonin Kinase-Domänen [16]. Manche Mitglieder dieser Familie, sogenannte Todesrezeptoren (FAS [CD95/APO-1], TNFR-I, DR3 [TRAMP], DR4 [TRAIL-R1], DR5 [TRAIL-R2], DR6, EDAR), enthalten die sogenannte Todesdomäne (engl. death domain, DD), die aus ~ 60-70 Aminosäuren besteht und das Todessignal bzw. die Apoptose vermittelt [17;18]. Die weiteren Mitglieder dieser Rezeptorsuperfamilie, die keine Todesdomäne enthalten, sind bekannt als TNFR-II, CD40, CD30 [15]. Nach der Aktivierung der Rezeptoren durch Liganden erfolgt eine Trimerisierung oder Multimerisierung des Rezeptors [16;19]. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass in Abwesenheit des Liganden die Selbst-Vereinigung des Rezeptors durch eine PLAD (engl. pre-ligand-binding assembly domain) Region erfolgt [20;21]. Außer diesem membrangebundenen Rezeptorkomplex gibt es die löslichen Formen, welche durch proteolytische Spaltung (z. B. bei TNFR-I, TNFR-II, CD27, CD30, CD40, FAS) bzw. alternatives Spleißen (wie 4-1BB) zustande kommen [16;22].

#### *Tumor Nekrose Faktor (TNF) Liganden Superfamilie:*

Für die TNF-Rezeptorsuperfamilie wurden 19 Liganden beschrieben [15]. Beispiele sind TNF, LT $\alpha$ , LT $\beta$ , CD27 Ligand (L), CD30L, CD40L, 4-1BBL, OX40L und FASL [15;19]. Diese gehören zur TNF-Superfamilie und sind Typ 2-Membranproteine. Die extrazelluläre (C-terminal) Region des Liganden ist für die Interaktion mit TNF-Rezeptoren verantwortlich [16], welche eine geringe Sequenzhomologie zwischen den TNF-Liganden Familien zeigt [19]. Die meisten Liganden funktionieren als Trimer/Multimere membrangebundene Proteine, somit induzieren sie die Aggregation von Rezeptoren. Dabei können eine wenige Mitglieder, wie TNF und FAS Ligand, auch als lösliche Formen wirken [16].

### **1.2.1 Tumor Nekrose Faktor (TNF) assoziierte Proteine**

Die Bindung von TNF-Liganden führt zur Trimerisierung von Rezeptor-Monomeren [19] und anschließend zur Interaktion des zytoplasmatischen Rezeptoranteils über spezifische Bindungsmotive mit den verschiedenen intrazellulären Adaptormolekülen. Zwei Klassen intrazellulären Adaptormolekülen können unterschieden werden: TRAFs (engl. TNF receptor-

associated factors) und Todesdomänen (engl. death domain, DD)-Moleküle. Bisher sind sechs Mitglieder der TRAF-Familie in Säugetieren identifiziert worden [19]. TRAFs interagieren mit ihrer konservierten C-terminalen Region (TRAF-Domäne) mit den zytoplasmatischen Regionen der TNF-Rezeptoren. Die TRAF-Domäne dient für die Homo- oder Hetero-Oligomerisierung innerhalb der TRAF-Familie. Die meisten TRAF-Proteine haben N-terminale Ring-Finger- und verschiedene Zink-Finger-Strukturen [23]. Zu den Adaptormolekülen mit der Todesdomäne gehören FADD (engl. Fas associated death domain) /MORT-1, RIP (engl. receptor interaction protein) und TRADD (engl. TNFR associated death domain). Sie interagieren über ihre Todesdomäne mit der Todesdomäne der TNF-Rezeptorsuperfamilie [16;19].

### 1.2.2 Der Zytokinrezeptor CD30 und CD30 Ligand

Der Zytokinrezeptor CD30 (Ki-1) wurde ursprünglich als ein Oberflächenmolekül identifiziert, welches auf Hodgkin- und Reed-Sternberg (RS)-Zellen des Hodgkin-Lymphoms exprimiert wird [10]. Neben den Hodgkin Lymphomen zeigen auch die Anaplastisch Großzelligen Lymphome (ALCL), Lymphomatoide Papulose (kutanen T-Zell-Lymphom) eine konstante CD30-Expression [10]. In den übrigen Lymphomentitäten wird eine CD30-Expression der Tumorzellen nur vereinzelt und nicht als konstantes bzw. charakteristisches Merkmal angetroffen. Im normalen lymphatischen Gewebe beschränkt sich die Expression von CD30 auf wenige extrafollikuläre aktivierte T- und B-Blasten und B-Blasten am Rand von Keimzentren [24]. Der CD30 Rezeptor findet sich auch regelmäßig auf virustransformierten (engl. human T cell lymphotropic virus-1, -2 [HTLV-1,-2]; Epstein-Barr virus [EBV]) T- und B-Zellen [10;24]. Die Expression von CD30 außerhalb des lymphatischen Systems findet sich außerdem bei wenigen Tumoren, wie embryonalen Karzinomen [25].

#### *CD30-Proteinstruktur:*

Das menschliche *CD30* Gen ist lokalisiert auf Chromosom 1p36 [26]. Der CD30 Rezeptor ist Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie vom Typ 1-Transmembranprotein [24;26]. Die biochemische Darstellung hat gezeigt, dass der CD30 Rezeptor mit 120 kDa Größe durch Glykosylierung aus einem Vorläufer-Protein (~ 84 kDa) entsteht. Die lösliche Form des CD30

Rezeptors (sCD30) hat eine Größe von 85 kDa, welche wahrscheinlich durch die proteolytische Spaltung des membrangebundenen CD30-Moleküls zustande kommt [27]. Der Zytokinrezeptor CD30 besteht aus einem Führungspeptid (engl. leader peptide) von 18 Aminosäuren (AS), extrazellulärer Domäne mit 365 AS, einer 24 AS langen transmembranen Region und der zytoplasmatischen Domäne mit 188 AS [24]. Die extrazelluläre Domäne besitzt sechs Cystein-reiche Motive mit ~ 40 AS [24], die nach dem dritten durch eine sogenannte „hinge“-Region (~ 50 AS) unterbrochen sind [27] (siehe Abbildung 1-1). Die zytoplasmatische Domäne ist spezifisch für CD30. Es besteht keine Sequenzhomologie mit anderen Mitgliedern der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR)-Familie, was auf eine Differenz im Signalmechanismus hindeutet [27]. Die zytoplasmatische Domäne von CD30 besitzt keine Sequenz von einer katalytischen Kinase-Aktivität [27].

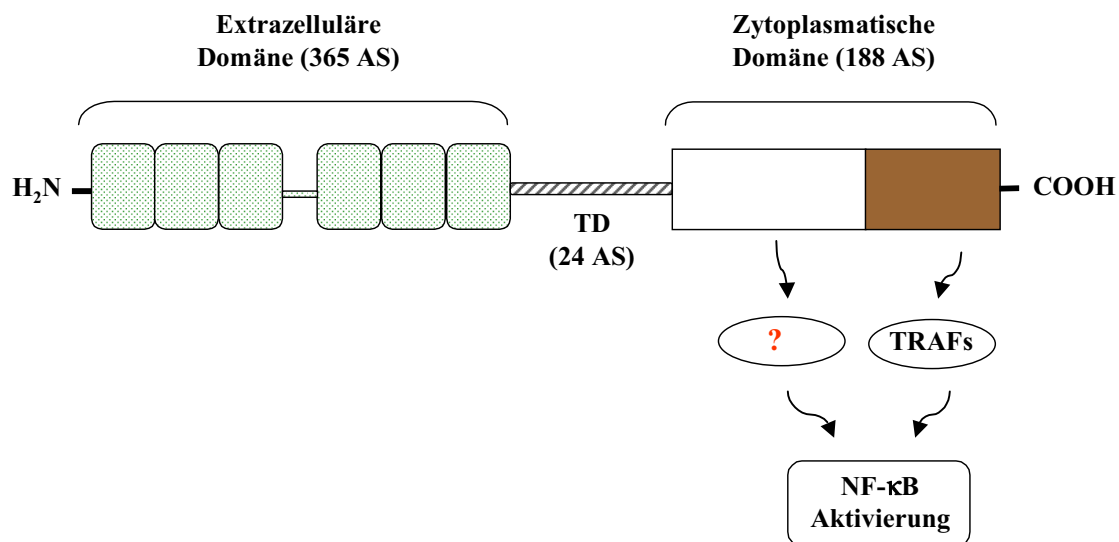
#### *CD30 Ligand (CD30L):*

Der CD30 Ligand (CD153) ist ein Typ 2-Membranglykoprotein (40 kDa Größe) und gehört zur TNF-Superfamilie [16;23]. Das Gen für den CD30L befindet sich auf Chromosom 9q33. Der CD30 Ligand bildet eine Homotrimerie als funktionsfähige Struktur [16;23] und ist als eine membrangebundene Form vorhanden [16], die beim Menschen mit einer extrazellulären Domäne (C-terminales Ende mit 172 AS) und der zytoplasmatischen Domäne (N-terminales Ende mit 40 AS) zu finden ist. Die Expression von CD30L findet sich bei Neutrophilen, Eosinophilen, aktivierten T-Zellen und ruhenden B-Zellen [23].

### **1.2.3 CD30-vermittelte Signalwege**

Die Aktivierung des CD30 Rezeptors kann durch Bindung des CD30 Liganden (siehe 1.2) oder eines CD30-spezifischen Antikörpers [28-30] erfolgen, was eine Trimerisierung des Rezeptors zur Folge hat [19]. Die zytoplasmatische Domäne (PEQET, EEEGKE, EPPLGSC Motive) des Rezeptors assoziiert mit den Adaptormolekülen TRAF (engl. TNF receptor-associated factor) 1, 2, 3, und 5 [26;31-33]. TRAF2 und TRAF5 vermitteln die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [23;29;31;34]. Das „crosslinking“ des CD30 Rezeptors führt zu einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der die Aktivierung des NF- $\kappa$ B zur Folge hat [35]. CD30-Aktivierung führt auch zur Aktivierung weiterer Signalwege, wie SAPK (engl. stress-activated kinase) /JNK (engl. c-jun N-terminal kinase) [23;36]. TRAF1, TRAF2 und TRAF3

binden an das C-Terminus des CD30 Rezeptors (42 Aminosäuren), der in zwei Regionen, 2A und 2B, unterteilt ist. Dabei wird die Bindung an TRAF1 und TRAF2 durch beide Regionen vermittelt, während TRAF3 nur an die 2A Region binden kann [23;37]. Außerdem wurde beschrieben, dass die zytoplasmatische Domäne auch eine TRAF-unabhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung vermitteln kann [23;37] (siehe Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des CD30-Rezeptors und seiner funktionellen Domäne.**

Die C-terminale Domäne besitzt Regionen (braun gefärbt), die die CD30 Signale über TRAF-Proteine vermitteln. Möglicherweise besitzt der C-terminale Abschnitt auch eine TRAF-unabhängige NF- $\kappa$ B Aktivierungsregion (weiße Kästchen). Die extrazelluläre Domäne besitzt sechs der Cystein-reichen Wiederholungsmotive (hellgrüne Kästchen mit Punkten). TD: Transmembrane Domäne.

Modifiziert aus: [23]

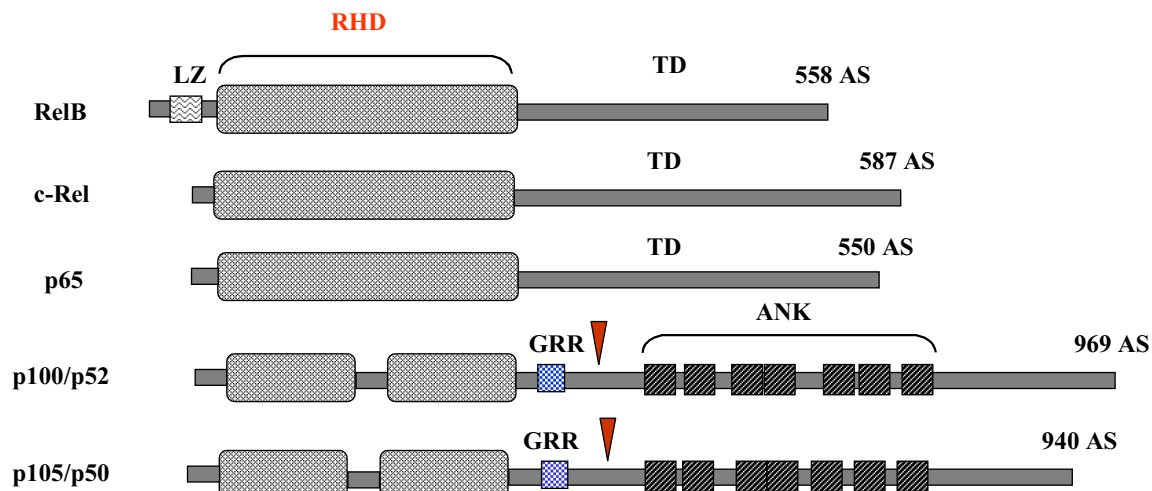
## 1.3 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B; Struktur, Inhibitoren, Signalweg

### 1.3.1 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B Familie

NF- $\kappa$ B (engl. nuclear factor-kappa B) ist ein eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der in allen Zelltypen vorhanden sein kann [38]. 1986 wurde NF- $\kappa$ B zunächst als ein nukleärer Faktor beschrieben, der die Transkription des Immunglobulins kappa ( $\kappa$ ) leichte Kette in B-Zellen reguliert [39]. NF- $\kappa$ B ist ein Mitglied der Rel-Familie, die aus konservierten Proteinen mit



ähnlichen Strukturen besteht. In Säugetieren sind fünf Mitglieder dieser Familie vorhanden: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), NF- $\kappa$ B2 (p100/p52). Sie liegen als Homo- oder Heterodimeren vor, welche wie p50:p65, p50:c-Rel, p65:p65, p65:c-Rel die Transkription von Zielgenen aktivieren. Andere Kombinationen der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten wie z. B. p50:p50, p52:p52 können aber auch zur Repression von bestimmten Zielgenen führen [38;40]. NF- $\kappa$ B wird durch Assoziation an inhibitorische Proteine, bekannt als I $\kappa$ B (engl. Inhibitor of NF- $\kappa$ B), reguliert [38;41]. Die NF- $\kappa$ B/Rel Proteinfamilie besitzt in der N-terminalen Region eine stark konservierte Rel-Homologie-Domäne (engl. rel homology domain, RHD) von 300 Aminosäuren Länge. RHD ist verantwortlich für die Dimerisierung, DNA-Bindung und die Interaktion mit den I $\kappa$ B-Proteinen [38;40;42]. Diese Proteinfamilie besitzt auch eine Kernlokalisationssequenz (engl. nuclear localization sequence, NLS) [38;42]. p65 (RelA) und c-Rel zeigen eine Transkriptions-aktivierende Domäne, die für die Aktivierung die Transkription benötigt wird. Dimere, die nur aus Rel Proteinen ohne die Transkriptions-aktivierende Domäne bestehen, wie p50, reprimieren die Transkription [42]. p50 und p52 Proteine werden wahrscheinlich durch post- oder ko-translationale Vorgänge aus den Vorläuferproteinen p100, p105 hergestellt, die in ihren C-terminalen Regionen mehrere Ankyrin-Wiederholungen aufweisen [38;40] (siehe Abbildung 1-2). Die NF- $\kappa$ B Dimeren binden mit unterschiedlichen Affinitäten an die DNA-Zielsequenz („ $\kappa$ B site“) mit der Konsensussequenz „GGGRNNYYCC“ (R: Purine, Y: Pyrimidine, N: jede Base) [42], welche im Promotor und Enhancer der verschiedenen Gene vorhanden ist [38].



**Abbildung 1-2: Übersicht über die Protein NF- $\kappa$ B-Familie aus Säugetieren.**

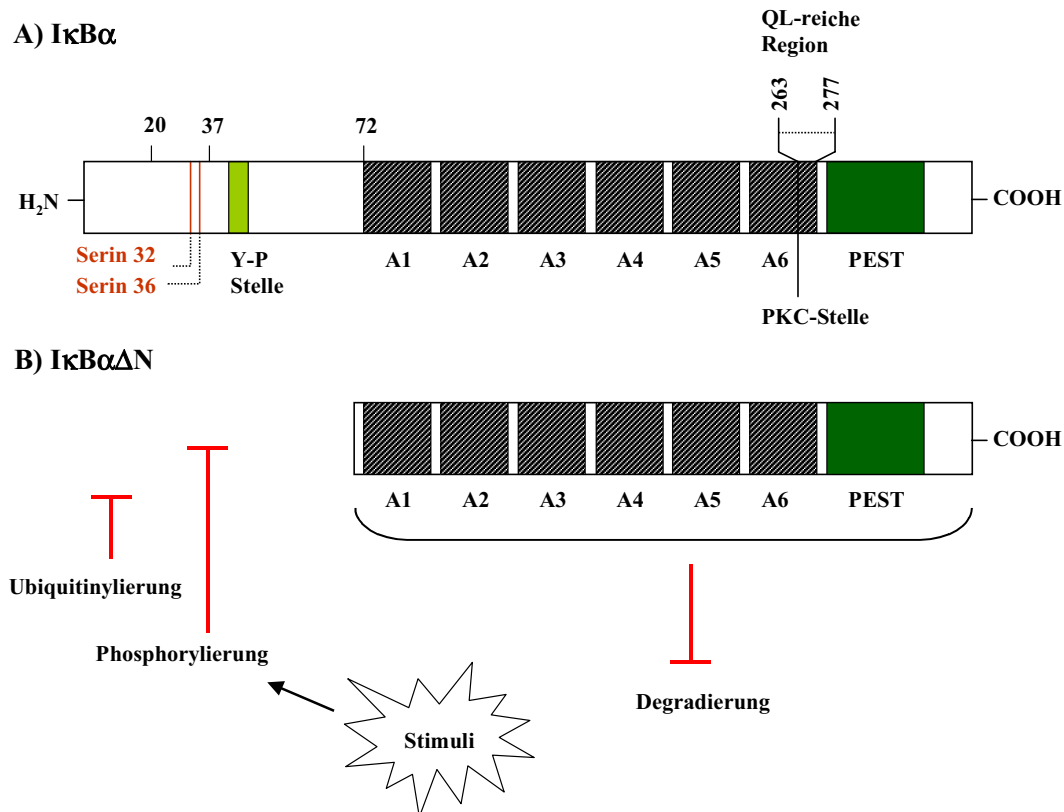
Das charakteristische Merkmal der NF- $\kappa$ B-Proteine ist die Rel-Homologie-Domäne (RHD), im hellgrauen Kasten gezeigt. Einige Mitglieder der Familie besitzen außerdem im C-terminalen Bereich eine Transaktivierungsdomäne (TD). LZ: Leucin-Zipper Domäne von RelB. Die Ankyrin-Wiederholungsregionen (ANK) sind im Kästchen mit Querstreifen dargestellt. Die roten Pfeile zeigen die endoproteolytische Spaltungsstelle für p100/p52 bzw. p105/p50. GRR: die Glycin-reiche Region (blau-weiße Kästchen) spielt eine Rolle bei der Degradierung des Proteins. Die Anzahl von Aminosäuren (AS) steht für jedes Protein in der rechten Seite. Entnommen aus: [38]

### 1.3.2 Die inhibitorischen NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) Proteine

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wird durch seine zytoplasmatischen Inhibitoren I $\kappa$ B (engl. Inhibitor of NF- $\kappa$ B) reguliert. In unstimulierten Zellen sind die meisten NF- $\kappa$ B/Rel Dimere an I $\kappa$ Bs im Zytoplasma gebunden [40]. In Säugetieren gibt es sieben Mitglieder der I $\kappa$ B-Familie: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3 sowie die Vorläufer-Rel Proteine p100 und p105 [38;40;42]. Alle I $\kappa$ B-Proteine bestehen aus sechs oder sieben Ankyrinregionen [42], die mit der Rel-Homologie-Domäne (RHD) von NF- $\kappa$ B interagieren, so dass die Kernlokalisationssequenz (NLS) von NF- $\kappa$ B maskiert wird [38;40;42;43]. Nur die zytoplasmatischen Proteine wie I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  besitzen eine N-terminale regulatorische Region, die für eine Stimuli-induzierte Degradierung des Proteins benötigt wird [42]. Der C-Terminus von I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  besteht aus einer sogenannten PEST-Domäne, die reich an Prolin, Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin ist und eine Phosphorylierungsstelle hat. Die PEST-Domäne reguliert die Stabilität der I $\kappa$ Bs [44]. Die Expression der I $\kappa$ Bs, außer I $\kappa$ B $\beta$ ,

wird durch NF- $\kappa$ B reguliert [42]. I $\kappa$ B $\alpha$  wird durch Stimuli schnell degradiert, was eine rasche Aktivierung des NF- $\kappa$ B zur Folge hat. I $\kappa$ B $\alpha$  seinerseits ist wiederum Zielgen von NF- $\kappa$ B und wird durch die Aktivität von NF- $\kappa$ B in seiner Expression gesteuert. Neu synthetisiertes I $\kappa$ B $\alpha$  kann in den Zellkern gelangen und NF- $\kappa$ B von DNA entfernen. Hierdurch findet ein Ausschleusen von NF- $\kappa$ B in das Zytoplasma statt, wodurch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Bindung an I $\kappa$ B $\alpha$  in einen sogenannten „feedback pathway“ blockiert wird (siehe Abbildung 1-4). Die Kernexportsequenz (engl. nuclear export sequence, NES) von I $\kappa$ B $\alpha$  spielt hierbei eine entscheidende Rolle für diesen Ablauf [42;45]. Der Unterschied zwischen den I $\kappa$ Bs bezieht sich auf ihre Struktur bzw. auf ihre Affinität zu bestimmten NF- $\kappa$ B/Rel Komplexen. Die meisten p50:p65 und p50:c-Rel-Komplexe werden durch I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  Proteine reguliert. I $\kappa$ B $\epsilon$  ist der spezifische Inhibitor der p65 und c-Rel-Komplexe [38;44]. Das nukleäre Protein Bcl-3 hat die Bindungsspezifität für p50 und p52-Homodimeren, welche bei der Aktivierung der Transkription beteiligt ist [38;44]. I $\kappa$ B $\gamma$  wurde bisher nur in lymphatischen Zellen gefunden. Es zeigt eine Sequenzähnlichkeit mit der I $\kappa$ B-ähnlichen C-terminalen Region von p105 und das I $\kappa$ B $\gamma$  Genprodukt ist das Ergebnis einer alternativen Promotor-Verwendung der C-terminalen Region des p105. I $\kappa$ B $\gamma$  inhibiert wahrscheinlich nur p50 oder p52-Homodimere [38]. Das nukleäre Protein I $\kappa$ B $\zeta$  (MAIL/INAP) gehört vermutlich ebenfalls zur I $\kappa$ B-Familie von Säugetieren und zeigt eine geringe Homologie zu Bcl-3 und weiteren I $\kappa$ Bs, seine Funktion konnte bisher noch nicht identifiziert werden [45].

**I $\kappa$ B $\alpha$**  ist ein Protein mit 37 kDa Größe (Aminosäuren [AS] 1-317) [38] und besteht aus drei Domänen: N-terminal (72 AS), sechs Ankyrinwiederholungen (A1-A6) und C-terminal (AS 277-317) (siehe Abbildung 1-3). Jede Domäne spielt eine wichtige Rolle für die NF- $\kappa$ B Signalisierung [46]. Die N-terminale Domäne ist in die Signal-induzierte Degradierung involviert, die die Phosphorylierung des Serin 32 und Serin 36 [38;47] und die Ubiquitylierung Lysin 21 und Lysin 22 [48] zur Folge hat. Die Mutationen in diesen Aminosäuren verhindern die Degradierung des Proteins [46]. Infolge der Bindung des sogenannten Superrepressors I $\kappa$ B $\alpha$  (srI $\kappa$ B $\alpha$ , ein mutiertes I $\kappa$ B $\alpha$ ) an NF- $\kappa$ B findet nach Stimulation keine Phosphorylierung bzw. Degradierung des Proteins statt [49] (siehe Abbildung 1-3). Dadurch bleibt I $\kappa$ B $\alpha$  an NF- $\kappa$ B weiter gebunden, was eine Inhibition der NF- $\kappa$ B Aktivierung in der Zelle zur Folge hat [49]. Die Hodgkin-Zelllinie L428 zeigt nach Transfektion mit einer Adenoviralen srI $\kappa$ B $\alpha$  Mutante (srI $\kappa$ B $\alpha$ , AS 71-317) eine Inhibition der NF- $\kappa$ B Aktivität und eine Induktion von Apoptose [50].



**Abbildung 1-3: Die schematische Darstellung des menschlichen I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins (Aminosäuren 1-317) und eines trunkierten I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N).**

**A:** Die N-terminale Domäne von I $\kappa$ B $\alpha$  besitzt zwei Regionen: zwei Serine an der Stelle 32 und 36 (DSGLDS) und eine Konsensus Tyrosin-Phosphorylierungsstelle (Y-P Stelle; KDEEYEQMVK) (Aminosäure [AS] zwischen 38 und 47) und es ist begleitet von einer Ankyrinwiederholungsdomäne, die aus sechs Ankyrinwiederholungen (A1-A6) besteht. Die C-terminale Region (AS 277-317) besteht aus PEST Sequenzen und einer Glutamin-(Q), Leucin-(L)-reichen Region (AS 263-277). Die dargestellten Aminosäuren 37 bzw. 72 stehen in Bezug zu dem verkürzten Superrepressor I $\kappa$ B $\alpha$  (srI $\kappa$ B $\alpha$ ). Modifiziert aus: [51]

**B:** Die schematische Darstellung eines trunkierten I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N, AS 71-317), das durch Stimulation keine Phosphorylierung, Ubiquitinylierung bzw. Degradierung zeigt. Siehe Text.

### 1.3.3 Der IKK (I $\kappa$ B Kinase) Komplex

Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B findet durch den aktivierten I $\kappa$ B Kinase (IKK)-Komplex statt, der eine Größe von 700-900 kDa aufweist [42;45]. Bisher sind drei Einheiten dieses Komplexes bekannt: die IKK $\alpha$  (IKK1) und IKK $\beta$  (IKK2) dienen als katalytische Einheit des Komplexes. Sie zeigen eine starke Proteinhomologie, welche aus einer N-terminalen

Kinasedomäne bzw. „Helix-Loop-Helix“ (HLH), Leucin-Zipper (LZ) Motiven besteht. Die dritte Komponente ist ein 48 kDa großes Protein, IKK $\gamma$ /NEMO (engl. NF- $\kappa$ B essential modulator) und dient als regulatorische Einheit des IKK-Komplexes [42;45]. Es besteht aus sogenannten „coiled coil“ Strukturen mit einem LZ Motiv nahe der C-terminalen Region [42]. Die Dimerisierung von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  findet über das LZ Motiv statt, wobei diese Dimerisierung für die Kinase-Aktivität benötigt wird [45;52]. Eventuell interagiert IKK $\gamma$  mit IKK $\alpha$ -IKK $\beta$  Dimer und ihre Selbst-Assoziation dient der Entstehung des 700-900 kDa Komplexes [42]. IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  besitzen wie andere Proteinkinasen in ihrer Kinasedomäne eine sogenannte Aktivierungsschleife. Das Sequenzmotiv der Aktivierungsschleife ist bei beiden Kinasen identisch. Die Aktivierung des IKK-Komplexes findet durch die Phosphorylierung statt bzw. die Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife von IKK $\alpha$  bzw. IKK $\beta$  [42]. Mutationen in dieser Region bzw. das Ersetzen der Aminosäuren Serin (Ser 177, Ser 181 bei IKK $\beta$  und Ser 176 bei IKK $\alpha$ ) zu Alanin stehen mit der Verminderung der IKK-Aktivität in Verbindung. Außerdem spielt die „Helix-Loop-Helix“ (HLH) Region von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  bei der Aktivierung des IKK-Komplexes eine Rolle [42]. Es wurde gezeigt, dass IKK $\beta$  auch außerhalb der Aktivierungsschleife an Serinresten des HLH Motives (C-terminal) phosphoryliert wird [45]. Andererseits zeigen Proteinkinasen wie MAPKKK (engl. mitogen-activated protein kinase [K] kinase kinase) Familienmitglieder, NIK (engl. NF- $\kappa$ B inducing kinase), MEKK-1, -2, -3 und verschiedene PKC (engl. protein kinase C) Isozyme in ihren Wildtyp-Formen und bei Überexpression eine Aktivierung vom IKK-Komplex in Säugetieren [42].

### 1.3.4 Die zwei NF- $\kappa$ B Aktivierungswege

In den meisten Zellen bleibt NF- $\kappa$ B durch Assoziation mit den inhibitorischen I $\kappa$ B Proteinen im Zytoplasma in seinem inaktiven Zustand erhalten [38]. Dabei interagiert die Ankyrinregion der I $\kappa$ B Proteine mit der Rel-Homologie-Domäne (RHD) von NF- $\kappa$ B, wodurch die Kernlokalisationssequenz (NLS) von NF- $\kappa$ B maskiert wird [38;40;42;43]. Die Vorläufer-NF- $\kappa$ B/Rel p100 und p105 Proteine können ebenso als NF- $\kappa$ B-Inhibitoren wirken, da sie in ihrem carboxyterminalen Anteil die Ankyrin-Wiederholungsregionen (ANK) besitzen (siehe Abbildung 1-2), die sie mit den I $\kappa$ B-Familien gemeinsam haben (siehe 1.3.2).

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird durch verschiedene Stimuli ausgelöst [42;53] und durch die induzierte Degradierung des I $\kappa$ B Proteins bzw. partiellen Abbau von p100 oder p105 Proteinen intrazellulär vermittelt. Diese Degradierung wird durch Signal-induzierte Phosphorylierung gesteuert. Zahlreiche Stimuli wie proinflammatorische Zytokine, PAMPs (engl. pathogen-associated molecular patterns), die mit der TNFR-Superfamilie, Toll-like Rezeptor- (TLR) und Interleukin-1 Rezeptor -(IL-1R) Superfamilien in Verbindung stehen, haben die Aktivierung des I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplexes zur Folge [54]. Die IKK-Aktivität erfolgt durch die Phosphorylierung (an zwei konservierten Serinresten) innerhalb der Aktivierungsschleife der IKK $\alpha$  oder IKK $\beta$  und diese Phosphorylierung kommt entweder durch „upstream“ Kinasen (siehe 1.3.3) oder durch IKK selbst (Selbstphosphorylierung) zustande [40].

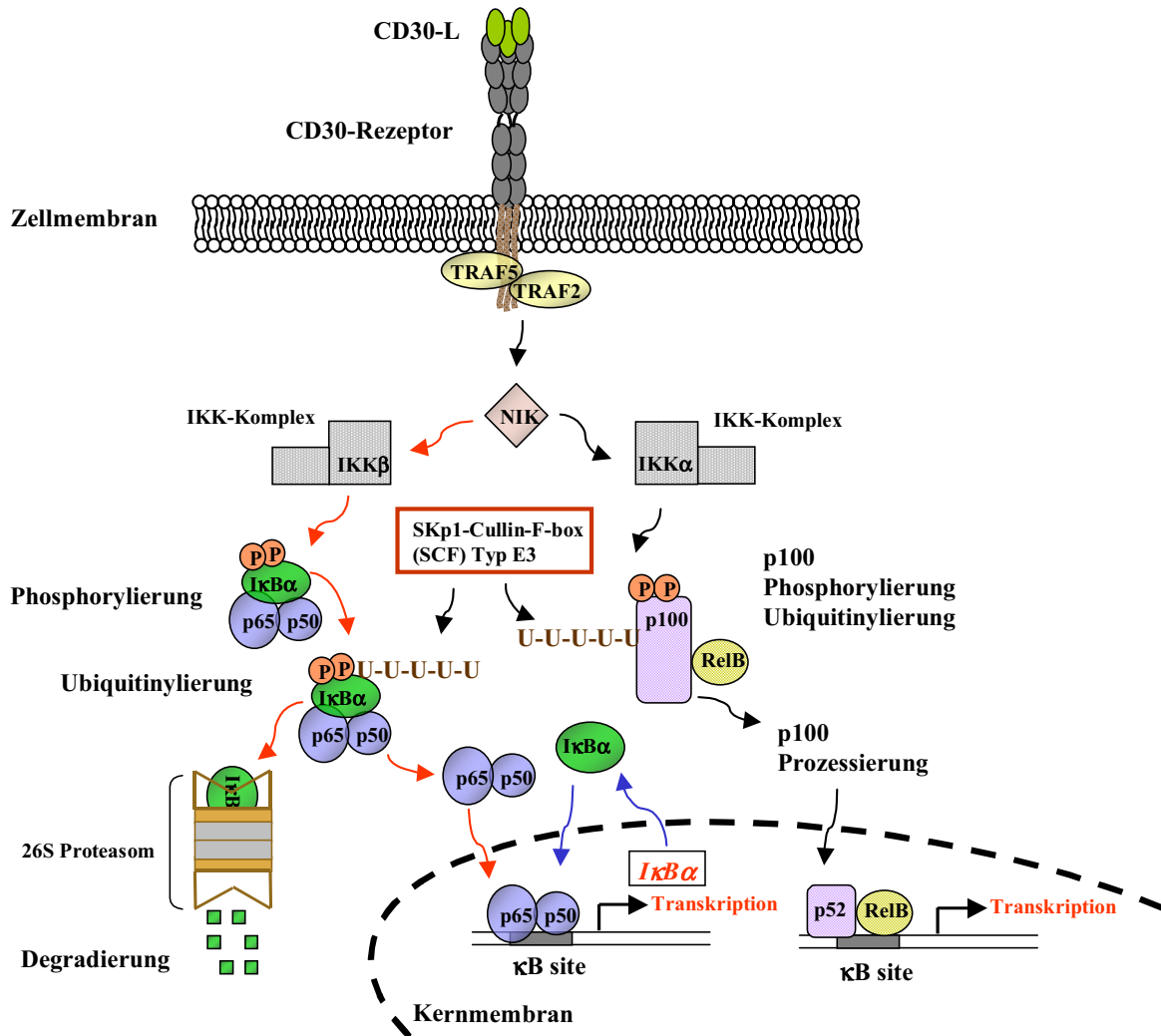
Bei dem klassischen NF- $\kappa$ B Aktivierungs-Signalweg („canonical“ Signalweg) werden überwiegend p50:p65 Heterodimere durch I $\kappa$ B $\alpha$  (jedoch nicht ausschließlich) reguliert [45]. Der aktivierte IKK-Komplex (IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ /NEMO) hat die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an Serin 32 und 36 zur Folge [45;54]. Auf diese Weise werden diese markiert und es erfolgt eine Polyubiquitinylierung der Lysin 21 und 22 durch eine spezifische Ubiquitinligase-Familie (SKp1-Cullin-F-box [SCF]-Typ E3). Diese Modifikationen ermöglichen eine Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch 26S Proteasom [42], die aus katalytischen (20S) und regulatorischen (19S) Einheiten bestehen [55]. Durch die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  wird die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) des NF- $\kappa$ B Dimer freigelegt, an Karyopherine gebunden und anschließend in den Zellkern transloziert [42], wo sie an „ $\kappa$ B“ Bindungsstellen in den Promotor- oder Enhancer-Regionen von Zielgenen binden kann (siehe Abbildung 1-4).

