

## 4. Diskussion

### *Differentielle Überexpression von TRAF1, A20 und cIAP-2 in HL-Tumorzellen im Vergleich zu ALCL-Tumorzellen und deren Induktion infolge CD30-Rezeptorstimulation in vitro*

Die erhobenen *in vivo* Daten zeigen eine deutliche Transkript-Überexpression der Proteine TRAF1, A20 und cIAP-2 in den Tumorzellen des HL im Gegensatz zu den Tumorzellen des ALCL. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen einer starken TRAF1 mRNA-Expression und einer bestehenden EBV-Infektion festgestellt werden. Das durch EBV kodierte Latente Membran Protein 1 (LMP1) gehört zwar zu der Familie der TNF-Rezeptoren, ist aber als einziges Mitglied konstitutiv aktiv. Bisherige Studien zeigten, dass LMP1 die TRAF1-Expression in EBV-transformierten B-lymphoblastischen Zelllinien induziert und der Rezeptor den Großteil des TRAF1-Proteins rekrutiert<sup>57,111</sup>. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass dieser Mechanismus auch *in vivo* existiert. Dennoch zeigte sich, dass auch EBV<sup>-</sup> Tumorzellen des HL eine starke TRAF1-Transkriptexpression aufweisen. Somit lässt sich die hohe TRAF1-Transkriptexpression nicht allein auf eine EBV-Infektion zurückführen, sondern resultiert vermutlich aus der Induktion des Proteins durch den CD30-Rezeptor, die hier *in vitro* nachgewiesen wurde.

Alle drei aberrant im HL exprimierten Proteine sind Genprodukte, die durch die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B reguliert werden<sup>112, 113, 114</sup>. Es ist zudem bekannt, dass der CD30-Rezeptor über die Interaktion mit den Signaltransduktionsproteinen TRAF1, TRAF2 NF- $\kappa$ B aktiviert<sup>102, 103, 101, 64</sup>. Der Anstieg des mRNA- und Proteingehalts von TRAF1, A20 und cIAP-2 nach CD30-Stimulation lässt sich damit auf die durch CD30-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B zurückführen.

Die hier gezeigte differentielle Überexpression der Proteine der CD30-vermittelten Signalleitung in den Tumorzellen des HL bedingt sicherlich die beobachteten unterschiedlichen Auswirkungen der CD30-Signaltransduktion. Da jedoch auch gezeigt werden konnte, dass die CD30-Stimulation zu der Induktion der drei Proteine führt, stellt sich die Frage, worauf der unterschiedliche basale Expressionsstatus in den CD30<sup>+</sup> Tumoren (ALCL und HL) beruht. Die geringe oder abwesende Expression der Proteine im ALCL lässt vermuten, dass die Tumorzellen keinen Kontakt zu CD30L-exprimierenden Zellen *in vivo* haben. Ihre Apoptoseresistenz ist wahrscheinlich nicht abhängig von der Expression dieser anti-apoptotischen Proteine. Die Tumorzellen des ALCL exprimieren durch die

chromosomale 2;5-Translokation das Fusionsprotein NPM-ALK, was vermutlich ihre Immortalisierung und Transformation verursacht <sup>115</sup>. Die Anwesenheit von CD30L<sup>+</sup> Zellen in der Nachbarschaft von HRS-Zellen wurde bisher in zwei Untersuchungen berichtet, bleibt aber kontrovers diskutiert, da sich die beiden Publikationen in der gefundenen zellulären Lokalisation von CD30L widersprechen <sup>116, 117</sup>. Ein anderer Befund jedoch könnte eher die hohe basale Expression der Proteine in den Tumorzellen des HL erklären. In den HRS-Zellen wurde eine hohe konstitutive Aktivität von NF- $\kappa$ B - hauptsächlich der p50/p65-Dimere - detektiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Aktivität stark zu der Immortalisierung der Zellen beiträgt <sup>118</sup>. So führt eine Inhibition von NF- $\kappa$ B zu spontaner Caspase-unabhängiger Apoptose in den HRS-Zellen <sup>119</sup>. Diese konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität in den HRS-Zellen wurde bisher auf die gefundenen Mutationen im I $\kappa$ B $\alpha$ -Gen und einer starken Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinasen (IKKs) in HRS-Zellen zurückgeführt <sup>120, 121</sup>.

