

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expressionsanalyse der TNFR-Signaltransduktionskomponenten in CD30-exprimierenden Tumorgeweben

Für die Untersuchung des Expressionsstatus eines Proteins auf Einzelzellebene im Gewebeschnitt eignen sich grundsätzlich zwei Methoden. Die eine ist die *in situ* Hybridisierung, die die mRNA des zu untersuchenden Proteins detektiert, aber somit nur den indirekten Schluss auf die exprimierte Proteinmenge zulässt. Eine andere Methode ist der direkte Nachweis des Proteins durch geeignete Antikörper. Zu Beginn dieser Untersuchung - und noch heute - waren nur wenige Antikörper gegen die Moleküle der TNFR-vermittelten Signaltransduktion kommerziell erhältlich. Somit wurden spezifische Bereiche der Proteine als cDNA amplifiziert, kloniert und dann als radioaktive RNA-Sonden in die *in situ* Hybridisierung eingesetzt. Untersucht wurden Paraffinschnitte von normalem lymphatischem Gewebe, EBV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen und CD30<sup>+</sup> Lymphomen. Eine Infektion mit EBV wurde durch immunhistochemische Färbungen für die EBV-charakteristischen Proteine LMP-1, ZEBRA und EBNA2 nachgewiesen. Bei vorliegender EBV-Infektion wurden Doppel-*in situ* Hybridisierungen mit Sonden für die EBV-kodierte kleine RNA (EBER) und die zu untersuchenden Transkripte durchgeführt, um eine Korrelation zwischen der Infektion und der Transkripthäufigkeit der Signaltransduktionsproteine zu ermöglichen.

Die nachfolgende Tabelle 3.1.1 gibt eine Übersicht der untersuchten Proteintranskripte und die gegebenenfalls abweichende Transkripthäufigkeit in Tumorzellen im Vergleich zu den umliegenden nicht neoplastischen Zellen.

mRNA	TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF5	TRAF6	TRADD	FADD	RIP
	+	-	-	-	-	-	-	-

mRNA	TRIP	A20	NIK	FLIP	IKK	TANK	clAP-1	clAP-2
	-	+	-	-	-	-	-	+

Tabelle 3.1.1. Expressionsstatus der Proteintranskripte im Vergleich von Tumorzellen zu den umliegenden gesunden Zellen.

Ein + kennzeichnet die stärkere Expression in den Tumorzellen, ein - keinen Unterschied zu den normalen Zellen.

Es zeigte sich eine deutliche Überexpression der Transkripte von TRAF1<sup>104, 105</sup>, A20<sup>105</sup> und cIAP-2<sup>106</sup> in den Tumorzellen des HL und zudem die Überexpression von TRAF1<sup>104, 105</sup> in EBV-infizierten Zellen. Die Expression der Transkripte aller anderen Signaltransduktionsmoleküle in den Tumorzellen entsprach der Expression in dem umliegenden Gewebe.

#### *TRAF1-Expression in reaktivem lymphatischem Gewebe*

Alle der untersuchten hyperplastischen Tonsillen zeigten in wenigen lymphatischen Blasten eine schwache bis mittelgradige TRAF1-Expression. Die ruhenden Lymphozyten, Mantelzellen und Follikelzentrumzellen sowie dendritische Zellen und Makrophagen waren TRAF1<sup>-</sup> (Abbildung 3.1.1).

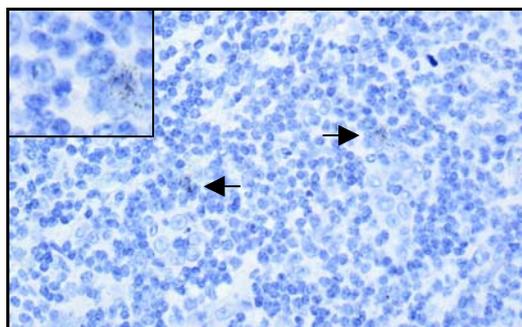


Abbildung 3.1.1. Mit der TRAF1-Antisensesonde hybridisierte hyperplastische Tonsille. Die wenigen TRAF1<sup>+</sup> lymphatischen Blasten sind mit Pfeilen markiert und ein vergrößerter Ausschnitt ist in der linken oberen Ecke abgebildet.

#### *TRAF1-Expression in EBV-assoziierten Erkrankungen*

In fünf von sieben Fällen von infektiöser Mononukleose (IM) waren in mehr als der Hälfte der lymphatischen Blasten mittelgradige bis starke Signale zu erkennen (Tabelle 3.1.2).

Fall Nummer	Blasten mit TRAF1-Expression in %	Intensität des TRAF1-Signals
1	70	+++
2	50	+++
3	50	+++
4	50	++
5	50	++
6	30	++
7	20	+

Tabelle 3.1.2. Expression der TRAF1-mRNA in Blasten in Fällen mit IM. Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++.

Durch die simultane Hybridisierung mit EBER- und TRAF1-Sonden zeigte sich, dass in fünf von sechs Fällen eine starke TRAF1-Expression mit der EBV-Infektion korreliert (Abbildung 3.1.2 A und B).

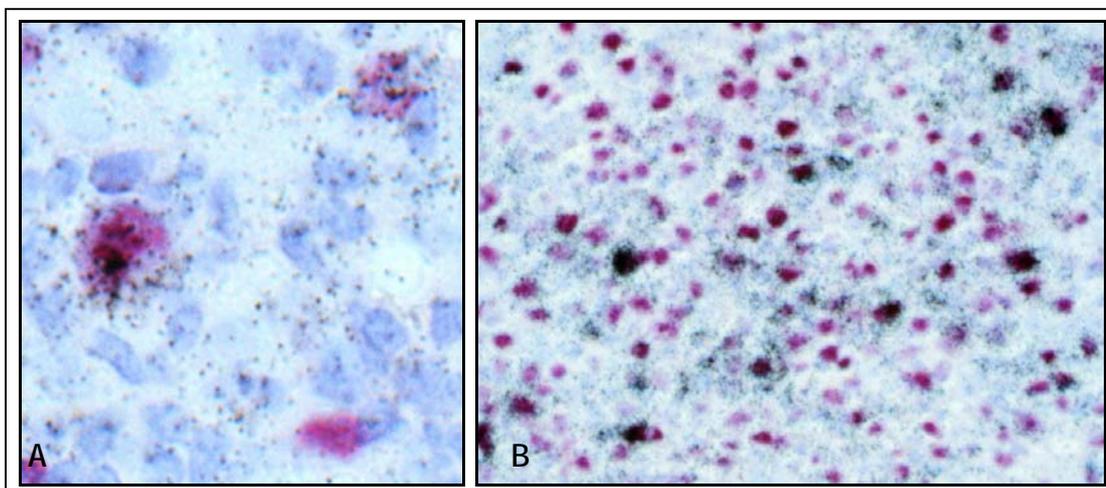


Abbildung 3.1.2. Doppelmarkierung an Tonsillengewebe von Patienten mit IM mit den TRAF1 (schwarz) und EBER (rot) Antisensesonden (A und B).  
Bild A zeigt eine Ausschnittsvergrößerung.

Die TRAF1-Expression war in den Fällen der atypischen Lymphoproliferation (ALP) mittelgradig bis stark. In zwei Fällen zeigte sich, dass fast alle Blasten eine mittelgradige bis starke Konzentration an TRAF1-Transkripten enthalten. Eine mittelgradige bis starke TRAF1-Expression zeigten 30-40% der Blasten in den restlichen vier Fällen (Tabelle 3.1.3).

Fall Nummer	Blasten mit TRAF1-Expression in %	Intensität des TRAF1-Signals
1	40	++
2	30	+++
3	40	++
4	80	++
5	90	+++
6	40	++

Tabelle 3.1.3. Expression der TRAF1-mRNA in Blasten in Fällen der ALP.  
Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++.

### *TRAF1-Expression in Lymphomen*

Die Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen des HL zeigten in 16 von den untersuchten 23 Fällen des klassischen HL einen hohen Anteil an TRAF1-mRNA und nur in fünf Fällen einen eher mittelgradigen Gehalt an TRAF1-Transkripten (Abbildung 3.1.3).

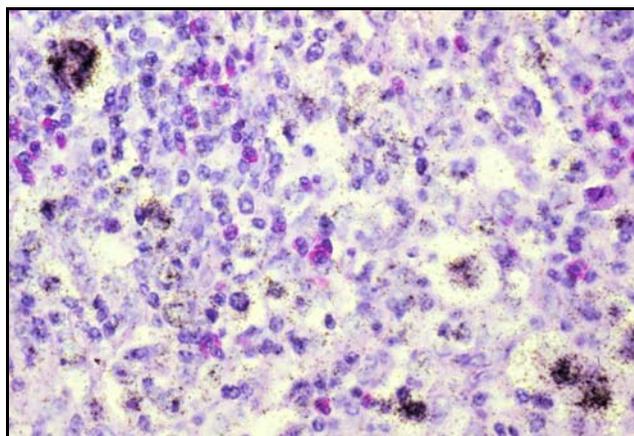


Abbildung 3.1.3. TRAF1 *in situ* Hybridisierung eines Falles von klassischem HL.