Ein weiterer NF- $\kappa$ B Aktivierungsmechanismus findet über einen sogenannten alternativen Signalweg („noncanonical“ Signalweg) statt. Über diesen Signalweg erfolgt die Phosphorylierung des p100 Inhibitorproteins durch IKK $\alpha$  an zwei Serinresten in der C-terminalen Region [56]. Anschließend findet die Polyubiquitinylierung Lysin 855 des p100 Proteins durch die Ubiquitinligase Familie SCF $^{\beta}$ -TrCP statt [45] und führt zur proteasomalen Degradierung des C-terminalen Proteins. Dieses hat die Freisetzung p52 bzw. die Prozessierung p100 zu p52 zur Folge [45;54;56;57]. p100 kann mit RelB NF- $\kappa$ B-Familienmitgliedern dimerisieren (p100:RelB) [40;54], so dass nach Prozessierung von p100 ein p52:RelB Dimer steht, das anschließend in den Zellkern transloziert wird und die Expression der Zielgene regulieren kann [54;58] (siehe Abbildung 1-4), während das Vorläufer-Rel Protein p105 ebenso wie p100 durch einen signalabhängigen Weg prozessiert

werden kann. Die Prozessierung p105 zu p50 kann auch in einem signalunabhängigen Weg vorkommen [38]. Die beiden Vorläuferproteine p105 und p100 besitzen eine Glycin-reiche Region (GRR) (siehe Abbildung 1-2), welche als eine Spaltungsanweisung dient. Dadurch findet die Abspaltung der I $\kappa$ B-ähnlichen C-terminalen Region der Proteine vor GRR statt [38;45].

### 1.3.5 Die CD30 vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung

Die Bindung des CD30 Liganden oder eines CD30-spezifischen Antikörpers an den CD30-Rezeptor führt zur Trimerisierung der Rezeptormoleküle (siehe 1.2.3), deren zytoplasmatische Domäne dann mit den TRAF (engl. TNF receptor-associated factor) Adaptorproteinen assoziieren kann, die für die Signalweiterleitung in der Zelle verantwortlich sind (siehe 1.2.1 und 1.2.3). Dabei sind insbesondere TRAF2 und TRAF5 für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B verantwortlich [23;29;31;34]. Dabei interagiert TRAF2-Protein mit NIK (engl. NF- $\kappa$ B inducing kinase) [23], was wiederum zur Aktivierung des I $\kappa$ B Kinase (IKK) Komplexes (IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ) führen kann (siehe 1.3.3) und damit kommt es zur Phosphorylierung von inhibitorischen NF- $\kappa$ B Proteinen (I $\kappa$ B $\alpha$ , p100). Weiterhin findet die Polyubiquitinylierung von Proteinen statt (siehe 1.3.4). Diese hat die Degradierung des I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins bzw. partiellen Abbau von p100 zur Folge (siehe Abbildung 1-4). Dadurch findet der NF- $\kappa$ B Aktivierungsmechanismus über die „canonical“ und „noncanonical“ Signalwege statt (siehe 1.3.4) [59]. TRAF2 kann auch weitere Kinasen wie MAPKKK (engl. mitogen-activated protein kinase [K] kinase kinase) bzw. MEKK1 (engl. MAP kinase kinase-1) aktivieren. Dies löst die Aktivierung von IKK $\beta$  aus, was wiederum zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt [23]. Weiterhin kann NIK mit anderen Mitgliedern der TRAF-Familie wie TRAF-1, -3, -5 und 6 assoziieren [23].



**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Signaltransduktion zur NF-κB Aktivierung am Beispiel des CD30 Rezeptors.**

Als Antwort auf die Bindung des CD30 Liganden (L) wird der IKK-Komplex (IKKα und IKKβ) aktiviert, was zur NF-κB Aktivierung durch den klassischen (rote Pfeile) bzw. alternativen (rechts, schwarze Pfeile) Signalweg führen kann. Die Aktivität von NF-κB wird durch IκBα in einem sogenannten „feedback pathway“ reguliert (blaue Pfeile). Siehe Text für Details (siehe 1.3.2 und 1.3.5).

### 1.3.6 Bedeutung von NF-κB als Transkriptionsfaktor

NF-κB hat als Transkriptionsfaktor eine große Bedeutung im Immunsystem. Durch eine Inaktivierung („knockout“) von NF-κB/Rel Genen in Mäusen wurde die Funktion der Mitglieder der NF-κB Familie aufgeschlüsselt. p50 oder c-Rel-defiziente Mäuse zeigten Defekte in der Proliferation von reifen Lymphozyten sowie in dem Antikörper-



Klassenwechsel (engl. class switch) und wiesen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegen bestimmte Pathogene auf [60]. Die p65 (RelA) defizienten Mäuse starben, wobei ihre Leber aufgrund des programmierten Zelltodes (Apoptose) eine massive Degeneration zeigte. RelB scheint bei der T-Zell vermittelten Immunität eine wichtige Rolle zu spielen [38]. Kombinierte p50/p65 Gen-Inaktivierung („knockout“) hatte einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung von Lymphozyten und zeigt, dass NF- $\kappa$ B auch eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Lymphozyten übernimmt [38].

Verschiedene Stimuli (z. B. Bakterien, Viren oder ihre Produkte) (siehe [53]) induzieren die NF- $\kappa$ B-Aktivität. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat die Induktion der Expression von zahlreichen Zielgenen zur Folge, welche u. a. für die Chemokine (wie IL-8, Eotaxin), Zytokine (z. B. IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ ), Adhäsionsmoleküle (z. B. ICAM-1, VCAM-1), Akute-Phase-Proteine (wie C-reaktives Protein) (siehe [53]) und induzierbare Effektor Enzyme (wie iNOS und COX-2) kodieren. Manche Zytokine bzw. Chemokine, die als Antwort auf die NF- $\kappa$ B Aktivität exprimiert werden, können die Einwanderung und die Reifung von Lymphozyten induzieren [40]. NF- $\kappa$ B ist auch an der Regulation eines breiten Spektrums von Genen beteiligt, die für die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (z. B. T-Zell Wachstumsfaktor IL-2, B/T-Zell Wachstumsfaktor IL-6 sowie Koloniestimulierende Faktoren M-CSF, G-CSF, GM-CSF) zuständig sind [61]. NF- $\kappa$ B reguliert die Transkription von Genen, die in immun- bzw. inflammatorische Antworten involviert sind [42].

Außerdem sind die Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie an der Kontrolle des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt. Die aktivierte NF- $\kappa$ B induziert die Pro-Überlebens-Gene in den meisten Zellen, dadurch entsteht ein Schutz dieser Zellen vor der Apoptose [42]. A20 ist ein Zinkfinger Protein und hat die Inhibition von TNF- $\alpha$ -vermittelter Apoptose zur Folge, wobei sich die „ $\kappa$ B“ Bindungsstelle im Promotor des *A20* Gens befindet [62]. Unter bestimmten Umständen und in bestimmten Zelltypen kann NF- $\kappa$ B Apoptose induzieren [42], wobei bis jetzt keine direkte Regulation von NF- $\kappa$ B in der Expression von pro-apoptotischen Genen (z. B. *Caspasen* oder pro-apoptotische *Bcl-2* Familienmitglieder) gefunden wurde [62]. NF- $\kappa$ B beeinflusst außerdem den Zellzyklus. Die aktivierte NF- $\kappa$ B kann die Transkription des *Cyclin D1* Gens regulieren [63], die den Übergang der Zellen aus der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase des Zellzyklus positiv regulieren kann. Dennoch wurde bewiesen, dass NF- $\kappa$ B/Rel Aktivität mit dem Zellzyklusarrest in Verbindung steht [62].

Die meisten Stimuli verursachen eine vorübergehende Aktivierung des IKK-Komplexes bzw. die NF- $\kappa$ B Aktivität in der Zelle. Eine dauerhafte NF- $\kappa$ B Aktivierung kann schädliche oder

tödliche Folgen haben, welche mit einem septischen Schock oder einer akuten Entzündung in Zusammenhang stehen [42]. Aufgrund der Beteiligung an der Regulation von wichtigen Prozessen wie Schutz vor Apoptose, Zellproliferation und Differenzierung kann die Deregulierung von NF- $\kappa$ B mit der Entstehung der Krankheiten bzw. Tumoren in Verbindung stehen. Die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B beim Hodgkin-Lymphom, die mit einer hohen Expression Zellzyklus-regulatorischer Proteine (z. B. Cyclin D2), anti-apoptotischen Proteinen (Bfl-1/A1, c-IAP-2, TRAF1, Bcl-x<sub>L</sub>) und Zelloberflächen-Rezeptoren (CD40 und CD86) in Hodgkin-/Reed-Sternberg Zellen korreliert, wird mit der Entwicklung dieses Lymphoms in Verbindung gebracht [50].

## 1.4 Apoptose

Die Zellen von multizellulären Organismen können aus verschiedenen Gründen durch Apoptose oder Nekrose absterben [64]. Die Apoptose ist ein physiologischer Selbstmordprozess der Zelle während der Embryonalentwicklung [65;66] und der Homöostase von Geweben [65;67]. Bei der Apoptose handelt es sich um ein genetisch gesteuertes Programm, das in den verschiedenen Spezies sehr konserviert erhalten ist [66;68-70]. Eine apoptotische Zellveränderung beginnt mit einer Schrumpfung, Ausstülpung der Zellmembran (sog. Plasmamembran-„Blebbing“) und einer Kondensation des Zellkerns und einer Degradierung der DNA. Die nukleären Fragmente und die Ausstülpung der Zellmembran bilden sog. apoptotische Körper (engl. apoptotic bodies), die von Nachbarzellen bzw. Makrophagen phagozytiert und abgebaut werden können [64;65;71;72]. Hierbei kommt es zu keiner Freisetzung zytosolischen Inhalts und der Vorgang wird nicht von Entzündungserscheinungen begleitet [64;65;71]. Apoptose ist ein energieverbrauchender Vorgang [67]. All dies macht die Apoptose klar unterscheidbar von der Zellnekrose, bei der es zu einer ungesteuerten Zellschwellung mit Zerstörung der Membranintegrität kommt, was zur unkontrollierten Freisetzung des zytoplasmatischen bzw. nukleären Inhalts ins interzelluläre Milieu führt. Als Antwort auf den nekrotischen Zelltod kommt es zu Entzündungsreaktionen[64;67;71].

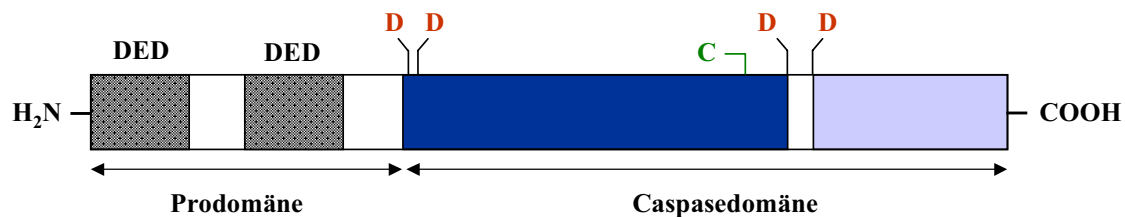
Die multizellulären Organismen benötigen ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und -elimination, um überleben zu können. Eine zu geringe bzw. übermäßige Apoptose wird mit einer Reihe von Krankheitsbildern, wie Autoimmunstörungen, Krebs, neurogenerative Erkrankungen (wie Alzheimer) u. v. a. in Verbindung gebracht [64;73].

Verschiedene physiologische bzw. pathologische Stimuli können Apoptose induzieren [67]. Zytokine, Hormone, Viren [74] sowie UV- oder  $\gamma$ -Strahlungen und Wachstumsfaktor-Entfernung [75] haben eine Apoptose-Induktion zur Folge, wobei Apoptose auch künstlich durch verschiedene biochemische Agenzien (wie Kinase-Inhibitoren) ausgelöst werden kann [67]. Zur Behandlung von Krebserkrankungen (z. B. auch hämatopoetische Tumore) werden neben verschiedenen Chemotherapeutika beispielsweise auch Topoisomerase I und II Inhibitoren eingesetzt, die in der Lage sind, Apoptose in den Tumorzellen zu induzieren [76].

### 1.4.1 Caspasen

In dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* wird die Apoptose durch die Genprodukte CED-3 und CED-4 vermittelt [68;77;78] und verwandte Gene wurden auch in Säugetieren identifiziert. Die Familie der Cysteinproteasen (Caspasen) entspricht dabei dem CED-3 [79]. Caspasen spielen eine wesentliche Rolle bei der Initiation und Ausführung der Apoptose [68;78;80]. In Säugetieren existieren mehr als 14 unterschiedliche Caspasen [68]. Elf verschiedene Caspasen sind bisher beim Menschen beschrieben worden [81;82]. Caspasen sind Cystein-Aspartat-Proteasen (engl. **cysteiny l aspartate-specific proteases**) Familien [75], die als inaktive Zymogene (Procaspasen) synthetisiert werden. Procaspasen besitzen eine Prodomäne und zwei (die große und kleine) Untereinheiten [74;75;83]. Die große Untereinheit enthält eine konservierte Pentapeptid (QACXG [X = R, Q, G]) aktive Stelle [83]. Die Aktivierung von Procaspasen findet durch die proteolytische Spaltung nach dem Aspartatrest zwischen Prodomäne und Untereinheiten bzw. zwischen der großen und kleinen Untereinheit statt (siehe Abbildung 1-5). Hierdurch wird die Prodomäne freigesetzt und aktive Caspase besteht aus einem Tetramer mit zwei Heterodimeren, welche aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten besteht [74;75;80;83]. Man unterscheidet Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen, wie Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10, sind zu frühen Zeitpunkten des apoptotischen Signalwegs aktiv. Sie sind durch eine lange N-terminale Prodomäne gekennzeichnet [68]. Diese wird entweder als DED (engl. death effector domain) oder als CARD (engl. caspase recruitment domain) bezeichnet und sie assoziieren über elektrostatische (bei CARD) bzw. hydrophobe (bei DED) Wechselwirkungen [84] mit einem spezifischen Adaptorprotein (siehe 1.4.2.1 und 1.4.2.2). Dies führt zu einer räumlichen Annäherung mehrerer Zymogene und führt zur Autoproteolyse und damit zur Aktivierung der Initiatorcaspasen [74;75]. Die Effektorcaspasen mit kurzer Prodomäne

(Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7) haben keine DD (engl. death domain), DED und CARD Regionen [85]. Sie werden von aktiven Initiatorcaspasen durch Spaltung prozessiert [68;74;75] und agieren zu einem späteren Zeitpunkt im apoptotischen Signalweg. Aktivierte Effektorcaspasen wiederum schneiden zahlreiche Substrate [85], was in letzter Konsequenz zu den typischen morphologischen Veränderungen der Zelle führt.



**Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des Caspase-8 Proteins.**

Caspase-8 (Aminosäuren [AS] 1-479) besteht aus einer Prodomäne (AS 1-208) und einer Caspasedomäne (AS 209-479). Die Prodomäne besteht aus zwei DED Regionen (graue Kästchen mit schwarzen Punkten). Die große (p18) (dunkelblaue Kästchen) und kleine (p11) (hellblaue Kästchen) Untereinheit sind in der Caspasedomäne dargestellt. **D**: Aspartatrest. **C**: Cystein, liegt in der aktiven Stelle. Modifiziert aus: [86]

### 1.4.1.1 Auswirkungen der Caspaseaktivierung

Zurzeit sind etwa 280 Caspasesubstrate bekannt [87]. Die Cysteinproteasen (Caspasen) erkennen vier Aminosäuren (sog. S4-S3-S2-S1) und die Spaltung des Substrates erfolgt C-terminal vom Aspartatrest (S1) [75]. Die Proteine werden durch die Caspasen spezifisch und mit hoher Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m > 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) gespalten [80]. Für die meisten Substrate ist nicht bekannt, welche Auswirkungen die Spaltungen durch die Caspasen mit sich bringen. Die Degradierung mancher Zielproteine ist zellspezifisch, z. B. findet die Spaltung von  $\beta$ -Aktin nur bei bestimmten Krebszellen (z. B. beim Eierstock-Karzinom) und wird in keinem anderen Zelltyp beobachtet [87]. In einigen Fällen kann die Proteolyse von Zielproteinen direkt mit morphologischen Veränderungen während des Zelltods in Verbindung gebracht werden. Ein klassisches Beispiel dafür ist der DNase-Inhibitor  $I^{\text{CAD}}/\text{DFF45}$ , dessen Spaltung durch Caspase-3, CAD (engl. caspase-activated deoxyribonuclease)-Nuklease freisetzt, welche zur DNA-Fragmentierung führt [74;87]. Die Spaltung der Kernproteine und die Komponenten der Zellkernporen führen zu weiteren Veränderungen, wie z. B. verminderten Transport in den Zellkern [87]. Durch die Spaltung von Proteinen des DNA-Metabolismus und der DNA-

Reparatur, wie PARP (engl. poly [ADP-ribose] polymerase), kommt es zur Unterbindung der DNA-Reparatur [74;87;88]. Die Caspasen initiieren die Zerstörung der Proteine, wie Cytokeratin-18, Gas2, Vimentin und Plectin, welche am Aufbau zytoskelettaler Strukturen beteiligt sind. Die Caspasen zerstören außerdem Proteine, die an der Zelladhäsion oder der Vermittlung der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind. Dazu gehören  $\beta$ -Catenin, Plakoglobin und E-Cadherin [87]. Zahlreiche Proteine, die für Signalübertragungswege verantwortlich sind, werden ebenfalls durch Caspasen gespalten. Beispiele hierfür sind STAT-1 (engl. signal transducer and activator of transcription-1), NF- $\kappa$ B (RelA), I $\kappa$ Bs. Ein großer Prozentsatz der Caspasesubstrate sind Kinasen. Dazu gehören PAK-2 (engl. p21-activated kinase-2) Raf-1 und Akt-1 [74]. Außerdem initiieren Caspasen die Spaltung (Entfernung BH4-Domäne) der Apoptoseinhibitoren Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> Proteine [87], dadurch wird die anti-apoptotische Funktion der Proteine entfernt und die hergestellten Produkte unterstützen die Apoptose. Hierbei wird ein positiver „feedback loop“ ausgebildet, und dies hat eine Verstärkung der apoptotischen Prozesse zur Folge [68;80;87].

## 1.4.2 Apoptosesignalwege

Der Prozess der Apoptose wird in zwei Kategorien eingeteilt: den extrinsischen (oder Todesrezeptor) und intrinsischen (oder mitochondrialen) Signalwege [89;90].

### 1.4.2.1 Der Todesrezeptor-Signalweg

Beim Todesrezeptor-Signalweg wird die Apoptose durch die Interaktion der TNF-Superfamilie Liganden (wie FASL/CD95L/APO-1L) mit Todesrezeptoren (wie FAS/CD95/APO-1) (siehe 1.2) ausgelöst. Über die zytoplasmatisch gerichtete Todesdomäne (DD) des trimerisierten Rezeptors werden das Adaptorprotein wie FADD (engl. Fas associated death domain) (siehe 1.2.1) über ihre C-terminale Todesdomäne gebunden [74]. Dieses Adaptorprotein interagiert über ihre DED (engl. death effector domain) Region mit der DED-Domäne der Initiatorprocaspase-8 (FLICE/MACH/Mch 5) und führt zur Bildung eines Todes-induzierenden Signalkomplexes (engl. death-inducing signaling complex, DISC) im Zytoplasma. Diese Interaktion führt zu einer Autoproteolyse bzw. der Aktivierung der Initiatorcaspase-8 (siehe 1.4.1) [74;75;90]. Die aktive Caspase-8 kann wiederum direkt die Effektorcaspase-3 und -7 aktivieren [75]. Andererseits kann sie das Mitglied der Bcl-2-

Familie Bid (engl. BH3-interacting death agonist) in t-Bid (engl. truncated Bid) spalten [72;75]. Diese hat die Translokation von t-Bid zu den Mitochondrien zur Folge [72;91]. Das gespaltene Bid kann einerseits mit anti-apoptotischem Protein Bcl-2 [85] oder Bcl-x<sub>L</sub> interagieren und es blockiert bzw. neutralisiert ihre anti-apoptotische Funktion auf der Mitochondrienmembran. Die t-Bid Wechselwirkung mit pro-apoptotischem Protein Bax (Mitglieder der Bcl-2-Familie) hat eine Konformationsänderung in dem Bax Protein zur Folge [91;92]. Diese führt zur Oligomerisierung und Einfügung von Bax in den äußere Mitochondrienmembran [91] und damit zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien [72;75;91;92]. Somit werden die Apoptosesignale durch den mitochondrialen Weg (siehe 1.4.2.2) bzw. durch eine positive Amplifikationsschleife verstärkt [75] (siehe Abbildung 1-6).

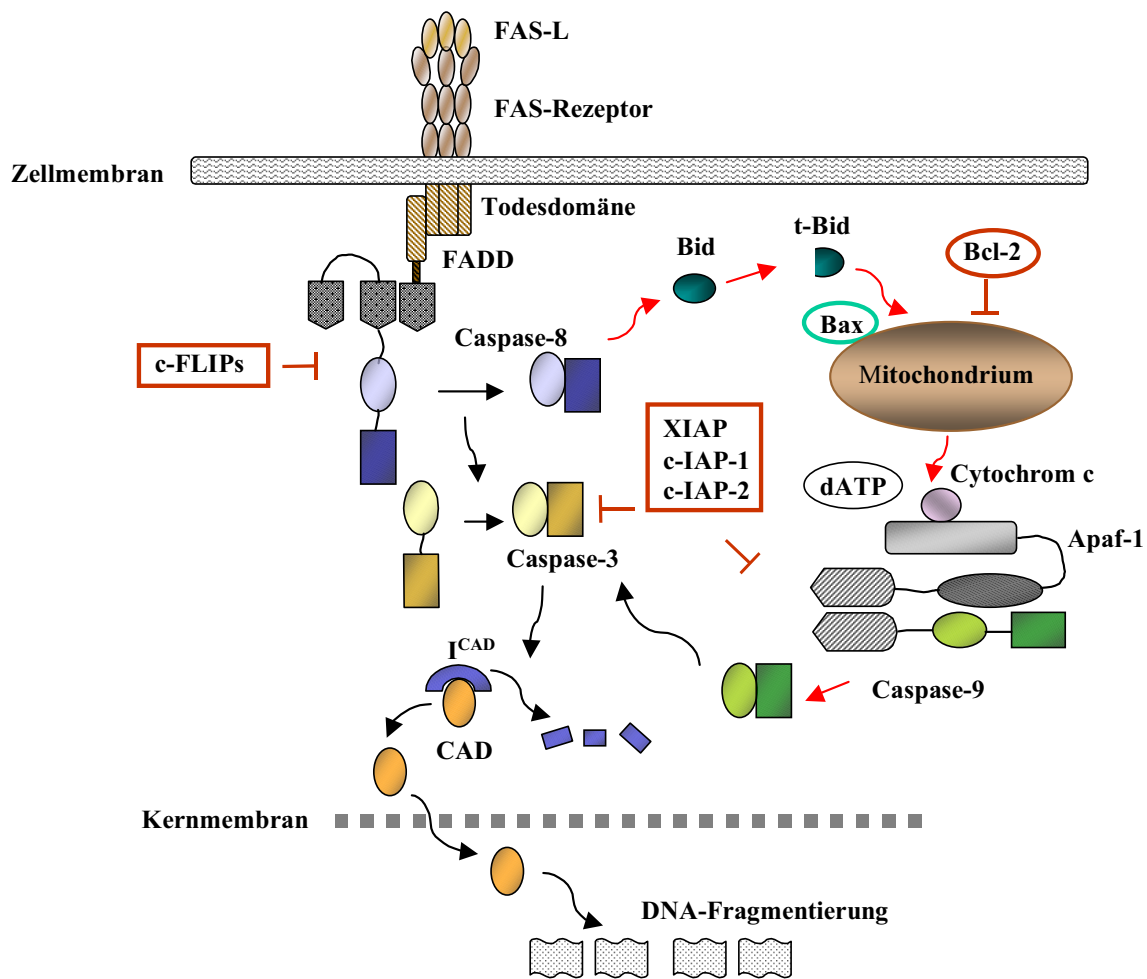
#### **1.4.2.2 Der mitochondriale Signalweg**

Der mitochondriale Signalweg wird von Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z. B. FAS) verwendet, um von ihnen ausgelöste Apoptosesignale zu vervielfältigen (siehe 1.4.2.1). Dieser Signalweg kann durch zahlreichen Stimuli (z. B. ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika) ausgelöst werden. Hierdurch wird die Mitochondrienmembran permeabel, was zur Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol führt [90]. In Anwesenheit von Cytochrom c und dATP (Deoxyadenosintriphosphat) kann Apaf-1 (engl. apoptotic protease-activating factor-1) Protein zur Bildung des sogenannten Apoptosom-Komplexes oligomerisiert werden [75]. Anschließend interagiert Apaf-1 über seine CARD (engl. caspase recruitment domain) Region mit der CARD-Domäne der Initiatorprocaspase-9 [75;90;93]. Diese führt zu einer Autoproteolyse bzw. Aktivierung der Procaspase-9. So kann die aktive Caspase-9 wiederum die Effektorcaspasen-3 und -7 aktivieren [75] (siehe Abbildung 1-6). Die Aktivierung dieser Effektorcaspasen führt ihrerseits zur Spaltung weiterer Zielproteine (siehe 1.4.1.1), was schließlich die Strukturveränderungen in der Zelle bewirkt.

#### **1.4.3 Die Regulierung von Caspasen bzw. Apoptose**

Die durch Todesrezeptoren vermittelte Apoptose kann durch c-FLIPs (engl. cellular FLICE-inhibitory proteins) verhindert werden. c-FLIPs besitzen eine N-terminale Domäne mit zwei DED-Regionen [75], um an FADD zu binden. Dies führt zur einer Konkurrenz mit der

Procaspase-8 um die Bindung an das Adaptorprotein FADD im „DISC“ [80;94]. c-FLIP ist in drei verschiedenen Isoformen vorhanden: c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub> und c-FLIP<sub>R</sub>. Alle drei Isoformen können bei Überexpression die Aktivierung von Procaspase-8 verhindern [75]. Die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind Hauptregulatoren des mitochondrial vermittelten Apoptosesignalwegs. Die Bcl-2 Familie teilt sich in zwei Unterklassen: die anti-apoptotischen Mitglieder, wie Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und können die Freisetzung von Cytochrom c durch Mitochondrien verhindern [74]. Dadurch wird die mitochondrial vermittelte Apoptose blockiert. Andererseits kann Bcl-x<sub>L</sub> mit Apaf-1 interagieren und damit die Aktivierung von Caspase-9 verhindern [68]. Bax bindet wie andere pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder an die Mitochondrienmembran und fördert die Freisetzung von Cytochrom c. Die pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie können mit anti-apoptotischen Proteinen (wie Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, A1) interagieren und damit wird die Pro-Überlebens-Funktion dieser Proteine neutralisiert [68]. Die IAP (engl. inhibitor of apoptosis) Familie zeigt eine anti-apoptotische Wirkung. Bis heute sind acht IAP-Familienmitglieder bei Säugetieren bekannt [75]. BIR (engl. baculoviral IAP repeat) Motiv dient als Funktionsfähige Einheit in IAP Proteinen. XIAP (engl. X chromosome-linked IAP), c-IAP-1 und c-IAP-2 besitzen drei BIR-Domänen, aber nur eine (BIR3) Domäne verhindert die Aktivierung von Caspase-9 [75]. Andererseits wird die Aktivierung der Effektorcaspase-3 und -7 durch XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 inhibiert [74].



**Abbildung 1-6: Die Schematische Darstellung der apoptotischen Signalwege.**

Der Todesrezeptor-Signalweg wird von Mitgliedern der Todesrezeptoren FAS/CD95/APO-1 vermittelt, die durch c-FLIPs inhibiert werden können. In dieser Darstellung wird der mitochondriale Signalweg vom FAS-Rezeptor verwendet, wobei durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie und XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 blockiert werden kann. Die Aktivierung der Procaspase-3 erfolgt durch aktive Caspase-8 bzw. Caspase-9, welche durch XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 inhibiert wird. Die aktive Caspase-3 hat die Spaltung I<sup>CAD</sup> zur Folge, wobei CAD freigesetzt wird. Dies führt zur DNA-Fragmentierung. Todesdomäne (DD): braune Kästchen mit Streifen, DED-Domäne: graue Kästchen mit schwarzen Punkten, CARD-Domäne: hellgraue Kästchen mit Streifen. Erläuterungen siehe Text. Modifiziert aus: [72]

## 1.5 Die Zelllinie Karpas 299 als Modellsystem

Karpas 299 ist eine ALCL (Anaplastisches großzelliges Lymphom)-Zelllinie, die aus einer leukämischen Ausschwemmung der Tumorzellen eines 25-jährigen Patienten gewonnen



wurde. Die ALCL Zellen exprimieren einige T-Zellassoziierte Antigene, wie CD4, CD5, und sind positiv für HLA (engl. human leucocyte antigen)-DR und das epitheliale Membranantigen [10;95]. Ein besonders charakteristisches Merkmal der ALCL Tumorzellen ist die konstante Expression des TNF-Rezeptormoleküls CD30 (Ki-1) [10]. Wie etwa die Hälfte der systemischen ALCL tragen auch die Zellen der Zelllinie Karpas 299 die Translokation (2;5) (p23;q35), in deren Folge es zur Expression eines Fusionsproteins kommt, welche aus der Oligomerisierungs-Domäne von NPM bzw. der intrazytoplasmatischen Region (katalytische Domäne) von ALK besteht (siehe 1.1.1). Das chimäre NPM/ALK Protein kann als Homodimer (durch „crosslinking“ mit anderen NPM/ALK Molekülen) oder Heterodimer (durch „crosslinking“ mit Wildtyp NPM) auftreten, wobei die Homodimerbildung eine konstitutive Aktivierung der katalytischen Domäne von ALK zur Folge hat [8;9;96]. NPM/ALK kann an SH2 Domänen von Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) und Adaptorprotein GRB2 binden [97]. Durch diese Interaktionen kann eine mitogene Proliferation der betreffenden Zellen ausgelöst werden und dies könnte einen wichtigen Faktor in der neoplastischen Transformation darstellen. Dieses wurde auch durch den Befund unterstützt, dass das *NPM/ALK*-Fusionen transplantierbare Tumore (allerdings keine ALCL) in Mäusen hervorruft [98].

Aufgrund dieses und weiterer ALCL-Merkmale kann die Karpas 299 Zelllinie als ein Modellsystem dienen, um die molekularen Vorgänge, die zur Entstehung des ALCL führen, detailliert untersuchen zu können.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Zytokinrezeptor CD30 wird in den Tumorzellen des anaplastisch großzelligen T-Zell Lymphoms (ALCL) konstitutiv exprimiert [8;10] und die CD30-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [23;28;29;31;34;37] könnte eine wesentliche Rolle in der Pathogenese dieser Lymphomentität spielen.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Zusammenspiel von CD30 und NF- $\kappa$ B im ALCL näher beleuchtet werden. Hierfür sollen die Auswirkungen auf die NF- $\kappa$ B Aktivität durch das Einbringen einer dominant-negativen I $\kappa$ B $\alpha$  Mutante in eine ALCL-Zelllinie (Karpas 299) untersucht werden. Da der I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N Mutante die N-terminalen Aminosäuren fehlen, bleibt die signalabhängige Degradierung des trunkierten Inhibitors aus und NF- $\kappa$ B kann nicht mehr in

---

den Zellkern transloziert werden, um seine Zielgene zu aktivieren. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche Auswirkung hat die NF- $\kappa$ B Blockade auf die ALCL Zellen?
2. Welche Bedeutung hat die Aktivierung von CD30 auf ALCL Zellen mit und ohne NF- $\kappa$ B Inhibition?
3. Welche Signalwege werden durch die Aktivierung von CD30 in ALCL Zellen mit und ohne NF- $\kappa$ B Inhibition beeinflusst?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten verschiedene molekularbiologische und biochemische Methoden zum Nachweis der Veränderungen auf Protein- und RNA-Ebene eingesetzt werden. Von den Ergebnissen dieser Untersuchungen werden wichtige Aussagen für die Bedeutung von CD30 und NF- $\kappa$ B für die Pathogenese des ALCL erwartet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Die für die Arbeit verwendeten humanen Zelllinien sowie ihre zelluläre Herkunft und ihr Verwendungszweck sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die gebrauchten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

**Tabelle 2-1:** Zelllinie, Zelltyp, Kulturbedingungen, Verwendungszweck

Zelllinie	Herkunft/Charakteristika/ Kultivierung	Verwendungszweck
Daudi	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom) Medium: 90 % RPMI, 10 % FCS	Behandlung mit Etoposid (Positivkontrolle für den Western Blot, Caspase-3 Nachweis)
HL60	Zelllinie Myeloische Leukämie Medium: 90 % RPMI, 10 % FCS	Behandlung mit Etoposid (Positivkontrolle für den Western Blot, Caspase-3 Nachweis)
Karpas 299	Anaplastisches großzelliges Lymphom (ALCL) Zelllinie vom T-Zell-Typ Medium: 90 % RPMI, 10 % FCS	Transfektion, Behandlung mit Arsentrioxid (Positivkontrolle für den Western Blot, Caspase-8 Nachweis)
ΔN133	IκBαΔN produzierender Zelllinie Karpas 299, G418 <sup>R</sup> (*) Medium: 90 % RPMI, 10 % FCS 1200 μg/ml G418 Sulfat	Untersuchung von CD30 Signalweg
L428	Hodgkin-Zelllinie vom B-Zell-Typ (cHL) Medium: 90 % RPMI, 10 % FCS	Negativkontrolle für den Western Blot (IκBα Nachweis)
L1236	Hodgkin-Zelllinie vom B-Zell-Typ (cHL) Medium: 90 % RPMI, 10 % FCS	Positivkontrolle für den Western Blot (IκBα Nachweis), Negativkontrolle für die PCR (IκBαΔN Nachweis)

Zelluläre Herkunft, Kulturbedingungen und Charakteristika aus: "The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book", **Hans G. Drexler**, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig Germany. **Academic Press**, 2001 (San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo)

(\*) Daten aus eigener Untersuchung (siehe 2.2.12.1)

### 2.1.2 Zellkultur

**Zellkulturmedium:** RPMI 1640 mit Glutamax (Gibco)  
FCS (Fötale Kälberserum) (Gibco)  
30 min bei 56 °C inaktiviert  
(Wasserbad, GFL)  
Penicillin/Streptomycin (Gibco)  
(10000 Units/ml Penicillin G Natrium,  
10000 µg/ml Streptomycin Sulfat in 0,85 %  
Saline)

Für die Zellkultur wurden 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

**Selektionsmedium:** RPMI 1640 mit Glutamax (Gibco)  
FCS (Gibco) (Hitze-inaktiviert)  
1200 µg/ml G418 Sulfat

**Einfriermedium:** 92,5 % FCS (Gibco) (Hitze-inaktiviert)  
7,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)  
(Serva)

Die Substanzen wurden sterilfiltriert (Filter 0,2 µm, Schleicher&Schuell) und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.1.3 Chemikalien für die Zellkultur

Die verwendeten Chemikalien (und ihre Konzentration) sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2-2:** Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Beschreibung	Stammlösung	Verwendete Konzentration	Bezugsquelle
G418 Sulfat (Geneticin)	Antibiotikum	50 mg/ml (72,2 mM) gelöst in Medium RPMI 1640	1200 µg/ml	Calbiochem
Z-VAD-fmk (Z-Val-Ala-DL-Asp (OMe)-fluoromethylketone)	Pan-Caspase Inhibitor	21,4 mM gelöst in DMSO (Dimethylsulfoxid)	50 µM	Bachem
Z-IETD-fmk Z-I-E(OMe)-T-D(OMe)-FMK	Caspase-8 Inhibitor	20 mM gelöst in DMSO	10 µM	R&D Systems
Etoposid (VP-16)	Topoisomerase II Inhibitor*	50 mM gelöst in DMSO	4 µM	Sigma
Arsentrioxid (AS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	NF-κB Inhibitor**	10 mM gelöst in 0,1 M NaOH, Sterilfiltriert	10 µM	Sigma

\* : Burden et al. [99]

\*\* : Mathas et al. [100]

Anschließend wurden die Stammlösungen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.1.4 Vektorkonstrukte

Das pcDNA3 Vektorkonstrukt (mit IκBαΔN) wurde von Prof. C. Scheidereit vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt wurde zur Überprüfung nach der Retransformation (siehe 2.2.1.1) mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I verdaut (siehe 2.2.1.5).