#### *Die Überexpression von cIAP-2 als mögliche Ursache hoher NF- $\kappa$ B- Aktivität in HRS-Zellen*

Zwei der drei in den HRS-Zellen als überexprimiert identifizierten Proteine TRAF1 und A20 sind durch NF- $\kappa$ B induzierbar, stellen aber auch negative Regulatoren der NF- $\kappa$ B-Aktivität dar <sup>113, 122</sup>. Für TRAF1 wurde gezeigt, dass es ein Substrat von den Caspasen-3, -6 oder -8 während der TNFR-vermittelten Apoptose darstellt <sup>123, 124</sup>. Das hierbei durch Proteolyse entstehende C-terminale Fragment von TRAF1 inhibiert potent die TRAF2-vermittelte NF- $\kappa$ B-Aktivierung <sup>123</sup>. Eine Inhibition erfolgt hier wahrscheinlich über die Wechselwirkung mit TRAF2, in dessen Folge TRAF2 von dem Rezeptor-Signalkomplex abgelöst wird <sup>124</sup>. Diese Untersuchungsergebnisse belegen damit eine negativ regulatorische Funktion von TRAF1 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung <sup>125</sup>. Da eine inhibitorische Wirkung nur von dem TRAF1-Fragment ausgeht, ist eine pro- oder anti-apoptotische Funktion von TRAF1 von dem Aktivitätsstatus der Caspasen in der Zelle abhängig.

Welcher Mechanismus A20 befähigt NF- $\kappa$ B zu inhibieren, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Gezeigt wurde jedoch die Interaktion des A20-Proteins mit TRAF2 und IKK- $\gamma$  <sup>75, 126</sup>. Dies führt zu der Vermutung, dass A20 durch Bindung von TRAF2 und der I $\kappa$ B-Kinase die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindern kann. Funktional wurde A20 erstmals als ein Inhibitor der TNFR-vermittelten Apoptose charakterisiert <sup>73</sup>. Dieser Effekt wird zum einen durch eine Reduktion der TNF-induzierten Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials und zum anderen durch eine Blockade der Effektor-Caspasen-Aktivierung, wie Caspase-3, von A20 ausgeübt <sup>72</sup>. Für den protektiven Effekt von

A20 auf die TNFR-vermittelte Apoptose ist aber auch eine weitere Hypothese denkbar. Bekannt ist, dass A20 TRAF2 bindet und dies in der gleichen Region des TRAF2-Proteins, wie es auch für cIAP-1 und -2 gezeigt werden konnte<sup>37, 75</sup>. Es besteht damit die Möglichkeit, dass A20 die cIAPs durch Kompetition von dem TRAF2-Komplex ablöst und sie damit ihre anti-apoptotische Funktion ausüben können<sup>127</sup>.

Der Befund einer Überexpression von Proteinen mit negativ regulatorischer Auswirkung auf NF- $\kappa$ B in den HRS-Zellen scheint einen Widerspruch zu der berichteten konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivität darzustellen. Jedoch lässt sich diese augenscheinliche Kontradiktion durch den zusätzlich detektierten hohen Expressionsstatus von cIAP-2 entkräften. Die cIAPs stehen zwar unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B, haben aber keine negative regulatorische Funktion<sup>114</sup>. Als direkte Inhibitoren von Effektor-Caspasen besitzen sie ein hohes anti-apoptotisches Potential. Gezeigt werden konnte, dass cIAP-2 nicht nur in der Lage ist, die Aktivierung von Caspase-9 zu verhindern, zudem kann auch bereits aktivierte Caspase-3 durch cIAP-2 inhibiert werden<sup>40, 39</sup>. Darüber hinaus wurde berichtet, dass der RING-Finger des cIAP-2-Proteins als Ubiquitin-Ligase die Ubiquitinierung von Caspase-3 mediert und damit den Abbau von Caspase-3 über den Ubiquitin-Proteasomen-Abbauweg katalysieren könnte<sup>45</sup>. Diese zusätzliche Funktion scheint seine anti-apoptotische Wirkung weiter zu steigern. Neben seiner Funktion als Exekutor der Apoptose spielt Caspase-3 auch eine Rolle bei dem Abbau der aktiven NF- $\kappa$ B Dimere im Kern der Zelle<sup>128</sup>. Die nachfolgende Abbildung 4.1 versucht, die im Folgenden dargestellten zellulären Zusammenhänge, aus denen möglicherweise die hohe konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität in den Tumorzellen des HL resultiert, zu verdeutlichen.