In Fällen von Lymphozyten-predominatem HL (LPHL) schienen die Signale deutlich schwächer als in den klassischen HL-Fällen (Tabelle 3.1.4).

Fall Nummer	Entität	Tumorzellen mit TRAF1-Expression in %	Intensität des TRAF1-Signals	Virusinfektion der Tumorzellen
1	HL-MC	90	+++	
2		20	+	
3		90	+++	EBV
4		90	+++	EBV
5		90	+++	EBV
6		90	+++	EBV
7		70	+++	EBV
8		80	+++	EBV
9		90	+++	EBV
10		90	+++	EBV
11		90	+++	EBV
12		80	+++	EBV
13	HL-NS	90	+++	
14		80	+++	
15		80	++	
16		90	+++	
17		90	++	
18		100	++	
19		90	+	
20		90	++	EBV
21		50	++	EBV
22		80	+++	EBV
23		90	+++	EBV
24	LPHL	70	++	
25		60	+++	
26		70	++	
27		90	++	
28		50	+	

Tabelle 3.1.4. Expression der TRAF1-mRNA in den Tumorzellen des HL.

Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++. Abkürzungen: HL-MC, HL vom gemischten zellulären Subtyp; HL-NS, HL des nodular sklerotischen Subtyps; LPHL, Lymphozyten predominates HL; EBV, Epstein-Barr Virus.

Die Tumorzellen des ALCL zeigten im Vergleich zum HL eine geringere Expression von TRAF1-Transkripten. Unter ihnen zeigten die Fälle des ALCL mit Umlagerungen der T-Zellrezeptorgene die schwächste Expression. Hierbei wiesen die Tumorzellen zweier der fünf untersuchten Fälle keinerlei und einer nur zu einem Prozent eine Expression der TRAF1-mRNA auf. Die Expression der TRAF1-mRNA in den verschiedenen Lymphomen ist in Tabelle 3.1.5 aufgeführt.

Fall Nummer	Entität	Tumorzellen mit TRAF1-Expression in %	Intensität des TRAF1-Signals	Virusinfektion der Tumorzellen
29	B-ALCL	70	++	
30		90	+	
31		10	+	
32		90	+	
33		80	+	
34		50	+	
35	T-ALCL	1	+	
36		0		
37		0		
38		20	+	
39		30	+	
40	0-ALCL	70	+	
41		90	+	
42	B-CLL	>1	+	
43		>1	+	
44		>1	+	
45		1	+	
46		0		
47	DLBCL	20	++	
48		50	+	HIV
49		20	++	HIV
50		20	+	HIV
51		30	++	HIV
52		30	++	HIV
53		1	+	EBV,HIV
54		0		EBV,HIV
55		60	+	EBV,HIV
56		5	++	EBV,HIV
57		10	++	EBV,HIV
58		2	+	EBV,HIV
59		20	++	EBV,HIV
60		10	+	EBV,HIV
61		80	++	EBV
62	PLBLL	0		
63		0		
64		0		EBV,HIV
65		0		EBV
66		20	++	EBV
67	Burkitt	20	++	
68		0		EBV

Tabelle 3.1.5. Expression der TRAF1-mRNA in den Tumorzellen der Non-Hodgkin-Lymphome.

Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++. Abkürzungen: B-ALCL, ALCL mit Expression von B-Zell Markern; T-ALCL, ALCL mit Expression von T-Zell Markern; 0-ALCL, ALCL ohne Expression von B- oder T-Zell Markern; B-CLL, chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ; DLBCL, diffuses großzelliges B-Zell Lymphom; PLBLL, plasmoblastisches Lymphom; EBV, Epstein-Barr Virus; HIV, humanes Immundefizienz Virus.

Eine schwache bis mittelgradige Signalstärke in wenigen Tumorzellen war in den Fällen des diffusen, großzelligen B-Zell Lymphoms (DLBCL) zu erkennen. Nur in zwei Fällen waren mehr als 50% der Tumorzellen mittelgradig bis stark TRAF1+. Ein anderer Fall zeigte keine Signale für die TRAF1-mRNA. Alle anderen Lymphome enthielten nahezu keine oder nur wenige TRAF1-Transkripte.

Eine Korrelation zwischen der TRAF1-Transkriptexpression und bestehender EBV-Infektion zeigte sich auch bei den Lymphomen. Eine starke Signalintensität der TRAF1-mRNA wurde in EBV+ Tumorzellen gefunden. Dieser Zusammenhang wurde durch Doppelhybridisierung mit EBER- und TRAF1-Sonden an verschiedenen Fällen des klassischen HL verifiziert. So zeigte sich, dass die meisten HRS-Zellen sowohl TRAF1+ als auch EBV+ sind.

#### *clAP-2-Expression in reaktivem lymphatischem Gewebe*

Reaktive Blasten in hyperplastischen Tonsillen zeigten eine starke clAP-2-Positivität. An der Gesamtheit der lymphatischen Zellen machen jedoch die clAP-2+ nur einen Anteil von bis zu 10% aus (Tabelle 3.1.6).

Fall Nummer	Blasten mit clAP-2-Expression in %	Intensität des clAP-2-Signals
1	10	+++
2	10	+++
3	10	+++
4	10	++
5	10	++
6	>1	+++
7	5	+++
8	2	+++

Tabelle 3.1.6. Expression der clAP-2-mRNA der reaktiven Blasten in hyperplastischen Tonsillen. Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++.

#### *clAP-2-Expression in EBV-assoziierten Erkrankungen*

Die Expression der clAP-2-mRNA in den sechs Fällen infektiöser Mononukleose zeigte sich nur in wenigen Zellen (>1-10%) mit schwachen Signalintensitäten. Die Blasten mit EBER+ Signalen waren dabei nur in Ausnahmen auch clAP-2+. In den drei untersuchten Fällen von ALP konnte kein Signal der clAP-2-Transkripte beobachtet werden.

*clAP-2-Expression in Lymphomen*

In den 23 Fällen des klassischen HL zeigte sich in 19 Fällen ein deutlich erhöhter Anteil von Tumorzellen ( $\leq 50\%$ ) mit mittelgradiger Signalstärke der clAP-2-mRNA. Ein starkes Signal in 80% der Tumorzellen liess sich in zwei Fällen beobachten. Nur in vier Untersuchungen war ein Signal für die clAP-2-Transkripte nur schwach oder gar nicht zu erkennen. Die untersuchten Fälle des LPHL waren durchgehend positiv für die clAP-2-Expression mit mittelgradigen bis starken Signalen (Tabelle 3.1.7).

Fall Nummer	Entität	Tumorzellen mit clAP-2-Expression in %	Intensität des clAP-2-Signals	Virusinfektion der Tumorzellen
1	HL-MC	50	+	
2		60	+	
3		60	+	EBV
4		60	++	EBV
5		50	+	EBV
6		5	+	EBV
7		30	+	EBV
8		60	+	EBV
9		60	++	EBV
10		60	++	EBV
11		50	+	EBV
12		0		EBV
13	HL-NS	0		
14		60	++	
15		80	+++	
16		80	+++	
17		80	++	
18		30	+	
19		50	+	
20		80	++	
21		70	+	
22		50	+	EBV
23		0		EBV
24	LPHL	80	+++	
25		80	++	
26		30	+	
27		90	+++	
28		50	+	

Tabelle 3.1.7. Expression der clAP-2-mRNA in den Tumorzellen des HL.

Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++. Abkürzungen: HL-MC, HL vom gemischten zellulären Subtyp; HL-NS, HL des nodular sklerotischen Subtyps; LPHL, Lymphozyten predominantes HL; EBV, Epstein-Barr Virus.

Die Tumorzellen des ALCL zeigten keinerlei Erhöhung des clAP-2-Signals gegenüber dem Hintergrund. So verhielt es sich auch in den anderen untersuchten Non-Hodgkin-Lymphomen. Nur in wenigen Zellen des B-CLL konnten clAP-2-Transkripte detektiert werden (Tabelle 3.1.8). Ein

Zusammenhang zwischen HIV- beziehungsweise EBV-Infektion und der cIAP-2-Transkripthäufigkeit, wie er für die TRAF1-Expression gezeigt werden konnte, konnte nicht festgestellt werden.