### 2.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Primer für PCR, RT-PCR und die Sequenzierung sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2-3:** Primersequenzen und deren Verwendungszweck

Gen	Primersequenz 5'-3'	Verwendungszweck
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Screening der isolierten Klone mittels PCR
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGGC	
I $\kappa$ B $\alpha$ for	GGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTAT	RT-PCR und Sequenzierung zur Überprüfung isolierter Klon ( $\Delta$ N133)
I $\kappa$ B $\alpha$ rev	CACTTCCATGGTCAGTGCCTTT	

### 2.1.6 Puffer und sonstige Lösungen

#### LB-Medium (5x)

#### (Luria-Bertani-Medium)

125 g Luria Broth Base (Gibco BRL)  
mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt,  
autoklaviert

#### LB -Platten

37 g Luria Agar (Gibco BRL)  
mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt,  
autoklaviert und abgekühlt auf 40 °C, danach  
Zugabe von Antibiotikum  
(z. B. Ampicillin 100  $\mu$ g/ml)

Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

#### Bakterienstamm

In dieser Arbeit wurde der Stamm *E.coli* TOP10 (Invitrogen) verwendet.

### 2.1.6.1 Verwendete Elektrophoresepuffer

<b>TAE (50x)</b>	2 M Tris-Base (Roth) 0,05 M EDTA, pH 8,0 5,7 % Eisessig (J.T.Baker)
<b>TBE (20x)</b>	1,8 M Tris-Base (Roth) 1,8 M Borsäure (Roth) 0,05 M Na <sub>2</sub> EDTA (Gibco BRL)
<b>DNA Probenpuffer (3x)</b>	500 µl 10x Orange G 100 µl 0,25 % Xylencyanol FF 900 µl Aqua dest.
<b>TE (1x)</b>	10 mM Tris (Roth), pH 8,0 1 mM EDTA (Invitrogen)

### 2.1.6.2 Reagenzien für SDS-Gel Elektrophorese und Western Blot

<b>Elektrophoresepuffer (10x)</b>	0,5 M 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS, Sigma) 0,5 M Tris-Base (Roth) 34,7 mM Sodiumdodecylsulfate (SDS, Merck) 10,3 mM EDTA (Merck) mit Aqua dest. (Millipore) auf 500 ml aufgefüllt.
-----------------------------------	--

Für die SDS-Gel-Elektrophorese wurde der Puffer als 1x Lösung verwendet.

**Proteinprobenpuffer (4x)  
(4xSDS PAGE-Puffer)** 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 (Roth)  
40 % Glycerol (Merck)  
8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck)  
0,4 % Bromphenol Blue (Sigma)  
8 % Sodiumdodecylsulfate (SDS, Merck)  
mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt,  
aliquotiert, bei -20 °C aufbewahrt

**Transferpuffer (10x)** 0,25 M Tris-Base (Roth)  
1,87 M Glycin (Serva)  
mit Aqua dest. (Millipore) auf 1000 ml auf-  
gefüllt.

Zum Blotten wurde dem 1x Transferpuffer 20 % Methanol (Merck) hinzugegeben. Der pH-Wert betrug 8,3.

**Blockierungspuffer/  
Verdünnungsmedium für Antikörper/  
Waschpuffer** 50 mM Tris-Base (Roth) pH 7,5  
150 mM NaCl (Merck)  
0,1 % Triton X-100 (Serva)  
1 % Magermilchpulver (fettfrei)  
(Applichem GmbH; Sucofin)

**Detektionsreagenzien** ECL Western Blotting Detection Reagents  
(Pierce)

**Proteinextraktionspuffer** Passive Lysis Buffer 5x (Promega)  
Complete EDTA-free (Roche)  
(Protease Inhibitor Cocktail in Tablettenform)

50 ml 1x Lysis Puffer wurde mit Aqua dest. (Millipore) angesetzt. Eine Tablette *Complete EDTA-free* wurde in 1x Lysis Puffer gelöst. Die Lösung war ca. 1-2 Wochen bei 4 °C bzw. 12 Wochen bei -20 °C haltbar.

**PBS (1x)** Phosphat-gepufferte Salzlösung (Gibco)



### 2.1.6.3 Reagenzien für die Immunhistologie

**Citrat-Puffer** 0,1 M Citronensäure Monohydrat (Merck)

**EDTA** 1 mM EDTA (Merck)  
pH 8,0

**Hämalaunlösung** 50 g Kalialaun (Merck)  
1 g Hämatoxylin (Merck)  
0,2 g NaJO<sub>3</sub> (Merck)

wurden in 1 Liter Aqua dest. unter Rühren über Nacht gelöst. Danach wurden 50 g Chloralhydrat (Merck) und 1 g Zitronensäure (Merck) hinzugefügt und wieder über Nacht gerührt.

**Waschpuffer (10x)** TBST Tris Buffered saline mit  
Tween 20 (Dako)

Beim Waschen wurde der Puffer als 1x Lösung verwendet.

### 2.1.7 Gele

**Polyacrylamidgele** NuPAGE 10 % Bis-Tris Gel (Invitrogen)  
(1,0 mm x 10 well)

**Polyacrylamidgele (6 %)** 5 ml 20x TBE  
(ausreichend für ca. 15 Minigele) 15 ml 40 % Acrylamid/  
Bisacrylamid (19:1, Gibco BRL)  
80 ml Aqua dest.  
0,5 ml 10 % Ammoniumpersulfat (APS,  
Bio-Rad)  
40 µl TEMED (Bio-Rad)

Die Substanzen wurden gemischt, nach dem Entgasen der Lösung wurden APS und TEMED zugegeben. Anschließend wurden die Gele zügig gegossen, da das Acrylamid nach Zugabe zu polymerisieren beginnt. Das APS wurde jeweils frisch angesetzt.

**Agarosegele (1,5 %)** 100 ml 1x TAE-Puffer  
1,5 g Agarose (Sigma)

**Agarosegele (1 %)** 100 ml 1x TAE-Puffer  
1 g Agarose (Sigma)

Die Suspensionen (1,5 % oder 1 % Gel) wurden in der Mikrowelle erhitzt, bis der Agar vollständig gelöst war.

## 2.1.8 Antikörper

### 2.1.8.1 Primärantikörper

Tabelle 2-4 gibt eine Übersicht über beim Western Blot bzw. in der Immunhistologie verwendete Antikörper.

**Tabelle 2-4:** Primärantikörper

Zielprotein	Beschreibung	Quelle	Verdünnung	Bezugsquelle
Caspase-9	Polyklonal	Kaninchen	1:500	Santa Cruz Biotechnology
cleaved Caspase-8	Monoklonal	Maus	1:50 *	Cell Signaling Technology
Caspase-8	Polyklonal	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
cleaved Caspase-3	Polyklonal	Kaninchen	1:1000 1:20 *	Cell Signaling Technology
Bid	Polyklonal	Kaninchen	1:500	Cell Signaling Technology
β-Aktin	Monoklonal	Maus	1:40000	Abcam
IκBα	Polyklonal	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

\* Verwendet in der Immunhistologie

### 2.1.8.2 Sekundärantikörper

In Tabelle 2-5 sind die beim Western Blot bzw. in der Immunhistologie verwendeten Sekundärantikörper dargestellt.

**Tabelle 2-5:** Sekundärantikörper

Beschreibung	Verdünnung	Bezugsquelle
HRP-konjugiert Anti-Maus	1: 10000	Dako
HRP-konjugiert Anti-Kaninchen	1: 5000, 1:2000	Amersham
Biotinylierte Anti-Maus und Anti-Kaninchen Ziegen-Immunglobuline*	gebrauchsfertig	Dako

\* Verwendet in der Immunhistologie

### 2.1.8.3 Verwendete Antikörper in der Zellkultur

Stammlösung, verwendete Konzentrationen und Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für die Zellkultur sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 2-6:** Zellkulturantikörper

Antikörper	Beschreibung	Stammlösung	Verwendete Konzentration	Bezugsquelle
Ki-1 (anti-CD30) (Murine-Ki-1)	Monoklonal (CD30 spezifische Antikörper)	1 mg/ml in 1x PBS	0,5 µg/ml	Institut für Pathologie, CBF
IgG <sub>3</sub>	Monoklonal (Isotyp-spezifisch für Ki-1, Kontrollantikörper)	0,5 mg/ml bzw. 1 mg/ml in 1x PBS	0,5 µg/ml	ATCC (Klon Nr.CRL- 1893)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vervielfältigung, Isolierung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Retransformation

Die Vervielfältigung von pcDNA3 Vektor-konstrukt (mit I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) wurde mit dem *TOPO<sup>®</sup> Cloning and Transformation continued Kit* (Invitrogen) nach der *One Shot<sup>®</sup> Chemical* Transformationsmethode durchgeführt. 1  $\mu$ l (100 ng) des Vektors pcDNA3 (mit I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) wurde mit 50  $\mu$ l der kompetenten Bakteriensuspension (*E.coli* Stamm TOP10) gemischt. Die weiteren Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bakteriensuspension mit dem Plasmid wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 Sek. bei 42 °C (Wasserbad, Biometra) wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 250  $\mu$ l auf Raumtemperatur gebrachtes SOC Medium zugefügt. Eine Stunde wurde bei 37 °C geschüttelt (Thermoplatte, Eppendorf). Ungefähr 10-50  $\mu$ l der Zellsuspension wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C (Brutschrank, Heraeus) inkubiert. Anschließend wurden mehrere Bakterienkolonien, die auf den Agarplatten gewachsen waren, mit sterilen Spitzen gepickt in 5 ml 1x LB Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific GmbH) inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde von den *E.coli* Über-Nacht-Kulturen durchgeführt (siehe 2.2.1.2).

#### 2.2.1.2 DNA-Präparation

Die Plasmid-DNA aus 3 ml LB-Ampicillin *E.coli* Über-Nacht-Kultur wurde mit Hilfe des *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) nach Herstellerangaben isoliert. Nach der Aufreinigung wurde die DNA in 100  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die isolierte DNA wurde mittels Restriktionsverdau geprüft (siehe 2.2.1.5). Anschließend wurden die Fragmente durch Agarosegelelektrophorese (1,5 %) aufgetrennt (siehe 2.2.2.1). Nach der Überprüfung des Plasmids wurden 2 ml der Über-Nacht-

Bakterienkultur weiter in 1x LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für 3-6 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Diese Bakterienkultur wurde in 200 ml 1x LB Medium (100 µg/ml) Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) zusammen mit *QIAfilter Cartridges* (Qiagen) verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 100 µl 1x TE Puffer aufgenommen.

### 2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Plasmid-DNA (pcDNA3 Vektorkonstrukt [mit IκBαΔN]) wurde über die Absorption bei 260 nm spektrophotometrisch (HP 8452A Diode Array Spectrophotometer) festgestellt. 1.0  $A_{260\text{nm}}$  entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparate ergibt sich aus dem Quotienten von  $OD_{260\text{nm}}$  und  $OD_{280\text{nm}}$ . Eine proteinfreie Nukleinsäure weist einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf.

Die Konzentrationen von RNA und DNA wurden mittels Spektrophotometer *NanoDrop ND1000* und entsprechender *NanoDrop Software 3.1.2* (NanoDrop Technologies Inc) gemessen. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mittels 1 µl Nukleinsäurepräparaten ohne Verdünnung. Die Konzentration wird aus der Optischen Dichte bei 260 nm errechnet. Die Reinheit wird anhand des Verhältnisses  $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$  und zusätzlich über den Quotienten  $OD_{260\text{nm}}/OD_{230\text{nm}}$  überprüft. Eine reine DNA weist einen Quotienten von ~1,8 auf, eine reine RNA einen Wert von ~2,0. Das Verhältnis  $OD_{260\text{nm}}/OD_{230\text{nm}}$  liegt zwischen 1,8 und 2,2.

### 2.2.1.4 Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Der Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) erlaubt eine automatisierte Analyse der Qualität von isolierter RNA. Für die Analyse wurden der *RNA 6000 Nano Assay Chip* und entsprechende Reagenzien verwendet. Diese Technik basiert auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und ermöglicht eine Bestimmung von zwölf RNA-Proben in einem Lauf hinsichtlich ihrer Qualität und Konzentration. Die Analyse erfolgt in einem „Chip“, der aus Glas besteht und in den mehrere untereinander verbundene Mikrokapillaren eingätzt wurden. Vor einer Messung wurden die Kapillaren zunächst mit einem gelartigen

fluoreszenzfarbstoffhaltigen Polymer gefüllt. Die Proben und ein mitgeführter Standard wurden in die *Chip-Wells* pipettiert und über die Mikrokapillaren in ein elektrisches Feld fortbewegt. Sie wurden automatisch in die Trennkapillare weitergeleitet, um dort entsprechend ihrer Fragmentgröße durch den Molekularsiebeffekt mit Hilfe eines Polymers aufgetrennt zu werden. Die Systemsoftware analysiert automatisch die Ergebnisse anhand von Fluoreszenzsignalen, indem sie ein Elektropherogramm und ein gelähnliches Bild erzeugt. Bei dem Elektropherogramm einer qualitativ hochwertigen RNA sind beide Peaks der ribosomalen 28S und 16S RNA deutlich zu erkennen.

### **2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA**

Restriktion ist das Schneiden von DNA-Molekülen mit Hilfe von Enzymen, den Restriktionsendonukleasen. Diese Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Alle Restriktionsverdaue wurden in einem maximalen Restriktionsvolumen von 15 µl durchgeführt. 4 µl (~ 500 ng) pcDNA3 Vektorkonstrukt (mit IκBαΔN) wurden mit je 5 Einheiten der beiden Restriktionsenzyme Hind III (Gibco) und Xho I (Gibco) und dem entsprechenden Puffer „react 2“ (Gibco) gemischt. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und die Fragmente anschließend mittels Agarosegelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Gel überprüft (siehe 2.2.2.1).

### **2.2.1.6 Isolierung von genomischer DNA**

Die Isolierung genomischer DNA aus Zelllinien wurde mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurden  $1-5 \times 10^6$  Zellen 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert (Varifuge 3.OR, Heraeus), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Die weiteren Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte DNA wurde in 1x TE Puffer aufgenommen, die Konzentration mittels *NanoDrop ND1000* (siehe 2.2.1.3) bestimmt. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei 4 °C.

### 2.2.1.7 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien erfolgte mit dem *RNAeasy Mini-Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial dienten  $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen. Das Zellpellet im Lysispuffer (*RNAeasy Mini-Kit*) wurde mittels *QIAshredder* (Qiagen) homogenisiert. Um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, wurden RNase-freie Gefäße (Sarstedt) eingesetzt und der Arbeitsplatz und alle verwendeten Geräte mit *RNase Zap* (Ambion) dekontaminiert. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung mittels *NanoDrop ND 1000* (siehe 2.2.1.3) bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.2.2 Gelelektrophorese

### 2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die mit Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden in 1%igen bzw. 1,5%igen Agarosegelen mit Ethidiumbromid (5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidstammlösung [10 mg/ml]) in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung zwischen 50 und 150 V (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL) aufgetrennt. Die gewählte Spannung und die Laufzeit waren dabei von der Größe der Fragmente abhängig. Als Größenstandard dienten 600 ng einer 1 kb DNA Leiter (Gibco BRL). Zur Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse wurde das Gel unter UV-Licht (Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000, Bio-Rad) betrachtet und fotografiert.

### 2.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten unter einer Größe von 400 bp erfolgte auf 6%igen Polyacrylamidgelen in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini V8, Gibco BRL) mit 1x TBE Puffer. Die PCR-Produkte wurden 2:1 mit Probenpuffer versetzt und mit Hilfe einer Hamilton Spritze in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde eine 600 ng 1 kb DNA Leiter (Gibco BRL) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200 Volt (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL). Anschließend wurde das Gel für ca. 1 min in

ethidiumbromidhaltigem 1x TBE Puffer gefärbt (1 µg/ml) und unter UV-Licht auf einer Geldokumentationsanlage (Gel Doc 2000, Bio-Rad) fotografiert.

### **2.2.2.3 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)**

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen [101]. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden jeweils 10 oder 10,7 µg Zelllysat mit einem 4fach SDS-PAGE-Puffer (siehe 2.1.6.2) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach dem Erhitzen wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend mit Hilfe einer Hamilton Spritze in die Geltaschen eines 10%igen *NuPAGE Bis-Tris* Gels (Invitrogen) pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen (*Full Range Rainbow Marker RPN 800* von Amersham Bioscience; *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard Marker* von Invitrogen). Die SDS-Gelelektrophorese fand im Eisbad in einer mit Elektrophoresepuffer (siehe 2.1.6.2) gefüllten *XCell SureLock™* Elektrophoresekammer (Invitrogen) statt. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 100 V (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL), dann hatte das Bromphenolblau des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht. Die Gele wurden für die Western Blot-Analyse weiterverwendet.

### **2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **2.2.3.1 Screening der Einzelklone mittels PCR**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde als in-vitro Verfahren zur Vervielfältigung der klonierten Fremd-DNA (hier:  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$  im pcDNA3 Vektorkonstrukt) verwendet. Hierbei wurden T7- und BGH rev-Primer (siehe Tabelle 2-3) zur Amplifikation eingesetzt. Die PCR erfolgte in einem Volumen von 25 µl mit 1 Einheit *AmpliTaQGold Polymerase* (Applied Biosystems), 1x Puffer II, und von jedem Primer wurden 0,4 mM eingesetzt, von jedem dNTP (Applied Biosystems) 0,25 mM. Die Konzentration an  $\text{MgCl}_2$  betrug 3 mM. Als Ausgangsmaterial dienten 500 ng DNA. Amplifikationsbedingungen waren 95 °C 10 min, 35x (95 °C 45 sec, 55 °C 45 sec, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min. Die PCR wurde in einem



*MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler* durchgeführt. Zur Analyse wurden 6 µl PCR Ansatz auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.2.2.1). Die erwartete Produktgröße betrug ca.1000 bp.

### 2.2.3.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Unter der reversen Transkription versteht man eine Reaktion, bei der mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) mRNA in einzelsträngige cDNA (engl. complementary DNA) umgeschrieben wird. Um Verunreinigungen der isolierten RNA (aus ΔN133 und Karpas 299 Zellen) mit genomischer DNA auszuschließen, wurde ein DNase-Verdau (Qiagen-DNase) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration mittels *NanoDrop ND1000* (siehe 2.2.1.3) gemessen. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 100 ng/µl mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser verdünnt. 300 ng Gesamt-RNA wurden unter Verwendung von *Taq Man Reverse Transkription* Reagenzien in cDNA umgeschrieben, welche dann in die PCR eingesetzt wurde. Die reverse Transkription erfolgte in einem Volumen von 25 µl unter folgenden Bedingungen:

**Tabelle 2-7:** RT-Schritt mit Random Hexamer Primern

Komponente	Endkonzentration
10x RT Puffer	1x RT Puffer
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,5 mM
dNTPs mit dTTP (10 mM)	2 mM
RNase Inhibitor 20 U/µl	10 U
Reverse Transkriptase 50 U/µl	31,25 U
Random Hexamer 50 µM	2,5 µM

Der RT-Schritt zur Umschreibung der mRNA wurde mit dem nachfolgend beschriebenen Temperaturprofil im *Biometra T3 Thermocycler* durchgeführt:

25 °C 10 min	Primeranlagerung
48 °C 30 min	Synthese
95 °C 5 min	Denaturierung
4 °C	Abkühlung

Die umgeschriebene mRNA wurde als Template in eine PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das pcDNA3 Vektorkonstrukt (mit I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N). Die PCR erfolgte in einem 25  $\mu$ l Reaktionsansatz unter folgenden Bedingungen:

**Tabelle 2-8:** PCR Ansatz für RT-PCR

Komponente	Endkonzentration
10x PCR Puffer	1x PCR Puffer
dNTPs (12,5 mM)	0,25 mM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 mM
Ampli Taq Gold Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 U
Mix-Primer: (jeweils 50 pmol/ $\mu$ l)	10 pmol
I $\kappa$ B $\alpha$ *	

\* Von jedem I $\kappa$ B $\alpha$  for bzw. I $\kappa$ B $\alpha$  rev Primer (siehe Tabelle 2-3) wurden 50 pmol/ $\mu$ l eingesetzt.

Als Ausgangsmaterial dienen 5  $\mu$ l cDNA. Die Primer wurden mit Hilfe der Software *Primer Express* (Applied Biosystems) ausgewählt. Die Amplifikationsbedingungen waren 95 °C 10 min, 35x (95 °C 45 sec, 55 °C 45 sec, 72 °C 30 sec), 72 °C 10 min. Die Reaktion wurde in einem *MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler* durchgeführt. Zur Analyse wurden 6  $\mu$ l PCR Ansatz auf einem Gel aufgetragen.

## 2.2.4 Sequenzierung

Sequenziert wurden die RT-PCR Produkte der  $\Delta$ N133 Zellen sowie die PCR Produkte des pcDNA3 Vektorkonstruktes (mit I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) (siehe 2.2.3.2).

Zur Sequenzierung der RT-PCR, PCR Produkte wurden die Reamplifikationsprimer (I $\kappa$ B $\alpha$ , siehe Tabelle 2-3) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma „Microsynth“. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit vorhandenen Datenbanksequenzen (GenBank) verglichen ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)).

### 2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die BCA (engl. bicinchoninic acid) *Protein Assay Kit* (Pierce) nach Smith BCA-Methode angewandt [102]. BCA interagiert mit  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen. Hierfür werden die  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen gebildet, wenn die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im alkalischen Milieu durch Proteine reduziert werden. Durch die Interaktion von BCA mit  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen wird eine Farbreaktion gebildet, die durch eine Absorptionsmessung bei 562 nm gemessen werden kann. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe aus BSA (engl. bovine serum albumin). Jeweils 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösungen wurden in eine *96-Well* Mikrotiterplatte (Nunc) gegeben. Sowohl für die Standardreihe als auch für die Proteinproben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die BCA-Reagenzlösung wurde aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B angesetzt. In jede Vertiefung wurden 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenzlösung aufgetragen und die Platte wurde für 30 min bei 37 °C (Inkubator, Heraeus) inkubiert. Die Platte wurde im ELISA-Plattenlesegerät (MRX, Dynex Technologies) bei 570 und 630 nm gemessen. Anhand der BSA-Standardreihe mit bekannten Konzentrationen wurden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

### 2.2.6 Herstellung von Zelllysaten

Zur Untersuchung zellulärer Extrakte mittels SDS-PAGE bzw. Western Blot wurden die Proteine aus den CD30-stimulierten (bzw. behandelten) und den nicht stimulierten Kontrollzellen isoliert. Nach der Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.2.13.2) wurden die Zellen 5 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1x PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde das PBS von den Zellen entfernt und das Pellet ( $1 \times 10^7$  Zellen) in 1 ml Proteinextraktionspuffer (siehe 2.1.6.2) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Zelllysate durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Zelllysate wurden in Eppendorfgefäße überführt und anschließend 5 min bei 10000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Biofuge). Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße pipettiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* bestimmt (siehe 2.2.5). Die zellulären Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.7 Western Blot

Der Western Blot basiert auf der Methode von Towbin [103]. Die im Acrylamidgel getrennten Proteine wurden durch das Elektrobplotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran überführt, anschließend können die gewünschten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Die Auftrennung der Proteine wurde mittels *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid* Gelelektrophorese (SDS PAGE) durchgeführt (siehe 2.2.2.3). Die aufgetrennten Proteine wurden durch das Elektrobplotverfahren (X Cell II™ Blot Module, X Cell Surelock™ Electrophoresis Cell von Invitrogen) mit entsprechendem Transferpuffer (siehe 2.1.6.2) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences) übertragen. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 30 V (Power Supply ST 606 T von Gibco BRL bzw. Power Pac Universal von Bio-Rad) im Eisbad. Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran mit Blockierungspuffer (siehe 2.1.6.2) für eine Stunde auf einem Schüttler (Kottermann 4010) bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen der Membran mit dem Milchpulver abgesättigt, um eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit den verschiedenen Primärantikörpern (IkB $\alpha$ , „cleaved“ Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bid,  $\beta$ -Aktin; siehe Tabelle 2-4) im entsprechenden Antikörperverdünnungsmedium (siehe 2.1.6.2) in einem Überkopfmischer (Heidolph Reax 2). Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Membran mit Waschlösung (siehe 2.1.6.2) dreimal für 5 min gewaschen. Die Reaktion mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2-5) wurde für ca. 45 min bei Raumtemperatur im Mini-Hybridisierungsofen (Biometra) im entsprechenden Antikörperverdünnungsmedium (siehe 2.1.6.2) durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit dem Waschlösung dreimal für 5 min gewaschen. Die Detektion der gebundenen Proteine fand über eine Chemolumineszenzreaktion mit den *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Pierce) nach Angaben des Herstellers statt. Die Exposition der Membranen erfolgte für einige Minuten bis zu mehreren Stunden mit dem *HyperFilm ECL™* (Amersham Biosciences).

## 2.2.8 Entfernen gebundener Antikörper („Stripping“)

Um eine Membran nochmals zu verwenden, besteht die Möglichkeit, die gebundenen Antikörper zu entfernen (zu „strippen“) und die Membran mit neuen Antikörpern zu hybridisieren. Die Membran wurde bei 37 °C im Wasserbadschüttler (Memmert) ca. 15-20 min in *Stripping* Puffer (Pierce) inkubiert. Anschließend wurde der *Stripping* Puffer verworfen, die Membran wurde viermal für 5 min mit Waschpuffer (siehe 2.1.6.2) gewaschen und danach im Blockierungspuffer (siehe 2.1.6.2) für eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin konnte die Membran erneut mit dem primären Antikörper inkubiert werden.

## 2.2.9 Immunhistologie

### 2.2.9.1 Paraffineinbettung

Die  $1,5 \times 10^5$  Zellen wurden nach entsprechender Behandlung (siehe 2.2.13.9) für 5 min 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen. Nach den Waschschritten wurde das PBS von den Zellen abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml 4%igem Formalin ca. 24 Stunden fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit Filterpapier und Gazetüchchen in eine Plastikkassette überführt. Danach wurden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 96 %, 100 %) entwässert und anschließend in Xylol gebracht. Jeder Inkubationsschritt betrug hierbei 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurden die Blöcke 1 h bei 60 °C (Inkubator, Heraeus) in Paraffin inkubiert und anschließend eingebettet.

### 2.2.9.2 Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten

Es wurden 1,5 µm dicke Schnitte der Paraffin-eingebetteten Blöcke mit einem Mikrotom (Microm GmbH) auf Objektträger (Dako) aufgebracht. Die Paraffinschnitte wurden für ca. 3 Stunden oder über Nacht bei 65 °C getrocknet. Um die Paraffinschnitte vom Paraffin zu

befreien, erfolgte eine Entparaffinierung 2 x 10 min in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) für jeweils 5 min bei RT rehydriert. Nach dem Waschen mit Aqua dest. wurden sie je nach verwendetem Antikörper vorbehandelt. Hierfür wurden die Schnitte für 2 min in Citratpuffer (für den primären Antikörper „cleaved“ Caspase-3, siehe Tabelle 2-4) oder 1 min in 1 mM EDTA-Lösung (für den primären Antikörper aktive Caspase-8, siehe Tabelle 2-4) gekocht und unter fließendem Wasser abgekühlt. Durch diese Hitzebehandlung mit Citrat-Puffer bzw. 1 mM EDTA-Lösung erfolgte eine Demaskierung der Proteine. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Behandlung in 1x Waschpuffer (siehe 2.1.6.3) aufbewahrt.

#### **2.2.9.2.1 Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) – Methode**

Die Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase- (APAAP) Methode ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers durch eine Färbereaktion in Gewebeschnitten. Nach Zugabe eines Primärantikörpers wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der sowohl an den Primärantikörper als auch an den im darauffolgenden Schritt verwendeten anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper bindet. Dieser anti-Alkalische Phosphatase-Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase verbunden (APAAP) und nach Substratzugabe entsteht da, wo die Antikörpermoleküle gebunden haben, ein roter Farbniederschlag. Die primären Antikörper (Caspase-3 bzw. Caspase-8, siehe Tabelle 2-4) wurden mit Antikörper-Verdünnungsmedium (*Dako Real<sup>TM</sup> Antibody Diluent*) verdünnt. Die Schnitte wurden mit 1x Waschpuffer (siehe 2.1.6.3) gespült. Anschließend wurde auf jeden Schnitt 100 µl verdünnter Primärantikörper gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte intensiv mit 1x Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Vom Brückenantikörper (Biotinylierte Anti-Maus und Anti-Kaninchen Ziegen-Immunglobuline, siehe Tabelle 2-5) wurden 200 µl pro Schnitt pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1x Waschpuffer wurde die Schnitte für 30 min mit 200 µl des APAAP-Komplexes (Alkalische Phosphatase [AP] konjugiertes Streptavidin von Dako) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit 1x Waschpuffer erfolgte die Entwicklung. Die Entwicklerlösung für die Färbereaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt und verwendet (*ChemMate<sup>TM</sup> Detection Kit, Alkaline Phosphatase/RED*,

*Rabbit/Mouse*, Dako). Die Schnitte wurden mit destilliertem Wasser gespült. Zur Darstellung der Zellen im mikroskopischen Bild wurden die Schnitte 1 min in Hämalaunlösung inkubiert. Anschließend wurden sie mit lauwarmem Leitungswasser gespült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Schnitte wurden mit 50-60 °C warmer Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck) eingedeckt.

### **2.2.10 Zytozentrifugenpräparation**

Dieses Verfahren ermöglicht die Zentrifugation von Zellen auf einen Objektträger. Die mit Arsenitoxid behandelten bzw. Kontroll-Karpas 299 Zellen (siehe 2.2.13.10.2) wurden 5 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet danach in 1x PBS gewaschen und in 1x PBS resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde durch Verdünnung mit 1x PBS eingestellt, um eine zu hohe Zellkonzentration zu vermeiden. Pro Präparat wurden 50 µl Zellsuspension 5 min bei 5000 rpm in einem *Shandon Cytospin 4* (Thermo) zentrifugiert. Zur Beurteilung der Zelldichte auf dem Objektträger wurde diese unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Objektträger (Cytopräparate) wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend gefärbt (siehe 2.2.10.1). Objektträger, die nicht sofort gefärbt wurden, wurden bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.2.10.1 Immunhistologische Färbung von Cytopräparaten**

Die Cytospinobjektträger wurden getrocknet und 1 h in 10 % Formalin fixiert, anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 85 %, 96 %, 100 %) mit einer 5 min Inkubationszeit pro Schritt bei Raumtemperatur entwässert und danach 1 h bei 65 °C (Inkubator, Heraeus) getrocknet. Anschließend wurden die Präparate 1 min in 1 mM EDTA-Lösung gekocht (siehe 2.2.9.2) und unter fließendem Aqua dest. abgekühlt. Dadurch wurde eine Demaskierung der Antigene ermöglicht. Danach wurden die Cytospinpräparate bis zur Weiterverarbeitung in 1x Waschpuffer (siehe 2.1.6.3) aufbewahrt. Die immunhistologische Färbung wurde mit der APAAP-Methode (siehe 2.2.9.2.1) durchgeführt.

### 2.2.11 Durchflusszytometrische Analyse

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (wie Propidiumjodid) markiert. Die Zellen werden durch eine Kapillare geschickt, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der dann von einem Laserstrahl erfasst wird. Photodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die relative Größe, relative Granularität (Komplexität) bzw. relative Fluoreszenzintensität der analysierten Partikel darstellt.

#### 2.2.11.1 Apoptose-Nachweis durch Propidiumjodid (PI)

Die Induktion von Zelltod oder Apoptose führt zu einer Schädigung der Zellmembran. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) bindet sich an die Nukleinsäuren der geschädigten Zellen, kann aber nicht in Zellen mit intakter Zellmembran eindringen. Deshalb werden nur nekrotische bzw. apoptotische Zellen (im späten Stadium) durch PI gefärbt. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 5 ml stimulierte und nicht stimulierte Zellen (siehe 2.2.13.9) in *FACS* Röhrchen (5 ml *polystyrene round bottom tube*, Falcon) gegeben und 5 min 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden 2-mal mit 1x PBS gewaschen. 5 µl PI (10 mg/ml) wurden in 250 µl 1x PBS gegeben und gut gemischt. Das Zellpellet wurde in der PI/PBS Lösung resuspendiert. Die Messung wurde in einem *FACS*Sort (Becton-Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der *CellQuest* bzw. *CellQuest Pro* Software.

#### 2.2.11.2 Bestimmung der Apoptose mit Hilfe von Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI)

Apoptose ist durch eine Reihe morphologischer Veränderungen charakterisiert, wie durch die Kondensation des nukleären Chromatins, Zusammenfügen von zytoplasmatischen Organellen, Zell-Schrumpfung, Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials und Veränderungen in der Zelloberfläche. Die apoptotischen Zellen werden schnell *in vivo* phagozytiert, während die Zerstörung der Plasmamembran nur im späteren Stadium *in vitro* stattfindet [104]. Phosphatidylserine (PS) ist ein negativ geladenes Phospholipid, welches normalerweise auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist [105].



Während der Apoptose verändern die apoptotischen Zellen ihre Oberflächen-Chemie, wobei PS von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran lokalisiert wird. Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiges Protein mit hoher Affinität für PS, somit bindet es an Zellen, die PS auf der äußeren Zellmembran präsentieren. Weiterhin ist Annexin V an Fluoreszeinisothiozyanat (engl. fluorescein isothiocyanate, FITC) gekoppelt, um apoptotische Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermitteln zu können. Außerdem werden die apoptotischen Zellen im späteren Stadium durch Propidiumjodid (PI) gefärbt. Hierbei kann Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-konjugiertes Annexin (Annexin V-FITC) in Kombination mit PI für die durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer/toter Zellen verwendet werden. Dazu werden die analysierenden Zellen (siehe 2.2.13.9 bzw. 2.2.13.12) 5 min 1200 rpm bei RT zentrifugiert. Die Färbung der Zellen wurde mit Hilfe des *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen<sup>TM</sup>) nach Herstellerangabe durchgeführt. Das Zellpellet wurde mit kaltem 1x PBS gewaschen und mit 1x Bindungs-Puffer auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Zu  $1 \times 10^5$  Zellen dieser Zellsuspension wurden 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC und 5  $\mu\text{l}$  PI gegeben und für 15 min im Dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400  $\mu\text{l}$  1x Bindungs-Puffer hinzugefügt. Die Messung erfolgte in einem *FACSort* (Becton-Dickinson). Die Auswertung wurde mittels *CellQuest* bzw. *CellQuest Pro* Software durchgeführt.