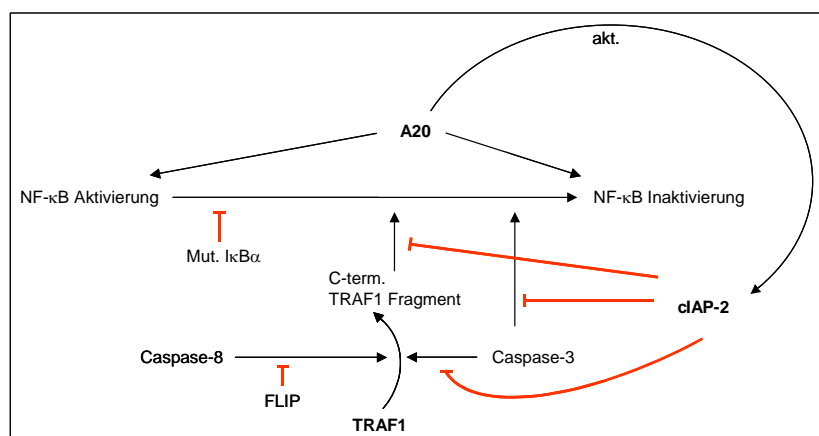


Abbildung 4.1. Zelluläre Vorgänge, die zu einer hohen konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivität in den HRS-Zellen führen könnten.

Die negativ regulative Funktion von TRAF1 geht von durch Caspase-3 und -8 proteolysierten C-terminalen Fragmenten aus. Neueste Studien zeigen, dass in den HRS-Zellen das für Caspase-8 inhibitorische Protein FLIP konstitutiv exprimiert wird und so die über Fas vermittelte Caspase-8-Aktivierung beeinträchtigt <sup>129</sup>. Damit bliebe zur Proteolyse der TRAF1-Fragmente nur Caspase-3, deren Aktivierung durch cIAP-2 unterdrückt wird. Als Folge könnte TRAF1 nicht mehr die NF- $\kappa$ B-Aktivität negativ regulieren.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Inaktivierung aktiver NF- $\kappa$ B-Dimere führt, ist mit dem I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein verknüpft. Dieses Protein ist in der Lage, in den Zellkern vorzudringen und dort aktive Dimere zu inhibieren <sup>130</sup>. Die in einigen Zelllinien und HRS-Zellen gefundene Mutation des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins lässt eine solche Funktion wahrscheinlich nicht mehr zu <sup>121</sup>. Somit könnte ein Abbau der aktiven p50/p65-Dimere im Kern nur noch durch Caspase-3 erfolgen. Diese jedoch ist durch Überexpression von cIAP-2 inhibiert. Damit bliebe als weiterer bekannter negativer Regulator der NF- $\kappa$ B-Aktivität nur noch das A20-Protein, welches zudem vermutlich noch die cIAP-2-Aktivität fördert und dem die hohe Aktivität von IKK entgegensteht <sup>120</sup>. Als Folge ist das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inaktivierung zu Gunsten der Aktivierung verschoben und trägt vermutlich deutlich zu der berichteten konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivität der HRS-Zellen bei.

Eine konstitutive oder starke Aktivität von NF- $\kappa$ B wird auch in verschiedensten anderen Tumorarten berichtet. Durch seine Rolle in der Tumorentstehung und -progression wird NF- $\kappa$ B als potentiell Ziel von Anti-Krebs-Therapeutika zunehmend interessanter <sup>131</sup>.