Fall Nummer	Entität	Tumorzellen mit cIAP-2-Expression in %	Intensität des cIAP-2-Signals	Virusinfektion der Tumorzellen
29-31	0-ALCL	0		
32-34	T-ALCL	0		
35	DLBCL	0		EBV
36-39		0		HIV
40	Burkitt	0		
41-43	T-LBL	0		
44-45	B-LBL	0		
46-50	Marg.	0		
51	B-CLL	5	+	
52		5	+	
53		1	+	
54		1	+++	
55	B-CLL/Richt.	20	++	

Tabelle 3.1.8. Expression der cIAP-2-mRNA in den Tumorzellen der Non-Hodgkin-Lymphome.

Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++. Abkürzungen: T-ALCL, ALCL mit Expression von T-Zell Markern; 0-ALCL, ALCL ohne Expression von B- oder T-Zell Markern; DLBCL, diffuses großzelliges B-Zell Lymphom; T-LBL, T lymphoblastisches Lymphom/Leukämie; B-LBL, B lymphoblastisches Lymphom/Leukämie; Marg., Marginalzellen Lymphom; B-CLL, chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ; EBV, Epstein-Barr Virus; HIV, humanes Immundefizienz Virus.

#### *A20-Expression in reaktivem lymphatischem Gewebe*

Einige reaktive Blasten in den sieben untersuchten hyperplastischen Tonsillen zeigten einen geringen bis mittelgradigen Gehalt an A20-Transkripten. Diese A20<sup>+</sup> Population macht einen Anteil von 1-4% an den gesamten lymphatischen Zellen der Tonsille aus. Die mesenchymalen und epithelialen Zellen waren in allen Fällen durchgehend A20<sup>-</sup> (Abbildung 3.1.4).

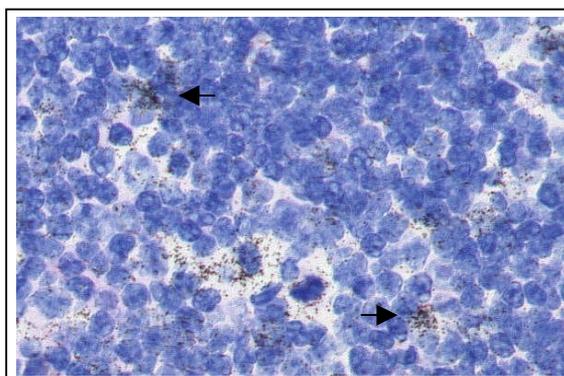


Abbildung 3.1.4. A20-Expression in lymphatischem Gewebe. Die A20<sup>+</sup> Blasten sind durch Pfeile markiert.

*A20-Expression in EBV-assoziierten Erkrankungen*

In den sieben untersuchten Fällen von infektiöser Mononukleose konnte mit sehr inhomogenen Verteilungen (5-90%) ein mittelgradig intensives Signal für A20 in den EBV<sup>+</sup> Blasten beobachtet werden. Die untersuchten drei Fälle von ALP zeigten in 10% der Zellen ein schwaches bis mittelgradiges A20-Signal.

*A20-Expression in Lymphomen*

Die Tumorzellen aller bis auf zwei der 22 klassischen HL Fälle zeigten sich A20<sup>+</sup> mit mittelgradigen bis starken Signalintensitäten. In 14 von 22 Fällen konnte ein A20-Signal in über 80% der Tumorzellen festgestellt werden. Alle Fälle des LPHL zeigten A20<sup>+</sup> Tumorzellen mit jedoch schwächerer Signalintensität im Vergleich zu den HRS-Zellen (Tabelle 3.1.9).

Fall Nummer	Entität	Tumorzellen mit A20-Expression in %	Intensität des A20-Signals	Virusinfektion der Tumorzellen
1	HL-MC	0		
2		80	++	
3		70	++	
4		90	+++	EBV
5		90	++	EBV
6		90	++	EBV
7		40	++	EBV
8		80	+++	EBV
9		20	++	EBV
10		90	++	EBV
11		70	+	EBV
12	HL-NS	90	+++	
13		80	++	
14		90	++	
15		90	+++	
16		90	+	
17		80	+++	
18		0		
19		90	+++	
20		25	++	EBV
21		70	+	EBV
22		90	++	EBV
23	LPHL	80	++	
24		60	++	
25		30	+	
26		50	+	

Tabelle 3.1.9. Expression der A20-mRNA in den Tumorzellen des HL.

Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++. Abkürzungen: HL-MC, HL vom gemischten zellulären Subtyp; HL-NS, HL des nodular sklerotischen Subtyps; LPHL, Lymphozyten predominantes HL; EBV, Epstein-Barr Virus.

Unter den verschiedenen Entitäten der Non-Hodgkin-Lymphome war eine signifikante A20-Expression nur in zwei Fällen der anaplastischen Variante des CD30<sup>+</sup> diffusen, großzelligen B-Zell Lymphoms erkennbar (Tabelle 3.1.10).

Fall Nummer	Entität	Tumorzellen mit A20-Expression in %	Intensität des A20-Signals	Virusinfektion der Tumorzellen
27-31	0-ALCL	0		
32-34	T-ALCL	0		
35-36	ALCL(Haut)	0		
37-39	DLBCL	0		
40-41		0		EBV
42-44		0		HIV
45-46		0		EBV,HIV
47-48	DLBCL-A	80	+	
49	Burkitt	0		EBV,HIV
50-52	T-LBL	0		
53-54	B-LBL	0		
55-59	B-CLL	>1	+	
60-63	FCL	~1	+	

Tabelle 3.1.10. Expression der A20-mRNA in den Tumorzellen der Non-Hodgkin-Lymphome.

Eine schwache Signalintensität ist gekennzeichnet mit +, eine mittelgradige mit ++ und eine starke mit +++. Abkürzungen: 0-ALCL, ALCL ohne Expression von B- oder T-Zell Markern; T-ALCL, ALCL mit Expression von T-Zell Markern; ALCL(Haut), primäres ALCL der Haut; DLBCL, diffuses großzelliges Lymphom; T-LBL, T lymphoblastisches Lymphom/Leukämie; B-LBL, B lymphoblastisches Lymphom/Leukämie; B-CLL, chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ; FCL, Follikelzentrums Lymphom; EBV, Epstein-Barr Virus; HIV, humanes Immundefizienz Virus.

Ein Zusammenhang zwischen einer viralen Infektion der Tumorzellen und der A20-Transkription liess sich nicht erkennen.

### 3.2. Funktionelle Analysen aberrant exprimierter Proteine in HRS-Zellen

Die differentielle Überexpression dreier anti-apoptotischer Proteine der TNFR-vermittelten Signalleitung in den HRS-Zellen, im Vergleich zu den Tumorzellen des ALCL, lässt vermuten, dass die unterschiedlichen Reaktionen, die CD30 in verschiedenen Zellen auszulösen vermag, auf diesem Expressionsmuster beruhen. Gestärkt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass der CD30-Signalweg in den HRS-Zellen keine Apoptose auszulösen vermag, aber in Zellen des ALCL die Apoptose auslösende Funktion von CD30 durchaus gegeben ist. Um die Hypothese weitergehend zu untermauern, wurde nun untersucht, ob sich (i) das Expressionsmuster in den kultivierten HRS- und ALCL-Zellen wiederfinden lässt, (ii) der Rezeptor CD30 selbst an der Hochregulation der Proteine TRAF1, A20 und cIAP-2 beteiligt ist und nachfolgend (iii) eine Rekonstitution des Expressions-

schemas der HRS-Zellen in ALCL-Zellen durch Transfektion das Apoptoseverhalten der ALCL-Zellen beeinflusst.

#### *Expression und von TRAF1, A20 und cIAP-2 in Zelllinien sowie ihre Induzierbarkeit durch CD30-Rezeptorstimulation*

Für diese Untersuchung wurden zwei ALCL-Zelllinien mit 2;5-Translokation (Karpas 299, JB6), zwei HL-Zelllinien mit Immunglobulinumlagerungen (B-HL) (L428, KM-H2) und zwei HL-Zelllinien mit umgelagerten T-Zell Rezeptorgenen (T-HL) (HDLM2, L540) mit dem agonistischen monoklonalen Antikörper Ki-1 stimuliert. Als negative Kontrolle wurden die Zellen mit einem unspezifischen Kontrollantikörper gleichen Isotyps (IgG<sub>3,κ</sub>) inkubiert. Nach jeweils 16 und 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels Western und Northern Blot analysiert.