## 2.2.12 Transfektion

Transfektion mittels Elektroporation ermöglicht die Einführung der DNA in eukaryotische Zellen. Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen durch elektrische Spannung reversibel permeabel, so dass die DNA in die Zelle eindringen kann. Die Transfektionsmethode der Firma „Amaxa“ ermöglicht die direkte Übertragung der DNA in den Zellkern (Nukleofektion). Hierbei werden die optimierten elektrischen Parameter mit spezifischen Puffern (*Nucleofector<sup>TM</sup> Solution*) eines jeden Zelltyps kombiniert. Zur Transfektion der Karpas 299 Zellen wurde die Methode der Firma „Amaxa“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 5 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das Pellet in warmem Transfektionspuffer (*Nucleofectionsolution&Supplement* [T], Amaxa) auf eine Endkonzentration von  $2 \times 10^6/100 \mu\text{l}$  resuspendiert. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit 5  $\mu\text{g}$  DNA (pcDNA3 Vektorkonstrukt [mit  $\text{IkB}\alpha\Delta\text{N}$ ], siehe 2.1.4) gemischt und in eine

Küvette (Amaxa) pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Programm „V-01“ des Nukleofektors (Amaxa) durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden sofort mit 500  $\mu$ l warmem (37 °C) Medium (mit 20 % FCS) gemischt. Anschließend wurden sie in 1,5 ml Medium (mit 20 % FCS) in 12-Wellzellkulturplatten (Nunc) gegeben. Als Kontrolle wurde die  $2 \times 10^6$  resuspendierten Zellen in Transfektionspuffer (T) verwendet. Danach wurden sie bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (siehe 2.2.13.1). Dieses Konstrukt enthält ein selektierbares Gen. Um den stabilen Transfektanten mit integriertem Konstrukt zu selektieren, wurden am nächsten Tag 1200  $\mu$ g/ml G418 Sulfat (Calbiochem) (siehe 2.2.13.6) hinzugegeben. Der Selektionsdruck wurde 14 Tage aufrechterhalten, wobei das Medium (mit 20 % FCS) alle 4-5 Tage erneuert und mit frischem G418 Sulfat (1200  $\mu$ g/ml) versetzt wurde.

### **2.2.12.1 Herstellung stabiler Transfektanten bzw. Einzelklon $\Delta$ N133**

Für die Herstellung eines stabilen Einzelklons wurden die transfizierten Karpas 299 Zellen nach 14 Tagen durch limitierte Verdünnungen subkloniert. Dazu wurde diese Zellpopulation in einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) des Selektionsmedium (mit 20 % FCS) (siehe 2.1.2) angesetzt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe in entsprechende 96-Wellzellkulturplatten (Nunc) pipettiert. Die Platten wurden für 10 bis 12 Tage bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden sie unter dem Mikroskop betrachtet und die herangewachsenen Zellen wurden (von 1:100 bzw. 1:1000 Platten) weiter verdünnt. Durch diese Verdünnung konnte erreicht werden, dass sich statistisch nur eine Zelle in jeder Vertiefung mit Selektionsmedium befand. Die Platten wurden für weitere 7 Tage bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Einzelklone wurden unter dem Mikroskop identifiziert und mit Hilfe von Pipetten in 24-Wellzellkulturplatten (Nunc) mit dem Selektionsmedium eingesetzt und ca. 7 Tage bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Einzelne Klone sind in diesem Zeitraum zu einer Population herangewachsen. Sie wurden in größere Zellkulturplatten bzw. Kulturgefäße überführt. Die Proteinexpression konnte mittels Western Blot (siehe 2.2.7) und isolierter DNA mit Hilfe der PCR (siehe 2.2.3.1) analysiert werden, somit wurden die positiven Einzelklone identifiziert. Der positive Einzelklon  $\Delta$ N133 wurde mithilfe der Sequenzierung des RT-PCR Produktes weiter analysiert (siehe 2.2.4). Die  $\Delta$ N133 Zellen wurden mit einem CD30-spezifischen Antikörper stimuliert (siehe 2.2.13.9) bzw. mit den Z-VAD-fmk und Z-IETD-fmk Inhibitoren behandelt (siehe 2.2.13.11, 2.2.13.12). Anschließend wurden die positiven Einzelklone bei -80 °C und bei -196 °C (siehe 2.2.13.3) aufbewahrt.

## **2.2.13 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.13.1 Zellkulturbedingungen**

Die humanen Zelllinien (siehe Tabelle 2-1) wurden in RPMI 1640 Medium mit Glutamax kultiviert. Je nach den Ansprüchen der Zelllinie bzw. des durchgeführten Experimentes wurden 1,5 %, 10 % oder 20 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) zugegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Inkubator) (Heraeus) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Als antibakterielle Agenzien wurden Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Das Medium wurde zweimal pro Woche erneuert. Dabei wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Das Splittingverhältnis richtete sich nach dem Wachstumsverhalten der entsprechenden Zelllinie. Alle Experimente wurden in der exponentiellen Wachstumsphase angesetzt. Je nach Zellmenge wurden die Zellen in Kulturplatten bzw. in Kulturflaschen inkubiert. Wurden nur kleinere Zellmengen benötigt, so erfolgte die Kultivierung in 24-, 12-, 6-Wellzellkulturplatten (Nunc) bzw. 25 cm<sup>2</sup> Flaschen (Nunc, Sarstedt). Zur Kultivierung der größeren Zellmenge wurden 75 cm<sup>2</sup> bzw. 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Nunc, Sarstedt) verwendet. Zum Ernten wurden die Zellen in Zellkulturröhrchen (Nunc, Sarstedt) 5 min bei 1200 rpm Raumtemperatur zentrifugiert (Minifuge RF, Varifuge 3.OR, Heraeus). Anschließend wurde das Medium dekantiert und das Zellpellet in dem entsprechenden Medium wiederaufgenommen. Bei allen Experimenten wurden die Kontrolle der Morphologie und die Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.13.2) mikroskopisch (Leica, Zeiss) durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter der sterilen Werkbank (Gelaire BB 6A) durchgeführt.

#### **2.2.13.1.1 Allgemeine Vorgehensweise beim Behandeln und Stimulieren bzw. bei der Proliferationsbestimmung von Zellen**

Um die Zellen im Stadium der exponentiellen Proliferation zu behandeln bzw. stimulieren zu können, wurde ein Tag vor dem Experiment ein Teil der Zellsuspension entnommen und durch frisches Medium (mit 10 % FCS) bzw. Selektionsmedium (mit 10 % FCS) (siehe 2.1.2) ersetzt (Splittingverhältnis: 1:3). Für die Versuche wurde von herangewachsenen Zellen ein Zellpool erstellt und dessen Zellzahl (siehe 2.2.13.2) bestimmt. Die Zellen wurden 5 min bei

1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit vorgewärmtem (37 °C Wasserbad, GFL) Medium (mit 10 % FCS oder 1,5 % FCS) bzw. Selektionsmedium (mit 10 % FCS oder 1,5 % FCS) auf eine bestimmte Zelldichte eingestellt und in entsprechenden Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturplatten angesetzt. Um eine bakterielle Kontamination auszuschließen, wurden Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet.

### **2.2.13.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit 0,4 % Trypanblau (Gibco) versetzt. Die Zählung wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer (Brand) mikroskopisch durchgeführt. Das Trypanblau kann nicht in die Zellen mit intakter Zellmembran eindringen. Somit werden die Zellen mit permeabilisierter Zellmembran (tote Zellen) angefärbt. Nachdem vier Quadranten mit je 16 Quadraten ausgezählt waren, wurde der Mittelwert der Zellen errechnet und die Zellzahl/ml wurde nach folgender Formel berechnet:  $\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert die Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$

### **2.2.13.3 Aufbewahrung eukaryotischer Zellen**

Die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden bei Raumtemperatur 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml kaltem Einfriermedium (siehe 2.1.2) resuspendiert. Die Suspension wurde auf 1 ml Einfrierröhrchen (Nunc) verteilt und sofort auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden bei -80 °C bzw. bei -196 °C (Stickstofftank, K-Series) aufbewahrt.

### **2.2.13.4 Auftauen der eukaryotischen Zellen**

Die eingefrorenen Zellen wurden langsam mit 1 ml sterilem PBS (1x) in 5 ml PBS (1x) überführt und aufgetaut. Die Zellen wurden in 1x PBS gewaschen, um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend wurden sie 5 min bei 1200 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5-8 ml vorgewärmtem

Medium (mit 10 % FCS) in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **2.2.13.5 Aufbewahren der Bakterienzellkulturen**

Zur Aufbewahrung für längere Zeit wurden die Bakterienkulturen in 1x LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in Einfrierröhrchen (Nunc) mit Glycerin (Merck) 1:1 versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.2.13.6 Selektionstest**

Geneticin (G418 Sulfat) gehört zu den Aminoglykosid-Antibiotika. Es zeigt eine Inhibition von Proteinsynthese bei prokaryotischen bzw. eukaryotischen Zellen und hat eine toxische Wirkung auf Bakterien, Würmer, Hefen, Protozoen und höhere Pflanzen bzw. Säugerzellen. G418 Sulfat dient als selektives Agens für transfizierte Zellen, die neo<sup>r</sup>/kan<sup>r</sup> resistente Gene exprimieren. Die auf diese Weise transfizierten Zellen exprimieren die Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase, welche G418 Sulfat, Neomycin und Kanamycin inaktivieren kann. Da es bei der Transfektion von Zellen nicht immer zu einer vollständigen Transfektion kommt, ist eine Selektion notwendig. Der Selektionstest Karpas 299 mit G418 Sulfat (siehe Tabelle 2-2) wurde in 6-Wellzellkulturplatten durchgeführt. In jede Vertiefung wurden 5 ml (2 x 10<sup>5</sup> Zellen) Zellsuspension pipettiert und in entsprechende Vertiefungen wurde G418 Sulfat (Konzentration 100-1700 µg/ml) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Die Quantifizierung der lebenden bzw. toten Zellen erfolgte nach zehn Tagen mit Trypanblau (siehe 2.2.13.2). Bei einer Konzentration von 1200 µg/ml G418 Sulfat sterben die nicht transfizierten Karpas 299 Zellen. Diese Konzentration wurde für die Selektion der Transfektanten verwendet.

#### **2.2.13.7 Proliferationstest mit Trypanblau**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von ΔN133 Zellen (siehe 2.2.12.1) wurden 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) in 6-Wellzellkulturplatten gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Quantifizierung der lebenden bzw. toten Zellen der sechs

unabhängigen Experimente erfolgte mittels Trypanblau (siehe 2.2.13.2) nach 24 h, 48 h und 72 h. Als Kontrolle dienten Karpas 299 Zellen. Bei der Auswertung handelt es sich um die arithmetischen Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen. Die Abschätzung der Messungsgenauigkeit wurde durch die Berechnung der Standardabweichung der Messwerte bestimmt.

### **2.2.13.8 WST-1 Zellvitalitätsassay**

Beim *WST-1 Assay* (Roche) handelt es sich um eine spektrophotometrische Quantifizierung von Wachstum und Vitalität der Zellen. Diese Bestimmung beruht auf einem Tetrazoliumsalz (WST-1), das durch zelluläre Enzyme zu Formazan umgesetzt wird. Die Zunahme der Anzahl lebender Zellen entspricht der Zunahme der aktiven mitochondrialen Dehydrogenase, welches ein Aufsteigen des farbigen Formazan anzeigt, das quantifiziert werden kann. Zur Durchführung wurde eine 96-Wellzellkulturplatte verwendet. In jede Vertiefung wurden 100 µl Karpas 299 Zellsuspension ( $2 \times 10^4$  Zellen) als Dreifachbestimmung gegeben. Anschließend wurden in entsprechende Vertiefungen 10-, 20-, 50-, 100- µM Z-IETD-fmk (1:50 verdünnt mit Medium [mit 10 % FCS] der Stammlösung, siehe Tabelle 2-2) zugegeben, um die Wirkung von Z-IETD-fmk (Caspase-8 Inhibitor) auszuschließen, wurde 30 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, danach 10 µM Arsentrioxid (siehe Tabelle 2-2) pipettiert. Als Kontrolle dienten die Zellen ohne und mit DMSO, die Zellen mit 0,1 M NaOH und 10-, 20-, 50-, 100- µM von Z-IETD-fmk bzw. die Zellen mit 0,1 M NaOH. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden 10 µl *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Roche) hinzugefügt. Die Messung erfolgte nach 30 min, 2 h, 4 h und 5 h bei 450 nm in einem ELISA-Plattenlesegerät (MRX, Dynex Technologies) bei einer Referenzwellenlänge von 630 nm. Als Leerwert für diese Messung dienten 100 µl des verwendeten Mediums (mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin).

### **2.2.13.9 CD30 Stimulation der Zellen**

Um die CD30 Signalwege in den Zellen zu untersuchen, muss der Rezeptor CD30 mit entsprechendem Ligand oder Antikörper stimuliert werden. Hiermit wurden  $1,2 \times 10^5$  bzw.  $1,5 \times 10^5$  ΔN133 Zellen (siehe 2.2.12.1) und die Kontrollzelllinie Karpas 299 (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) mit 0,5 µg/ml des CD30-Antikörpers Ki-1 (siehe Tabelle 2-6)

stimuliert. Die Inkubation der Zellen mit 0,5 µg/ml IgG<sub>3</sub> (siehe Tabelle 2-6) oder ohne Zusatz von Antikörpern diente als negative Kontrolle. Die Stimulation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> nach jeweils 5, 16, 24, 48 und 72 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und anschließend die Quantifizierung der Anzahl lebender bzw. toter Zellen (siehe 2.2.13.2) durchgeführt. Von den stimulierten und Kontrollzellen wurde die Gesamt-RNA (siehe 2.2.1.7) isoliert bzw. Zelllysate (siehe 2.2.6) hergestellt. Die stimulierten bzw. Kontrollzellen wurden für die durchflusszytometrische Analyse (siehe 2.2.11) verwendet und die Zellen nach 16 Stunden Inkubation für die immunhistologische Färbung (siehe 2.2.9) eingesetzt.

#### **2.2.13.10 Bestimmung der toxischen Wirkung von Etoposid und Arsentrioxid (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)**

Um die toxische Wirkung der Agenzien Etoposid bzw. Arsentrioxid (siehe Tabelle 2-2) auf Zelllinien zu untersuchen, wurden jeweils 5 ml ( $2 \times 10^5$  Zellen) Zellsuspension der Zelllinien Daudi, HL60 und Karpas 299 (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) in verschiedene 6-Wellzellkulturplatten gegeben. Anschließend wurde zu den Daudi und HL60 Zellen (0,9-, 1-, 2-, 3-, 4- µM) Etoposid (1:100 verdünnt mit Millipore Wasser aus Stammlösung, siehe Tabelle 2-2) pipettiert. Zur Karpas 299 Zellsuspension wurde (2-, 4-, 6-, 8-, 10- µM) Arsentrioxid hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 6 Tage. Die Quantifizierung toter bzw. lebender Zellen fand nach 24 h, 48 h, 72 h bzw. 6 Tagen mittels Trypanblau statt (siehe 2.2.13.2). Als Kontrolle dienten die Zellen ohne Behandlung bzw. mit DMSO und 0,1 M NaOH. Anschließend wurden die Konzentration und Inkubationszeit bestimmt, bei der alle Zellen tot waren. Diese Bedingungen wurden für die weiteren Versuche verwendet (siehe 2.2.13.10.1, 2.2.13.10.2).

##### **2.2.13.10.1 Behandlung der Daudi und HL60 Zelllinie mit 4 µM Etoposid**

Zu  $2 \times 10^5$  Daudi und HL60 Zellen (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) wurden jeweils 4 µM Etoposid hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 6 Tage lang für Daudi bzw. 48 h für HL60 Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Als Kontrolle dienten Zellen ohne und mit DMSO. Nach Bestimmung der Zellzahl der lebenden bzw. toten Zellen (siehe 2.2.13.2) wurde die Zelllysate

hergestellt (siehe 2.2.6) und durch SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) bzw. Western Blot (siehe 2.2.7) analysiert.

### **2.2.13.10.2 Induktion der Apoptose durch 10 $\mu$ M Arsenitrioxid ( $As_2O_3$ ) in Karpas 299 Zellen**

Zu  $2 \times 10^5$  Karpas 299 (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) wurden 10  $\mu$ M Arsenitrioxid (siehe 2.2.13.10) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  für 48 Stunden. Die Zellen ohne oder mit 0,1 M NaOH dienten als Kontrolle. Nach der Quantifizierung der lebenden bzw. der toten Zellen (siehe 2.2.13.2) wurde von den Zellen die Zelllysate (siehe 2.2.6) hergestellt und durch SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3) und Western Blot (siehe 2.2.7) analysiert. Behandelte bzw. Kontrollzellen wurden für die Zytozentrifugenpräparation (siehe 2.2.10) weiterverwendet.

### **2.2.13.11 Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von Z-IETD-fmk**

1 ml ( $1,2 \times 10^5$  Zellen)  $\Delta$ N133 bzw. Karpas 299 Zellsuspension (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) wurde in 24-Wellzellkulturplatten gegeben und Z-IETD-fmk (10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) (siehe Tabelle 2-2) in entsprechende Vertiefungen pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  wurde in diese Vertiefung 0,5  $\mu$ g/ml des CD30-Antikörpers Ki-1 hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 48 Stunden bei 37 °C und 5 %  $CO_2$ . Als Kontrolle dienten die Zellen mit oder ohne IgG<sub>3</sub> (0,5  $\mu$ g/ml) bzw. Ki-1 (0,5  $\mu$ g/ml), die Zellen mit DMSO, die Ki-1 stimulierten Zellen mit DMSO und die Zellen mit IgG<sub>3</sub> und DMSO. Nach der Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.2.13.2) wurden die Zellen für WST-1 Zellvitalitätsassay verwendet (siehe 2.2.13.8), somit wurden 100  $\mu$ l Zellen (stimulierte bzw. Kontroll-Zellen) in 96-Wellzellkulturplatten gegeben und 10  $\mu$ l des *Cell Proliferation Reagent WST-1* zugegeben. Die Messung erfolgte nach 30 min, 2 h, 4 h und 7 h bei 450 nm auf einem ELISA-Plattenlesegerät (MRX, Dynex Technologies) bei einer Referenzwellenlänge von 630 nm. Als Leerwert für diese Messung dienten 100  $\mu$ l verwendetes Medium (mit 1,5 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin).



### **2.2.13.12 Die Blockierung der Apoptose mittels Z-IETD-fmk und Z-VAD-fmk Inhibitoren in $\Delta$ N133 Zellen**

$1,2 \times 10^5$   $\Delta$ N133 und Karpas 299 Zellen wurden in verschiedene 175 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) und 10  $\mu$ M Z-IETD-fmk (siehe Tabelle 2-2) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der CD30-Antikörper Ki-1 (0,5  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 Stunden. Um die Wirkung des Pan-Caspase Inhibitors zu untersuchen, wurden die  $1,5 \times 10^5$   $\Delta$ N133 und Karpas 299 Zellen (nach Vorbereiten, siehe 2.2.13.1.1) mit 0,5  $\mu$ g/ml Ki-1 (CD30-spezifische Antikörper) stimuliert und dazu 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk (siehe Tabelle 2-2) pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 16, 48 und 72 Stunden. Als Kontrolle dienten Zellen mit Ki-1 (0,5  $\mu$ g/ml) bzw. mit IgG<sub>3</sub> (0,5  $\mu$ g/ml) behandelten Zellen, die Zellen mit IgG<sub>3</sub> (0,5  $\mu$ g/ml) und 10  $\mu$ M Z-IETD-fmk bzw. die Zellen mit IgG<sub>3</sub> (0,5  $\mu$ g/ml) und 50  $\mu$ M Z-VAD-fmk und die Zellen ohne und mit DMSO. Anschließend wurde von den Zellen (Z-IETD-fmk behandelte bzw. Kontroll-Zellen) Zelllysate (siehe 2.2.6) hergestellt. Die Zellen wurden für die durchflusszytometrische Analyse (siehe 2.2.11) verwendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung und Charakterisierung einer $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ produzierenden ALCL (Anaplastische großzellige Lymphom)-Zelllinie

#### 3.1.1 Überprüfung des Vektorkonstrukts

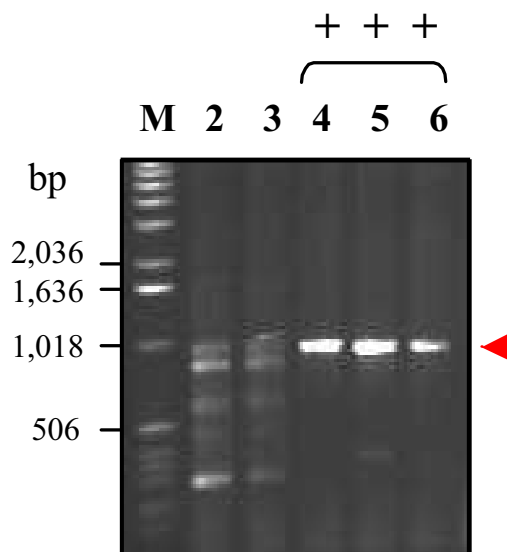
Die Vervielfältigung des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -haltigen pcDNA3 Vektorkonstrukts (siehe 2.1.4) wurde nach der *One Shot*<sup>®</sup> *Chemical* Transformationsmethode durchgeführt. Hierbei wurden 100 ng des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -haltigen pcDNA3 Vektorkonstrukts mit (50  $\mu\text{l}$ ) der kompetenten Bakteriensuspension (*E.coli* Stamm TOP10) gemischt und inkubiert, was zu einer massiven Vermehrung des Vektorkonstrukts führt (Retransformation, siehe 2.2.1.1). Die isolierte Plasmid-DNA (DNA-Präparation, siehe 2.2.1.2) wurde durch die Restriktionsendonukleasen (Hind III, Xho I) weiter analysiert (siehe 2.2.1.5). Diese beiden Restriktionsenzyme schneiden auf beiden Seiten der sogenannten „multiple cloning site“, so dass das Restriktionsfragment die Länge des einklonierten Inserts widerspiegelt. Das hier zur Darstellung gebrachte Fragment zeigte eine Länge von ca. 800 bp und entspricht somit der erwarteten Größe des einklonierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Konstrukts. Weiterhin wurde zur Überprüfung des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -haltigen pcDNA3 Vektorkonstrukts ein PCR durchgeführt und die PCR-Produkte sequenziert (siehe 2.2.4). Zur Amplifikation bzw. Sequenzierung der Insert ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ ) Region wurden die Primer  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  for und  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  rev (siehe Tabelle 2-3) verwendet, die komplementär zu den Sequenzen im pcDNA3 Vektor-Anteil und der Insert ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ ) Region sind. Dabei wurde außer dem Insert ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ ) auch der pcDNA3 Vektor-Anteil amplifiziert. Die erhaltene Sequenz der PCR-Produkte wurde mit in der Genbank-Datenbank (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) vorhandenen Sequenzen verglichen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Konstrukt mit dem korrespondierenden Abschnitt des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Datenbankeintrags übereinstimmt.

#### 3.1.2 Selektion (Screening) von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden ALCL-Zelllinien

Zur Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  wurden Karpas 299 Zellen mit einem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -haltigen pcDNA3 Plasmid durch Elektroporation transformiert. Die Transfektion der Karpas 299

Zellen wurde mit dem Transfektionssystem der Firma „Amaxa“ (siehe 2.2.12) durchgeführt. In zwei Transformationsexperimenten wurden insgesamt 97 unabhängige Klone isoliert, die in Gegenwart von 1200 µg/ml G418 Sulfat wachsen konnten. Bei dieser Konzentration von G418 Sulfat starben die nicht transfizierten Karpas 299 Zellen (Selektionstest, siehe 2.2.13.6). Für das Screening der Einzelklone mittels PCR Analyse (siehe 2.2.3.1) wurden sieben Klone ausgewählt. Hierbei konnte durch PCR-Amplifizierung des transfizierten Konstrukts mit den Oligonukleotid-Primern T7 und BGH (engl. Bovine Growth Hormone, Polyadenylierungssignal-Sequenzen) (siehe Tabelle 2-3) bei vier Klonen (Klon 1, Klon 2, Klon 3, Klon 4) ein Fragment mit der Länge von 1000 bp identifiziert werden, das aus ca. 800 bp der Insertregion (IkB $\alpha$  $\Delta$ N) und ca. 200 bp der Vektorregion bestand. Drei dieser positiven Klone sind in Abbildung 3-1 (Spuren 4, 5, 6) dargestellt. Bei drei weiteren Klonen konnte die IkB $\alpha$  $\Delta$ N Sequenz nicht nachgewiesen werden, zwei Negativklone (ohne IkB $\alpha$  $\Delta$ N Insert) zeigten erwartungsgemäß keine Insertsequenz (siehe Abbildung 3-1). Zur Kontrolle der Sensitivität und Spezifität der PCR wurde das Plasmid pcDNA3, welches das Insert IkB $\alpha$  $\Delta$ N enthält, in unterschiedlichen Konzentrationen (10 pg, 1 pg, 100 fg) als Template eingesetzt. Die PCR mit den Primern T7 und BGH war so sensitiv, dass weniger als 100 fg Plasmid pcDNA3 (mit IkB $\alpha$  $\Delta$ N) nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die ausbleibende Amplifikation bei den Negativkontrollen wie mock transfizierte (pcDNA3) Karpas 299 bzw. von den nicht transfizierten Zelllinien Karpas 299, L1236 sowie PCR Ansätze ohne DNA belegen die Spezifität des Nachweises (Daten nicht gezeigt). Aus einem Positivklon (Klon 1) sowie Karpas 299 Zellen (Wildtyp) wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.1.7) und durch RT-PCR analysiert. Hierbei wurde isolierte RNA revers transkribiert und mittels einer PCR amplifiziert (siehe 2.2.3.2). Als Primer dienten IkB $\alpha$  for (liegt in dem pcDNA3 Vektor-Anteil) und IkB $\alpha$  rev (komplementär zur Insert Region) (siehe Tabelle 2-3). Dadurch konnten außer dem Insert (IkB $\alpha$  $\Delta$ N) auch angrenzende pcDNA3 Vektor-Anteile amplifiziert werden. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem Gel aufgetragen und anschließend wurden die RT-PCR-Produkte von Klon 1 bzw. das Produkt der PCR-Positivkontrolle (IkB $\alpha$  $\Delta$ N-haltiger pcDNA3 Plasmid) sequenziert (siehe 2.2.4) und die erhaltene Sequenz mit in der Genbank-Datenbank (Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) vorhandenen Sequenzen verglichen. Der Datenbankvergleich ergab eine vollständige Übereinstimmung des IkB $\alpha$  $\Delta$ N-Konstrukts mit dem korrespondierenden Abschnitt des IkB $\alpha$ -Datenbankeintrags. Um die Proteinexpression von IkB $\alpha$  $\Delta$ N in den isolierten Klonen untersuchen zu können, wurden die zellulären Extrakte von

35 Klonen durch Western Blot analysiert, wobei die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  mit anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörpern nachgewiesen wurde. Der anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörper bringt auch die Expression von nativem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  zur Darstellung, wobei als Positivkontrolle die Zelllinie L1236 (siehe Tabelle 2-1) verwendet wurde, die eine konstitutive Expression von nativem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Protein zeigt. Als Negativkontrolle diente die Zelllinie L428 (siehe Tabelle 2-1), die ein mutiertes  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Protein (mit einer trunkierten C-terminalen Region) aufweist [50;106;107], das nicht durch den verwendeten anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörper detektiert werden konnte. In Abbildung 3-2 wird exemplarisch ein Positivklon (Klon 1) dargestellt, welcher die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  aufwies, während die Wildtypzelllinie Karpas 299 nur natives  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  exprimiert. Für die weiteren Untersuchungen wurde dieser Klon (Klon 1) ausgewählt (siehe Abbildung 3-1, Spur 4 und Abbildung 3-2, Spur 1) und mit  $\Delta\text{N133}$  bezeichnet. Anschließend wurde dieser ermittelte isolierte Positivklon  $\Delta\text{N133}$  im Selektionsmedium angezogen und auf eine mögliche Auswirkung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Expression am Wachstum der Zellen bzw. an den CD30 Signalwegen untersucht.

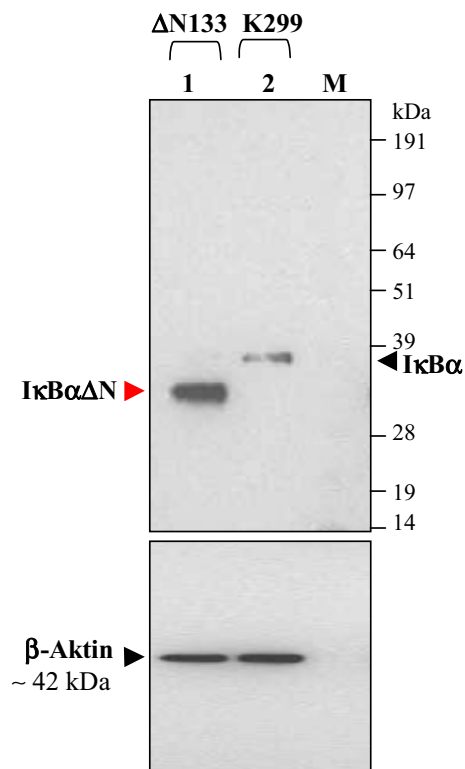


**Abbildung 3-1: Screening der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Einzelklone mittels DNA-PCR.**

Für die Amplifikation des  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Inserts wurden die Primer T7 und BGH (siehe Tabelle 2-3) verwendet.

- Die Positivklone (+): Spuren 4, 5 und 6
- Die Negativklone: Spuren 2 und 3

Der rote Pfeilkopf gibt die Position des Amplifikats an. **M**: Größenstandard, links ist die Länge einiger Fragmente in Basenpaaren (bp) angegeben. Aufgetragen wurden 6  $\mu\text{l}$  aus dem Reamplifikationsansatz, 1%iges mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel.



**Abbildung 3-2: Darstellung einer IκBαΔN Proteinexpression in einer ALCL-Zelllinie (Karpas 299) mittels Western Blot.**

Proteinextrakte des isolierten Klon 1 und der nativen Karpas 299 Zelllinie. Nachweis mit einem Antikörper gegen IκBα (siehe Tabelle 2-4).

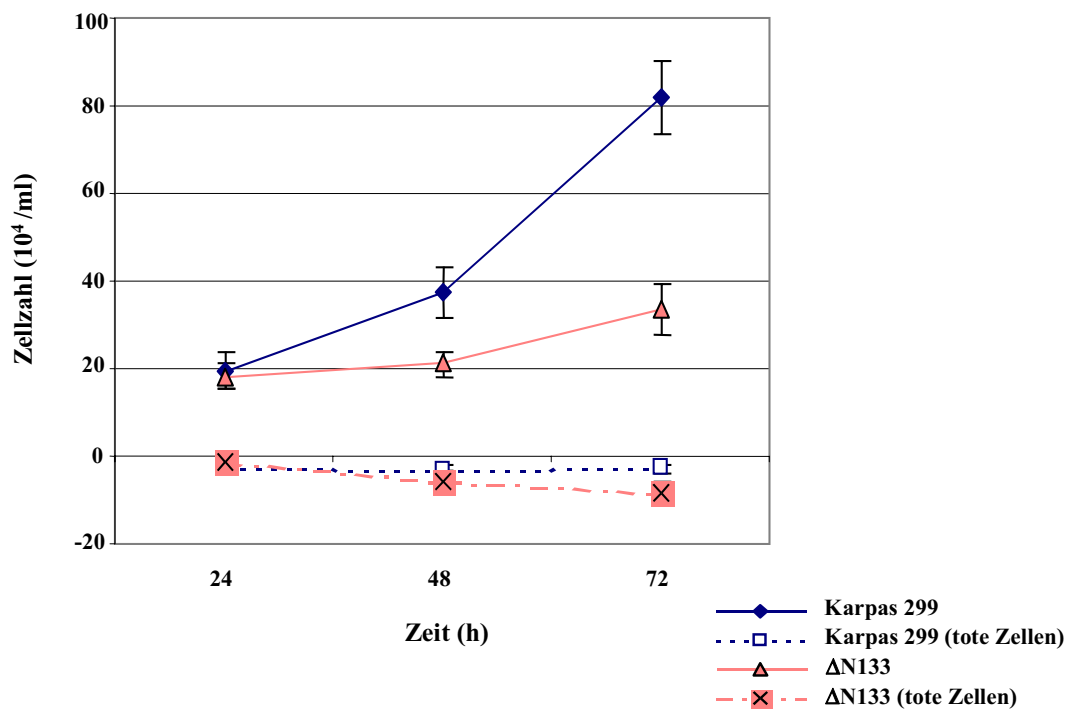
- Klon 1 (ΔN133): Spur 1
- Karpas 299 (K299): Spur 2

Der rote Pfeilkopf gibt die Position des IκBαΔN Proteins an, die Größe liegt bei ~ 32 kDa. Die Größe vom nativen IκBα (~ 37 kDa) ist mit einem schwarzen Pfeilkopf dargestellt. M: Größenstandards mit Angaben der Größe in Kilodalton (kDa) sind rechts dargestellt. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Pro Spur wurden 10,7 μg Proteinextrakt eingesetzt, NuPAGE 10%iges Bis-Tris Gel.

### 3.1.3 Die IκBαΔN-Expression und ihr Einfluss auf das Wachstum der ΔN133 Zellen

Die ΔN133 Zellen exprimierten das um 70 Aminosäuren trunkeerte IκBα (Aminosäure 71-317) Protein (IκBαΔN), das mit 32 kDa ein um 5 kDa geringeres Molekulargewicht aufweist als das endogene Wildtyp IκBα (~ 37 kDa, siehe Abbildung 3-2). Wie die publizierten Daten zeigen, ist das trunkeerte IκBαΔN in der Lage, durch Bindung an den Transkriptionsfaktor NF-κB dessen Aktivität weitgehend zu blockieren [50]. Die damit verbundenen Auswirkungen wurden bereits für Hodgkin Lymphom Zelllinien untersucht und beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  Expression auf ALCL Zelllinien untersucht werden. Zunächst wurden der Phänotyp und das Wachstumsverhalten der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden Zelllinie ( $\Delta\text{N133}$ ) überprüft. Die mikroskopische Inspektion der Zellen ergab auch nach längerem Wachstum keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp (Karpas 299). Die  $\Delta\text{N133}$  Zellen wuchsen im Medium wie Wildtyp-Zellen, so dass metabolischen Störungen durch die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  ausgeschlossen werden konnten. Um Hinweise auf eine veränderte Wachstumsrate der Zellen zu erhalten, wurde das Wachstumsverhalten der  $\Delta\text{N133}$ - und Wildtyp-Kulturen verglichen (siehe Abbildung 3-3). In allen sechs unabhängigen Experimenten wurde jeweils eine verlängerte Generationszeit der rekombinanten Zelllinie ( $\Delta\text{N133}$ ) festgestellt. Die Quantifizierung der vitalen Zellen mittels Trypanblau ergab keinen signifikanten Unterschied angefärbter Zellen im Vergleich zum Wildtyp Karpas 299. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Zelllinien nicht im Anteil apoptotischer Zellen unterscheiden.



**Abbildung 3-3: Wachstum der  $\Delta\text{N133}$  und Karpas 299 (Wildtyp) Zellen in Medium.**

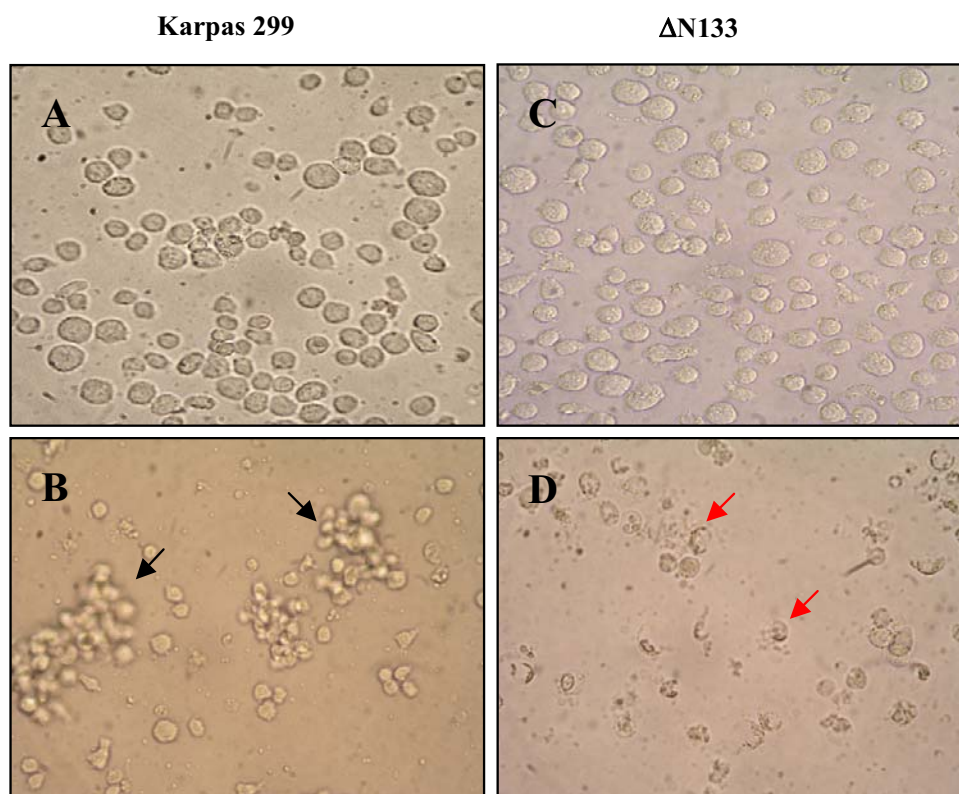
Zellen wurden in 5 ml Medium mit einer Ausgangsdichte  $1,5 \times 10^5$  Zellen/ml eingesetzt. Die Quantifizierung der lebenden bzw. toten Zellen erfolgte in sechs unabhängigen Experimenten mittels Trypanblau nach 24, 48 und 72 Stunden. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten mit ihren Standardabweichungen.