#### *Der weitere Beitrag der cIAP-2-Überexpression zur Apoptoseresistenz der HL-Tumorzellen*

Neben der starken NF- $\kappa$ B-Aktivität in den HRS-Zellen wurde auch ein anderer Befund für die Immortalisierung der Zellen verantwortlich gemacht. Die HRS-Zellen exprimieren zwar Fas, sind aber unzugänglich für die Fas vermittelte Apoptose. Ursächlich schien für diesen Befund eine somatische Mutation des Fas-Gens, die in HRS-Zellen gefunden wurde <sup>132</sup>. Untersuchungen an verschiedenen HL-Zelllinien ergaben jedoch, dass die Linien vom B-Zelltyp (L1236, L428 und KM-H2) resistent gegenüber Fas vermittelter Apoptose sind, obwohl sie unmutiertes Fas-Rezeptor-Protein exprimieren <sup>133, 134</sup>. Eine Ursache hierfür ist sicherlich die starke FLIP-Expression der Tumorzellen <sup>129, 135</sup>. Dennoch stellt FLIP für einmal aktivierte Caspase-8 ein Substrat dar, so dass hier eher ein

Gleichgewicht vorliegt als eine einseitige Inhibition<sup>136</sup>. Der Apoptoseweg über die TNF-Rezeptoren, wie Fas, ohne Einbeziehung der Mitochondrien, beinhaltet jedoch kein regulatorisches Protein für cIAP-2. Das einzig bekannte Protein, das in der Lage ist, die anti-apoptotische Wirkung von cIAP-2 zu beeinträchtigen, ist DIABLO und wird von den Mitochondrien sezerniert<sup>47, 48, 137</sup>. Eine Überexpression von cIAP-2 in den HL-Zellen vom B-Zelltyp, wie sie hier gezeigt werden konnte, kann damit die Aktivierung der Caspase-3 durch Fas voll inhibieren. Dass eine Zugänglichkeit gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose stark durch das Expressionsniveau von cIAPs bestimmt wird, wurde durch eine Studie an HIEC-Zellen bestätigt<sup>138</sup>. Somit ist auch davon auszugehen, dass das hohe Expressionsniveau von cIAP-2 die HRS-Zellen - trotz stark exprimierter Caspase-3<sup>139, 140</sup> - vor TNFR-vermittelter Apoptose schützt und damit bedeutend zu ihrer Apoptoseresistenz beiträgt.

#### *Identifikation der Wechselwirkung von hUBC-9 mit den Proteinen CD30 und TRAF5*

Die Funktionsfähigkeit des eigens etablierten 2H-Systems wurde durch den Nachweis bereits bekannter Interaktionen des CD30<sub>cyt</sub>-Köderproteins mit TRAF1, TRAF2, TRAF5 bestätigt. So konnten die bisher unbekanntenen Protein-Interaktionen von hUBC-9 mit CD30 und TRAF5 identifiziert und auch in Säugetierzellen verifiziert werden.

Aufgrund der biologischen Funktion von hUBC-9 als SUMO-konjugierendes Enzym konnte vermutet werden, dass es sich bei den interagierenden Proteinen CD30 und TRAF5 um Zielproteine dieser Modifikation handelt. Obwohl es nicht gelang, diese Modifikation nachzuweisen, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass SUMO-1 oder seine Verwandten SUMO-2, -3 an diese Proteine gebunden werden. Eine solche Modifikation könnte unter bestimmten Bedingungen, wie Zellstress oder Hitzeschock, erfolgen. Von den Proteinen SUMO-2 und -3, die auch durch hUBC-9 konjugiert werden, konnte gezeigt werden, dass sie unter normalen Zellbedingungen frei in großer Konzentration in der Zelle vorliegen, nach Temperaturerhöhung auf 42°C aber massiv an Proteine mit hohem Molekulargewicht gebunden werden. Daraus lässt sich folgern, dass hier nicht gegeneinander austauschbare Homologe vorliegen, sondern SUMO-2 und -3 eine grundsätzlich andere Funktion als SUMO-1 erfüllen<sup>141</sup>. Da Antikörper gegen SUMO-2, -3 nicht kommerziell erhältlich sind, konnte nicht untersucht werden, ob nicht diese Proteine durch hUBC-9 an CD30 und TRAF5 gebunden werden.

Viele der bekannten, durch SUMO modifizierten, Proteine wurden über ihre Interaktion mit hUBC-9 identifiziert. Dennoch sind nicht alle mit hUBC-9 interagierenden Proteine auch Ziele einer SUMO-

Modifikation. Zu den bekannten mit hUBC-9 interagierenden Proteinen gehören Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie wie Fas<sup>86, 142</sup> und TNFR1<sup>143</sup>, Daxx, ein Fas-bindendes Protein, das Apoptose potenziert<sup>144</sup>, und MEKK1-Kinase<sup>143</sup>. Für alle diese Proteine konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, dass sie einer SUMO-Modifikation unterliegen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sie nur Bindungspartner für sumotylierte Proteine darstellen oder es sich bei ihnen um die bis jetzt noch nicht identifizierten SUMO-Ligasen handeln könnte.