Es zeigte sich, dass der basale Expressionsstatus von TRAF1, A20 in den Zelllinien, dem in den Tumorzellen gefundenen entspricht. Die Analyse mittels Northern Blot ergab eine geringe Grundexpression der mRNA von TRAF1, A20 und cIAP-2 in den ALCL-Zelllinien entsprechend den ALCL-Tumorzellen *in vivo*. Eine geringe bis moderate Expression von TRAF1 und A20 konnte in den T-HL-Zelllinien, die offensichtlich nur wenige Fälle des klassischen HL repräsentieren, detektiert werden. Die B-HL-Zelllinien, die den Tumorzellen des klassischen HL entsprechen, zeigen wie die Tumorzellen in der *in situ* Hybridisierung eine hohe Grundexpression an TRAF1 und A20. Die Grundexpression von cIAP-2 in den HL-Zelllinien zeigte sich zwar stärker als in den ALCL-Zelllinien, aber ein deutlicher Unterschied zwischen B-HL- und T-HL-Zelllinien liess sich nicht erkennen. Die durchgeführten Western Blot-Analysen spiegeln dieses basale Expressionsverhalten auf Proteinebene wider. Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Western und Northern Blot sind in den Abbildungen 3.2.1-3.2.4. dargestellt.

Durch Stimulation des CD30-Rezeptors wurde die Expression von TRAF1 in allen CD30<sup>+</sup> Zelllinien gesteigert (Abbildung 3.2.1. und 3.2.2.). Dieser Anstieg liess sich am deutlichsten in den Zelllinien beobachten, die eine geringe basale Proteinmenge an TRAF1 exprimieren. Die CD30-induzierte TRAF1-Expression erreichte in den Zelllinien des ALCL und T-HL nach bereits 16 Stunden ihr Maximum.

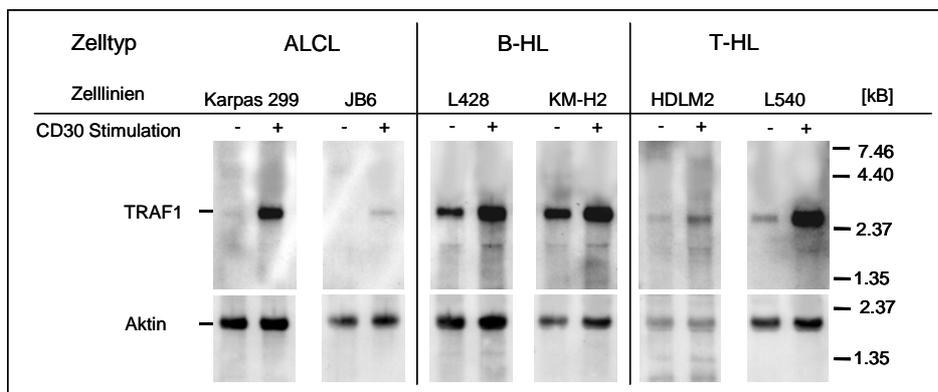


Abbildung 3.2.1. Northern Blot-Analyse der TRAF1-Expression mit und ohne CD30-Stimulation. Das Expressionslevel von TRAF1 ist jeweils nach 16 h Inkubation mit dem agonistischen CD30 mAb Ki-1 und einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps gezeigt. Der relative Anteil von aufgetragener RNA wird durch die Stärke der Aktin-Bande indiziert.

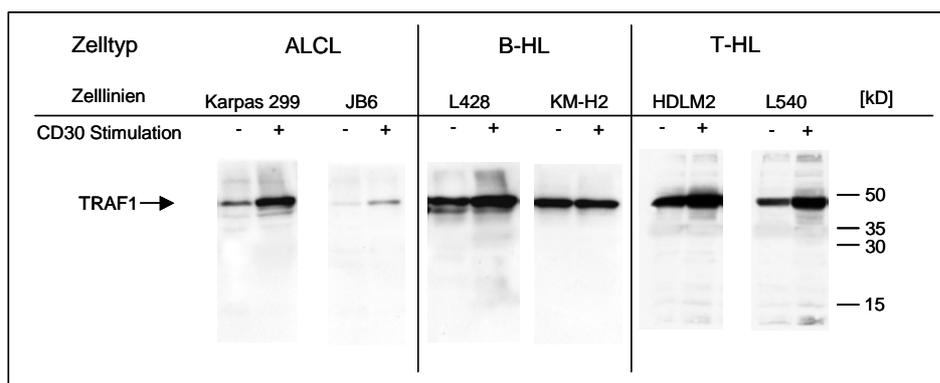


Abbildung 3.2.2. Western Blot-Analyse der TRAF1-Expression mit und ohne CD30-Stimulation. Das Expressionslevel von TRAF1 ist jeweils nach 48 h Inkubation mit dem agonistischen CD30 mAb Ki-1 und einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps gezeigt. Es wurden 15 µg Gesamtproteinmenge je Spur aufgetragen.

Die Induktion der A20-Expression durch CD30 konnte in den ALCL- und T-HL-Zelllinien beobachtet werden. Analog der induzierten TRAF1-Expression konnte auch für A20 in den Zellen mit hoher basaler Expression ein Anstieg kaum noch beobachtet werden. Aufgrund des unspezifischen Reaktionsverhaltens des kommerziell erhältlichen monoklonalen A20-Antikörpers konnten hier keine Aussagen mit Hilfe eines Western Blots erhalten werden. Nachfolgende Abbildung 3.2.3. zeigt die Ergebnisse der Northern Blot-Untersuchung für A20.

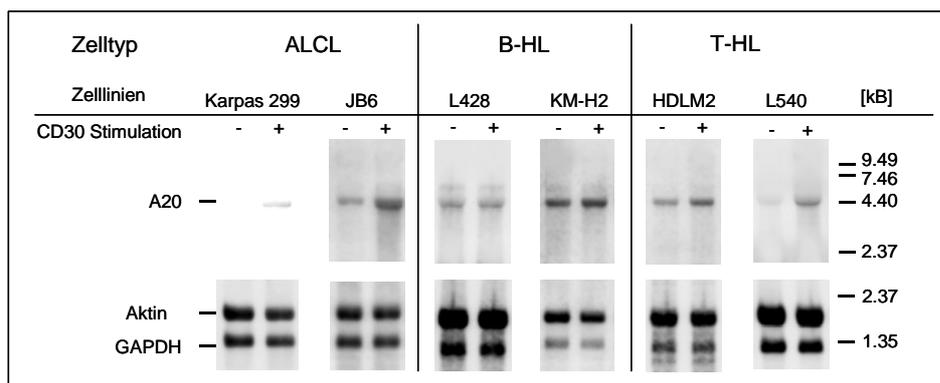


Abbildung 3.2.3. Northern Blot-Analyse der A20-Expression mit und ohne CD30-Stimulation.

Das Expressionslevel von A20 ist jeweils nach 16 h Inkubation mit dem agonistischen CD30 mAb Ki-1 und einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps gezeigt. Der relative Anteil von aufgetragener RNA wird durch die Stärke der GAPDH-Bande indiziert.

Die Induktion von cIAP-2 durch CD30-Rezeptorstimulation mittels Northern Blot konnte nur für die Zelllinien Karpas 299, HDLM2 und L540 zweifelsfrei gezeigt werden (Abbildung 3.2.4.). Aufgrund unzureichender Sensitivität des polyklonalen Anti-cIAP-2-Serums, liess sich ein Anstieg der cIAP-2-Proteinmenge durch CD30-vermittelte Induktion nicht zeigen.

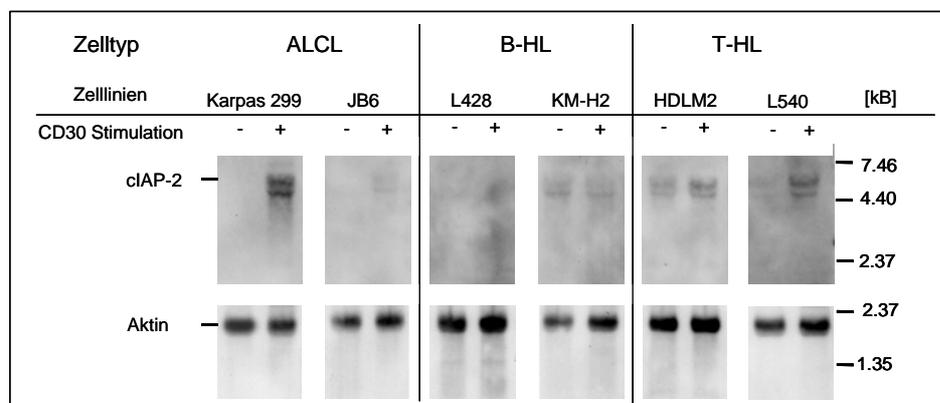


Abbildung 3.2.4. Northern Blot-Analyse der cIAP-2-Expression mit und ohne CD30-Stimulation.