### **3.2 Die Stimulation vom Zytokinrezeptor CD30 in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierender ALCL Zelllinie ( $\Delta\text{N133}$ )**

Die konstante Expression des Zytokinrezeptors CD30 ist charakteristisch für das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL). Welche Rolle CD30 bei der Entstehung des Lymphoms spielt, ist allerdings noch nicht geklärt. In der Literatur ist bekannt, dass die Aktivierung des Rezeptors CD30 mittels seines Liganden oder eines CD30-spezifischen monoklonalen Antikörpers zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führte [28-30;59] (siehe 1.2.3). Um die Bedeutung der CD30-vermittelten NF- $\kappa$ B Aktivierung zu untersuchen, wurden im Rahmen der Arbeit die ALCL-Zelllinie Karpas 299 sowie die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -transformierte Karpas 299 ( $\Delta\text{N133}$ ) verwendet (siehe 2.2.12 und 2.2.12.1). Um die Auswirkungen der CD30-vermittelten Signaltransduktion in NF- $\kappa$ B-defizienten Karpas 299 Zellen untersuchen zu können, wurden die  $\Delta\text{N133}$  und Karpas 299 (Kontrollversuch) Zellen mit einem CD30-spezifischen agonistischen monoklonalen Antikörper (Ki-1) stimuliert. Als Negativkontrolle wurden beide Zelllinien mit einem unspezifischen Kontrollantikörper gleichen Isotyps ( $\text{IgG}_3$ ) inkubiert. Die Stimulation wurde in 5, 16, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt (siehe 2.2.13.9). Zunächst wurde das Wachstum der verschiedenen Zelllinien nach CD30-Stimulation analysiert. Wildtyp Karpas 299 Zellen wachsen ohne CD30-Stimulation und in Gegenwart des  $\text{IgG}_3$  Kontrollantikörpers in Zellsuspension (siehe Abbildung 3-4), während die Zugabe des CD30-Antikörpers nach 30 Minuten zur Ausbildung von Zell-„Clustern“ (Akkumulationsform; siehe Abbildung 3-4, B) führt. Außerdem wiesen die Zellen ein verlangsamtes Wachstum nach 48 bzw. 72 Stunden auf, das aber nicht mit der Zunahme von Trypanblau-gefärbten Zellen korrelierte. Die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierende ALCL Zelllinie zeigte zwar nach CD30-Stimulation ebenfalls eine Tendenz zur Ausbildung von Zell-„Clustern“, die aber durch den massiv eintretenden Zelltod, der nach 48 bzw. 72 Stunden ein Maximum erreichte, überlagert wird (siehe Abbildung 3-4, D).

Zum Nachweis von nativem und trunkiertem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurden die Proteinextrakte von transfizierten und nicht transfizierten Karpas 299 Zellen sowohl mit (Ki-1 Antikörper) und ohne (Medium bzw.  $\text{IgG}_3$ -Kontrolle) CD30-Stimulation (nach 5 Stunden) mittels Western Blot untersucht. In den nicht transfizierten Zellen ließ sich sowohl mit als auch ohne CD30-Stimulation das native  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Protein darstellen, wobei die Menge von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Protein in CD30-stimulierten Zellen etwas schwächer erscheint (siehe Abbildung 3-5, Spur 5). In den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -transfizierten Karpas 299 Zellen ließ sich nahezu ausschließlich das trunkierte  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$

Protein nachweisen, dessen Expressionsstärke sich durch Stimulation des CD30-Rezeptors nicht veränderte (siehe Abbildung 3-5, Spur 8). Die Hodgkin Zelllinie (L428), die ein mutiertes  $I\kappa B\alpha$  Protein (mit einer trunkierten C-terminalen Region) exprimiert, das durch den anti- $I\kappa B\alpha$  Antikörper (detektiert C-terminales Ende des Proteins) nicht detektierbar war, wurde als Negativkontrolle verwendet (siehe Abbildung 3-5, Spur 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die CD30-Stimulation eine  $I\kappa B\alpha$ -Degradierung in den Wildtyp-Zellen (Karpas 299) geschieht, infolgedessen kommt es zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung (siehe 1.3.5). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des CD30-spezifischen Antikörpers Ki-1 keine  $I\kappa B\alpha\Delta N$ -Degradation in den rekombinanten Karpas 299 Zellen bewirken kann. In der verkürzten  $I\kappa B\alpha$ -Mutante ( $I\kappa B\alpha\Delta N$ ) fehlen die ersten 70 Aminosäuren der N-terminalen Region, so dass die CD30-Stimulation keine Phosphorylierung und damit Degradierung des Proteins induzieren kann (siehe Abbildung 1-3, B).



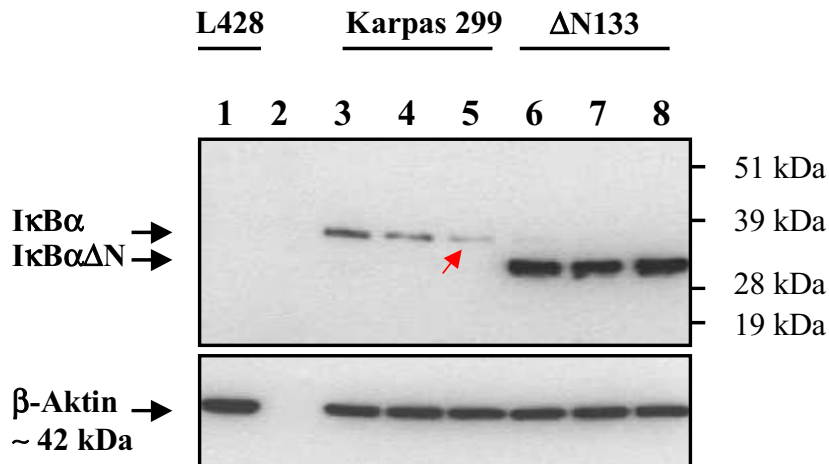
**Abbildung 3-4: Auswirkung der CD30-Stimulation auf  $\Delta N133$  und Karpas 299 Zellen.**

$1,2 \times 10^5$   $\Delta N133$  bzw. Wildtyp Karpas 299 Zellen wurden für 24 Stunden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) stimuliert.

- Karpas 299 Zellen: **A**) im Medium, **B**) stimuliert mit Ki-1
- $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierende ALCL Zelllinie ( $\Delta N133$ ): **C**) im Medium, **D**) stimuliert mit Ki-1

Die schwarzen Pfeile verweisen auf Zell-„Cluster“ in der Zellkultur. Die toten Zellen sind mit roten Pfeilen dargestellt. Die Darstellung wurde mit einer Digital-Kamera (Olympus; Typ C-5050) fotografisch dokumentiert.





**Abbildung 3-5: IκBα Protein-Expression** (Western Blot. NuPAGE 10%iges Bis-Tris Gel) **in CD30 stimulierten und unstimulierten Karpas 299 (Wildtyp und ΔN133) Zellen.**  $1,5 \times 10^5$  Karpas 299 bzw. ΔN133 Zellen wurden für 5 Stunden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) stimuliert. Der Nachweis für die IκBα bzw. IκBαΔN Proteine erfolgte mit einem IκBα Antikörper (siehe Tabelle 2-4).

- Karpas 299 Zellen: 3) im Medium, 4) mit IgG<sub>3</sub>, 5) stimuliert mit Ki-1
- ΔN133 Zellen: 6) im Medium, 7) mit IgG<sub>3</sub>, 8) stimuliert mit Ki-1
- Zelllinie L428: 1) unbehandelt (Negativkontrolle)

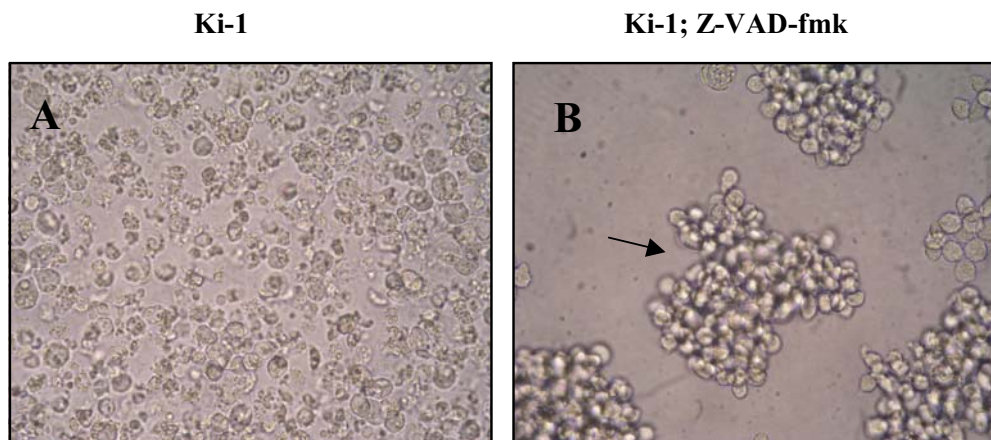
Der rote Pfeil zeigt eine IκBα-Degradierung in die CD30-stimulierten Karpas 299 Zellen. β-Aktin diente als Ladungskontrolle. Spur 2: Der Größenstandard mit Angaben der Größe in kilodalton (kDa) ist exemplarisch rechts dargestellt. Pro Spur wurden vom Proteinextrakt  $10,7 \mu\text{g}$  eingesetzt.

### 3.2.1 Nachweis der Apoptose der CD30 stimulierten ΔN133 Zellen mittels Propidiumjodid (PI)

Die bisherigen Beobachtungen haben gezeigt, dass die IκBαΔN-exprimierenden Karpas 299 Zellen (ΔN133) nach Stimulation von CD30 in Apoptose gehen, wobei ein Maximum bei 72 Stunden zu verzeichnen war. Um den Mechanismus der Apoptose-Induktion besser zu verstehen, wurde zunächst ein Pan-Caspase-Inhibitor eingesetzt. Hierfür wurden die ΔN133 und Wildtyp (Karpas 299) Zellen für 16, 48 und 72 Stunden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  CD30 spezifischen Antikörper (Ki-1) in Kombination mit  $50 \mu\text{M}$  Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk (Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone) stimuliert (siehe 2.2.13.12). Z-VAD-fmk führt zur irreversiblen Hemmung der Caspaseaktivität. Die mikroskopische Analyse der Zellen ergab, dass ohne Z-VAD-fmk die IκBαΔN-transfizierten Karpas 299 Zellen nach CD30 Stimulation – wie erwartet – durch massive Apoptose abstarben (siehe Abbildung 3-6, A). Diese

Apoptose setzte nach etwa 16 Stunden ein und erreichte nach 72 Stunden ihren Höhepunkt. In Gegenwart von Z-VAD-fmk konnte die CD30-vermittelte Apoptose in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-transfizierten Karpas 299 Zellen praktisch komplett unterdrückt werden, wobei diese Zellen nach CD30 Stimulation und mit dem Pan-Caspase-Inhibitor die von dem Wildtyp her bekannten Zell-, „Cluster“ ausbildeten und keinen nennenswerten Anteil an apoptotischen Zellen zeigten (siehe Abbildung 3-6, B). Die Wildtyp Karpas 299 Zellen wiesen nach CD30 Stimulation mit und ohne Pan-Caspase-Inhibitor ein übereinstimmendes Zellwachstumsmuster unter Ausbildung von Zell-, „Clustern“ auf, während nicht CD30-stimulierte Karpas 299 Zellen als Einzelzellsuspensionen wuchsen. Die Bestimmung der toten Zellen mittels Trypanblau ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen CD30-stimulierten und unstimulierten Karpas 299 Zellen. Auch die Zugabe von Z-VAD-fmk ergab keine Änderung in der Zahl der toten Zellen.

Zur genauen Quantifizierung der Apoptose-Effekte wurden die Wildtyp und I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-transfizierten Karpas 299 Zellen einer Propidiumjodid (PI)-Messung unterzogen. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nur in permeabilisierte Zellmembranen bzw. in apoptotische Zellen (im späten Stadium) eindringen kann und sich dort an die DNA anlagert. Somit lässt sich die Apoptose in der Durchflusszytometrie (FACS, „Fluorescence Activated Cell Sorting“) nachweisen und quantifizieren. Es wurden sowohl PI gefärbte Wildtyp Karpas 299 Zellen als auch der  $\Delta$ N133 Klon mit und ohne CD30 Stimulation durch Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.2.11.1). Wie in Abbildung 3-7 dargestellt, wurde eine Apoptoserate von 40,3 % in den  $\Delta$ N133 Zellen nach CD30 Stimulation nachgewiesen (f), während die Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk die Apoptoserate auf 5,6 % reduzieren konnte (siehe Abbildung 3-7, h). Diese Ergebnisse konnten in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen und auch mit veränderten Inkubationszeiten bestätigt werden. Die Apoptoserate der CD30-stimulierten und mit dem Pan-Caspase-Inhibitor behandelten  $\Delta$ N133 Zellen entsprach dem Anteil an apoptotischen Zellen, der nach CD30 Stimulation in den Wildtyp Karpas 299 Zellen bestimmt werden konnte (4,5 %; siehe Abbildung 3-7, b). Nicht stimulierte bzw. Kontroll (IgG<sub>3</sub>)-stimulierte Karpas 299 und  $\Delta$ N133 Zellen zeigten ebenfalls keine nennenswerte Apoptose (siehe Abbildung 3-7). Diese Ergebnisse belegen, dass die CD30-vermittelte Apoptose der I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-transfizierten Karpas 299 Zellen über die Aktivierung von Caspasen ausgelöst wird. Die weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeiten dienten zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen.



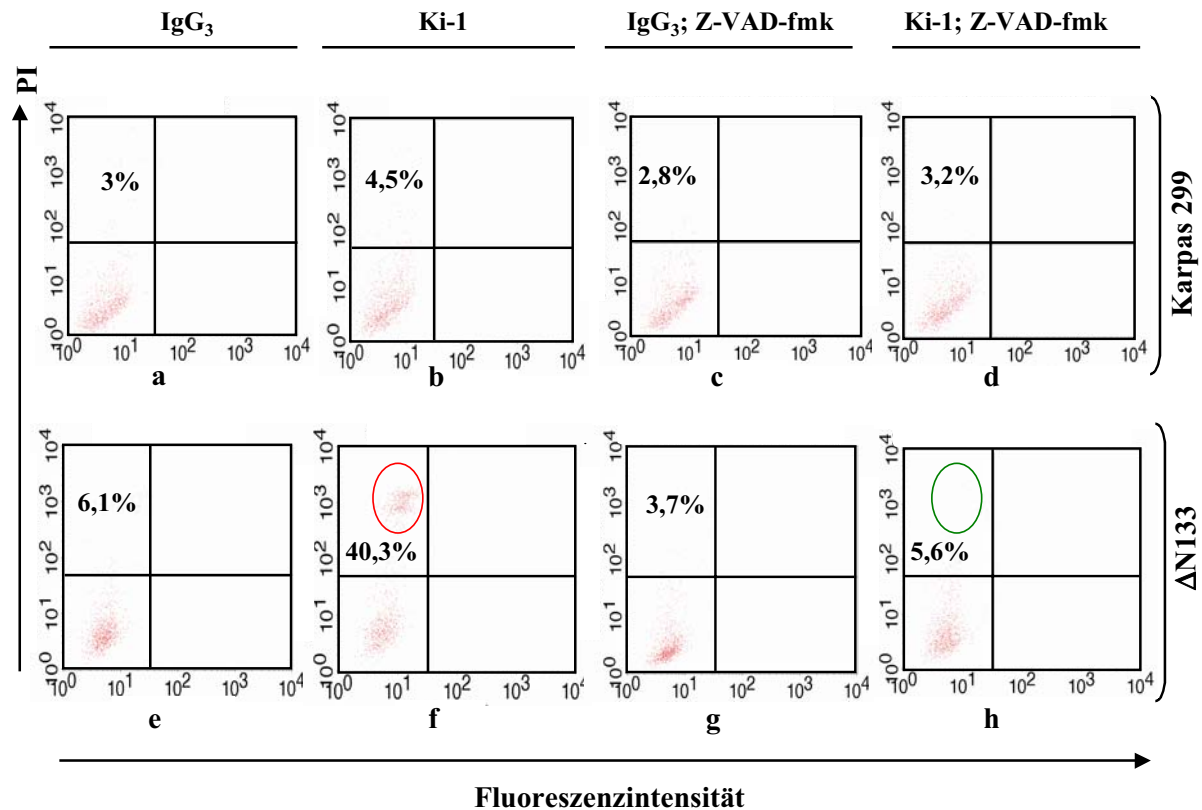
**Abbildung 3-6: Zytomorphologie der  $\Delta$ N133 Zellen nach CD30 Stimulierung mit bzw. ohne Zugabe des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk.**

$1,2 \times 10^5$  Zellen wurden für 72 Stunden stimuliert:

**A)** mit dem CD30-spezifischen Antikörper Ki-1 (0,5  $\mu$ g/ml)

**B)** mit dem CD30-spezifischen Antikörper Ki-1 (0,5  $\mu$ g/ml) in Gegenwart des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk (50  $\mu$ M)

Der Pfeil kennzeichnet die Ausbildung von Zell-„Clustern“ in der Zellkultur. Die Morphologie wurde mit einer Digital Kamera (Olympus; Typ C-5050) fotografisch dokumentiert.



**Abbildung 3-7: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose mittels Propidiumjodid (PI).**

$1,5 \times 10^5$  Zellen wurden für 16 Stunden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) in Kombination mit  $50 \mu\text{M}$  Z-VAD-fmk (Pan-Caspase-Inhibitor) stimuliert, die Zellen geerntet und gefärbt mit einem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI). Im oberen linken Quadranten der Dot-Plots ist der Anteil apoptotischer Zellen in Prozent angegeben.

- Wildtyp Karpas 299 Zellen: a) mit IgG<sub>3</sub>, b) stimuliert mit Ki-1, c) mit Z-VAD-fmk und IgG<sub>3</sub>, d) mit Z-VAD-fmk und Ki-1
- ΔN133 Zellen: e) mit IgG<sub>3</sub>, f) stimuliert mit Ki-1, g) mit Z-VAD-fmk und IgG<sub>3</sub>, h) mit Z-VAD-fmk und Ki-1

Die rot umrandete Region zeigt die apoptotischen Zellen und der grün dargestellte Kreis soll die Aufhebung der Apoptose symbolisieren. Die Messung wurde in FACSsort (Becton-Dickinson) durchgeführt und mithilfe der CellQuest bzw. CellQuest Pro Software ausgewertet.

### **3.3 Aktivierung des Zytokinrezeptors CD30 führt zum Todesrezeptor-signalweg in $\Delta$ N133 Zellen**

#### **3.3.1 Nachweis der Aktivierung bzw. Inhibition von Caspase-8 mittels Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI)**

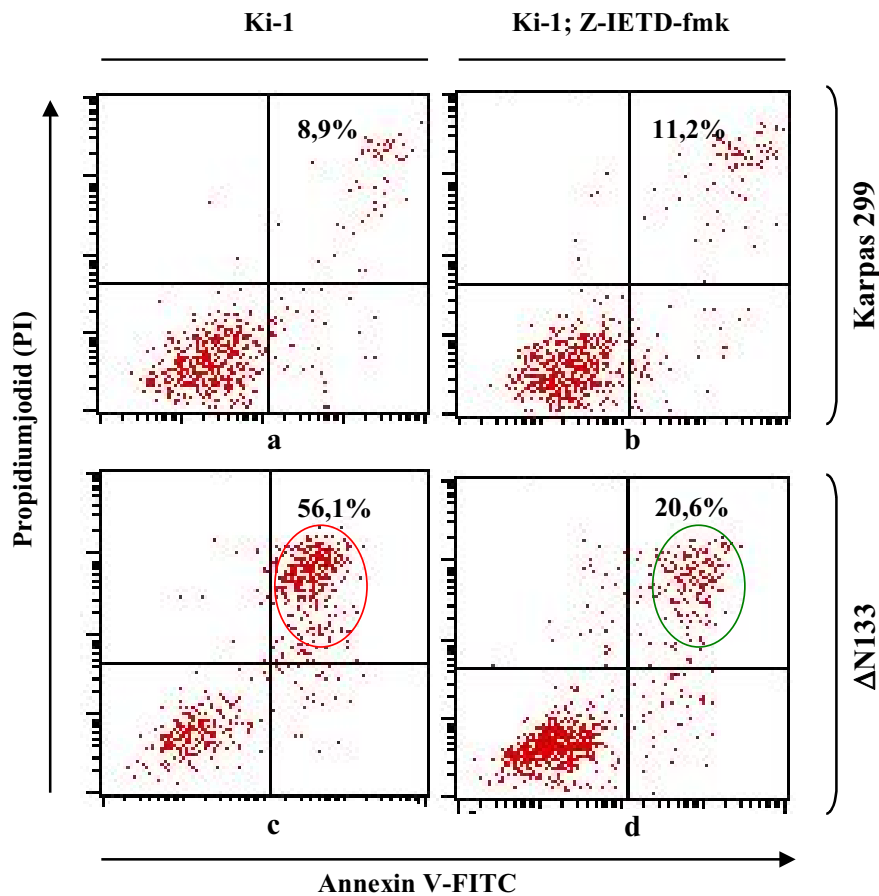
Die Stimulation des CD30 Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper Ki-1 führte in mehr als 40 % der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  transfizierten Karpas 299 Zellen ( $\Delta$ N133) zur Apoptose, die durch den Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk nahezu aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse implizieren, dass es sich hierbei um einen Caspase-abhängigen Zelltod handelt. Durch die weiteren Untersuchungen sollten die beteiligten Signalwege aufgeschlüsselt werden.

Man unterscheidet zwischen Initiatorcaspasen (z. B. Caspase-8) und Effektorcaspasen (z. B. Caspase-3). Caspase-8 ist wesentlich früher in die Apoptose involviert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion im Todesrezeptorsignalweg, da sie in der Lage ist, mit dem Adaptorprotein FADD den sog. „DISC“-Komplex zu bilden, der wiederum zur Aktivierung dieser Caspase führt (siehe 1.4.2.1). Die Aktivierung von Procaspase-8 wie anderer Procaspasen findet durch die proteolytische Spaltung nach dem Aspartatrest zwischen Prodomäne und Untereinheiten bzw. zwischen der großen und kleinen Untereinheit statt (siehe Abbildung 1-5). Die aktive Caspase-8 besteht aus einem Tetramer mit zwei Heterodimeren (siehe 1.4.1). Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz von Caspase-8 im Fall der CD30-induzierten Apoptose wurden die Zellen zunächst mit einem zellpermeablen Caspase-8-Inhibitor Z-IETD-fmk (Z-I-E(OMe)-T-D(OMe)-FMK) behandelt (siehe Tabelle 2-2). Dieser Inhibitor bindet an Caspase-8 und blockiert irreversibel ihre Aktivität. Es wurden die  $\Delta$ N133 bzw. Wildtyp Karpas 299 Zellen mit zwei Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) von Z-IETD-fmk behandelt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) hinzugegeben und die Inkubation wurde für weitere 48 Stunden fortgesetzt (siehe 2.2.13.11). Die Quantifizierung der lebenden bzw. toten Zellen mittels Trypanblau bzw. die Analyse durch die WST-1 Zellvitalitätsassay bewies, dass nach Zugabe von Z-IETD-fmk die CD30-vermittelte Apoptose nahezu völlig blockiert wurde. Um die Wirkung von Z-IETD-fmk auf die Blockierung der Caspase-8 Aktivität zu reduzieren und eine Kreuzreaktivität mit anderen Caspasen weitgehend auszuschließen, wurde für die weitere Untersuchung eine geringere Dosis von Z-IETD-fmk (10  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Um diese

Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurde die I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierende bzw. Wildtyp Karpas 299 Zelllinie mit 10  $\mu$ M Z-IETD-fmk behandelt und anschließend mit dem CD30-spezifischen Antikörper (Ki-1) für 48 Stunden stimuliert (siehe 2.2.13.12). Die Zellen wurden mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-konjugiertem Annexin (Annexin V-FITC) und Propidiumjodid (PI) gefärbt und einer durchflusszytometrischen Analyse zugeführt (siehe 2.2.11.2). Während der Apoptose wird Phosphatidylserine (PS) von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran lokalisiert. Hierbei bindet Annexin V (ein Ca<sup>2+</sup> abhängiges Protein) an PS auf der äußeren Membran. Da Annexin V mit FITC gekoppelt ist, können die apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden. Durch PI werden die nekrotischen bzw. apoptotischen (im späten Stadium) Zellen nachgewiesen. Durch diese Doppelfärbung (AnnexinV-FITC; PI) wurden die apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Wie Abbildung 3-8 (c) zeigt, wurde 48 Stunden nach Zugabe des CD30-Antikörpers Ki-1 zu den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 Zellen eine Apoptoserate von 56,1 % nachgewiesen, wobei es sich um apoptotische Zellen im späten Stadium handelte (AnnexinV [positiv] und PI [positiv]). Durch die zusätzliche Gabe des Caspase-8 Inhibitors (Z-IETD-fmk) konnte die durch CD30-Stimulation induzierte Apoptoserate der I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Zellen auf 20,6 % reduziert werden (siehe Abbildung 3-8, d). Die Wildtyp Zellen (Karpas 299) zeigten nach CD30 Stimulation oder in Kombination mit Z-IETD-fmk keine Caspase-8 Aktivität bzw. Inhibition (siehe Abbildung 3-8, a und b). Als funktionelle Kontrolle wurden die Zellen mit einem Kontrollantikörper (0,5  $\mu$ g/ml IgG<sub>3</sub>) und Z-IETD-fmk oder ohne Caspase-8 Inhibitor und die Zellen mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) verwendet, wobei es zu keiner Induktion von Apoptose kam (Daten nicht gezeigt).

Die mikroskopische Darstellung bzw. die mit Trypanblau gefärbten Zellen bestätigten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen. Es zeigte sich im Mikroskop ein apoptotisches Bild in den CD30 stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Zellen ( $\Delta$ N133), welches durch die Zugabe des Caspase-8 Inhibitors teilweise aufgehoben wurde. Der zusätzliche Nachweis von „Cluster“-Formationen – wie sie auch in nicht transfizierten Karpas 299 Zellen nach CD30 Stimulation zu beobachten sind – belegte darüber hinaus, dass die CD30 Stimulation auch eine Caspase-8 abhängige Signaltransduktion bewirkt. Um die Bedeutung der Caspase-8 Aktivierung für die Apoptose der CD30-stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 Zellen ( $\Delta$ N133) weiter zu untersuchen, wurde die Prozessierung der Caspase-8 mittels Western Blot und Immunhistologie untermauert.



**Abbildung 3-8: Durchflusszytometrische Analyse der Blockierung der Caspase-8 Aktivität mittels Z-IETD-fmk.**

$1,2 \times 10^5$   $\Delta$ N133 bzw. Wildtyp (Karpas 299) Zellen wurden 30 min vor der CD30-Stimulation mit Z-IETD-fmk ( $10 \mu\text{M}$ ) versetzt und anschließend mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) stimuliert, die Zellen 48 h nach Stimulation geerntet und anschließend wurden sie mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugiertem Annexin (Annexin V-FITC) und Propidiumjodid (PI) gefärbt.

- Karpas 299 Zellen: **a)** stimuliert mit Ki-1, **b)** mit Z-IETD-fmk (Caspase-8 Inhibitor) und Ki-1
- $\Delta$ N133 Zellen: **c)** stimuliert mit Ki-1, **d)** mit Z-IETD-fmk (Caspase-8 Inhibitor) und Ki-1

Im oberen rechten Quadranten der Dot-Plots sind die Annexin V-FITC (positive) bzw. PI (positive) Zellen ( $V^+/PI^+$ ) als Prozentwert dargestellt. Die unteren linken Quadranten sind die vitalen Zellen (Annexin V-FITC [negative] / PI [negative]). Die apoptotischen Zellen sind rot umkreist. Die umkreiste grüne Region ist für eine reduzierte Apoptose dargestellt. Die Messung erfolgte in FACSsort (Becton-Dickinson) und die Auswertung wurde mithilfe der CellQuest bzw. CellQuest Pro Software durchgeführt.

### 3.3.2 CD30 Signalweg führt zu Prozessierung der Caspase-8 in $\Delta$ N133 Zellen

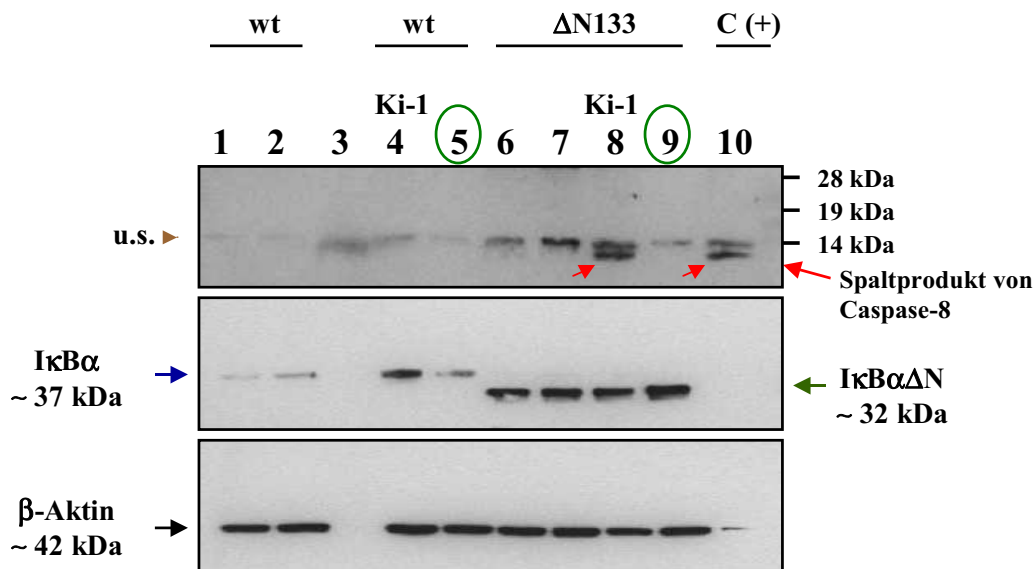
Durch die bisher gezeigte Analyse wurde die Aktivierung des Todesrezeptorsignalweges in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierender ALCL Zelllinie ( $\Delta$ N133) bewiesen. Um die Prozessierung der Caspase-8 zu analysieren, wurden die  $\Delta$ N133 bzw. Wildtyp (Karpas 299) Zellen mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) in Kombination mit 10  $\mu\text{M}$  Z-IETD-fmk (Caspase-8 Inhibitor) stimuliert (siehe 2.2.13.12). Nach 48 h wurden Proteinextrakte hergestellt und zur Analyse der Caspase-8 Prozessierung mittels Western Blot angesetzt. Die Detektion der Caspase-8 erfolgte mit einem anti-Caspase-8 Antikörper (siehe Tabelle 2-4). Wie Abbildung 3-9 zeigt, führte die CD30 Stimulation zur Prozessierung (Spaltung) von Caspase-8 in der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden ALCL Zelllinie ( $\Delta$ N133; Spur 8, roter Pfeil). Diese Aktivität und Autokatalyse von Caspase-8 konnten durch den Inhibitor Z-IETD-fmk vollständig blockiert werden (siehe Abbildung 3-9, Spur 9). In parallel durchgeführten Stimulationsversuchen mit der Wildtyp Karpas 299 Zelllinie kam es nach CD30 Stimulation zu keiner Prozessierung von Caspase-8 und es konnte auch keine Apoptose beobachtet werden (siehe Abbildung 3-9, Spur 4). Als Positivkontrolle dienten mit Arsentrioxid (10  $\mu\text{M}$ ) für 48 h behandelte Wildtyp (Karpas 299) Zellen (siehe 2.2.13.10.2), die eine Prozessierung der Caspase-8 aufwiesen (siehe Abbildung 3-9, Spur 10). Die mit einem Kontrollantikörper ( $\text{IgG}_3$ ) behandelten Zelllinien (siehe Abbildung 3-9, Spuren 2 und 7) und die Zellen mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) (Daten nicht gezeigt) zeigten keine Aktivierung von Caspase-8.

Um die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  zu überprüfen, wurde die Western Blot-Membran von den Caspase-8 Antikörpern befreit (siehe 2.2.8) und anschließend mit anti- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 2-4). Dabei konnte bestätigt werden, dass die Expression des trunkierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins in den transfizierten Zelllinien über den gesamten Versuchsablauf erhalten geblieben war und dass in den transfizierten Zellen das native  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein nicht oder nur noch in Spuren vorhanden war (siehe Abbildung 3-9, Blot in der Mitte, Spuren 6-9). In den nicht-transfizierten Karpas 299 Zellen konnte die Expression des nativen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins hingegen nachgewiesen werden, wobei es in der Positivkontrolle (Arsentrioxid behandelte Karpas 299 Zellen) nicht detektiert wurde (siehe Abbildung 3-9, Blot in der Mitte). Als Ladekontrolle wurde ein  $\beta$ -Aktin Antikörper verwendet. Überraschenderweise brachte die Positivkontrolle (Arsentrioxid behandelte Karpas 299 Zellen) im Western Blot nur



eine sehr geringe Menge  $\beta$ -Aktin zur Darstellung (siehe Abbildung 3-9, Spur 10), obwohl für diese Analyse dieselbe Proteinmenge von 10  $\mu$ g eingesetzt wurde.

Schließlich wurden noch immunhistologische Färbungen durchgeführt, um die Prozessierung der Caspase-8 in CD30-stimulierten  $\Delta$ N133-Zellen auf zellulärer Ebene zu demonstrieren. Hierfür wurden die  $\Delta$ N133 bzw. Wildtyp (Karpas 299) Zellen 16 h nach CD30 Stimulation geerntet und Paraffinschnitte für die immunhistologischen Färbungen hergestellt (siehe 2.2.9). Der immunhistologische Nachweis erfolgte mit einem anti-Caspase-8 Antikörper („cleaved“ Caspase-8, siehe Tabelle 2-4), der nur das Spaltprodukt der Caspase-8 detektieren kann (siehe Abbildung 3-10, B). Als Positivkontrolle dienten Cytospinpräparate der mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid (48 h) behandelten Karpas 299 Zellen (siehe 2.2.10) (Daten nicht gezeigt).