Im Gegensatz zu der Durchsichtung mit CD30- und TRAF5-Köderproteinen, führte die 2H-Durchsichtung mit TRAF1 als Köderprotein zu keinerlei auswertbaren Ergebnissen. Hier zeigte sich mit dem gesamten TRAF1-BD-Fusionsprotein, als auch mit dem N-terminalen Teil von TRAF1 in Fusion mit BD bei Kontakt mit AD-cDNA-Bank-Konstrukten eine konstitutive Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase. Somit lässt sich vermuten, dass genau dieser N-terminale Anteil von TRAF1 allein mit der AD-Domäne wechselwirkt und nicht mit dem in Fusion exprimierten Protein Y. Eine solche Wechselwirkung lässt keine Untersuchung dieses Proteins im 2H-System zu. Solch ein Effekt wurde vielfach auch von anderen mit dem 2H-System arbeitenden Forschern beobachtet. So ist bekannt, dass nicht jedes Köderprotein geeignet ist, bei einer 2H-Durchsichtung zu auswertbaren Ergebnissen zu führen.

#### *Abweichungen in den Nukleotidsequenzen der untersuchten Schlüsselproteine der Apoptose*

In den untersuchten Sequenzdaten aus Lymphom- und Tumorzelllinien, sowie verschiedenen nicht malignen Normalgewebetypen von Caspase-8/FLICE wurden keinerlei Abnormitäten festgestellt. Aufgrund dieser unmutierten Transkriptsequenzen kann davon ausgegangen werden, dass es in den Apoptose-gestörten Lymphomzellen seine biologische Funktion erfüllen kann. Durch die starke FLIP-Expression in den HRS-Zellen scheint jedoch auf Regulationsebene der Aktivierung von FLICE eine Inhibition aufzutreten, die einen Einfluss auf die Apoptoseresistenz der Tumorzellen ausübt<sup>129</sup>.

Die Untersuchung der Caspase-3-Transkripte ergab eine übereinstimmende Abweichung aller untersuchten Zelltypen zur publizierten Sequenz. Untersucht wurden hierbei nicht nur verschiedenste Tumorzelllinien und Normalgewebetypen, sondern auch zusätzlich die Tumorzelllinie Jurkat, aus der die publizierte Sequenz ermittelt wurde. Auch hierbei fand sich die ermittelte Abweichung wieder. Problematisch bei der Beurteilung dieses Befundes ist, dass von Zelllinien verschiedene Subklone

existieren und sich so nicht sicher folgern lässt, dass bei der Erstcharakterisierung ein Fehler erfolgte. So bleibt zu vermuten, dass die gefundene Sequenz den hauptsächlich exprimierten Typ darstellt, während die publizierte Sequenz in Subklonen der Zelllinie Jurkat exprimiert wird.

Die Caspase-3, die wie alle Caspasen als Pro-Enzym exprimiert wird, enthält drei Domänen: Eine N-terminale Domäne, eine große Untereinheit von ~20 kDa und eine kleine Untereinheit mit ~10 kDa. Ihre Aktivierung erfordert die proteolytische Spaltung der großen und kleinen Untereinheit. Infolge der Trennung dimerisieren die beiden Domänen, und die Caspase ist somit aktiv. Röntgenkristallstrukturanalysen zweier aktiver Caspase-3-Proteine ergaben, dass die aktivierten Heterodimere als Tetramer mit zwei unabhängigen katalytischen Zentren vorliegen<sup>145</sup>. Der gefundene Basenaustausch liegt jedoch weder innerhalb des für Caspase-3 identifizierten katalytischen Zentrums, noch im Bereich der Schnittstelle zwischen kleiner und großer Untereinheit (Abbildung 4.2.).