Das Expressionslevel von cIAP-2 ist jeweils nach 16 h Inkubation mit dem agonistischen CD30 mAb Ki-1 und einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps gezeigt. Der relative Anteil von aufgetragener RNA wird durch die Stärke der Aktin-Bande indiziert.

### *Vergleich des Apoptoseverhaltens von ALCL- und HL-Zellen unter Berücksichtigung des Expressionsstatus von TRAF1, A20 und cIAP-2*

Der Einfluss unterschiedlich exprimierter Proteinmengen auf die Zugänglichkeit bezüglich CD30-vermittelter Apoptose wurde durch durchflußzytometrische Analysen bestimmt. Dazu wurden die Zelllinien mit dem agonistischen CD30-Antikörper Ki-1 stimuliert. Um den Einfluss der adaptiven

Geninduktion über CD30 zu belegen, wurden die Versuche auch bei simultaner Blockade der *de novo* Proteinbiosynthese durch Cycloheximid (CHX) durchgeführt.

CD30 induzierte in den ALCL-Zelllinien Karpas 299 und JB6 Apoptose und verminderte die Zellproliferation. Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen zu den Zeitpunkten  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 4, 8, 16 und 36 Stunden nach Ki-1-Inkubation zeigte, dass nach 16 Stunden dieser Effekt maximal auftrat. Die Induktion von Apoptose und verminderter Zellproliferation liess sich durch Blockade der *de novo* Proteinbiosynthese deutlich steigern. Im Gegensatz dazu hatte die Ki-1-Inkubation der vier HL-Zelllinien wenig oder keinen Einfluss auf die Zellen. Die simultane CD30-Stimulation und Blockade der *de novo* Proteinbiosynthese allerdings verursachte in den T-HL-Zellen einen deutlichen Rückgang der Proliferation und Induktion von Apoptose, während die B-HL-Zellen ihre Apoptoseresistenz sogar unter diesen Bedingungen beibehielten (Abbildung 3.2.5 A und B).

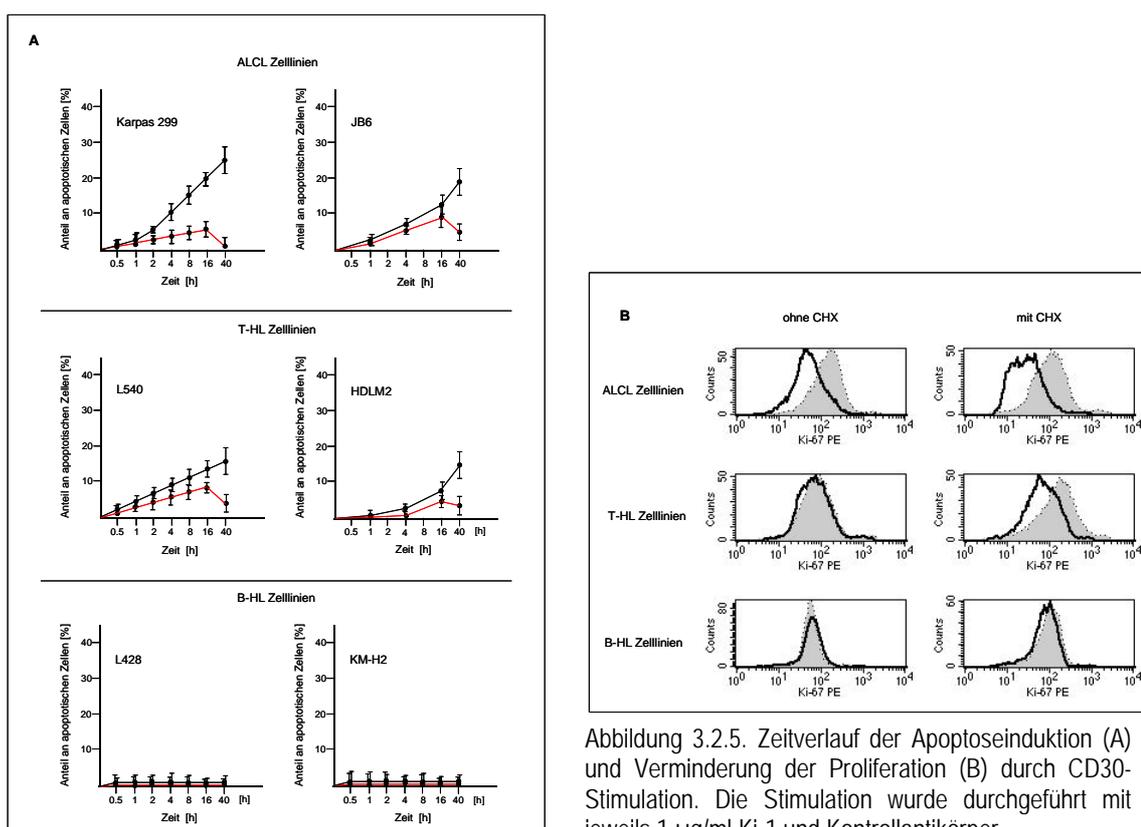


Abbildung 3.2.5. Zeitverlauf der Apoptoseinduktion (A) und Verminderung der Proliferation (B) durch CD30-Stimulation. Die Stimulation wurde durchgeführt mit jeweils  $1 \mu\text{g/ml}$  Ki-1 und Kontrollantikörper.

(A) Die Abbildung zeigt den Anteil an apoptotischen Zellen nach CD30-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die schwarze Linie entspricht Zellen mit CHX-Behandlung, die rote denen ohne CHX-Inkubation. Dargestellt sind die Durchschnittswerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Messergebnissen. (B) Die Zellproliferationsrate wurde anhand der Ki-67-Expression bestimmt. CD30-stimulierte Zellen bilden die Fläche unter der durchgängigen Linie, unstimulierte Zellen die unter der gestrichelten Linie. Die Resultate ohne (links) und mit (rechts) CHX Inkubation sind gezeigt für die Zelllinien Karpas 299 (ALCL), L540 (T-HL) und L428 (B-HL). Die Resultate der jeweiligen zweiten ALCL-, T-HL- oder B-HL-Zelllinie waren identisch.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen deutlich auf den Zusammenhang zwischen der hohen basalen Expression der Proteine und der Resistenz gegenüber CD30-vermittelter Apoptose hin. Um jedoch die Korrelation letztendlich zu beweisen, wurde versucht, durch Anhebung des basalen Expressionsstatus von TRAF1, cIAP-2 und A20 in den Zellen mit geringer Basalexpression eine Resistenz gegenüber CD30-induzierter Apoptose zu erreichen.

Dazu wurden Karpas 299- und L540-Zellen mit einem Expressionsvektor, kodierend für ein TRAF1-GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) Fusionskonstrukt, transfiziert und ihre Reaktion auf die CD30-Stimulation untersucht. Als Ergebnis konnte eine deutliche Verringerung des anti-proliferativen und apoptotischen Effekts der CD30-Stimulation beobachtet werden (Abbildung 3.2.6).

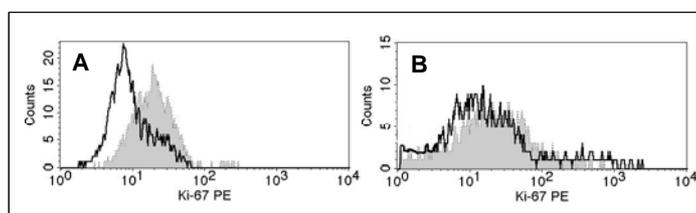


Abbildung 3.2.6. Vergleich des Proliferationsverhaltens nach CD30-Stimulation von (A) mock transfizierten und (B) mit TRAF1-transfizierten Karpas 299 Zellen. CD30-stimulierte Zellen bilden die Fläche unter der durchgängigen Linie, unstimulierte Zellen die unter der gestrichelten Linie.

Auch wiederholte Transfektion der Zellen mit analogen A20- und cIAP-2-Konstrukten führte jedes Mal zu einer zu geringen Zahl an transfizierten Zellen, so dass die Durchführung einer durchflußzytometrischen Analyse unmöglich war. So konnte nur anhand der Rekonstruktion des TRAF1-Expressionsstatus, wie es in den B-HL Zellen gefunden wurde, dessen anti-apoptotische Wirkung belegt werden (Tabelle 3.2.1).

Zelllinie	TRAF1 Expression basal	Apoptose nach CD30-Stimulation	Apoptose nach CD30-Stimulation + CHX
ALCL	keine bis schwach	mittel	stark
ALCL/ T-HL + TRAF1	mittel bis stark	keine	mittel
T-HL	mittel	mittel	mittel bis stark
B-HL	mittel bis stark	keine	keine

Tabelle 3.2.1. Apoptoseverhalten nach CD30-Stimulation der Zelllinien in Abhängigkeit von der basalen TRAF1-Expression.

