

Abteilung Innere Medizin III
Universität Ulm
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Hartmut Döhner

CD30 vermittelte Signalwege in anaplastisch großzelligen Lymphomen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Vorgelegt von
Christof Schneider
Geboren in Schwäbisch Gmünd

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD. Dr. Stephan Stilgenbauer

2. Berichterstatter: PD Dr. Simone Fulda

Tag der Promotion: 20.10.2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Hodgkin-Lymphome und großzellige anaplastische Lymphome	1
1.2 Der Zytokinrezeptor CD30	4
1.3 TNFR assoziierte Proteine	6
1.4 CD30-vermittelte Signalwege	8
1.5 Aufgabenstellung	9
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.2 Molekularbiologische Methoden	18
2.3 Zellbiologische Methoden	21
2.4 Proteinchemische Methoden	24
3 Ergebnisse	29
3.1 CD30 und NPM-ALK Expression in ALCL Zelllinien	29
3.2 Wachstumsverhalten verschiedener ALCL Zelllinien und der Hodgkin-Lymphom Zelllinie HDLM2 während CD30-Stimulation	32
3.3 Expression von Zellzyklus inhibierenden Proteinen unter CD30-Stimulation	34
3.4 Koimmunpräzipitation von PCNA3	40
3.5 CD30 vermittelte Apoptose in ALCL-Zelllinien	43
3.6 Expression von Apoptose inhibierenden Proteinen in ALCL-Zelllinien	46
3.7 Aktivierung von MAP Kinasen in Karpas 299 Zellen in Abhängigkeit von der CD30 Stimulation	54
4 Diskussion	57
5 Zusammenfassung	64
6 Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

µg	10 ⁻⁶ Gramm
µl	10 ⁻⁶ Liter
µM	10 ⁻⁶ Mol
A; G; C; T	Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ALCL	„anaplastic large cell lymphoma“
ALK	„anaplastic lymphoma kinase“
APS	Ammoniumpersulfat
b	Basen
bp	Basenpaare
C	Celsius
Cdk	„cyclin-dependent kinase“
cDNA	„complementary“ DNA
CKI	„cyklin kinase inhibitor“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithriolthreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FADD	„Fas-associated death domain protein“
FCS	„fetal calf serum“
FISH	„two-colour fluorescence in situ hybridization“
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HPR	„horse-radish-peroxidase“
Ig	Immunglobulin

IP	Immunpräzipitation
kD	Kilodalton
L	Ligand
M.	Morbus
mA	Milliampere
min	Minute(n)
mM	10^{-3} Mol
mRNA	„messenger“ RNA
ng	10^{-9} Gramm
NHL	„non-Hodgkin's-Lymphoma“
NPM	Nucleophosmin
P.I.	Protease-Inhibitoren
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„phosphate-buffered-saline“
PCR	„polymerase-chain-reaktion“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcription“-PCR
SDS	„sodiumdodecylsulfat“
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TRADD	„TNFR-associated death domain protein“
TRAF	„TNFR-associated factor“
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Hodgkin-Lymphome und großzellige anaplastische Lymphome

Lymphome werden in die Kategorien der Hodgkin-Lymphome und der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) eingeteilt.

Die Hodgkin-Lymphome sind morphologisch durch die Identifikation von multinukleären Reed-Sternberg-Zellen und mononukleären Hodgkin-Zellen abgrenzbar. Sie exprimieren das Zelloberflächenantigen CD30 (Ki-1), das durch Immunfärbung nachgewiesen werden kann (Schwab et al. 1982). Histologisch wird der klassische Morbus Hodgkin in vier Untergruppen unterteilt: das nodulär-sklerosierende, das lymphozytenreiche, das mischzellige und das lymphozytenarme Hodgkin-Lymphom. Der lymphozytenprädominante Morbus Hodgkin wird dagegen als selbständige Entität aufgefasst. Zwei typische Marker der Reed-Sternbergzellen, nämlich CD15 und CD30, werden von den Tumorzellen dieses Typs nicht exprimiert.