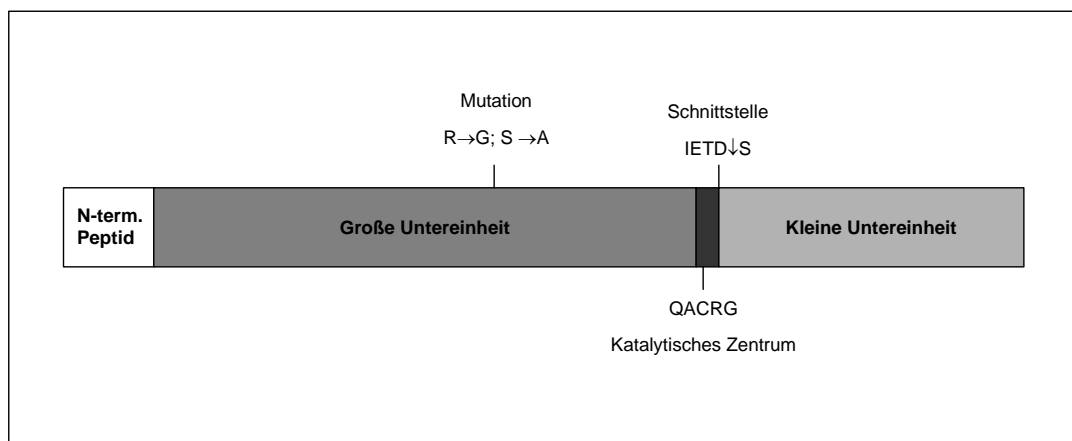


Abbildung 4.2. Lokalisation der Abweichungen zur Zielsequenz in untersuchten Caspase-3-Transkripten.

Somit ergibt sich kein Hinweis darauf, dass dieser Basenaustausch unmittelbar Einfluss auf die Funktionsfähigkeit von Caspase-3 hat. Dennoch hat ein Austausch von polaren Aminosäuren zu unpolaren sicherlich Auswirkungen auf die Proteineigenschaften. Da die gefundene Aberration zur Zielsequenz jedoch in den Caspase-3-Transkripten der Tumorzelllinien und in denen des Normalgewebes gefunden wurde, ist sie nicht als tumorspezifisch anzusehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neuartige Varianten der Apaf-1-cDNA charakterisiert. Sie unterscheiden sich von der erstmals publizierten Form durch verschiedenartige Abweichungen. Interessanterweise treten all diese Aberrationen ohne Verschiebung des Leserasters auf und zeigen

keine Spezifität für Tumorzellen. Dies lässt vermuten, dass die gefundenen Apaf-1-Variationen drei neue funktionelle Isoformen darstellen und keine dysfunktionalen Mutationen. Ein Vergleich der ermittelten Sequenzen mit der Exon-Intron-Struktur des *apaf-1*-Gens zeigt, dass die Apaf-1<sub>L</sub>-Form alle exprimierten Exons (Exon 2 - Exon 27) enthält und damit das vollständig transkribierte *apaf-1*-Gen darstellt. Im Gegensatz dazu fehlt der Apaf-1<sub>M</sub>-Struktur Exon 18 und der Apaf-1<sub>XS</sub>-Form Exon 25. Diese Unterschiede sind also auf posttranskriptionale Modifikation zurückzuführen, und es handelt sich bei den Formen um Spleiß-Varianten.

Die zweite Insertion in der Apaf-1<sub>XS</sub>-Form befindet sich innerhalb des Exons 12 und zeigt nicht die Konsensussequenz eines Intron-Exon-Überganges<sup>146</sup>. So ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass dieser Abschnitt ein durch Mutation nicht gespleißtes Intron darstellt. Vielmehr liesse sich vermuten, dass es sich hierbei um ein noch nicht identifiziertes weiteres Exon des *apaf-1*-Gens handelt.