+TRAF1 gibt die mit TRAF1-Expressionsvektor transfizierten Zellen an.

Da eine Untersuchung physiologischer Effekte mittels der Überexpression eines Proteins zu artifiziellen Effekten führen kann, sollte mit Hilfe von antisense Versuchen, also durch Blockade der Expression eines Proteins, dessen funktionelle Bedeutung untersucht werden. Dazu wurden antisense GFP-Fusionsprodukte von TRAF1, A20 und cIAP-2 hergestellt und in Zellen mit hoher basaler Expression dieser Proteine transfiziert. Leider führte die Transfektion dieser Konstrukte zu einem sofortigen Absterben der transfizierten Zellen, was auf die essentielle Funktion dieser Proteine für die verwendeten lymphatischen Zellen hinweist. Die Herabsetzung der Expression der Zielproteine mit anderen Methoden, wie der Transfektion von nicht abbaubaren antisense Sonden, war wenig erfolgreich. Durch den Einsatz fluoreszenzfarbstoffmarkierter Sonden wurde zwar die Aufnahme der Sonden durch die Zellen verifiziert, dennoch konnte nach Western Blot-Untersuchung keine Verringerung der Proteinkonzentration von TRAF1, A20 oder cIAP-2 detektiert werden.

### 3.3. Identifikation neuer Interaktionspartner von CD30 und TRAF5

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden zwei kommerziell erhältliche 2H-Systeme modifiziert und kombiniert angewandt. Als Vorversuche wurden 2H-Assays mit positiven und negativen Kontrollen durchgeführt und hiermit die Methode als einsetzbar verifiziert.

Die cDNAs, die auf neue Wechselwirkungen zu untersuchenden Proteine wurden in sogenannte Köder-Vektoren kloniert. Aus der mRNA der HL-Zelllinien L1236 und L428 sowie den ALCL-Zelllinien Karpas 299 und JB6 wurden repräsentative cDNA-Banken erstellt, die nach Interaktionspartnern von TRAF1, TRAF5 und dem cytoplasmatischen Anteil von CD30 (CD30<sub>cyt</sub>) durchsucht wurden. Die cDNA interagierender Genprodukte wurde isoliert, sequenziert, die erhaltenen Sequenzdaten mit der EMBL-Datenbank abgeglichen und so die interagierenden Proteine identifiziert.

#### *2H-Durchsuchungen mit CD30<sub>cyt</sub>, TRAF1 und TRAF5 als Köderproteine*

Die Untersuchungen mit dem CD30<sub>cyt</sub>-Köderprotein ergaben nach der Auswertung die Interaktion mit den Proteinen TRAF1, TRAF2 und TRAF5, wie es aus der Literatur bekannt ist. Dies belegt die Funktionsfähigkeit des eigens etablierten 2H-Systems. Darüber hinaus zeigte sich eine bisher unbekannte Interaktion mit einem Protein, das nach Datenbankabgleich als das humane Ubiquitin-konjugierende Enzym-9 (hUBC-9) identifiziert werden konnte. Diese Interaktion wurde in allen

untersuchten cDNA-Banken wiedergefunden und trat innerhalb eines Versuchs mit einer Häufigkeit >4 unabhängiger Klone auf.

Die 2H-Durchsuchungen mit TRAF5 als Köderprotein führten zu der Identifikation der Wechselwirkung von TRAF5 mit hUBC-9. Auch hier wurde diese Interaktion mehrfach (>4) und in allen untersuchten cDNA-Banken wiedergefunden.

Mit allen transformierten cDNA-Banken ergab die 2H-Durchsuchung mit TRAF1 als Köderprotein nach der Selektion im Test auf die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität über 90% eindeutig positive Hefen. Da dieses Verhalten vermutlich auf die Proteineigenschaften des Fusionsproteins aus TRAF1 und der BD (LexA)-Domäne zurückzuführen ist, wurde ein neues Fusionsprotein kloniert. Der auf neue Interaktionen zu untersuchende Anteil von TRAF1 ist der N-terminale Bereich des Proteins, der zu keinem der anderen TRAF-Proteine homolog ist<sup>55</sup>. So wurde nur dieser Bereich in Fusion mit der BD (LexA)-Domäne kloniert und der Versuch erneut durchgeführt. Wiederum ergab der Test in über 90% der Hefen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Es zeigte sich damit, dass auch das neue Köderprotein unspezifische Reaktionen hervorruft. Damit konnten keine neuen Erkenntnisse von Proteininteraktionen des TRAF1-Proteins gewonnen werden.

#### *Verifikation der identifizierten Interaktionen*

Eine Wechselwirkung zweier, noch dazu chimärer, Fusionsproteine im Milieu der Hefe kann sich aufgrund anderer posttranslationaler Modifikationsschemata der Hefe als artifiziell erweisen. Damit ist eine im 2H-System aufgespürte Wechselwirkung nur als ein erstes Indiz einer physiologisch relevanten Interaktion zweier Proteine zu werten und muss weitergehend untersucht werden. Dazu werden die identifizierten Proteine in Säugetierzellen auf wechselseitige Interaktion getestet.

Da Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine CD30, TRAF5 und hUBC-9 zur Verfügung standen, wurde die Methode der Co-Immunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion angewandt. Aus Zelllysaten von Karpas 299 und L428 wurde sowohl CD30 als auch TRAF5 mit dem spezifischen Antikörper über Agarose-Protein G-Konjugate mit gebundenen Proteinen präzipitiert. Nach gelelektro-

phoretischer Auftrennung des Präzipitates und Western Blot-Analyse liess sich hUBC-9 durch Antikörper nachweisen. Die nachfolgende Abbildung 3.3.1 zeigt das Ergebnis der Untersuchung.

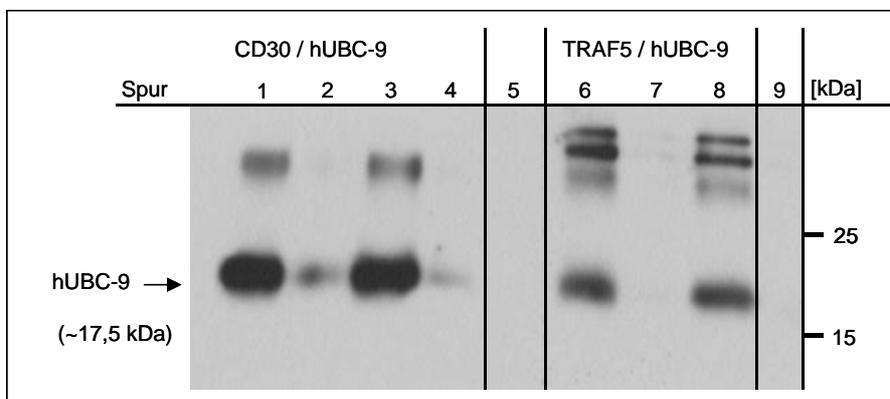


Abbildung 3.3.1. Western Blot-Analyse der Co-Immünpräzipitate von CD30 (Spur 1-4) und TRAF5 (Spur 6-8) mit einem gegen hUBC-9 gerichteten Antikörper. Spur 5 und 9 zeigen als negative Kontrolle in zur Co-Präzipitation äquivalenter Konzentration aufgetragenen Antikörper zur Präzipitation von CD30 und TRAF5.

Damit konnte gezeigt werden, dass die im 2H-System detektierte Interaktion von CD30 und TRAF5 mit hUBC-9 auch in menschlichen Lymphozyten auftritt.

#### *Untersuchung der physiologischen Bedeutung der Interaktion*

Die Identifikation des SUMO-konjugierenden Enzyms hUBC-9 als neuen Interaktionspartner von CD30 und TRAF5 lässt die Vermutung zu, dass es sich bei CD30 und TRAF5 um Zielproteine einer Sumotylierung handeln könnte. Als minimale Konsensussequenz einer SUMO-Akzeptorstelle wird das Aminosäuremotiv:  $\Psi$ KX(E,D) angenommen, wobei X für eine beliebige und  $\Psi$  für eine Aminosäure mit unpolarer Seitenkette steht. Viele, wenn auch nicht alle sumotylierten Proteine weisen dieses Motiv auf, und die Ergebnisse von Mutagenese-Untersuchungen lassen vermuten, dass SUMO über den Lysinrest gebunden wird.

Sowohl in der AS-Sequenz von CD30 als auch TRAF5 sind diese potentiellen Sumotylierungsstellen enthalten. So wurde versucht, diese Modifikation direkt mittels Immunpräzipitation und Western Blot nachzuweisen. Es zeigte sich jedoch, daß die kommerziell erhältlichen SUMO-1-Antikörper weder im Western Blot, noch in der Immunpräzipitation Protein-SUMO-1-Konjugate erkannten.

