

5. Zusammenfassung

Ausgehend von der Fragestellung konnten für alle drei untersuchten Aspekte einer in Frage kommenden Ursache der Apoptoseresistenz der CD30⁺ Tumorzellen neue Erkenntnisse gewonnen werden. Diese Ergebnisse lassen sich hinsichtlich ihrer Tumorspezifität und ihres Beitrages zur Apoptoseresistenz oder generellen Zellregulation unterscheiden.

Vergleichende Untersuchung der Expression von Signaltransduktionsproteinen in CD30⁺ Tumorzellen

Es wurden Gewebsschnitte von normalem lymphatischem Gewebe, EBV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen und CD30⁺ Lymphomen auf die Transkriptexpression einiger TNFR-Signaltransduktionsmoleküle mittels *in situ* Hybridisierungen untersucht. Es konnte eine Überexpression der Transkripte von TRAF1¹⁰⁴, A20 und cIAP-2 differentiell in den Tumorzellen des HL im Vergleich zu denen des ALCL festgestellt werden. Zudem wurde eine Induktion dieser Proteine durch CD30-Rezeptorstimulation gezeigt. Es gelang, den Einfluss dieser anti-apoptotischen Proteine auf die unterschiedliche Signalwirkung der CD30-Stimulation mit dem basalen Expressionsstatus der Proteine zu korrelieren. Hierbei konnte die anti-apoptotische Wirkung von TRAF1 durch Transfektion in ALCL-Zellen belegt werden¹⁰⁵.

Durchsuchung von cDNA-Banken CD30⁺ Zelllinien auf neuartige Interaktionspartner von CD30 und TRAF5

Mit Hilfe des 2H-Systems konnte die bisher unbekannte Interaktion der Proteine CD30 und TRAF5 mit hUBC-9 gezeigt werden. Eine mögliche durch hUBC-9 vermittelte Sumotylierung der Proteine konnte jedoch weder nachgewiesen, noch ausgeschlossen werden.

Analyse der kodierenden Sequenzen von apoptotischen Schlüsselproteinen in CD30⁺ Zelllinien

Mutationsanalysen der cDNAs von Apaf-1, FLICE und Caspase-3 in CD30⁺ Zelllinien, nicht-lymphatischen Tumorzelllinien und nicht-malignen Referenzproben ergab keine Abweichungen für die Transkripte von FLICE. In allen generierten cDNA-Proben von Caspase-3 konnte eine generelle Abweichung von der Zielsequenz, die zu einem Austausch von zwei Aminosäuren der Proteinsequenz führt, festgestellt werden. Die Untersuchung von Apaf-1-Transkripten führte zu der

Charakterisierung dreier neuartiger Formen der Apaf-1-mRNA, die vermutlich Spleißvarianten darstellen¹⁰⁷.

Die nachfolgende Übersicht (Tabelle 5.1) fasst die Untersuchungsergebnisse noch einmal zusammen und ordnet sie hinsichtlich ihres zellulären Kontextes ein. Dabei erfolgt die Zuordnung unter der Berücksichtigung des derzeitigen Wissenstandes.

Es besteht ein Beitrag zur	Die Befunde sind	
	tumorspezifisch	nicht tumorspezifisch
Apoptoseresistenz	Transkriptüberexpression von TRAF1, A20 und cIAP-2 im HL	Induktion der Expression von TRAF1, A20 und cIAP-2 durch CD30-Stimulation
generellen Zellregulation		Interaktion von hUBC-9 mit CD30 und TRAF5 Charakterisierung dreier neuer Apaf-1-Formen

Tabelle 5.1. Zusammengefasste Darstellung der Untersuchungsergebnisse.

Summary

CD30 is a prominent member of the tumour necrosis factor receptor (TNFR) family. One of the major functions of these receptors is believed to be the induction of apoptosis. Therefore it is surprising that this receptor is overexpressed by highly proliferating tumours such as Hodgkin lymphoma (HL) and anaplastic large cell lymphoma (ALCL). Currently it is well known that the stimulation CD30 leads to apoptosis of ALCL tumour cells but not of Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) cells of HL.

These very different results of CD30 stimulation might be related to the diverse expression of CD30-associated signal transduction components. Therefore the expression of these signal transduction components were examined in tumour cells of ALCL, HL and normal tissue by *in situ* hybridisation. The study revealed a differential transcript overexpression of the anti apoptotic proteins TRAF1, A20 and cIAP-2 in tumour cells of

HL in contrast to the low expression levels in ALCL tumour cells. Additionally it was demonstrated that stimulation of CD30 receptor leads to the induction of TRAF1, A20 and cIAP-2 in ALCL and B-HL cell lines. Furthermore the anti apoptotic function of TRAF1 was shown.

Up to now it is still unknown how CD30 is capable of inducing apoptosis. All identified components of CD30-associated signal transduction seem to miss any apoptotic functionality. Hence the reasonable assumption arises that other related signal transduction components exist that induce apoptotic pathways. To search for putative novel interactions, a two-hybrid screening was performed in cDNA of HL-, ALCL-cell lines with CD30 and its signal transduction components TRAF1 and TRAF5 as baits. A novel protein-protein interaction of CD30 and TRAF5 with the human ubiquitin conjugating enzyme 9 (hUBC-9) had been discovered. Unfortunately it could not be revealed whether this interaction leads to hUBC-9 mediated SUMO-1 modification of these proteins or not.

To examine whether dysfunctional mutations of pro apoptotic proteins are the cause for apoptotic resistance the key players of apoptotic execution caspase-3, FLICE and Apaf-1 were investigated on mRNA level utilizing RT-PCR and sequence analysis methods. Therefore the cDNA of several CD30 positive tumour cell lines, cell lines of other tumour entity and normal tissue had been prepared and investigated. The mutational analysis of FLICE revealed no aberrations to the original identified sequence. All of the investigated cDNA probes for caspase-3 showed an aberration of two amino acids in contrast to the formerly publicised protein sequence. The study of the Apaf-1 transcripts did not disclose the expected tumour related alterations but led instead to the identification of three novel forms of Apaf-1 which probably represent splicing variants.