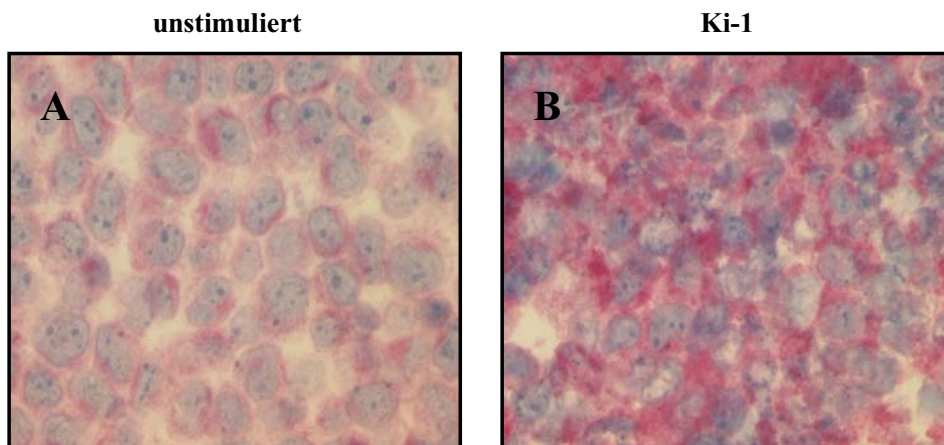
**Abbildung 3-9: Nachweis der Caspase-8 Prozessierung mittels Western Blot-Analysen.**

1,2 x 10<sup>5</sup>  $\Delta$ N133 bzw. Wildtyp (Karpas 299) Zellen wurden für 48 h mit 0,5  $\mu$ g/ml Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) in Kombination mit 10  $\mu$ M Z-IETD-fmk (Caspase-8 Inhibitor) stimuliert. Positivkontrolle C (+): 2 x 10<sup>5</sup> Karpas 299 Zellen für 48 h mit 10  $\mu$ M Arsentrioxid behandelt. Der Nachweis für das Caspase-8 Spaltprodukt erfolgte mit einem Caspase-8 Antikörper (siehe Tabelle 2-4).

- Karpas 299 (wt) Zellen: 1) Medium, 2) IgG<sub>3</sub>, 4) Ki-1, 5) Z-IETD-fmk und Ki-1, 10) Arsentrioxid (Positivkontrolle)

- $\Delta$ N133 Zellen: 6) Medium, 7) IgG<sub>3</sub>, 8) Ki-1, 9) Z-IETD-fmk und Ki-1

Die roten Pfeile geben die Position des Spaltprodukts bzw. der aktiven Form der Caspase-8 an. Die Spuren 5 und 9 (grün umkreist) stehen für CD30-Stimulation in Kombination mit Z-IETD-fmk. Der braune Pfeil gibt die Position einer unspezifischen (u. s.) Proteinbande an. Nach Entfernung der Antikörper von der Membran wurde der Vorgang mit I $\kappa$ B $\alpha$  Antikörpern wiederholt. (Kontrolle von I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-Expression, Blot in der Mitte). Spur 3: Größenstandard mit Angaben der Größe ist rechts dargestellt. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin. In jeder Spur wurden 10  $\mu$ g Proteinextrakt aufgetragen, NuPAGE 10%iges Bis-Tris Gel.



**Abbildung 3-10: Immunhistologischer Nachweis der aktivierten Caspase-8 in der  $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierenden ALCL Zelllinie ( $\Delta N133$ ).**

$1,5 \times 10^5$   $\Delta N133$  Zellen wurden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  CD30-spezifischen Antikörpern (Ki-1) für 16 Stunden stimuliert und für die immunhistologische Färbung eingesetzt. Die Färbung erfolgte mit anti-Caspase-8 Antikörpern („cleaved“ Caspase-8) (siehe Tabelle 2-4).

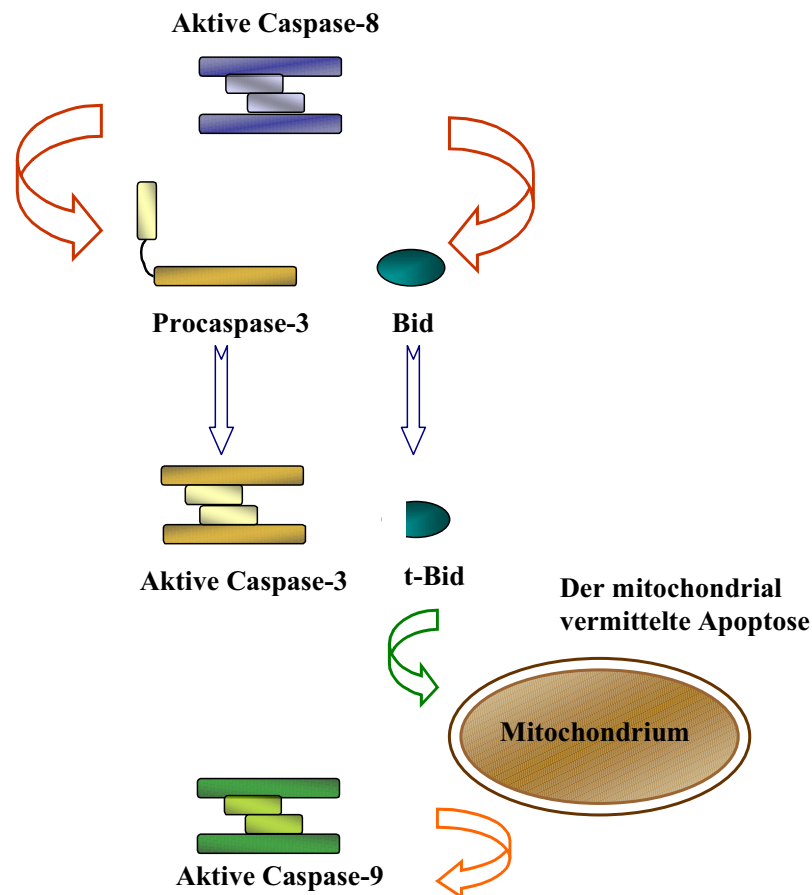
$\Delta N133$  Zellen: **A**) im Medium (unstimuliert), **B**) stimuliert mit Ki-1

Die Dokumentation erfolgte mit einer mit dem Olympus AX70 Mikroskop ausgestatteten JVC, KY-F70 Videokamera (Software Diskus 4.20).

(40-fache Vergrößerung)

### **3.4 Nachweis der Mitochondrien-abhängigen Apoptose in $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierenden ALCL Zellen ( $\Delta N133$ )**

Die bisher gezeigten Ergebnisse belegen, dass die  $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierende ALCL Zelllinie auf CD30 Stimulation mit einer Aktivierung der Caspase-8 bzw. einem Todesrezeptorsignalweg reagiert. Die Aktivierung von Caspase-8 führt wiederum zur Spaltung der Effektorcaspasen (z. B. Caspase-3) oder Bcl-2-Familienmitglieder (z. B. Bid) (siehe Abbildung 3-11). Durch die Aktivierung von Bid kann eine mitochondrial vermittelte Apoptose in die Wege geleitet werden bzw. durch die Beteiligung weiterer Faktoren kommt es zur Aktivierung von Caspase-9 (siehe 1.4.2.2). Die Mitglieder der TNF-Familie benutzen diesen mitochondrialen Weg, um das von ihnen ausgelöste Todessignal weiter zu verstärken.

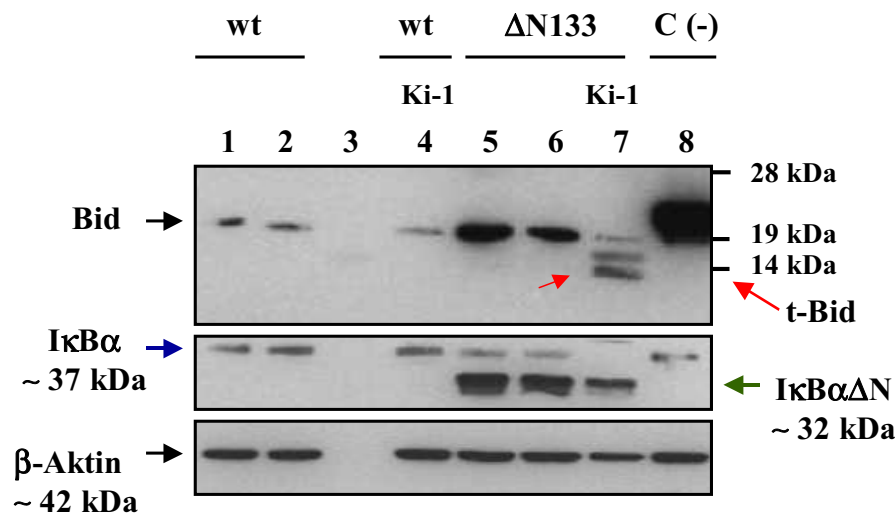


**Abbildung 3-11: Schematische Darstellung der mitochondrial vermittelten Apoptose durch aktive Caspase-8.**

Die aktive Caspase-8 kann Procaspase-3 bzw. Bid spalten. Durch die Spaltung von Bid in t-Bid kommt es zu einer mitochondrial vermittelten Apoptose, die ihrerseits zu der Aktivierung der Caspase-9 führt.

Um den Einfluss von Caspase-8 auf den mitochondrialen Signalweg näher zu untersuchen, wurde zunächst die Spaltung Bid zu t-Bid (engl. truncated Bid) analysiert. Hierfür wurden die  $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierende ALCL Zelllinie bzw. Wildtyp Karpas 299 Zellen mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) für 48 h stimuliert (siehe 2.2.13.9). Der hergestellte Proteinextrakt wurde mittels Western Blot analysiert. Zum Nachweis von Bid wurde ein anti-Bid Antikörper angesetzt, der sowohl die inaktive Form (Volllänge) als auch die gesplattete Form von Bid darstellt. Wie in Abbildung 3-12 dargestellt, kommt es nur in der  $I\kappa B\alpha\Delta N$ -transfizierten Karpas 299 Zelllinie nach CD30 Stimulation zu einer Aktivierung bzw. Spaltung von Bid (Spur 7), während in den Kontrollen ( $\text{IgG}_3$  bzw. ohne Antikörper) und in der Daudi-Zelllinie (Negativkontrolle) lediglich die Expression des ungesplatteten Bid-Proteins darstellbar ist (siehe Abbildung 3-12). Die Wildtyp Karpas 299 Zellen wurden unter

den gleichen Bedingungen behandelt wie rekombinante Zellen, wobei die Wildtyp Zellen nach CD30-Stimulation oder ohne Stimulation nur die Expression von Bid (Volllänge) und keine Spaltung von Bid zeigten, was den Erwartungen entsprach (siehe Abbildung 3-12, Spuren 1, 2, 4). Für den Nachweis der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Expression wurde der Antikörper (Bid) von der Membran entfernt (siehe 2.2.8) und mit  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörper (siehe Tabelle 2-4) inkubiert (siehe Abbildung 3-12, Blot in der Mitte).



**Abbildung 3-12: Western Blot-Analyse der Bid Expression mit und ohne CD30 Stimulation.**

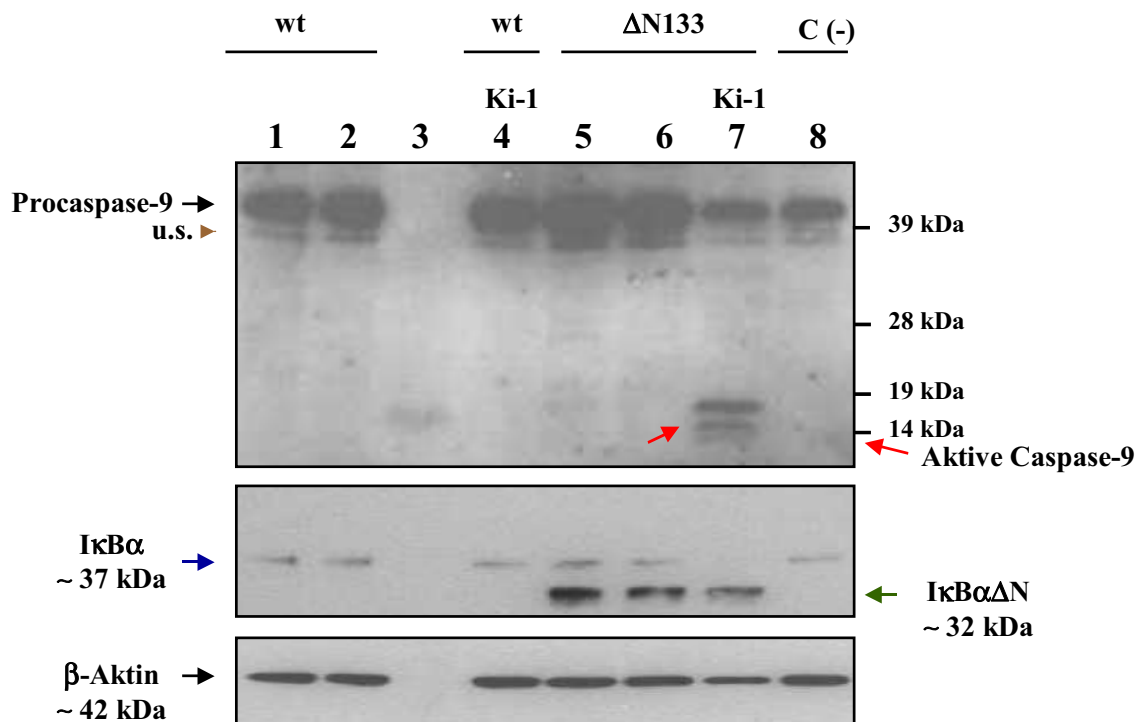
CD30-Stimulation der Zellen mit einem agonistischen monoklonalen CD30-Antikörper Ki-1.  $1,5 \times 10^5$   $\Delta\text{N133}$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierende ALCL Zelllinie) bzw. Wildtyp (Karpas 299) Zellen wurden für 48 h mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) und einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps ( $0,5 \mu\text{g/ml}$   $\text{IgG}_3$ ) inkubiert. Der Nachweis für das Bid Protein erfolgte mit einem Bid Antikörper (siehe Tabelle 2-4).

- Karpas 299 (wt) Zellen: 1) Medium, 2)  $\text{IgG}_3$ , 4) Ki-1
- $\Delta\text{N133}$  Zellen: 5) Medium, 6)  $\text{IgG}_3$ , 7) Ki-1
- Daudi (Burkitt-Lymphom): 8) unbehandelt

Die roten Pfeile zeigen die Position der gespaltenen Form von Bid (t-Bid). C (-) entspricht der Negativkontrolle. Für den Nachweis bzw. die Kontrolle der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Expression wurde nach Entfernung der Antikörper von der Membran der Vorgang mit  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörper wiederholt (Blot in der Mitte). Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Spur 3: Größenstandard ist exemplarisch rechts dargestellt. Pro Spur wurden vom Proteinextrakt  $10 \mu\text{g}$  eingesetzt, NuPAGE 10%iges Bis-Tris Gel.

Durch die Stimulation des Oberflächenrezeptors CD30 mit monoklonalen Antikörpern (Ki-1) fand die Prozessierung von der Caspase-8 in  $\Delta\text{N133}$  ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierende ALCL Zelllinie) statt, wobei die aktive Caspase-8 zu einer proteolytischen Spaltung des Vorläufers Bid zu t-Bid führte. t-Bid ist wiederum in der Lage, mit anderen pro-apoptotischen Proteinen zu interagieren (siehe 1.4.2.1) und so den mitochondrialen Apoptoseweg auszulösen. Um eine

potentielle Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs in diesen Zellen zu beleuchten, wurde die Prozessierung der Caspase-9 mittels Western Blot Analyse in CD30 stimulierten  $\Delta$ N133 Zellen untersucht. Hierfür wurden die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  exprimierenden ( $\Delta$ N133) sowie Wildtyp (Karpas 299) Zellen mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) für 48 h stimuliert (siehe 2.2.13.9). Es wurde die Proteinextrakte hergestellt und zur Analyse der Caspase-9 Prozessierung mittels Western Blot angesetzt. Die Detektion von Caspase-9 erfolgte mit Caspase-9 Antikörpern, die sowohl die Procaspase-9 als auch das aktive Spaltprodukt erkennen. Wie Abbildung 3-13 zeigt, konnte die Caspase-9 Aktivierung 48 Stunden nach die CD30-Stimulation in  $\Delta$ N133 Zellen nachgewiesen werden (Spur 7). In den Wildtyp Karpas 299 Zellen kam es weder mit CD30 Stimulation noch ohne Stimulation zu einer Caspase-9 Prozessierung (siehe Abbildung 3-13, Spuren 1, 2, 4). Auch die unbehandelte Burkitt-Lymphom Zelllinie Daudi zeigte lediglich eine Expression der Procaspase-9 (siehe Abbildung 3-13, Spur 8). Die Expression des trunkierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins in den transfizierten Karpas 299 Zellen wurde durch die Inkubation der Membranen mit  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörpern nachgewiesen (siehe Abbildung 3-13, Blot in der Mitte, Spuren 5-7), nachdem die Membranen von den vorangegangenen Signalen befreit wurden (siehe 2.2.8). Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die CD30 Stimulation in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  exprimierenden Zellen ( $\Delta$ N133) zur Aktivierung der für den mitochondrialen Apoptose-signalweg wichtigen Caspase-9 führte, welche wiederum die Aktivierung von Effektorcaspasen (wie Caspase-3) zur Folge haben kann.



**Abbildung 3-13: Nachweis der Aktivierung von Caspase-9 in der IκBαΔN exprimierenden ALCL Zelllinie (ΔN133) mittels Western Blot Analyse.**

$1,5 \times 10^5$  ΔN133 bzw. Wildtyp (Karpas 299) Zellen stimuliert für 48 h mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  monoklonalen CD30-spezifischen Antikörpern (Ki-1). Zum Nachweis von Caspase-9 diente ein Caspase-9 Antikörper, der die Procaspase und die aktive Caspase-9 detektiert (siehe Tabelle 2-4).

- Karpas 299 (wt) Zellen: 1) Medium, 2) IgG<sub>3</sub>, 4) Ki-1
- ΔN133 Zellen: 5) Medium, 6) IgG<sub>3</sub>, 7) Ki-1
- Burkitt Lymphom Zelllinie (Daudi): 8) unbehandelt (Negativkontrolle)

Die roten Pfeile zeigen die Position der aktiven Caspase-9. Der braune Pfeil gibt die Position einer unspezifischen (u. s.) Proteinbande an. C (-) entspricht der Negativkontrolle. Für den Nachweis von IκBαΔN-Expression wurde der Antikörper von der Membran entfernt und mit IκBα Antikörper inkubiert.

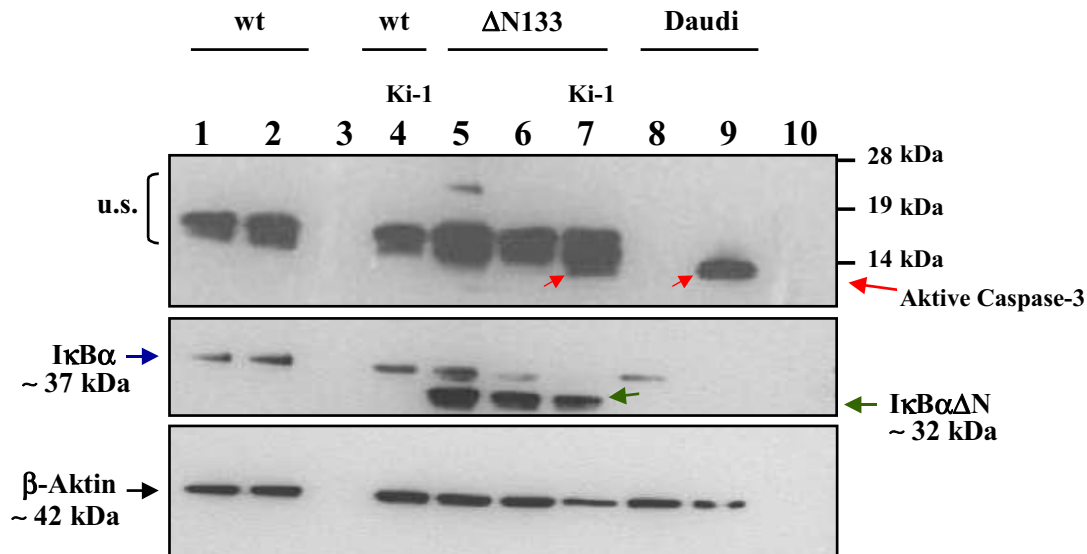
Spur 3: Größenstandard ist rechts dargestellt. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin. Auf jeder Spur wurden  $10 \mu\text{g}$  Proteinextrakt eingesetzt, NuPAGE 10%iges Bis-Tris Gel.

### **3.5 CD30-Stimulation führt zur Aktivierung der Caspase-3 in $I\kappa B\alpha\Delta N$ produzierenden ALCL-Zelllinie ( $\Delta N133$ )**

#### **3.5.1 Caspase-3 Prozessierung nach CD30-Stimulation in $\Delta N133$ Zellen (Western Blot)**

Es ist bekannt, dass Effektorcaspasen von aktiven Initiatorcaspasen (z. B. Caspase-8 und Caspase-9) durch Spaltung prozessiert werden, um das apoptotische Signal zu vermitteln. Caspase-3 ist eine Effektorcaspase, die zunächst als inaktives Zymogen (Procaspase-3) vorliegt und erst durch Spaltung von aktiven Initiatorcaspasen (Caspase-8 und Caspase-9) aktiviert wird. Aktive Caspase-3 besteht aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (siehe 1.4.1), welche weitere Substrate (strukturelle oder Haushalts-Proteine des Zellkern und Zytoskeletts [z. B. Aktin, Lamine] und DNase-Inhibitor  $I^{CAD}$ ) in den Zellen spalten können (siehe 1.4.1.1), was zu den typischen morphologischen Veränderungen in der Zelle führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus CD30 stimulierten  $\Delta N133$  bzw. Karpas 299 Wildtyp Zellen nach 48 h CD30 Stimulation (siehe 2.2.13.9) Proteinextrakt hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Es wurde ein anti-Caspase-3 Antikörper verwendet, welcher nur das Spaltprodukt von Caspase-3 (d. h. aktivierte Caspase-3) detektieren kann. In Abbildung 3-14 ist dargestellt, dass die  $I\kappa B\alpha\Delta N$ -exprimierende Karpas 299 Zelllinie nach CD30 Stimulation (Spur 7) mittels monoklonaler Antikörper Ki-1 die Prozessierung von Caspase-3 zeigte, welche mit den morphologischen Veränderungen der Zellen korrelieren konnte. Als Positivkontrolle diente die Burkitt-Lymphom Zelllinie Daudi, die mit 4  $\mu M$  Etoposid für sechs Tage inkubiert wurde (siehe 2.2.13.10.1), was zur Spaltung von Caspase-3 führte (siehe Abbildung 3-14, Spur 9). Die Karpas 299 (Wildtyp) Zellen wiesen nach CD30 Aktivierung keine Prozessierung von Caspase-3 auf. Die weiteren Kontrollen bzw. die Negativkontrolle wiesen kein immunreaktives Signal in Bezug auf das Caspase-3 Spaltprodukt. Die zusätzlichen Proteinbanden konnten als unspezifische Signale identifiziert werden, die bei der Positivkontrolle nicht auftraten (siehe Abbildung 3-14). Die  $\Delta N133$  Zellen wurden weiter auf die  $I\kappa B\alpha\Delta N$  Expression untersucht. Hierbei wurde diese Membran von anti-Caspase-3 Antikörpern entfernt (siehe 2.2.8) und mit anti- $I\kappa B\alpha$  Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 2-4). In Abbildung 3-14 (Spuren 5-7) zeigte sich eine Expression von dominant negativer Form von  $I\kappa B\alpha$  ( $I\kappa B\alpha\Delta N$ ), welche nur in  $\Delta N133$  Zellen auftrat und eine Größe von

etwa 32 kDa aufwies. Durch den Antikörper gegen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurde auch die native Form von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  detektiert, die in Wildtyp (wt) Zellen, in der Negativkontrolle und in unstimulierten  $\Delta\text{N133}$  Zellen nachweisbar war (siehe Abbildung 3-14). Eine  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Expression ließ sich in der Positivkontrolle (Daudi nach Etoposid) nicht darstellen (siehe Abbildung 3-14, Spur 9).



**Abbildung 3-14: Western Blot** (NuPAGE 10%iges Bis-Tris Gel; jeweils 10  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt) **zum Nachweis der Caspase-3 Spaltung.**

CD30 Stimulation der Zellen mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ki-1.  $1,5 \times 10^5$   $\Delta\text{N133}$  und Wildtyp (Karpas 299) Zellen wurden mit den Ki-1 (CD30-spezifischer Antikörper) stimuliert und ca. 48 Stunden nach der Stimulation geerntet. Der Nachweis für das Caspase-3 Spaltprodukt erfolgte mit einem Antikörper, der nur die aktivierte Caspase-3 erkennt (siehe Tabelle 2-4).

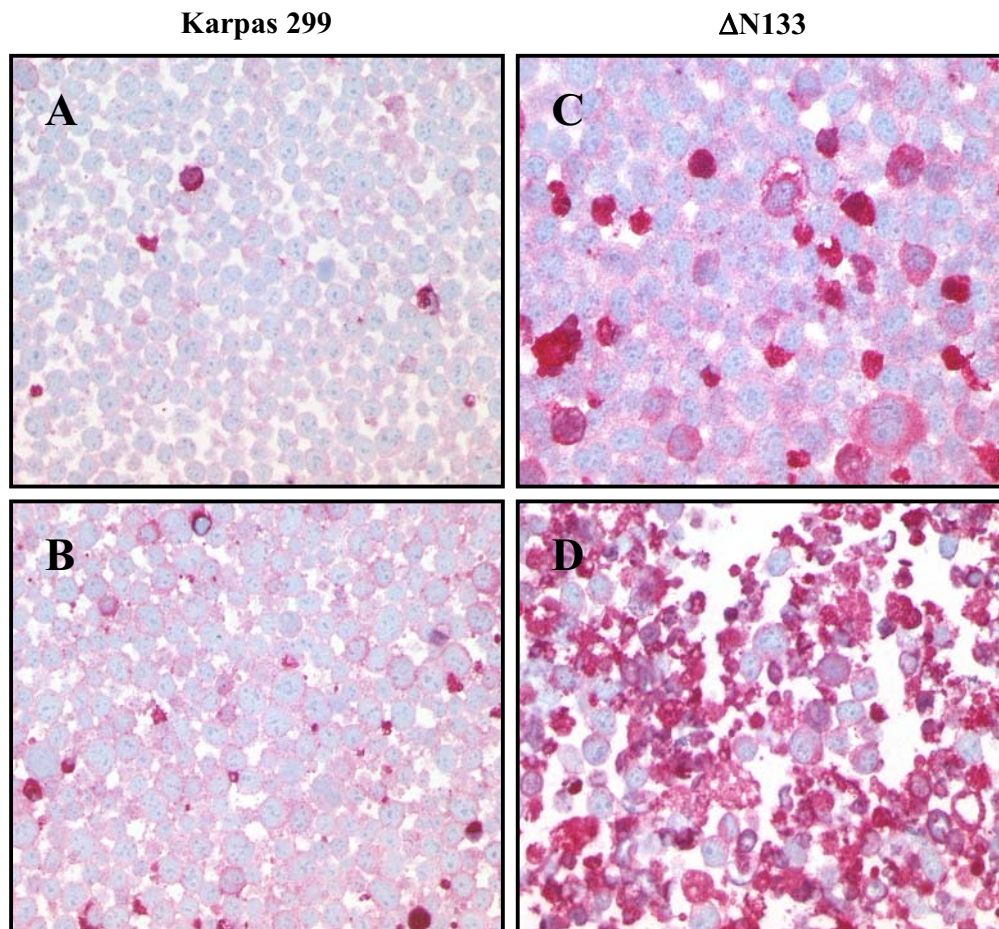
- Karpas 299 (wt) Zellen: 1) Medium, 2)  $\text{IgG}_3$ , 4) CD30 Stimulation
- $\Delta\text{N133}$  Zellen: 5) Medium, 6)  $\text{IgG}_3$ , 7) CD30 Stimulation
- Daudi Zellen (Kontrollen): 8) unbehandelt (Negativkontrolle), 9) Etoposid behandelt (4  $\mu\text{M}$  für sechs Tage, Positivkontrolle)

Die roten Pfeile zeigen die Position des Spaltprodukts von Caspase-3. Die Klammer zeigt die Position von unspezifischen (u. s.) Banden. Nach Entfernung des Caspase-3 Antikörpers wurde der Vorgang mit  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Antikörpern für die Kontrolle von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -Expression durchgeführt (mittlerer Teil) und die grünen Pfeile geben die Position des trunkierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  an und der blaue Pfeil stellt das native  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  dar.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle (unterer Teil). Spuren 3 und 10: Größenstandard mit Angaben der Größe in kDa.



### **3.5.2 Nachweis der Prozessierung von Caspase-3 mittels Immunhistologie (APAAP- Methode) in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ transfizierten Karpas 299 Zellen ( $\Delta\text{N133}$ )**

Um die Aktivierung von Caspase-3 in CD30 stimulierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden ALCL Zellen ( $\Delta\text{N133}$ ) weiter zu untersuchen, wurde die Prozessierung von Caspase-3 mittels immunhistologischer Färbung bestimmt. Hierfür wurden  $1,5 \times 10^5$   $\Delta\text{N133}$  bzw. Wildtyp Karpas 299 Zellen mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  CD30 spezifischen Antikörpern (Ki-1) stimuliert (siehe 2.2.13.9), nach 16 Stunden Inkubation geerntet und Paraffinschnitte hergestellt, die für die immunhistologische Färbung eingesetzt wurden (siehe 2.2.9). Zusätzlich wurde eine Quantifizierung der lebenden bzw. toten Zellen mittels Trypanblau durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten die Zellen mit ( $0,5 \mu\text{g/ml}$   $\text{IgG}_3$ ) bzw. ohne Antikörper. Als primärer Antikörper wurde ein anti-Caspase-3 Antikörper („cleaved“ Caspase-3) eingesetzt, der nur die aktive Form von Caspase-3 nachweisen kann. Dabei handelte es sich um denselben Caspase-3 Antikörper, der auch für die Western Blot Analysen verwendet wurde. Hierdurch können die Ergebnisse der Immunhistologie und der Western Blot Untersuchungen direkt verglichen werden. Abbildung 3-15 (D) zeigt, dass die  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$  transfizierten Karpas 299 ( $\Delta\text{N133}$ ) Zellen nach CD30 Stimulation eine starke Aktivierung von Caspase-3 aufweisen. In nicht transfizierten Karpas 299 Zellen kam es weder nach CD30 Stimulation noch ohne CD30 Stimulation zu einer nennenswerten Aktivierung der Caspase-3. Diese immunhistologischen Ergebnisse stehen im Einklang mit der Trypanblau-Anfärbung der Zellen sowie mit den Western Blot Analysen.



**Abbildung 3-15: Immunhistologischer Nachweis von aktiver Caspase-3 in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden ( $\Delta\text{N133}$ ) und nicht transfizierten Karpas 299 Zellen.**

$1,5 \times 10^5$   $\Delta\text{N133}$  bzw. Wildtyp Zellen (Karpas 299) wurden mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  CD30 spezifischen Antikörpern (Ki-1) für 16 h inkubiert und für die immunhistologische Färbung eingesetzt. Der Nachweis von Caspase-3 erfolgte mit einem Antikörper gegen die aktivierte Form der Caspase-3 („cleaved“ Caspase-3) (siehe Tabelle 2-4).

- Wildtyp Karpas 299 Zellen:  
A) ohne CD30 Stimulation, B) mit CD30 Stimulation
- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierende ALCL Zelllinie ( $\Delta\text{N133}$ ):  
C) ohne CD30 Stimulation, D) mit CD30 Stimulation

Die Dokumentation erfolgte mit einer mit dem Olympus AX70 Mikroskop ausgestatteten JVC, KY-F70 Videokamera (Software Diskus 4.20).  
(40-fache Vergrößerung)

### 3.6 Herstellung der Positivkontrolle für den Apoptosenachweis

#### 3.6.1 Apoptoseinduktion durch Etoposid bzw. Arsentrioxid in Zelllinien

Um die CD30-vermittelte Apoptose in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden ALCL Zellen ( $\Delta\text{N133}$ ) untersuchen zu können, wurde eine Positivkontrolle hergestellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Chemotherapeutika wie Etoposid (ein DNA Topoisomerase II Inhibitor [99]) eine apoptotische Wirkung auf die hämatopoetischen (Tumor)-Zellen haben [76]. Arsentrioxid, das Apoptose in Hodgkin/Reed-Sternberg Zelllinien induziert, steht mit der Aktivierung von Caspase-8 in Verbindung [100].

Um die Dosis-Empfindlichkeit sowie das zeitabhängige Apoptose-Verhalten von HL60 und Daudi- Zelllinien gegenüber Etoposid (siehe Tabelle 2-2) und die Karpas 299 Zelllinie in Bezug auf Arsentrioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) (siehe Tabelle 2-2) untersuchen zu können, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Zytostatikums (Etoposid bzw. Arsentrioxid) inkubiert (siehe 2.2.13.10). Durch die Quantifizierung der lebenden bzw. toten Zellen mittels Trypanblau wurde ermittelt, dass durch diese Agenzien eine dosis- und zeitabhängige Zelltod-Steigerung in diesen Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 4  $\mu\text{M}$  Etoposid eine zytotoxische Wirkung in HL60 bzw. Daudi Zellen hat, welche nach 48 Stunden in HL60 bzw. nach sechs Tagen in Daudi Zellen nachweisbar war. Die durchgeführten Untersuchungen mit Arsentrioxid gegenüber Karpas 299 zeigten, dass 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid nach 48 Stunden eine toxische Wirkung hatte, wobei die Anzahl der mit Trypanblau gefärbten Zellen anstieg. Eine nennenswerte (toxische) Wirkung von DMSO, das als Lösungsmittel eingesetzt wurde, konnte ausgeschlossen werden. Caspasen spielen eine wesentliche Rolle bei der Apoptoseinduktion (siehe 1.4.1). Um einen Caspase-abhängigen Zelltod in diesen behandelten Zellen nachweisen zu können, wurden von den behandelten Zelllinien Karpas 299 (10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid [nach 48 Stunden]), Daudi (4  $\mu\text{M}$  Etoposid [nach sechs Tagen]) und HL60 (mit 4  $\mu\text{M}$  Etoposid [nach 48 Stunden]) (siehe 2.2.13.10.1 und 2.2.13.10.2) die Proteinextrakte hergestellt und die Prozessierung der Caspase-3 mittels Western Blot Analyse untersucht. Es wurde ein anti-Caspase-3 Antikörper („cleaved“ Caspase-3) verwendet, der nur das Spaltprodukt von Caspase-3 nachweisen konnte (siehe Tabelle 2-4) und wurde die Aktivierung von Caspase-3 bzw. Apoptose in dieser Zelllinien in Bezug auf ihre Agenzien nachgewiesen. In Abbildung 3-14 (Spur 9) ist

dargestellt, dass die Daudi Zelllinie nach Etoposid (4  $\mu\text{M}$ ) Behandlung die Prozessierung von Caspase-3 zeigte.