Die Konjugation von SUMO-1 an ein Protein führt zu einer Größenzunahme von ~ 17 kDa. Es wurde daher versucht, eine Modifikation durch verändertes Laufverhalten der Proteine im Western Blot zu detektieren. Hierfür wurden Expressionskonstrukte von CD30, TRAF5, hUBC-9 und SUMO-1 für eine Transfektion in 293-Zellen generiert. Zusätzlich wurden Konstrukte von CD30 und TRAF5 erstellt, in denen die Lysinreste durch Argininreste in der SUMO-Akzeptorstelle mittels gerichteter Mutagenese ausgetauscht sind, um hier eine mögliche Sumotylierung zu verhindern. Die in TRAF5 und CD30 vorhandenen Konsensussequenzen, sowie die vorgenommenen Veränderungen sind in Abbildung 3.3.2 dargestellt.

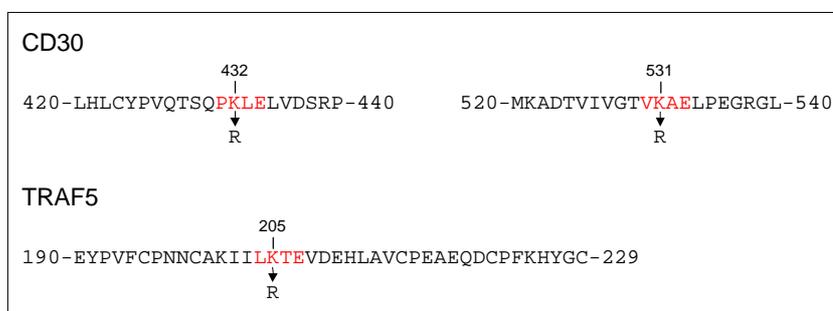


Abbildung 3.3.2. Ausschnitte aus den Sequenzen von CD30 und TRAF5. Die minimalen Konsensussequenzen einer SUMO-Modifikation sind in rot dargestellt. Der durch Mutagenese hervorgerufene Aminosäureaustausch zum Verhindern einer SUMO-Modifikation ist durch Pfeile indiziert.

Die erstellten Expressionsvektoren wurden dann nach folgendem Schema (Abbildung 3.3.3) in die 293-Zellen kotransfiziert.

Versuch	Transfizierte Konstrukte im pCDNA3.1-Vektor			
1	CD30 <sub>WT</sub>	hUBC-9	SUMO-1	
2	CD30 <sub>(K432→R)</sub>	hUBC-9	SUMO-1	
3	CD30 <sub>(K531→R)</sub>	hUBC-9	SUMO-1	
4	TRAF5 <sub>WT</sub>	hUBC-9	SUMO-1	
5	TRAF5 <sub>(K205→R)</sub>	hUBC-9	SUMO-1	
6	CD30 <sub>WT</sub>	hUBC-9	SUMO-1	TRAF5 <sub>WT</sub>

Abbildung 3.3.3. Schema der durchgeführten Transfektionen zum Nachweis der Sumotylierung.

Nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat nach Western Blot mit gegen CD30, TRAF5, SUMO-1 und hUBC-9 gerichteten Antikörpern untersucht. Die erfolgreiche Transfektion und

Expression der Proteine in den 293-Zellen konnte durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigte sich, dass sowohl die mutierten als auch die Wildtyp-Proteine sich nicht in ihrer Größe unterscheiden. Somit konnte auch mit diesem System die Modifikation von TRAF5 und CD30 durch SUMO-1 nicht nachgewiesen werden.

### 3.4. Mutationsanalyse von Schlüsselproteinen der Apoptose

Betrachtet man die zellulären Vorgänge, die zur Exekution der Apoptose führen, fällt auf, dass bestimmte Proteine eine Schlüsselposition einnehmen. Sie befinden sich an Stellen der Signaltransduktion, die nicht umgangen werden können. Zu diesen Proteinen gehören die Rezeptor-assoziierte Caspase-8/FLICE und der mitochondrial aktivierte Faktor Apaf-1. Wären diese Proteine durch mutationsbedingte Abweichungen außer Funktion gesetzt, könnte dies sowohl den TNFR-vermittelten als auch den mitochondrial medierten Apoptoseweg ausschalten. Aber auch eine funktionsbeeinträchtigende Mutation in der Caspase-3, der Exekutor-Caspase der Apoptose, hätte zur Folge, dass ein Absterben der Zellen durch den programmierten Zelltod unmöglich wäre. Deshalb wurden die Transkripte dieser Proteine auf Mutationen untersucht.

Mittels der RT-PCR-Methode wurden die cDNAs von Apaf-1, FLICE und Caspase-3 generiert, kloniert und nach der Sequenzierung mittels computergestütztem Sequenzvergleich ausgewertet. Diese Daten wurden jeweils für fünf verschiedene HL-Zelllinien L1236, L591, L428, HDLM-2 und KM-H2 und Karpas 299, eine Zelllinie des ALCL, sowie für die drei nichtlymphatischen Tumorzelllinien HeLa, Colo-320 und Tera-2 erhoben. Als nichtmaligne Referenz wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) und Transkripte aus normalem Niere-, Leber- und Herzgewebe untersucht.

Die Untersuchungen der Sequenzen der Transkripte des FLICE-Proteins zeigten keinerlei Abweichungen. Alle erhaltenen Sequenzdaten stimmten mit der von Muzio et al. und Boldin et al. publizierten und charakterisierten Sequenz überein.

Die Untersuchung der Caspase-3 ergab eine übereinstimmende Abweichung aller Transkripte zur verglichenen Zielsequenz, charakterisiert von Nicholson et al., dargestellt in Abbildung 3.4.1. Die Abweichung verursacht allerdings weder eine Verschiebung des Leserasters, noch das Auftreten eines Stopcodons. Vielmehr sind an den Positionen 331 A→G, 333 G→A, 334 A→G und 335 G→C

die Basen ausgetauscht. Dies führt in der Aminosäuresequenz zu dem Austausch von Arginin an Position 111 mit Glycin und Serin an Position 112 mit Alanin. Somit sind Aminosäuren mit geladener polarer Seitenkette (Arginin) und nicht geladener polarer Seitenkette (Serin) gegen unpolare Aminosäuren (Alanin, Glycin) ausgetauscht.

Nukleotidsequenz	
A	320-ATCACAGCAAAAAGGAGCAGTT-340
B	320-ATCACAGCAAAAGGAGCCAGTT-340
	↓ ↓ ↓
Übersetzte Aminosäuresequenz	
A	100-MRDVSKEDHSKRSSFVCVLLS-120
B	100-MRDVSKEDHSGASFVCVLLS-120
	↓ ↓

Abbildung 3.4.1. Abweichungen der untersuchten Caspase-3 Transkripte (B) von der Zielsequenz (A).

Die untersuchten Transkripte von Apaf-1 zeigten die deutlichsten Abweichungen von der publizierten Sequenz. So konnten nach Sequenzierung und Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei verschiedene neuartige Formen der Apaf-1 cDNA charakterisiert werden <sup>107</sup>. Der schematische Vergleich zwischen den neu charakterisierten und der erstmals veröffentlichten Apaf-1-Form von Zou et al. ist in Abbildung 3.4.2 dargestellt.

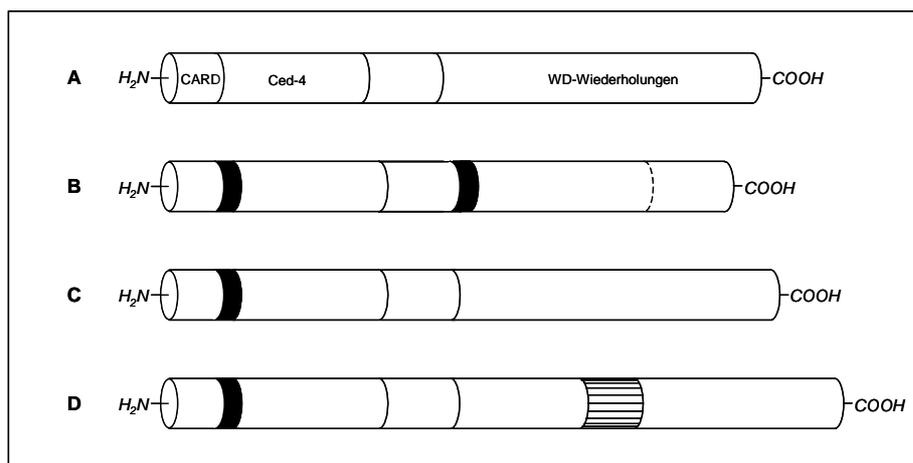


Abbildung 3.4.2. Darstellung struktureller Eigenschaften der verschiedenen Formen von Apaf-1. (A) publizierte Form <sup>13</sup>, (B) Apaf-1<sub>XS</sub>-Form, (C) Apaf-1<sub>M</sub>-Form, (D) Apaf-1<sub>L</sub>-Form. Die funktionellen Untereinheiten aller Formen entsprechen den in Form A zugewiesenen. Die schwarz ausgefüllten und die gestreift gemusterten Bereiche indizieren Insertionen und die gestrichelte Linie gibt an, in welcher Position die Deletion in Form B auftritt.