Anders verhält es sich mit der identischen Insertion von 33 bp an Position 296 der Nukleotidsequenz, die in allen Apaf-1-Formen charakterisiert wurde. Die der Erstveröffentlichung von Zou et al. zugrunde liegenden Daten wurden aus der Zelllinie HeLa S3 gewonnen, die einen Subtyp der normalen HeLa-Zellen darstellt und offensichtlich diese Form von Apaf-1 exprimiert. Da sich dieser Bereich aber sowohl im charakterisierten *apaf-1* Gen (Exon 3), als auch in allen anderen veröffentlichten Sequenzen der Apaf-1 cDNAs zeigt, muss davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine Deletion in der Nukleotidsequenz von Apaf-1 in HeLa S3-Zellen handelt. Die Deletion befindet sich direkt vor dem Übergang von Exon 3 zu Exon 4. Betrachtet man die Nukleotidsequenz in der Region, lässt sich erkennen, dass durch einen einzigen Basenaustausch an Position 328 von T nach A eine 3'-Spleißstelle entsteht. Zusätzlich weist der in dieser Form nicht enthaltene Bereich zu Beginn eine 5'-Spleißstelle auf. Zur Veranschaulichung ist dieser Ausschnitt der Sequenz in Abbildung 4.3 dargestellt. Eine Mutation der HeLa S3-Zellen im *apaf-1*-Gen an dieser Position hätte dann zur Folge, dass dieser Bereich als Intron identifiziert und durch Spleißen posttranskriptional entfernt wird. Somit liesse sich genau diese Nukleotidsequenz nicht mehr in der cDNA von Apaf-1 der HeLa S3-Zellen wiederfinden.



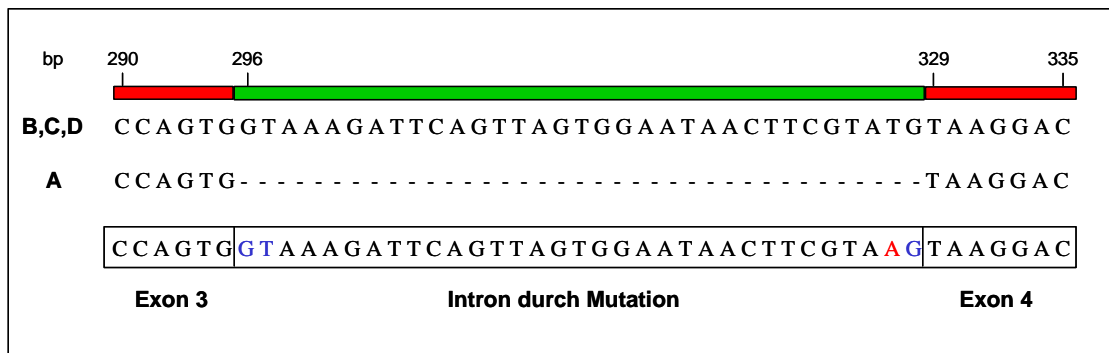


Abbildung 4.3. Sequenzvergleich der Formen B,C,D und A (HeLa S3) im Bereich der Deletion. Der rote Balken bezeichnet den Bereich der Übereinstimmung, der grüne den der Abweichung. Zu unterst aufgeführt ist der Exonbereich und das mögliche durch Mutation (rot) entstehende Intron. In blau und rot dargestellt sind die unveränderlichen Basen eines Intron-Exon-Überganges.

Wie in Abbildung 3.4.2 (A) dargestellt ist, besitzt das Apaf-1-Protein mehrere funktionelle Domänen: Die N-terminale Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), die die Caspase-9 Pro-Domäne bindet; eine zu CED-4 homologe Domäne, über die eine Homodimerisierung erfolgt; und multiple Tryptophan-Aspartat (WD)-Wiederholungen für Protein-Protein-Wechselwirkungen und regulatorische Einheit<sup>147, 148, 13</sup>. Darüber hinaus findet sich ein dATP/dGTP Bindungsmotiv A (P-loop). Bindet Cytochrom *c* an Apaf-1, hydrolysiert dieses infolge dATP/ATP und oligomerisiert über die CED-4 Domäne<sup>149, 150, 148</sup>. Gleichzeitig wird Pro-Caspase-9 über die CARD-Domäne rekrutiert und aktiviert<sup>151, 150, 108</sup>.

Die computergestützte Proteinmotiv-Analyse der Apaf-Formen zeigte, dass alle bisher bekannten Struktur motive, trotz An- oder Abwesenheit verschiedener Exons und Insertionen, konserviert sind. Darüberhinaus liess sich zeigen, dass innerhalb der WD-Domänen alle neu charakterisierten Formen neun WD-Wiederholungsmotive enthalten.