Die Karpas 299 Zelllinie wurde in Bezug auf Arsentrioxid (10  $\mu\text{M}$ ) auf die Caspase-8 Aktivität weiter untersucht. Die Karpas 299 Zellen wurden 30 min vor Arsentrioxid (10  $\mu\text{M}$ ) mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Caspase-8 Inhibitors Z-IETD-fmk (siehe Tabelle 2-2) versetzt. Die Analyse erfolgte 48 Stunden nach der Behandlung mittels WST-1 Zellvitalitätsassay (siehe 2.2.13.8), wobei es sich um die Spaltung des Tetrazoliumsalzes (WST-1, leuchtrote Farbe) durch zelluläre Enzyme (mitochondriale Dehydrogenase) zu Formazan (dunkelrote Farbe) handelte. Die dabei auftretende Farbreaktion wurde photometrisch detektiert und korrelierte mit der Anzahl der lebenden bzw. stoffwechselaktiven Zellen. Hierbei wurde durch diese Tests keine Zunahme farbigen Formazans in Karpas 299 Zellen in Bezug auf Arsentrioxid (10  $\mu\text{M}$ ) in verschiedenen Messungszeiten (siehe 2.2.13.8) nachgewiesen, wobei durch die zusätzliche Zugabe des Caspase-8 Inhibitors Z-IETD-fmk (50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ), die durch Arsentrioxid (10  $\mu\text{M}$ ) induzierte Apoptose teilweise reduziert werden konnte. Die unbehandelten Zellen (Kontrollzellen) wiesen eine hohe Anzahl von lebenden Zellen (eine Zunahme farbigen Formazans) auf. Um die Prozessierung der Caspase-8 zu analysieren, wurden die Karpas 299 Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid behandelt (siehe 2.2.13.10.2) und nach 48 Stunden ein Proteinextrakt hergestellt, der zur Analyse der Caspase-8 Aktivität mittels Western Blot eingesetzt wurde. Die Detektion der Caspase-8 erfolgte mit einem anti-Caspase-8 Antikörper (siehe Tabelle 2-4). Wie Abbildung 3-9 (Spur 10) zeigt, führte Arsentrioxid zur Aktivierung von Caspase-8 in der Karpas 299 Zelllinie. Es wurde noch immunhistologische Untersuchungen durchgeführt, um die Prozessierung der Caspase-8 in Arsentrioxid behandelten Karpas 299 Zellen demonstrieren zu können. Hierfür wurden die Karpas 299 Zellen 48 Stunden nach Arsentrioxid-Behandlung (10  $\mu\text{M}$ ) geerntet und Cytospin Präparate für immunhistologischen Färbung hergestellt (siehe 2.2.10). Der immunhistologische Nachweis erfolgte mit einem anti-Caspase-8 Antikörper („cleaved“ Caspase-8) (siehe Tabelle 2-4), der nur das Spaltprodukt der Caspase-8 detektieren konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Karpas 299 Zelllinie (gegenüber 10  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid) wurde als Positivkontrolle für die Western Blot Analyse sowie immunhistologische Untersuchung weiter verwendet. Die HL60 (Daten nicht gezeigt) und Daudi Zelllinien dienten als Positivkontrolle (Nachweis von Caspase-3 Aktivität) in Bezug auf Etoposid (4  $\mu\text{M}$ ) für die Western Blot Analyse.

Diese Ergebnisse konnten auch zeigen, dass die Chemotherapeutika einen Caspase-abhängigen Zelltod in Zelllinien vom anaplastischen großzelligen Lymphom (Karpas 299), Burkitt-Lymphom (Daudi) und Myeloische Leukämie (HL60) induzieren.

## 4 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (engl. nuclear factor-kappa B) hat eine große Bedeutung im Immunsystem und reguliert die Expression von zahlreichen Genen, die für Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Akute-Phase-Proteine und induzierbare Effektor-Enzyme kodieren [40;53]. NF- $\kappa$ B ist ohne extrazelluläre Stimulation an die I $\kappa$ B (engl. Inhibitor of NF- $\kappa$ B)-Proteine (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ ) gebunden und wird dadurch im Zytoplasma zurückgehalten, wodurch dessen Transport in den Zellkern blockiert wird [108] (siehe 1.3.2). Die meisten Stimuli verursachen über die vorübergehende Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK) Komplexes [42] die Phosphorylierung von I $\kappa$ B an zwei Serinresten in der N-terminalen Region. Nach der Polyubiquitinylierung bzw. Degradierung des I $\kappa$ B wird NF- $\kappa$ B frei und transloziert in den Zellkern, wo es an die DNA-Zielsequenz („ $\kappa$ B site“) bindet und die Expression von Zielgenen vermittelt (siehe 1.3.4). Zu diesen Zielgenen zählt auch der NF- $\kappa$ B-eigene Inhibitor *I $\kappa$ B $\alpha$*  [53;62;109], dessen Expression und Bindung an NF- $\kappa$ B zur Begrenzung der Reaktion führt („feedback pathway“) (siehe 1.3.2).

Während NF- $\kappa$ B in den meisten Zelltypen physiologischerweise nur zeitweise (d. h. nach Stimulation) aktiv ist [53], zeigen viele Tumorzellen hingegen eine konstitutive NF- $\kappa$ B Aktivität, wobei für diese NF- $\kappa$ B-Aktivität sowohl virale als auch genetische Ursachen in Frage kommen [110]. Über die dadurch vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B Zielgenen wie *Cyclin D1*, *c-MYC* und *c-MYB* kann es zu einer unkontrollierten Progression des Zellzyklus kommen. Darüber hinaus fördert die konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität zelluläre anti-apoptotische Programme, die für das Überleben entscheidend sind [63;110]. Dies erfolgt häufig über NF- $\kappa$ B regulierte Zielgene, die die p53-induzierte Apoptose blockieren können. Dabei kommt es zur Suppression von p53-induzierten Zielgenen, die normalerweise bei DNA-Schädigung induziert werden [110].

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit ein Ansatz über eine Superrepressor-Mutante (I $\kappa$ B $\alpha\Delta$ N) gewählt, um die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B im anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL; am Beispiel der Zelllinie Karpas 299) zu analysieren und die Bedeutung des Zytokinrezeptors CD30 für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu bestimmen.

#### 4.1 Blockierung der NF- $\kappa$ B Aktivität durch I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-Expression in der ALCL-Zelllinie Karpas 299

NF- $\kappa$ B ist häufig als p50:p65 (RelA) Dimer in Säugetieren vorhanden [53], wobei es überwiegend durch I $\kappa$ B $\alpha$  reguliert wird [45;111]. Die ALCL (engl. Anaplastic Large Cell Lymphoma)-Zelllinie Karpas 299 verfügt nur über eine geringe konstitutive NF- $\kappa$ B (p50:p65-Heterodimer), die durch Stimulation massiv gesteigert werden kann. Es ist bekannt, dass durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Transkription von Zielgenen wie *Cyclin D1* [63], *Cyclin D2* [50], *Cyclin D3* [53], *c-MYC*, *c-MYB* und verschiedene Wachstumsfaktoren [110] hochreguliert werden und so den Zellzyklus beschleunigen können. Die Überexpression von *Cyclin D*-Typen (*D1*, *D2*, *D3*) hat eine verkürzte G<sub>1</sub>-Phase zur Folge. Der Übergang durch die G<sub>1</sub>-Phase wird mittels der Cyclin D und E-Typen bzw. in der Kombination mit CDK (engl. cyclin-dependent kinase) 2, CDK3, CDK4 und CDK6 reguliert [112]. Dadurch wird das primäre Ziel des G<sub>1</sub> Cyclin-CDK-Komplexes, das RB (engl. retinoblastoma)-Protein, phosphoryliert. Hierdurch wird der Transkriptionsfaktor E2F (E2F-1, E2F-2, E2F-3) frei [113] und reguliert die Expression der Gene, die für die DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus notwendig sind [112].

Um den Einfluss von NF- $\kappa$ B (nach Stimulation bzw. ohne Stimulation) auf den Zellwachstum bzw. Überleben der ALCL-Zelllinie Karpas 299 näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Inhibition von der NF- $\kappa$ B Aktivität gewählt. Die Blockierung der NF- $\kappa$ B Aktivität lässt sich auf verschiedenen Wegen herbeiführen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine I $\kappa$ B $\alpha$  Deletionsmutante (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N kloniert in pcDNA3) in die ALCL-Zelllinie Karpas 299 transfiziert und die stabiler Transfektanten bzw. Klone hergestellt. Das trunkierte an NF- $\kappa$ B gebundene I $\kappa$ B $\alpha$  Molekül (es fehlen die ersten 70 Aminosäuren der N-terminalen Region [ $\Delta$ N]) kann nicht mehr phosphoryliert werden, so dass die nachfolgende Degradation in den Proteasomen unterbleibt (siehe Abbildung 1-3). Dies wiederum verhindert die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern, so dass es nicht mehr zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B Zielgenen kommen kann. Das Einbringen und die Expression des trunkierten I $\kappa$ B $\alpha$  Moleküls in native (nicht stimulierte) Karpas 299 Zellen (Klon  $\Delta$ N133) führte dennoch zu einer deutlichen Verlangsamung des Zellwachstums im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen und zeigte keine Apoptose-Induktion (siehe Abbildung 3-3). Offensichtlich ist NF- $\kappa$ B – trotz der

geringen konstitutiven Aktivität – auch in nativen und nicht stimulierten Karpas 299 Zellen an der Zellzyklusregulation beteiligt.

Vergleichbare Experimente mit dem trunkierten  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  Molekül haben in der Hodgkin-Zelllinie L428 nicht nur zur Reduktion der Proliferation, sondern auch zur Induktion von Apoptose geführt [50]. Offensichtlich spielt die konstitutive NF- $\kappa\text{B}$  (p50:p65)-Aktivität im Hodgkin-Lymphom eine wichtige Rolle für die Proliferation und den Schutz der Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS)-Zellen von Stress-induzierter Apoptose [114]. Es ist daher davon auszugehen, dass der anti-apoptotische Signalweg über die weiteren Mechanismen bzw. Faktoren in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 reguliert wird, welche den Tumorzellen einen erhöhten Schutz vor der Apoptose bieten.

## 4.2 Der CD30 Signalweg

Der Rezeptor CD30 wird der TNF (engl. tumor necrosis factor)-Rezeptor (TNFR) Superfamilie zugeordnet und wird konstant auf Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen vom Hodgkin-Lymphom bzw. auf Tumorzellen des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL) exprimiert [10]. Die Interaktion des CD30-Rezeptors mit dem CD30-Ligand (siehe 1.2) oder einem CD30-spezifischen Antikörper führt zur Aktivierung des Rezeptors [28-30], wodurch der CD30-Signalweg ausgelöst wird. Da die zytoplasmatische Region des Rezeptors keine Todesdomäne (engl. death domain, DD) [15] bzw. keine Sequenzen einer katalytischen Kinase-Aktivität besitzt [27], erfolgt die Signaltransduktion über die Adaptormoleküle wie TRAF (engl. TNF receptor-associated factor) 1, TRAF2, TRAF3 und TRAF5 [26;31-33]. Die Induktion des CD30-Signalwegs hat die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa\text{B}$  (siehe 1.3.5) bzw. die Aktivierung weiterer Signalwege, wie SAPK (engl. stress-activated kinase) /JNK (engl. c-jun N-terminal kinase), zur Folge [23;36].

### 4.2.1 Die CD30-Stimulation in der ALCL-Zelllinie Karpas 299

*Der CD30-Signalweg trägt zur NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivität in den Karpas 299 Zellen bei*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ALCL-Zelllinie Karpas 299 für 5, 16, 24, 48 und 72 Stunden mit oder ohne den CD30-spezifischen Antikörper (Ki-1) kultiviert. Diese CD30-



Stimulation führte in den Karpas 299 Zellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch den „canonical“ bzw. „noncanonical“ Signalweg [115] (siehe Abbildung 1-4). Bei dem klassischen („canonical“) NF- $\kappa$ B Aktivierungs-Signalweg wird überwiegend das p50:p65-Heterodimer durch I $\kappa$ B $\alpha$  (jedoch nicht ausschließlich) reguliert [45]. Hierbei steht die CD30 Signal-abhängige I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung mit der N-terminalen Region des Proteins in Zusammenhang, welche die Phosphorylierung Serin 32 und Serin 36 bzw. die Ubiquitinylierung Lysin 21 und Lysin 22 zur Folge hat (siehe 1.3.2 und 1.3.4). Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Western Blot nach der CD30-Stimulation (dreißig Minuten [115] bzw. fünf Stunden [siehe Abbildung 3-5, Spur 5]) in den Karpas 299 Zellen analysiert.

Ein weiterer NF- $\kappa$ B Aktivierungsmechanismus findet durch einen alternativen („noncanonical“) Signalweg in den Karpas 299 Zellen statt, den wir mit der Prozessierung p100 zu p52 in Verbindung bringen konnten [115]. Nach der Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. Prozessierung p100 zu p52 werden die NF- $\kappa$ B-Dimere in den Zellkern transloziert (siehe 1.3.4), wo sie an ihre DNA-Zielsequenz binden und die Transkription ihrer Zielgene regulieren kann. Dies wurde durch die nukleäre Translokation von p65, p50, p52 mittels EMSA (engl. electrophoretic mobility shift assay) nachgewiesen [115]. Durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde die Expression von Zielgenen induziert, die zum Teil eine wichtige Rolle in der Apoptose bzw. Zellproliferation spielen. Unter anderem konnten wir zeigen, dass die anti-apoptotischen NF- $\kappa$ B Zielgene *c-IAP2* (engl. cellular inhibitor of apoptosis protein 2), *BCL-2A1* (engl. Bcl-2-related protein A1), *A20* oder *c-FLIP* (engl. cellular FLICE inhibitor protein) hoch reguliert werden [115]. Diese sind in der Lage eine Caspase-Aktivität bzw. die Apoptose (siehe 1.4.3) in den CD30-stimulierten Karpas 299 Zellen zu blockieren (siehe Abbildung 3-7, b).

Unsere Ergebnisse stimmen mit Daten von Hübinger und Mitarbeitern [30] überein. In beiden Arbeiten konnten gezeigt werden, dass die CD30-Stimulation keine Zelltod-Induktion bzw. keine Spaltung vom Caspase-3-Substrat PARP (engl. poly [ADP-ribose] polymerase) in den Karpas 299 Zellen auslöst [30;115].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch festgestellt, dass die CD30-Stimulation innerhalb von 48 bzw. 72 Stunden eine Inhibition von Zellproliferation in den Karpas 299 Zellen ausgelöst hat. Die verlangsamte Proliferation korrelierte nicht mit der Anzahlzunahme von Trypanblaugefärbten Zellen, wobei in den Karpas 299 Zellen in Bezug auf die CD30-Aktivierung eine hohe Regulation von *Cyclin D2* und *p21<sup>CIP1/WAF1</sup>* (Cyclin-abhängigen Kinase [CDK] Inhibitor) stattgefunden hat, die von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B abhängig sind

[115]. Dabei steht die Überexpression von *Cyclin D1*, *D2* und *D3* mit einer verkürzten G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus in Zusammenhang. Somit werden die Zellen unter vermehrten Proliferationsdruck gesetzt. Dagegen findet hier trotz hoher Regulation von *Cyclin D2* ein Zellzyklusarrest in den CD30-stimulierten Karpas 299 Zellen statt. Es ist bekannt, dass die Aktivität des Cyclin-CDK-Komplexes durch die Bindung an ein CDK-inhibitorisches Protein blockiert wird [112]. Daher kann dieser Effekt durch die hohe Regulation des CDK-Inhibitors-Proteins p21<sup>CIP1/WAF1</sup> erklärt werden, das die Funktion des Cyclin D2/CDK-Komplexes in den Zellen blockieren konnte. In früheren Untersuchungen wurde auch gezeigt, dass die hohe Regulation von p21<sup>WAF1</sup> jeden Cyclin D2-CDK4-Komplex neutralisieren kann [59], die unabhängig vom Tumorsuppressor-Protein p53 abläuft [30]. Somit hat dies den Zellzyklusarrest in den CD30-stimulierten Karpas 299 Zellen zur Folge, dies hängt von der Aktivierung eines „canonical“ NF-κB-Signalwegs ab [59].

Es konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass die Stimulation des Zytokinrezeptors CD30 außer die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB auch die Aktivierung des JNK (engl. c-jun N-terminal kinase)-Signalwegs (gehört zur MAPK [engl. mitogen-activated protein kinase]-Gruppen) auslösen kann. Die Zytokinrezeptoren vermitteln die JNK-Aktivierung über die TRAF-Proteine. Somit trägt der JNK-Signalweg (über [MEKK1 bis 4], MKK4, MKK7) [116] zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (engl. activator protein-1) bei [116-118]. Der Transkriptionsfaktor AP-1 besteht aus Jun und Fos Familienmitgliedern, die als Homo- oder Heterodimere an die DNA-Bindungsstelle („AP-1 site“) binden können. AP-1 ist involviert in verschiedene biologische Prozesse [119;120]. Um eine CD30-vermittelte AP-1-Aktivierung einzuordnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Karpas 299 (nicht transfizierten sowie transfizierten) Zellen nach der CD30 Stimulation zur Ausbildung von Zell-„Clustern“ in der Zellkultur tendieren (siehe Abbildung 3-4, B). Dies kann durch die Induktion der Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen wie *ICAM-1* (engl. intercellular adhesion molecule-1) erklärt werden und wurde in den CD30-stimulierten Karpas 299 (nicht transfizierten) Zellen gezeigt [115]. Dies wurde in früheren Untersuchungen durch die Verwendung von anti-ICAM-1 Antikörpern bestätigt, die in der Lage sind, die CD30-abhängige Zellakkumulation („Cluster“ Bildung) zu verhindern [121]. ICAM-1 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche [121;122], das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es kann verschiedene Zell-Zell-Wechselwirkungen vermitteln wie z. B. die Adhäsion von Leukozyten an den Endothelzellen des Gefäßes, Zell-vermittelte Zytotoxizität, Tumor-Progression und Metastasierung [121].

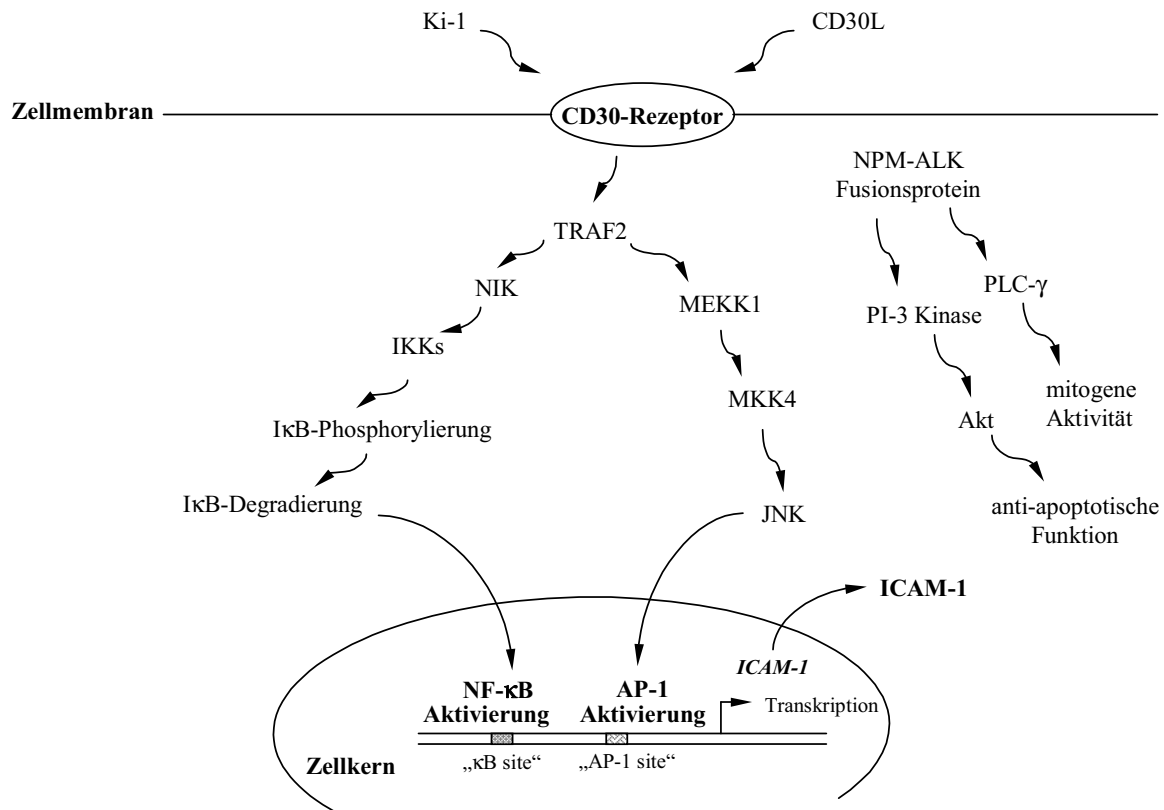
Die Expression von *ICAM-1* wird durch NF- $\kappa$ B reguliert [53]. Da die NF- $\kappa$ B-Aktivität mittels ektopter Expression eines dominant-negativ mutierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) in den Karpas 299 Zellen nahezu vollständig blockiert wurde und die Bildung von Zell-„Clustern“ auch in diesen Zellen zu beobachten ist, ist die Schlussfolgerung erlaubt, dass die Expression von ICAM-1 bzw. die Bildung von Zell-„Clustern“ über einen AP-1-abhängigen Signalweg induziert wird. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die *ICAM-1*-Expression durch die beiden Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 in den Karpas 299 Zellen reguliert wird (siehe Abbildung 4-1).

*Das NPM/ALK-Fusionsprotein blockiert den CD30-Signalweg in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 nicht*

Eine Besonderheit des ALCL ist die konstante Expression des CD30-Moleküls in allen Fällen [10]. Darüber hinaus findet sich in etwa der Hälfte der systemischen ALCL sowie in der Zelllinie Karpas 299 die Translokation (2;5) (p23;q35), in deren Folge es zur Expression eines Fusionsproteins kommt, welches aus der Oligomerisierungsdomäne des Nukleophosmin (NPM) und der intrazytoplasmatischen Region der „anaplastic lymphoma kinase“ (ALK) besteht (siehe 1.1.1). Das chimäre NPM/ALK-Protein kann als Homodimer (durch „crosslinking“ mit anderen NPM/ALK Molekülen) oder Heterodimer (durch „crosslinking“ mit NPM-Wildtyp) auftreten, wobei die Homodimer-Bildung eine konstitutive Aktivierung der katalytischen Domäne von ALK zur Folge hat [8;9;96]. Die onkogenen Rezeptor-Tyrosinkinase-Fusionsproteine (wie NPM/ALK) sind in den betroffenen Zellen konstitutiv aktiv [13]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass NPM/ALK im Vergleich zu anderen onkogenen Fusionsproteinen, wie BCR/ABL, ein starkes Transformationspotential sowohl in hämatopoetischen als auch fibroblastischen Zelllinien aufweist [123]. Jedoch ist wenig über einen Signalweg bekannt, bei dem NPM/ALK seine onkogene Wirkung im anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL) ausübt, wobei NPM/ALK anscheinend physikalisch mit Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K) assoziiert wird [9] und konstitutiv wird der anti-apoptotische PI-3-Kinase/Akt-Signalweg aktiviert [9;124].

In früheren Untersuchungen wurde eine Wechselwirkung zwischen CD30 und NPM/ALK beschrieben, die zwischen der intrazellulären Domäne von CD30 und dem ALK-Anteil des Fusionsproteins stattfinden soll [125]. In unseren Untersuchungen konnten wir jedoch zeigen, dass der CD30-Signalweg ungeachtet der NPM/ALK-Anwesenheit eine starke NF- $\kappa$ B-Aktivierung in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 induzieren kann [115]. Die Tatsache, dass die

Expression von NPM/ALK auch nicht durch die CD30-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflusst wird, zeigt sich ebenfalls an der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) – einem wichtigen „downstream“ Ziel von NPM/ALK –, dessen mitogene Aktivität [97] durch die CD30-Stimulation nicht verändert wird. Außerdem werden durch die CD30-Aktivierung weder die NPM/ALK-Autophosphorylierung noch die Phosphorylierung von PLC- $\gamma$  gesteigert [13;125].



**Abbildung 4-1: Der CD30-Signalweg in der ALCL-Zelllinie Karpas 299.**

Der CD30-Signalweg kann durch den CD30-Ligand (CD30L) oder einen CD30-spezifischen Antikörper (Ki-1) ausgelöst werden, wodurch es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 und zur Expression zahlreicher Zielgene (z. B. *ICAM-1*) kommt. Das NPM/ALK-Fusionsprotein hat die Aktivierung des anti-apoptotischen PI-3-Kinase/Akt-Signalwegs und Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) zur Folge, deren Aktivierung von CD30 bzw. NF- $\kappa$ B unabhängig ist.

#### 4.2.2 Der CD30-Signalweg induziert die Apoptose in den I $\kappa$ B $\alpha$ $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen

Der CD30-Signalweg hat die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Karpas 299 Zellen zur Folge. Es ist interessant zu hinterfragen, welche Auswirkung die Inhibition von NF- $\kappa$ B auf den CD30-Signalweg in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden in dieser Arbeit die rekombinierten I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen sowie die Wildtyp (parentalen) Zellen mit einem CD30-spezifischen Antikörper (Ki-1) stimuliert. Der verkürzten I $\kappa$ B $\alpha$ -Mutante (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) fehlen die ersten 70 Aminosäuren der N-terminalen Region, so dass die CD30-Stimulation weder die Phosphorylierung noch die Degradierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins induzieren kann (siehe Abbildung 3-5), so dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in diesen Zellen ausbleibt.

Während die Inhibition von NF- $\kappa$ B in I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen ohne gleichzeitige Stimulation von CD30 nur geringe Auswirkungen auf die Zellen hat, führt die CD30 in diesen Zellen zu einer dramatischen Induktion von Apoptose (siehe Abbildung 3-7, f und Abbildung 3-8, c). Dieser Effekt ist nur dadurch zu erklären, dass die Stimulation über CD30 in der Lage ist, Apoptose auszulösen. Wie bereits erwähnt wurde, kann durch die CD30 Stimulation außer der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (engl. activator protein-1) vermittelt werden. Die NF- $\kappa$ B-Aktivität wurde mittels ektopter Expression eines dominant-negativ mutierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) in den Karpas 299 Zellen nahezu vollständig blockiert, es ist aber die Aktivierung von AP-1 (über JNK-Signalweg) möglich, welche ein Todessignal induzieren kann.

Diese Ergebnisse passen sehr gut zu den Befunden aus publizierten Untersuchungen. Dabei stellte sich heraus, dass in den Promotorregionen von *FAS*-Rezeptor- (R) [126] bzw. *FAS*-Liganden- (L) Genen die AP-1-Bindungsdomäne vorhanden ist [118;127]. Es kann davon ausgegangen werden, dass pro-apoptotische Genprodukte wie z. B. FAS-R (Todesrezeptor) und FAS-L (siehe 1.2) in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen durch den Transkriptionsfaktor AP-1 hoch reguliert werden. Hierdurch wird vermutlich der exprimierte FAS-Ligand vom Zytoplasma auf die Zelloberfläche transportiert, um an den FAS-Rezeptor zu binden. Diese autokrine Wechselwirkung wird mit einer Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht. Es konnte u. a. gezeigt werden, dass die autokrine oder parakrine

Interaktion von FAS-R und FAS-L zur apoptotischen Elimination in die reagierenden CD4-positiven Lymphozyten führt [128-130].

In der Tat konnten wir zeigen, dass es durch Stimulation mit CD30 in den Karpas 299 Zellen mit einem intakten NF- $\kappa$ B System zu einer Hochregulation des *FAS*-Rezeptors- (R) kommt [115], wobei die tödliche Aktivität des Todesrezeptors (FAS-R) durch die Induktion von anti-apoptotischen Molekülen in diese Zellen neutralisiert wird, so dass es nicht zur Induktion der Apoptose kommt (siehe Abbildung 3-7, b).

Wie bereits ausgeführt, hat die CD30-Stimulation die Aktivierung von klassischen („canonical“) bzw. alternativen („noncanonical“) NF- $\kappa$ B Signalwegen in den Karpas 299 Zellen zur Folge. Die Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs (p50:p65-Heterodimer) wird in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen nahezu vollständig blockiert, während die Aktivierung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch die CD30-Stimulation noch möglich ist. Offensichtlich reicht die schwache anti-apoptotische Wirkung des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs nicht aus, um die pro-apoptotische Funktion des AP-1-Signalwegs in den CD30-stimulierten  $\Delta$ N133 Zellen zu unterdrücken.

#### *Die Induktion und Amplifizierung des Todessignals*

In dem unter 1.4.2.1 beschriebenen Todesrezeptorsignalweg wird der FAS-Rezeptor durch die Bindung an FAS-L aktiviert. Hierbei interagiert die zytoplasmatisch gerichtete Todesdomäne (DD) des FAS-Rezeptors mit dem Adaptorprotein FADD (über seine DD). FADD steht über seine DED (engl. death effector domain) Region mit der DED-Domäne der Initiatorcaspase-8 in Wechselwirkung und führt zur Bildung des Todes-induzierenden Signalkomplexes („DISC“). Diese Interaktion hat eine Autoproteolyse bzw. die Aktivierung von Procaspase-8 zur Folge (siehe 1.4.1). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte 48-stündige CD30-Stimulation führte in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta$ N133) Zellen in der Tat zur Prozessierung von Caspase-8 (siehe Abbildung 3-9, Spur 8). Um die Abhängigkeit der Apoptose – induziert durch die CD30-Stimulation – von Caspase-8 in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 Zellen zu zeigen, wurde der Inhibitor Z-IETD-fmk verwendet, der in der Lage ist, irreversibel die Caspase-8-Aktivität zu inhibieren (siehe Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9).

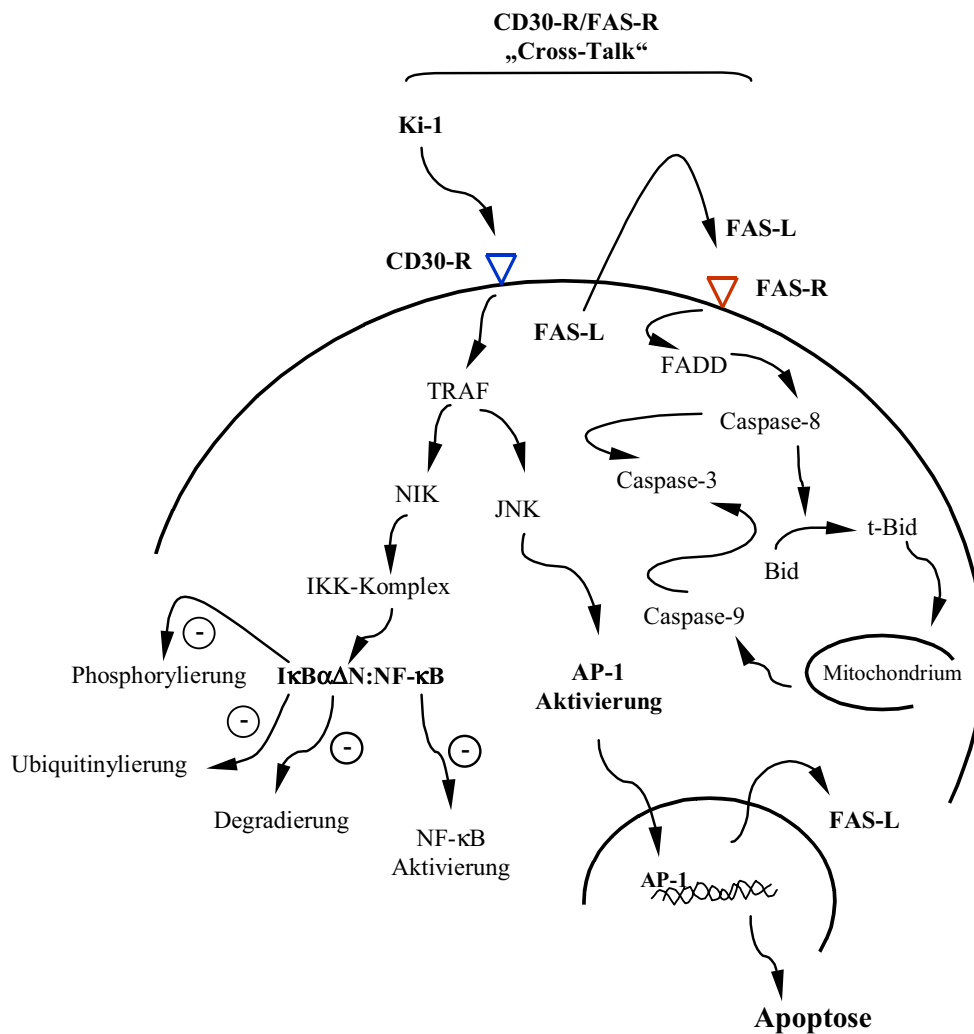
Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose wird durch zwei Typen von Signalwegen ausgelöst. Die sogenannten Typ 1-Zellen sind durch ein hohes Niveau von „DISC“-Bildung bzw. eine große Menge aktiver Caspase-8 charakterisiert [75;131], die mit der direkten Aktivierung der

„downstream“ Effektorcaspasen-3 und -7 in Zusammenhang steht. In den Typ 2-Zellen ist ein niedrigeres Niveau der „DISC“-Bildung vorhanden, was wiederum mit einer geringen Aktivierung von Caspase-8 einhergeht [75]. In diesem Fall braucht der Apoptosesignalweg einen zusätzlichen „amplification loop“, der zur Verstärkung des Todessignals im mitochondrialen Signalweg führt. Unter diesen Bedingungen wird das pro-apoptische Bcl-2-Proteinfamilien-Mitglied Bid (engl. BH3-interacting death agonist) durch die aktive Caspase-8 in t-Bid (engl. truncated Bid) gespalten [72;75;132] (siehe Abbildung 1-6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das gespaltene Bid-Produkt mittels Western Blot nach der 48-stündigen CD30-Stimulation der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden Karpas 299 Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 3-12, Spur 7). Gespaltenes Bid (t-Bid) kann mit den anti-apoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern wie Bcl-2 (oder Bcl-x<sub>L</sub>) interagieren, so dass es auf die äußere mitochondriale Membran inhibiert wird [85]. t-Bid geht darüber hinaus eine Wechselwirkung mit pro-apoptischen Faktoren wie Bax ein. Nach der mitochondrialen Translokation von t-Bid wird eine Konformationsänderung in Bax induziert, die eine Oligomerisierung bzw. Einfügung von Bax in der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge hat, wodurch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien vermittelt wird (siehe 1.4.2.1). Durch die Freisetzung von Cytochrom c bzw. die Anwesenheit von dATP kann Apaf-1 zur Bildung des Apoptosom-Komplexes oligomerisiert werden, was zur Rekrutierung bzw. Aktivierung von Procaspase-9 führt (siehe 1.4.2.2). Dies passt sehr gut zu den hier erhobenen Ergebnissen, dass die aktivierte Caspase-9 in  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta\text{N133}$ ) Zellen nach 48-stündiger CD30-Stimulation mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 3-13, Spur 7).

Es konnte außerdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der CD30-Signalweg in Bezug auf die FAS-Rezeptor-Aktivierung ebenfalls die Aktivierung von Effektorcaspase-3 in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta\text{N133}$ ) Zellen induzieren konnte (siehe Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15). Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die aktive Caspase-8 bzw. Caspase-9 oberhalb von Procaspase-3 agieren und dessen Aktivierung induzieren können [75]. Dabei agieren die Effektorcaspasen zu einem späten Zeitpunkt in dem apoptotischen Signalweg. Die Effektorcaspasen spalten die für die Apoptose charakteristischen Proteine und sind ebenso für die Spaltung von Proteinen, die größere morphologische Veränderungen zur Folge haben, verantwortlich (siehe 1.4 und 1.4.1.1).

Aus diesen Daten lässt sich ein Modell für die Apoptose-Induktion über eine CD30-Rezeptor/FAS-Rezeptor-Interaktion (CD30-R/FAS-R „Cross-Talk“) in den  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ -exprimierenden Karpas 299 ( $\Delta\text{N133}$ ) Zellen herleiten (siehe Abbildung 4-2).