Als eine übereinstimmende Eigenschaft zeigen alle charakterisierten Formen eine Insertion von 33 Nucleotiden nach Position 295 der veröffentlichten Sequenz. Der Einschub ist in allen untersuchten Transkripten identisch. Die sich so ergebende 3618 Basenpaar (bp) lange cDNA von Apaf-1 wird im Folgenden als mittelgradig lange Form (Apaf-1<sub>M</sub>, Abbildung 3.4.2, C) bezeichnet. Die beiden HL-Zelllinien L428 und L591, die PBL zweier Spender sowie Proben aus Herz-, Leber- und Nierengewebe zeigen eine 3747 bp lange Nucleotidstruktur mit einer zusätzlichen Insertion an Position 2466 von 129 Nucleotiden. Dies ist die längste gefundene Form und wird als Apaf-1<sub>L</sub> (Abbildung 3.4.2, D) bezeichnet. In den PBL eines der untersuchten Spender fand sich die dritte Variante, eine besonders kurze, die Apaf-1<sub>XS</sub> (Abbildung 3.4.2, B) genannt wird. Im Vergleich zu den anderen Varianten fehlen dieser Form die Nucleotide zwischen Position 3171 und 3296 und neben dieser Deletion zeigt sich eine zusätzliche Insertion von 24 bp an Position 1725. Eine Übersicht der Zelllinien sowie Zelltypen und der gefundenen Abweichungen ist in Tabelle 3.4.1 dargestellt.

Apaf-1 Formen	Apaf-1 <sub>XS</sub>	Apaf-1 <sub>M</sub>	Apaf-1 <sub>L</sub>
Länge (bp)	3516	3618	3747
Insertionen (bp/Position)	33/296 24/1726	33/296	33/296 129/2467
Deletionen (bp/Position)	126/3227	–	–
Zelllinie/ Gewebetyp	PBL	PBL, L1236, HDLM-2, KM-H2, Karpas 299, HeLa, Colo-320, Tera-2	PBL, L428, L591, Leber, Niere, Herz

Tabelle 3.4.1. Zusammengefasste Befunde der charakterisierten Apaf-1-Formen.

Die Nucleotidsequenzdaten der charakterisierten Apaf-1-Formen wurden der GeneBank/EMBL Datenbank übermittelt und sind veröffentlicht unter den Zugangsnummern (Accession numbers): AJ243048 (Apaf-1<sub>L</sub>), AJ243011 (Apaf-1<sub>M</sub>) und AJ243107 (Apaf-1<sub>XS</sub>).

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Deletionen und Insertionen der neuartigen Apaf-1-Formen Auswirkungen auf die Funktionalität des Proteins haben, wurde eine Suche nach diesen Proteinmotiven mittels Datenbankabgleich durchgeführt. Hiernach zeigte sich, dass alle bekannten Struktur motive von Apaf-1 auch in den Varianten konserviert sind. Der erste, allen Formen gemeinsame, neu charakterisierte Bereich von 11 Aminosäuren liegt zwischen der CARD und der CED-4 homologen Domäne. Obwohl ein Sequenzvergleich zu den jeweiligen Domänen

vorgenommen wurde, konnte dieser Bereich keiner der beiden Strukturen zugeordnet werden. Auch die bisher veröffentlichten Strukturdaten von Apaf-1 und Pro-Caspase-9 aus Röntgenkristallanalysen gaben keinen weiteren Aufschluss, da zur Kristallisation ein Apaf-1 Fragment verwandt wurde, welches nur die Region bis zu dem Aminosäurerest 97 enthält und damit nicht die gefundene Insertion abdeckt <sup>108</sup>.

Neben diesem N-terminalen Motiv enthalten die Formen Apaf-1<sub>xs</sub> und Apaf-1<sub>M</sub> weitere Abweichungen. Diese Insertion und Deletion in Apaf-1<sub>xs</sub> und die Deletion 18 in Apaf-1<sub>M</sub> befinden sich in dem Bereich, in dem die WD-Wiederholungsmotive enthalten sind. Dieses nur wenig konservierte repetitive Motiv formt einen  $\beta$ -Propeller, wobei jedes Wiederholungsmotiv ein kleines antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt bildet <sup>109</sup>. Mittels Computeranalyse <sup>110</sup> zeigte sich, dass dieses strukturelle Motiv trotz der Abweichungen erhalten bleibt. Wie die Abbildung 3.4.3 zeigt, besitzen alle Formen neun der WD-Wiederholungsmotive. Selbst in der kleinsten Variante lassen sich diese neun WD-Motive wiederfinden.

A 641	VFKAETGEKLEIK	AHEDEVLC	CAFSTDDR	FIATCS	VDKKVI	WNSMTGELVHTYDE	EHSEQVNC	CHFTNS	SHHLLLATGS
B 641	VFKAETGEKLEIK	AHEDEVLC	CAFSTDDR	FIATCS	VDKKVI	WNSMTGELVHTYDE	EHSEQVNC	CHFTNS	SHHLLLATGS
C 649	VFKAETGEKLEIK	AHEDEVLC	CAFSTDDR	FIATCS	VDKKVI	WNSMTGELVHTYDE	EHSEQVNC	CHFTNS	SHHLLLATGS
A 721	SDFCLKLWDL	LNQKECRNTM	F	GHTNSV	NHCRFS	PDDKLL	ASCSAD	GTLK	LWDATSANERK
B 721	SDFCLKLWDL	LNQKECRNTM	F	GHTNSV	NHCRFS	PDDKLL	ASCSAD	GTLK	LWDATSANERK
C 729	SDFCLKLWDL	LNQKECRNTM	F	GHTNSV	NHCRFS	PDDKLL	ASCSAD	GTLK	LWDATSANERK
A 801	VKCCSWSADGARIM	VAAKNI	FLFDI	HSTGL	LLGEI	H	GHSTIQ	YCDFSP	QNH
B 801	VKCCSWSADGARIM	VAAKNI	FLFDI	HSTGL	LLGEI	H	GHSTIQ	YCDFSP	QNH
C 809	VKCCSWSADGARIM	VAAKNI	FLFDI	HSTGL	LLGEI	H	GHSTIQ	YCDFSP	QNH
A 881	HLSWVHGVMFSP	DGSSFL	TSSDD	QTIRL	WE	T	KKVCK	NSAV	MLKQ
B 838	HLSWVHGVMFSP	DGSSFL	TSSDD	QTIRL	WE	T	KKVCK	NSAV	MLKQ
C 846	HLSWVHGVMFSP	DGSSFL	TSSDD	QTIRL	WE	T	KKVCK	NSAV	MLKQ
A 961	EAQVSCCCLSPHL	QYIAFG	DENGA	IEILE	LVN	NRIF	QSRF	QHKK	TVWHIQ
B 918	EAQVSCCCLSPHL	QYIAFG	DENGA	IEILE	LVN	NRIF	QSRF	QHKK	TVWHIQ
C 926	EAQVSCCCLSPHL	QYIAFG	DENGA	IEILE	LVN	NRIF	QSRF	QHKK	TVWHIQ
A 1041	RGHQETVKDFR	LLKNSR	LLSWS	FDGTV	KVWN	IITGN	KEKDFV	CHQG	TVLSC
B 998	RGHQETVKDFR	LLKNSR	LLSWS	FDGTV	KVWN	IITGN	KEKDFV	CHQG	TVLSC
C 1006	RGHQETVKDFR	LLKNSR	LLSWS	FDGTV	KVWN	IITGN	KEKDFV	CHQG	TVLSC
A 1121	HELRGHN	GCVRCS	AFSVD	STLL	ATGDD	NGEIRI	WNV	NGEL	LHL
B 1078	HELRGHN	GCVRCS	AFSVD	STLL	ATGDD	NGEIRI	WNV	NGEL	LHL
C 1078	HELRGHN	GCVRCS	AFSVD	STLL	ATGDD	NGEIRI	WNV	NGEL	LHL

Abbildung 3.4.3. Anordnung der mittels Computer vorhergesagten Positionen der WD-Motive (schwarz unterlegt) in der WD-Region von (A) Apaf-1<sub>L</sub>, (B) Apaf-1<sub>M</sub> und (C) Apaf-1<sub>xs</sub>.