Die NHL bilden eine heterogene Gruppe aus niedrigmalignen und hochmalignen Lymphomen. NHL werden mit Hilfe morphologischer, immunologischer und genetischer Kriterien, sowie nach Ursprung der Lymphomzelle klassifiziert. Die Mehrheit der NHL geht von B-Lymphozyten aus. T- oder Null-Zellen werden seltener als Ursprungszellen identifiziert (Foon et al. 1982). Die Inzidenz der NHL liegt bei 10-12 Fälle/100000 Einwohner/Jahr.

Die REAL-Klassifikation (Harris et al. 1994) und die Kiel-Klassifikation (Stansfeld et al. 1988) dienten als die gebräuchlichsten Klassifikationsschemata und wurden von der aktuellen WHO-Klassifikation abgelöst. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann Arbor-Klassifikation (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung nach der Ann Arbor-Klassifikation (1971)

Stadium	Defintion
I	Nodaler Befall einer einzelnen Lymphknotenregion (I) oder Vorliegen eines einzelnen, lokalisierten extranodalen Herdes (IE)
II	Nodaler Befall (II) und/oder lokaisierte extranodale Herde (IIE) in ≥ 2 Regionen auf einer Seite des Zwerchfells
II ₁	Befall von 2 benachbarten Lymphknotenregionen (II ₁) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf benachbartes Organ (II ₁ E) oder Befall zweier benachbarter extalymphatischer Organe (II ₁ E)
II ₂	Befall von 2 nicht benachbarten oder > 2 benachbarten Lymphknotenregion (II ₂) oder Befall eines extralymphatischen Organs mit Lymphknotenbeteiligung über die regionären Lymphknoten hinaus (II ₂ E) oder Befall zweier nicht benachbarter extalymphatischer Organe (II ₂ E)
III	Nodaler Befall (III) und/oder lokalisierte extranodale Herde (IIIE) auf beiden Seiten des Zwerchfells, ggf. mit Milzbefall (IIIS oder IIISE)
IV	Diffuser oder disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohn Lymphknotenbefall
A/B	Allgemeinsymptome
A	Keine Allgemeinsymptome
B	Allgemeinsymptome (Fieber $>38^{\circ}\text{C}$, Nachtschweiß, Gewichtsverlust $>10\%$ des Ausgangsgewichts innerhalb von 6 Monaten)

Das großzellige anaplastische Lymphom („anaplastic large cell lymphoma“, ALCL) wurde erstmalig 1985 beschrieben (Stein et al. 1985). Es handelt sich dabei meist um ein hochmalignes aggressives T- oder Null-Zell NHL, das häufig auch die Haut befällt. Das Knochenmark, die Lungen, das Weichteilgewebe, die Leber und der Gastrointestinaltrakt werden meistens in fortgeschrittenen Fällen befallen.

Die anplastischen B-Zell-Lymphome, die sehr selten sind, wurden in der Kiel Klassifikation als eigene Gruppe zusammengefasst. In der Real Klassifikation und laut WHO werden sie als Variante des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms angesehen (Stein et al. 1985, Chan et al. 1989, Harris et al. 1994).

Die ALCL gehören zu den seltenen NHL. Klinisch unterscheidet man primäre und sekundäre Formen. Die primären Formen werden in systemische, AIDS bezogene und primäre ALCL der Haut unterteilt (Chadburn et al. 1993, Chott et al. 1990). Das primäre systemische ALCL ist die häufigste Form. Sie macht bei Erwachsenen circa 2%-8% und bei Kindern ungefähr 20%-30% der NHL aus (Harris et al. 1994, Kadin et al. 1986, Mora et al. 2000). Das primäre ALCL der Haut betrifft vor allem ältere Menschen. Der Altersdurchschnitt liegt bei 60 Jahren. Es macht circa 9% aller Hautlymphome aus (Willemze et al. 1997).

Durch histologische Untersuchungen wird die Heterogenität dieses Lymphoms noch weiter verdeutlicht. Man unterscheidet „common type“, „small cell“, „giant cell-rich“, „lymphohistiocytic“ und „Hodgkin-like“ Varianten. Seltene Untertypen sind die „neutrophil-rich“, „sarcomatoid“ und die „hypocellular“ Variante .