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass der CD30-Signalweg zwei (gegenläufige) Prozesse in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 induzieren kann: (i) Einerseits führte es zur Apoptose-Induktion über die Aktivierung von Caspasen in den Zellen mit einem defizienten NF- $\kappa$ B-System. (ii) Andererseits zeigte sich eine Apoptose-Inhibition durch die Expression von anti-apoptotischen Zielgenen in den Zellen mit einem intakten NF- $\kappa$ B-System. Bei der Entwicklung von CD30-basierenden therapeutischen Ansätzen für das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) sollte diese Beobachtung des dualen Effekts des CD30-Rezeptors berücksichtigt werden.



**Abbildung 4-2: Modell für die CD30-vermittelte Apoptose in den I $\kappa$ B $\alpha$ ΔN-exprimierenden Karpas 299 (ΔN133) Zellen.**

Die NF- $\kappa$ B-Aktivität wird mittels ektopter Expression eines dominant-negativ mutierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (I $\kappa$ B $\alpha$ ΔN) in der ALCL-Zelllinie Karpas 299 nahezu vollständig blockiert. Die CD30-R/FAS-R-Wechselwirkung (CD30-R/FAS-R „Cross-Talk“) hat die Aktivierung von Caspasen bzw. die Apoptose zur Folge. Die Zellmembran, Mitochondrienmembran und Zellkernmembran sind durch offene Kreise angedeutet. CD30-R: CD30-Rezeptor, FAS-R: FAS-Rezeptor, FAS-L: FAS-Ligand, Ki-1: CD30-spezifischer Antikörper, (-) deutet hemmende Einflüsse an.



### 4.3 Die Apoptose-Induktion in den Daudi und Karpas 299 Zelllinien durch Zytostatika (Positivkontrollen)

Die Apoptose kann durch verschiedene physiologische Signale wie TNF- $\alpha$  bzw. den FAS/CD95-Liganden, aber auch durch den Einsatz genotoxischer bzw. zytotoxischer Agenzien hervorgerufen werden. Um den Apoptose-Effekt in Bezug auf die CD30-Stimulation in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 Zellen besser einordnen zu können, wurde in dieser Arbeit die Caspase-Aktivität im Vergleich mit Zytostatika behandelten Zelllinien untersucht. Die Behandlung der Zelllinie Karpas 299 führte – gezeigt durch Western Blot Analysen – bei Zugabe von 10  $\mu$ M Arsenitoxid (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) zur Caspase-8 Prozessierung (siehe Abbildung 3-9, Positivkontrolle) bzw. zur Aktivierung von Caspase-3 (Daten nicht gezeigt) und infolgedessen zur Apoptose. Interessanterweise kam es darüber hinaus zu einer drastischen Reduktion des  $\beta$ -Aktin-Proteins und zu einer starken Reduzierung/Degradierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (siehe Abbildung 3-9, Spur 10), diese findet wahrscheinlich als Konsequenz der Caspase-3-Aktivität statt. Dies passt gut zu der Beobachtung, dass unter den Caspasesubstraten auch Haushalts- und strukturelle Proteine (z. B. Aktin bzw. nukleäre Lamine) auftreten, zu deren Abbau es im Rahmen der Apoptose kommt (siehe 1.4.1.1). Durch die Caspasen werden auch zahlreiche Proteine gespalten, die in die Signaltransduktionswege involviert sind. Ein Beispiel dafür ist I $\kappa$ B $\alpha$  [62]. Weiterhin wurde gezeigt, dass manche Proteine sehr spät oder weniger vollständig als andere durch die Caspasen gespalten werden [74;87].

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Natriumarsenit (NaAsO<sub>2</sub>) bzw. Arsenitoxid (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) eine starke Inhibition der konstitutiven IKK bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivität in den Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS) Zelllinien zur Folge hat, wodurch NF- $\kappa$ B-abhängige Zielgene herunterreguliert werden [100]. Außerdem kann Arsenit Apoptose in Hodgkin-Zelllinien induzieren, die Caspase-8 abhängig ist [100].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Etoposid (4  $\mu$ M) eine Caspase-3 Aktivität in der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi induzierte (siehe Abbildung 3-14, Positivkontrolle), welche von der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung begleitet war. Es ist denkbar, dass I $\kappa$ B $\alpha$  als Konsequenz der Caspase-3 Aktivierung gespalten wurde. Wie bereits erwähnt wurde, können durch die Effektorcaspasen zahlreiche zelluläre Proteine im Rahmen der Apoptose gespalten werden.

## 5 Zusammenfassung

CD30 ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie, der auf allen Tumorzellen des anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphoms (ALCL) und des klassischen Hodgkin Lymphoms (cHL) exprimiert wird. Die Aktivierung des CD30 Rezeptors findet physiologischerweise durch die direkte Interaktion mit seinem Liganden statt oder kann durch „cross-linking“ mit CD30-spezifischen Antikörpern in-vitro induziert werden. Die CD30-vermittelte Signaltransduktion erfolgt durch Interaktion der zytoplasmatischen Region des Rezeptors mit den TNFR-assoziierten Faktoren (TRAFs), infolgedessen es über mehrere Schritte zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und des JNK (c-jun N-terminale Kinase)-Signalwegs kommt. Der JNK-Signalweg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CD30 für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und für das Überleben der ALCL-Tumorzellen zu untersuchen. Hierfür wurde die ALCL-Zelllinie Karpas 299 mit einem Expressionsvektor transfiziert, in den ein trunkiertes *I $\kappa$ B $\alpha$* -Gen kloniert wurde. Die Expression dieses Gens führt zu einem N-terminal verkürzten I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N), das zwar an NF- $\kappa$ B binden, aber nicht mehr abgebaut werden kann, so dass es zur Blockierung der transkriptionellen NF- $\kappa$ B Aktivität kommt.

Die I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierende Karpas 299 Zellen ( $\Delta$ N133) zeigten eine verminderte Wachstumsrate, ohne dass eine Erhöhung der spontanen Apoptose zu beobachten war. Nach Aktivierung des CD30-Rezeptors durch Bindung eines CD30-spezifischen Antikörpers (Ki-1) kam es jedoch zu einer massiven Induktion von Apoptose, während in nicht-transfizierten Karpas 299 die Apoptose-Induktion nahezu komplett ausblieb. Dieses dramatisch unterschiedliche Apoptose-Verhalten korreliert hervorragend mit der Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger Zielgene. Während es in nicht transfizierten Karpas 299 Zellen durch die CD30-Aktivierung zu einer starken Induktion von NF- $\kappa$ B-abhängigen Genen kommt, verhindert das trunkierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-transfizierten Zellen die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und blockiert dadurch die Expression der NF- $\kappa$ B Zielgene.

Die CD30-vermittelte Apoptose in den I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-exprimierenden Karpas 299 Zellen wird durch eine Aktivierung des Caspase-8 abhängigen Apoptoseweges (Todesrezeptorsignalwegs) ausgelöst. Durch die Spaltung von Bid (Mitglied der Bcl-2-Familie) durch Caspase-8 kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welches die Bildung des

Apoptosom-Komplexes bzw. die Prozessierung von Procaspase-9 zur Folge hat. Diese Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs verstärkt die Wirkung des Todesrezeptorsignalwegs und führt zur massiven Aktivierung der Effektorcaspase-3. Die Zugabe eines Pan-Caspase-Inhibitors verhindert die Auslösung der Apoptose nahezu vollständig.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von CD30 zwei (gegenläufige) Prozesse induziert: (i) Auslösung von Apoptose über die Aktivierung von Caspasen und gleichzeitig (ii) Blockierung von Apoptose durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B Zielgenen. Wird die Aktivierung von NF- $\kappa$ B – wie in dieser Arbeit gezeigt – verhindert, dann erfolgt die Caspase-vermittelte Auslösung von Apoptose. Das Wissen um diese duale Wirkung des CD30-Rezeptors ist für die Entwicklung von CD30-basierenden therapeutischen Ansätzen von großer Bedeutung.

## Summary

CD30, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, is expressed in the tumor cells of anaplastic large T cell lymphoma (ALCL) and classical Hodgkin's lymphoma (cHL). Physiological activation of the CD30 receptor takes place by direct interaction with its ligand or can be induced in-vitro by cross-linking with CD30-specific antibodies. CD30-mediated signal transduction is achieved by interaction of cytoplasmic tail of receptor with the TNFR-associated factors (TRAFs), followed by several steps which consequently lead to activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and JNK (c-jun N-terminal kinase) pathway. Moreover, JNK pathway stimulation leads to activation of transcription factor AP-1.

The aim of this study was to investigate the role of CD30 for NF- $\kappa$ B activation and for survival of ALCL tumor cells. For this purpose ALCL cell line Karpas 299 was transfected with an expression vector containing a truncated *I $\kappa$ B $\alpha$*  gene. The expression of this gene leads to an N-terminal shortened I $\kappa$ B $\alpha$  protein (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N), which is able to bind to NF- $\kappa$ B but cannot be degraded. This permanent binding of truncated inhibitor prevents the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B.

I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-expressing Karpas 299 cells ( $\Delta$ N133) showed a reduced growth rate but no increased spontaneous apoptosis. Activation of the CD30 signalling pathway by binding of a CD30-specific antibody (Ki-1) led, however, to massive induction of apoptosis in transfected

cells whereas no significant induction of apoptosis was detectable in untransfected Karpas 299 cells. This dramatic discrepancy in apoptosis correlates excellent with the expression of NF- $\kappa$ B-dependent target genes. Whereas the untransfected Karpas 299 cells displayed a strong CD30-mediated induction of NF- $\kappa$ B-dependent genes, I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-expressing Karpas 299 cells ( $\Delta$ N133) were unable to induce the expression of NF- $\kappa$ B target genes.

CD30-mediated apoptosis is triggered by activation of the caspase-8-dependent apoptosis pathway (death receptor signaling pathway) in I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-expressing Karpas 299 cells. Cleavage of Bid (a member of Bcl-2 family) by caspase-8 mediates the release of the cytochrome c from mitochondria, which results in the formation of the apoptosome complex and respectively the processing of procaspase-9. This activation of mitochondrial apoptosis signaling pathway enhances function of death receptor signaling pathway and leads to massive activation of effector caspase-3. This process was completely repressed by the addition of a pan-caspase inhibitor and led to a complete blockage of apoptosis in CD30-stimulated  $\Delta$ N133 (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N-expressing Karpas 299) cells.

The results of this study clearly indicate that CD30 activity induces two (opposite) processes (i) triggering of apoptosis by the activation of caspases and, at the same time, (ii) blockage of apoptosis through activation of NF- $\kappa$ B target genes. Inactivation of NF- $\kappa$ B, as showed in this study, leads to caspase-mediated apoptosis induction. Considering this dual function of the CD30 receptor might be of great importance for the development of CD30-based therapeutic approaches for patients suffering from ALCL.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ALCL	Anaplastisches Großzelliges Lymphom
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BGH	Rinder Wachstumshormon ( <i>Bovine Growth Hormone</i> )
CBF	Campus Benjamin Franklin
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
C-terminal	Carboxyl-Terminus
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Deoxyribonuklease
DR	Todesrezeptor ( <i>Death Receptor</i> )
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i>
EMA	Epitheliale Membranantigen
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
fg	Femtogramm
for	<i>forward</i>
G418 <sup>R</sup>	Geneticinresistenz
h	Stunden
HL	Hodgkin-Lymphom
H/RS	Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen

---

HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horse Radish Peroxidase</i> )
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaOH	Natriumhydroxid
neo <sup>r</sup>	Neomycin-Resistenzgen
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
N-terminal	Amino-Terminus
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleicacid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkriptase
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
Sek	Sekunde
Ser	Serin
T7	T7 Promotor
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
ü.N.	über Nacht

---

UV	Ultraviolett
V	Volt
Zellen/ml	Zellzahl pro 1 ml Puffer oder Medium

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Harris,N.L., Stein,H., Coupland,S.E., Hummel,M., Favera,R.D., Pasqualucci,L., and Chan,W.C.,** New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2001. 194-220.
2. **Hahn,H., Falke, D., Kaufmann, S. H. E., and Ullmann, U.,** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* 3. Auflage. Springer, Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio 1999.
3. **Alberts,B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D.,** *Molekularbiologie der Zelle.* 3. Auflage. VCH, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokio 1995.
4. **Harris,N.L., Jaffe,E.S., Stein,H., Banks,P.M., Chan,J.K., Cleary,M.L., Delsol,G., De Wolf-Peeters,C., Falini,B., Gatter,K.C., and .,** A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994. **84:** 1361-1392.
5. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* IARC Press, Lyon, 2001.
6. **Evans,L.S. and Hancock,B.W.,** Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2003. **362:** 139-146.
7. **Pasqualucci,L., Neumeister,P., Goossens,T., Nanjangud,G., Chaganti,R.S., Küppers,R., and Dalla-Favera,R.,** Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001. **412:** 341-346.
8. **Stein,H., Foss,H.D., Dürkop,H., Marafioti,T., Delsol,G., Pulford,K., Pileri,S., and Falini,B.,** CD30 (+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 2000. **96:** 3681-3695.
9. **Falini,B.,** Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *Br.J.Haematol.* 2001. **114:** 741-760.
10. **Stein,H., Mason,D.Y., Gerdes,J., O'Connor,N., Wainscoat,J., Pallesen,G., Gatter,K., Falini,B., Delsol,G., Lemke,H., and .,** The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985. **66:** 848-858.
11. **Foss,H.D., Anagnostopoulos,I., Araujo,I., Assaf,C., Demel,G., Kummer,J.A., Hummel,M., and Stein,H.,** Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and Null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 1996. **88:** 4005-4011.
12. **Morris,S.W., Kirstein,M.N., Valentine,M.B., Dittmer,K.G., Shapiro,D.N., Saltman,D.L., and Look,A.T.,** Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994. **263:** 1281-1284.



13. **Kutok,J.L. and Aster,J.C.**, Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2002. **20**: 3691-3702.
14. **Foxwell,B.M., Barrett,K., and Feldmann,M.**, Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Clin.Exp.Immunol.* 1992. **90**: 161-169.
15. **Aggarwal,B.B.**, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat.Rev.Immunol.* 2003. **3**: 745-756.
16. **Baker,S.J. and Reddy,E.P.**, Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 1996. **12**: 1-9.
17. **Ashkenazi,A. and Dixit,V.M.**, Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998. **281**: 1305-1308.
18. **Micheau,O. and Tschopp,J.**, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003. **114**: 181-190.
19. **Locksley,R.M., Killeen,N., and Lenardo,M.J.**, The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001. **104**: 487-501.
20. **Chan,F.K., Chun,H.J., Zheng,L., Siegel,R.M., Bui,K.L., and Lenardo,M.J.**, A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000. **288**: 2351-2354.
21. **Dong,L., Hülsmeier,M., Dürkop,H., Hansen,H.P., Schneider-Mergener,J., Ziegler,A., and Uchanska-Ziegler,B.**, Human CD30: structural implications from epitope mapping and modeling studies. *J.Mol.Recognit.* 2003. **16**: 28-36.
22. **Smith,C.A., Farrah,T., and Goodwin,R.G.**, The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994. **76**: 959-962.
23. **Horie,R. and Watanabe,T.**, CD30: expression and function in health and disease. *Semin.Immunol.* 1998. **10**: 457-470.
24. **Dürkop,H., Latza,U., Hummel,M., Eitelbach,F., Seed,B., and Stein,H.**, Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 1992. **68**: 421-427.
25. **Amakawa,R., Hakem,A., Kundig,T.M., Matsuyama,T., Simard,J.J., Timms,E., Wakeham,A., Mittrucker,H.W., Griesser,H., Takimoto,H., Schmits,R., Shahinian,A., Ohashi,P., Penninger,J.M., and Mak,T.W.**, Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 1996. **84**: 551-562.
26. **Dürkop,H., Oberbarnscheidt,M., Latza,U., Bulfone-Paus,S., Krause,H., Pohl,T., and Stein,H.**, Structure of the Hodgkin's lymphoma-associated human CD30 gene and the influence of a microsatellite region on its expression in CD30 (+) cell lines. *Biochim.Biophys.Acta* 2001. **1519**: 185-191.

27. **Falini,B., Pileri,S., Pizzolo,G., Dürkop,H., Flenghi,L., Stirpe,F., Martelli,M.F., and Stein,H.,** CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995. **85**: 1-14.
28. **Biswas,P., Smith,C.A., Goletti,D., Hardy,E.C., Jackson,R.W., and Fauci,A.S.,** Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity*. 1995. **2**: 587-596.
29. **Tsitsikov,E.N., Wright,D.A., and Geha,R.S.,** CD30 induction of human immunodeficiency virus gene transcription is mediated by TRAF2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997. **94**: 1390-1395.
30. **Hübinger,G., Müller,E., Scheffrahn,I., Schneider,C., Hildt,E., Singer,B.B., Sigg,I., Graf,J., and Bergmann,L.,** CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP1/WAF1) in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene* 2001. **20**: 590-598.
31. **Aizawa,S., Nakano,H., Ishida,T., Horie,R., Nagai,M., Ito,K., Yagita,H., Okumura,K., Inoue,J., and Watanabe,T.,** Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NFkappa B activation. *J.Biol.Chem.* 1997. **272**: 2042-2045.
32. **Gedrich,R.W., Gilfillan,M.C., Duckett,C.S., Van Dongen,J.L., and Thompson,C.B.,** CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J.Biol.Chem.* 1996. **271**: 12852-12858.
33. **Boucher,L.M., Marengere,L.E., Lu,Y., Thukral,S., and Mak,T.W.,** Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1997. **233**: 592-600.
34. **Lee,S.Y., Lee,S.Y., Kandala,G., Liou,M.L., Liou,H.C., and Choi,Y.,** CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF-kappa B activation and binding specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996. **93**: 9699-9703.
35. **Croager,E.J., Gout,A.M., and Abraham,L.J.,** Involvement of Sp1 and microsatellite repressor sequences in the transcriptional control of the human CD30 gene. *Am.J.Pathol.* 2000. **156**: 1723-1731.
36. **Harlin,H., Podack,E., Boothby,M., and Alegre,M.L.,** TCR-independent CD30 signaling selectively induces IL-13 production via a TNF receptor-associated factor/p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *J.Immunol.* 2002. **169**: 2451-2460.
37. **Duckett,C.S., Gedrich,R.W., Gilfillan,M.C., and Thompson,C.B.,** Induction of nuclear factor kappa B by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol.Cell Biol.* 1997. **17**: 1535-1542.
38. **Ghosh,S., May,M.J., and Kopp,E.B.,** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 1998. **16**: 225-260.

39. **Sen,R. and Baltimore,D.**, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. **46**: 705-716.
40. **Ghosh,S. and Karin,M.**, Missing pieces in the NF-kappa B puzzle. *Cell* 2002. **109 Suppl**: S81-S96.
41. **Zhong,H., Voll,R.E., and Ghosh,S.**, Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol.Cell* 1998. **1**: 661-671.
42. **Karin,M. and Ben-Neriah,Y.**, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappa B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 2000. **18**: 621-663.
43. **Jacobs,M.D. and Harrison,S.C.**, Structure of an I kappa B alpha/NF-kappa B complex. *Cell* 1998. **95**: 749-758.
44. **Whiteside,S.T. and Israel,A.**, I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin.Cancer Biol.* 1997. **8**: 75-82.
45. **Hayden,M.S. and Ghosh,S.**, Signaling to NF-kappa B. *Genes Dev.* 2004. **18**: 2195-2224.
46. **Van Antwerp,D.J. and Verma,I.M.**, Signal-induced degradation of I kappa B alpha: association with NF-kappa B and the PEST sequence in I kappa B alpha are not required. *Mol.Cell Biol.* 1996. **16**: 6037-6045.
47. **Traenckner,E.B., Pahl,H.L., Henkel,T., Schmidt,K.N., Wilk,S., and Baeuerle,P.A.**, Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 1995. **14**: 2876-2883.
48. **Scherer,D.C., Brockman,J.A., Chen,Z., Maniatis,T., and Ballard,D.W.**, Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995. **92**: 11259-11263.
49. **Kabouridis,P.S., Hasan,M., Newson,J., Gilroy,D.W., and Lawrence,T.**, Inhibition of NF-kappa B activity by a membrane-transducing mutant of I kappa B alpha. *J.Immunol.* 2002. **169**: 2587-2593.
50. **Hinz,M., Löser,P., Mathas,S., Krappmann,D., Dörken,B., and Scheidereit,C.**, Constitutive NF-kappa B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 2001. **97**: 2798-2807.
51. **Sun,S., Elwood,J., and Greene,W.C.**, Both amino- and carboxyl-terminal sequences within I kappa B alpha regulate its inducible degradation. *Mol.Cell Biol.* 1996. **16**: 1058-1065.
52. **Zandi,E., Rothwarf,D.M., Delhase,M., Hayakawa,M., and Karin,M.**, The I kappa B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for I kappa B phosphorylation and NF-kappa B activation. *Cell* 1997. **91**: 243-252.

53. **Pahl,H.L.**, Activators and target genes of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Oncogene* 1999. **18**: 6853-6866.
54. **Bonizzi,G. and Karin,M.**, The two NF-kappa B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004. **25**: 280-288.
55. **Ciechanover,A.**, The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 1998. **17**: 7151-7160.
56. **Nadiminty,N., Lou,W., Lee,S.O., Lin,X., Trump,D.L., and Gao,A.C.**, Stat3 activation of NF-kappa B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006. **103**: 7264-7269.
57. **Xiao,G., Harhaj,E.W., and Sun,S.C.**, NF-kappa B-inducing kinase regulates the processing of NF-kappa B2 p100. *Mol.Cell* 2001. **7**: 401-409.
58. **Pomerantz,J.L. and Baltimore,D.**, Two pathways to NF-kappa B. *Mol.Cell* 2002. **10**: 693-695.
59. **Wright,C.W., Rumble,J.M., and Duckett,C.S.**, CD30 activates both the canonical and alternative NF-kappaB pathways in anaplastic large cell lymphoma cells. *J.Biol.Chem.* 2007. **282**: 10252-10262.
60. **Horwitz,B.H., Scott,M.L., Cherry,S.R., Bronson,R.T., and Baltimore,D.**, Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappa B-deficient fetal liver cells. *Immunity.* 1997. **6**: 765-772.
61. **Baeuerle,P.A. and Henkel,T.**, Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* 1994. **12**: 141-179.
62. **Barkett,M. and Gilmore,T.D.**, Control of apoptosis by Rel/NF-kappa B transcription factors. *Oncogene* 1999. **18**: 6910-6924.
63. **Hinz,M., Krappmann,D., Eichten,A., Heder,A., Scheidereit,C., and Strauss,M.**, NF-kappa B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol.Cell Biol.* 1999. **19**: 2690-2698.
64. **Hetts,S.W.**, To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998. **279**: 300-307.
65. **Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R.**, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 1972. **26**: 239-257.
66. **Jacobson,M.D., Weil,M., and Raff,M.C.**, Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997. **88**: 347-354.
67. **Kam,P.C. and Ferch,N.I.**, Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000. **55**: 1081-1093.
68. **Nunez,G., Benedict,M.A., Hu,Y., and Inohara,N.**, Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998. **17**: 3237-3245.

69. **Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X.,** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997. **91**: 479-489.
70. **Hu,Y., Benedict,M.A., Wu,D., Inohara,N., and Nunez,G.,** Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998. **95**: 4386-4391.
71. **Kerr,J.F.,** Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol.* 1995. **5**: 55-57.
72. **Nagata,S.,** Fas ligand-induced apoptosis. *Annu.Rev.Genet.* 1999. **33**: 29-55.
73. **Cohen,G.M.,** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 1997. **326 ( Pt 1)**: 1-16.
74. **Earnshaw,W.C., Martins,L.M., and Kaufmann,S.H.,** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 1999. **68**: 383-424.
75. **Lavrik,I.N., Golks,A., and Krammer,P.H.,** Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J.Clin.Invest* 2005. **115**: 2665-2672.
76. **Bergeron,S., Beauchemin,M., and Bertrand,R.,** Camptothecin- and etoposide-induced apoptosis in human leukemia cells is independent of cell death receptor-3 and -4 aggregation but accelerates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated cell death. *Mol.Cancer Ther.* 2004. **3**: 1659-1669.
77. **Yuan,J., Shaham,S., Ledoux,S., Ellis,H.M., and Horvitz,H.R.,** The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993. **75**: 641-652.
78. **Benedict,M.A., Hu,Y., Inohara,N., and Nunez,G.,** Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra WD-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 8461-8468.
79. **Alnemri,E.S., Livingston,D.J., Nicholson,D.W., Salvesen,G., Thornberry,N.A., Wong,W.W., and Yuan,J.,** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996. **87**: 171.
80. **Thornberry,N.A. and Lazebnik,Y.,** Caspases: enemies within. *Science* 1998. **281**: 1312-1316.
81. **Degterev,A., Boyce,M., and Yuan,J.,** A decade of caspases. *Oncogene* 2003. **22**: 8543-8567.
82. **Koenig,U., Eckhart,L., and Tschachler,E.,** Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2001. **285**: 1150-1154.
83. **Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Fernandes-Alnemri,T., and Alnemri,E.S.,** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol.Cell* 1998. **1**: 949-957.

84. **Donepudi,M., Mac,S.A., Briand,C., and Grutter,M.G.,** Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol.Cell* 2003. **11**: 543-549.
85. **Budd,R.C.,** Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J.Clin.Invest* 2002. **109**: 437-441.
86. **Martin,D.A., Siegel,R.M., Zheng,L., and Lenardo,M.J.,** Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J.Biol.Chem.* 1998. **273**: 4345-4349.
87. **Fischer,U., Jänicke,R.U., and Schulze-Osthoff,K.,** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death.Differ.* 2003. **10**: 76-100.
88. **Nicholson,D.W.,** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death.Differ.* 1999. **6**: 1028-1042.
89. **Deng,Y., Ren,X., Yang,L., Lin,Y., and Wu,X.,** A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 2003. **115**: 61-70.
90. **Boatright,K.M. and Salvesen,G.S.,** Mechanisms of caspase activation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2003. **15**: 725-731.
91. **Cudrici,C., Niculescu,F., Jensen,T., Zafranskaia,E., Fosbrink,M., Rus,V., Shin,M.L., and Rus,H.,** C5b-9 terminal complex protects oligodendrocytes from apoptotic cell death by inhibiting caspase-8 processing and up-regulating FLIP. *J.Immunol.* 2006. **176**: 3173-3180.
92. **Desagher,S., Osen-Sand,A., Nichols,A., Eskes,R., Montessuit,S., Lauper,S., Maundrell,K., Antonsson,B., and Martinou,J.C.,** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J.Cell Biol.* 1999. **144**: 891-901.
93. **Kuida,K.,** Caspase-9. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 2000. **32**: 121-124.
94. **Reed,J.C.,** Dysregulation of apoptosis in cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999. **17**: 2941-2953.
95. **Fischer,P., Nacheva,E., Mason,D.Y., Sherrington,P.D., Hoyle,C., Hayhoe,F.G., and Karpas,A.,** A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood* 1988. **72**: 234-240.
96. **Bischof,D., Pulford,K., Mason,D.Y., and Morris,S.W.,** Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the Non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol.Cell Biol.* 1997. **17**: 2312-2325.
97. **Bai,R.Y., Dieter,P., Peschel,C., Morris,S.W., and Duyster,J.,** Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol.Cell Biol.* 1998. **18**: 6951-6961.
98. **Kuefer,M.U., Look,A.T., Pulford,K., Behm,F.G., Pattengale,P.K., Mason,D.Y., and Morris,S.W.,** Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood* 1997. **90**: 2901-2910.

99. **Burden,D.A., Kingma,P.S., Froelich-Ammon,S.J., Bjornsti,M.A., Patchan,M.W., Thompson,R.B., and Osheroff,N.,** Topoisomerase II. etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J.Biol.Chem.* 1996. **271:** 29238-29244.
100. **Mathas,S., Lietz,A., Janz,M., Hinz,M., Jundt,F., Scheidereit,C., Bommert,K., and Dörken,B.,** Inhibition of NF-kappa B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 2003. **102:** 1028-1034.
101. **Laemmli,U.K.,** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. **227:** 680-685.
102. **Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goeke,N.M., Olson,B.J., and Klenk,D.C.,** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 1985. **150:** 76-85.
103. **Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J.,** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992. **24:** 145-149.
104. **Ormerod,M.G.,** *Flow Cytometry.* Third Edition, Oxford University Press, Oxford; New York; Auckland; Cape Town; Dar es Salaam; Hong Kong; Karachi; Kuala Lumpur; Madrid; Melbourne; Mexico City; Nairobi; New Delhi; Shanghai; Taipei; Toronto 2000.
105. **Vermes,I., Haanen,C., Steffens-Nakken,H., and Reutelingsperger,C.,** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 1995. **184:** 39-51.
106. **Emmerich,F., Meiser,M., Hummel,M., Demel,G., Foss,H.D., Jundt,F., Mathas,S., Krappmann,D., Scheidereit,C., Stein,H., and Dörken,B.,** Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappa B activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 1999. **94:** 3129-3134.
107. **Krappmann,D., Emmerich,F., Kordes,U., Scharschmidt,E., Dörken,B., and Scheidereit,C.,** Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 1999. **18:** 943-953.
108. **Scheidereit,C.,** Signal transduction. Docking I kappa B kinases. *Nature* 1998. **395:** 225-226.
109. **Ito,C.Y., Kazantsev,A.G., and Baldwin,A.S., Jr.,** Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res.* 1994. **22:** 3787-3792.
110. **Greten,F.R. and Karin,M.,** The IKK/NF-kappa B activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2004. **206:** 193-199.
111. **Neumann,M., Grieshammer,T., Chuvpilo,S., Kneitz,B., Lohoff,M., Schimpl,A., Franza,B.R., Jr., and Serfling,E.,** RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *EMBO J.* 1995. **14:** 1991-2004.

112. **Brooks,A.R., Shiffman,D., Chan,C.S., Brooks,E.E., and Milner,P.G.,** Functional analysis of the human cyclin D2 and cyclin D3 promoters. *J.Biol.Chem.* 1996. **271**: 9090-9099.
113. **Weinberg,R.A.,** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995. **81**: 323-330.
114. **Bargou,R.C., Emmerich,F., Krappmann,D., Bommert,K., Mapara,M.Y., Arnold,W., Royer,H.D., Grinstein,E., Greiner,A., Scheidereit,C., and Dörken,B.,** Constitutive nuclear factor-kappa B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J.Clin.Invest* 1997. **100**: 2961-2969.
115. **Hirsch,B., Hummel,M., Bentink,S., Fouladi,F., Spang,R., Zollinger,R., Stein,H., and Dürkop,H.,** CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am.J.Pathol.* 2008. **172**: 510-520.
116. **Davis,R.J.,** Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000. **103**: 239-252.
117. **Weston,C.R. and Davis,R.J.,** The JNK signal transduction pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2002. **12**: 14-21.
118. **Harwood,F.G., Kasibhatla,S., Petak,I., Vernes,R., Green,D.R., and Houghton,J.A.,** Regulation of FasL by NF-kappa B and AP-1 in Fas-dependent thymineless death of human colon carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 10023-10029.
119. **Karin,M.,** The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 1995. **270**: 16483-16486.
120. **Angel,P. and Karin,M.,** The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim.Biophys.Acta* 1991. **1072**: 129-157.
121. **Nam,S.Y., Cho,K.S., Heo,Y.M., Ha,J.C., Kim,Y.H., Keun,Y.H., Han,H.P., Kim,H.M., and Podack,E.R.,** Regulation of lymphocyte clustering by CD30-mediated ICAM-1 up-regulation. *Cell Immunol.* 2002. **219**: 38-47.
122. **Marlin,S.D. and Springer,T.A.,** Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987. **51**: 813-819.
123. **Duyster,J., Bai,R.Y., and Morris,S.W.,** Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* 2001. **20**: 5623-5637.
124. **Slupianek,A., Nieborowska-Skorska,M., Hoser,G., Morrione,A., Majewski,M., Xue,L., Morris,S.W., Wasik,M.A., and Skorski,T.,** Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res.* 2001. **61**: 2194-2199.



125. **Hübinger,G., Scheffrahn,I., Müller,E., Bai,R., Duyster,J., Morris,S.W., Schrezenmeier,H., and Bergmann,L.,** The tyrosine kinase NPM-ALK, associated with anaplastic large cell lymphoma, binds the intracellular domain of the surface receptor CD30 but is not activated by CD30 stimulation. *Exp.Hematol.* 1999. **27**: 1796-1805.
126. **Cheng,J., Liu,C., Koopman,W.J., and Mountz,J.D.,** Characterization of human Fas gene. Exon/Intron organization and promoter region. *J.Immunol.* 1995. **154**: 1239-1245.
127. **Kasibhatla,S., Brunner,T., Genestier,L., Echeverri,F., Mahboubi,A., and Green,D.R.,** DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol.Cell* 1998. **1**: 543-551.
128. **Chan,H., Bartos,D.P., and Owen-Schaub,L.B.,** Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF-kappa B p50-p65 recruitment. *Mol.Cell Biol.* 1999. **19**: 2098-2108.
129. **Dhein,J., Walczak,H., Baumler,C., Debatin,K.M., and Krammer,P.H.,** Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995. **373**: 438-441.
130. **Ju,S.T., Panka,D.J., Cui,H., Ettinger,R., el-Khatib,M., Sherr,D.H., Stanger,B.Z., and Marshak-Rothstein,A.,** Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995. **373**: 444-448.
131. **Krammer,P.H.,** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000. **407**: 789-795.
132. **Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C., and Wang,X.,** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998. **94**: 481-490.

## 8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Michael Hummel, der mich während der Arbeit an diesem Projekt hervorragend betreut hat. Er hat mit seiner ständigen Diskussionsbereitschaft und seinen konstruktiven Vorschlägen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Harald Stein für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Arbeit am Institut für Pathologie, Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchführen konnte.

Bei Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel bedanke ich mich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu verfassen.

Herrn Dr. Burkhard Hirsch danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für die Hilfe bei der durchflusszytometrischen Analyse. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Horst Dürkop für sein besonderes Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Claus Scheidereit und seiner Arbeitsgruppe vom Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch danke ich für das Zur-Verfügung-Stellen des pcDNA3 (mit  $\kappa B\alpha\Delta N$ ) Vektorkonstruktes.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Edda von der Wall bedanken, die mich mit ihrer hilfsbereiten Art bei der Zellkultur unterstützte. Mein Dank gilt auch Frau Ines Puschendorf für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Ulrike Treichel und Frau Dr. Anke Ehlers für ihre Unterstützung bedanken, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Mein Dank geht auch an Frau Dr. Dido Lenze und Herrn Dr. Volkhard Seitz für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Insbesondere Frau Sandra Meier danke ich für ihre Unterstützung bei der immunhistologischen Färbung. Mein Dank gilt auch Frau Stefanie Mende und Frau Erika Berg für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

Für die freundschaftliche und inspirierende Arbeitsatmosphäre danke ich auch allen übrigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich bei meiner Familie und vor allem bei meinem Bruder bedanken. Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützt und mir dieses Studium ermöglicht haben. Daher ist diese Arbeit vor allem ihnen gewidmet.

Zu guter Letzt gilt mein Dank all jenen, die nicht namentlich genannt werden und trotzdem im Großen und Kleinen ihren Anteil am Erfolg dieser Arbeit haben.

## 9 Veröffentlichungen

### Publikation

- **Burkhard Hirsch, Michael Hummel, Stefan Bentink, Fariba Fouladi, Rainer Spang, Raphael Zollinger, Harald Stein and Horst Dürkop.**  
CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *The American Journal of Pathology* 2008, **172**: 510-520

### Posterpräsentation

- **Fariba Fouladi, Burkhard Hirsch, Horst Dürkop, Harald Stein and Michael Hummel.**  
CD30-mediated effects in NF- $\kappa$ B suppressed anaplastic large cell lymphoma.  
Beim Herbsttagung von GBM (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie) 2005, Berlin

## **10 Lebenslauf**

**Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen aus der online-Version entfernt.**