Da Apaf-1 mit Hilfe der CED-4- und WD-Domänen selbst-assoziiert, hat das WD-Motiv eine wichtige Funktion in der Regulation dieser Oligomerisierung. Untersuchungen haben gezeigt, dass Deletionsmutanten von Apaf-1 ohne WD-Domäne dimerisieren und so unabhängig von Cytochrom *c* Caspase-9 aktivieren<sup>150</sup>. Normalerweise wird dieses Verhalten durch die WD-Region unterdrückt, bis die Bindung von Cytochrom *c* an die WD-Domäne - vermutlich durch Konformationsänderung - diese Inhibition aufhebt<sup>147, 150, 148</sup>. Das Vorliegen von drei verschiedenen WD-Wiederholungsmotivdomänen in den Apaf-1-Formen könnte also zu einer unterschiedlichen Zugänglichkeit in Bezug auf die Aktivierung führen. Obwohl durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Apaf-1<sub>L</sub>-

Form leicht potenter in der Aktivierung von Caspase-9 ist als die Apaf-1<sub>M</sub>-Form, konnten keine großen Unterschiede in ihrem biologischen Verhalten festgestellt werden <sup>152</sup>.

Es ist bekannt, dass anti-apoptische Proteine der Bcl-2-Familie, wie Bcl-x<sub>L</sub> und Diva/Boo, an Apaf-1 binden. Bcl-x<sub>L</sub> bindet an der CED-4 homologen Domäne, und es bildet sich so ein ternärer Komplex <sup>153</sup>. Die Funktion dieser Wechselwirkung wird kontrovers diskutiert, dennoch konnte letztlich gezeigt werden, dass Bcl-x<sub>L</sub> durch Bindung an Apaf-1 nicht in der Lage ist, die Aktivierung von Caspase-9 zu verhindern <sup>34</sup>. Das Protein Diva bindet an verschiedene Stellen von Apaf-1, wie der CED-4 homologen Region, der WD-Domäne und der Region zwischen diesen beiden. Das legt die Vermutung nahe, dass diese Bindung eine sterische Hinderung für die Dimerisierung der Apaf-1 Proteine darstellt. Auch konnte gezeigt werden, dass die pro-apoptischen Bcl-2 Familienmitglieder Bak und Bik die Bindung zwischen Diva und Apaf-1 aufheben können. So lässt sich vermuten, dass ein komplexer Regelmechanismus unter Einbezug der WD-Domäne von Apaf-1 über die Dimerisierung des Proteins und damit die Caspase-9-Aktivierung entscheidet. Die in dieser Arbeit charakterisierten WD-Wiederholungsmotiv-Strukturen könnten daher weitere Interaktionsstellen für anti-apoptische Proteine zur Verfügung stellen als die bisher beschriebenen.

Apaf-1 wird ubiquitär exprimiert. Die Apaf-1<sub>L</sub>-Form mit der längsten WD-Struktur zeigte sich als die prädominant im gesunden Gewebe exprimierte Form, wobei sich jedoch auch immer die Apaf-1<sub>M</sub>-Form nachweisen liess <sup>152</sup>. Dies zeigt auch die vorliegende Arbeit, denn - wie in Tabelle 3.4.1 aufgeführt - zeigen die Lymphozyten alle drei Formen von Apaf-1, die Tumorzelllinien hauptsächlich den mittleren Typ, während die Apaf-1<sub>L</sub>-Form hauptsächlich im gesunden nichtlymphatischen Gewebe exprimiert wird. Ob ein Zusammenhang zwischen den exprimierten Apaf-1-Formen und der Apoptoseresistenz von verschiedenen Zelltypen besteht, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Abschließend lässt sich folgern, dass die beobachtete Überexpression der Proteine TRAF1, A20 und cIAP-2 in HRS-Zellen, sowie ihre Induzierbarkeit durch CD30-Stimulation, zu der Apoptose-Resistenz der Tumorzellen beiträgt. Da über die neuartige Wechselwirkung zwischen CD30 und TRAF5 mit hUBC-9 keine funktionellen Erkenntnisse gewonnen wurden, kann ein Beitrag zum Apoptoseschutz der CD30<sup>+</sup> Tumorzellen derzeit nicht abgeleitet werden. Auch die neu charakterisierten Apaf-1-Formen, scheinen eher Bestandteile der generellen Regulation von Apoptose darzustellen.