Das ALCL ist charakterisiert durch die Expression des Zytokinrezeptors CD30. Die CD30-positiven ALCL, auch Ki-1 Lymphome genannt, betreffen vor allem Kinder und junge Erwachsene. Das durchschnittliche Lebensalter beträgt ungefähr 34 Jahre. In dieser Altersgruppe machen die ALCL circa 25% aller NHL aus (Morris et al. 1994). CD30-positive ALCL haben im Vergleich zu anderen großzelligen NHL eine sehr gute Prognose (Pileri et al. 1994, Bitter et al. 1990). Bei Diagnose liegt bei 30% ein lokalisiertes Stadium vor (Stadium I/II). Die Hälfte der Patienten haben zu diesem Zeitpunkt Allgemeinsymptome und eine erhöhte LDH.

Morgan et al. beschrieben 1986 erstmals die chromosomale Translokation t(2;5). Diese ist bei ALCL mit der Expression des chimären Proteins NPM-ALK verbunden. In unterschiedlichen Studien wurde bei ALCL eine sehr häufige Assoziation (bis 100%) mit dieser Translokation gezeigt (Le Beau et al. 1989, Mason et al. 1990). Andere Studien zeigten eine deutlich geringere Assoziation (Greer et al. 1991, Lopategui et al. 1995). Das Durchschnittsalter von Patienten mit NPM-ALK-positiver ALCL liegt mit ungefähr 16,2 Jahren deutlich, nämlich 35 Jahre, unter dem NPM-ALK-negativer Patienten (Shiota et al. 1995). Mehrere Studien berichten über die Expression von NPM-ALK als eigenen unabhängigen Prognosefaktor bei systemischen ALCL (Falini et al. 1999, Gascoyne et al. 1999, Shiota et al. 1995, ten Berge et

al. 2000). In den Studien lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei ALK-positiven ALCL zwischen 70% und 90%. Im Vergleich dazu lag sie bei ALK-negativen ALCL zwischen 30% und 40%. NPM-ALK setzt sich aus dem N-terminalen Teil des nichtribosomalen Phosphoproteins NPM (Nucleophosmin) und der zytoplasmatischen Domäne der „anaplastic lymphoma kinase“ (ALK) zusammen (Morris et al. 1994, Pulford et al. 1997). Durch die chromosomale Translokation entsteht die 80kDa schwere Tyrosinkinase NPM-ALK. Es handelt sich bei NPM-ALK um eine hyperphosphorylierte und konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase (Hübinger et al. 1999, Bischof et al. 1997, Bai et al. 1998).

Prinzipiell erfolgt die Therapie der hochmalignen NHL mit kurativem Ansatz. Aufgrund der frühzeitigen Disseminierung müssen hochmaligne NHL schon im frühen Stadium als systemische Erkrankung betrachtet werden. Als Standardverfahren dient deshalb die systemische Chemotherapie. Beim ALCL im Stadium I und II besteht die Standardtherapie aus einer Chemotherapie mit 3 Zyklen CHOP (Tabelle 1.2) und einer ‚involved field‘ Bestrahlung. Im Stadium III und IV werden 6 Zyklen CHOP verabreicht.

Tabelle 1.2: ‚CHOP‘ Therapieprotokoll

CHOP:			
Cyclophosphamid	750mg/m ² /d	i.v.	d1
Doxorubicin	50mg/m ² /d	i.v.	d1
Vincristin	1,4mg/m ² /d	i.v.	d1, maximal 2mg absolut
Prednison	100mg absolut	p.o.	d1-d5

1.2 Der Zytokinrezeptor CD30

Der CD30 Rezeptor ist ein Mitglied der „Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor“ (TNFR) Superfamilie, die durch strukturelle und funktionelle Homologien gekennzeichnet ist (Durkop et al. 1992, Smith et al. 1994). Bekannte Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind neben CD30 TNFR-I, CD95, NGFR, CD27, CD40 und TNFR-II (Smith et al. 1994, Baker et al. 1996)). Die meisten TNFR bestehen aus einer zytoplasmatischen Domäne, einem transmembranen Teil und einem extrazellulären C-terminalen Bereich, der für die Erkennung und Interaktion mit den passenden Liganden verantwortlich ist (Smith et al. 1994). Die Sequenzhomologie ist mit 20%-25% sehr gering und hauptsächlich auf die extrazelluläre, cysteinreiche Domäne beschränkt (Smith et al. 1994). Die meisten TNF-Rezeptoren bestehen aus drei oder vier

homologen cysteinreichen Wiederholungen. CD30 ist der bisher einzig bekannte Zytokinrezeptor, dessen extrazellulärer Anteil sechs cysteinreiche Wiederholungen hat.

Der Zytokinrezeptor CD30 wurde ursprünglich als Oberflächenprotein von Reed-Sternberg und Hodgkin-Zellen identifiziert (Schwab et al. 1982, Stein et al. 1985). Jedoch wird CD30 nicht nur von Morbus Hodgkin-Zellen überexprimiert. CD30 wird auch auf Burkitt Lymphomen, B-Zell Lymphomen und ganz charakteristisch auf ALCL gefunden (Jones et al. 1995, Higgins et al. 1999, Stein et al. 2000). Darüber hinaus findet man den Rezeptor auch auf aktivierten und virustransformierten B- und T-Lymphozyten (Stein et al. 1985). Die CD30-Expression in gesunden Individuen ist dagegen sehr beschränkt. Im normalen lymphatischen Gewebe in der parafollikulären Region und den Keimzentren gibt es vereinzelt CD30-positive Lymphozyten (Stein et al. 1985, Durkop et al. 1997). Abgesehen von embryonalen Karzinomen wird CD30 von nicht-lymphatischen Tumoren nicht exprimiert. Dies hilft bei der Differenzierung zwischen CD30-positiven embryonalen Neoplasien und einem undifferenziertem Karzinom (Durkop et al. 2000, Pallesen et al. 1988, Latza et al. 1995).

Das menschliche Gen für CD30 liegt auf Chromosom 1p36 und wird in zwei mRNA transkribiert. Die Transkriptionsprodukte sind 3,8kb und 2.6kb groß (Durkop et al. 1997). Der Transkriptionsfaktor Sp1 und Mitglieder der Ets Familie wurden als Aktivatoren der CD30 Expression identifiziert, während der Transkriptionsfaktor Sp3 als Negativregulator dient (Croager et al. 2000).

Durch Glykosylierung eines 86kDa Kernproteins entsteht das 90kDa Vorläufermolekül. Der 120kDa schwere, reife Rezeptor entsteht durch Phosphorylierung des Vorläufermoleküls an den Tyrosin- und Serinresten (Forese et al. 1987, Nawrocki et al. 1988).

Einige der TNF-Rezeptoren liegen nicht nur als membrangebundene Form, sondern auch als lösliche Form vor. Diese löslichen Formen entstehen durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen Proteins oder durch Spleißen (Hansen et al. 1995). Die lösliche Form von CD30 (sCD30) kann sowohl in Kulturlösungen von CD30-positiven Tumorzellen als auch im Serum von Patienten mit einem CD30-positiven Lymphom nachgewiesen werden (Josimovic-Alasevic et al. 1989). Außerdem findet man bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, atopischen Erkrankungen, systemischer Sklerose, Kolonkarzinom und einer Vielzahl anderer Erkrankungen einen erhöhten Spiegel an sCD30 im Serum (Gerli et al. 1995, Dummer et al. 1997, Giacomelli et al. 1997, Iwagaki et al. 1999). Studien haben gezeigt, dass

Morbus Hodgkin Patienten, die bei Diagnosestellung einen erhöhten Serumlevel von sCD30 (sCD30>100U/ml) haben, eine schlechtere Prognose bezüglich 5-Jahres-Überlebensrate und Erreichen einer kompletten Remission haben (Nadali et al. 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patienten mit ALCL erzielt (Zinzani et al. 1998).

Im Vergleich zu CD30 ist die Expression des CD30 Liganden (CD30L) weniger eingeschränkt. Dieses 26kDa bis 40kDa große Typ-II-Membranprotein findet sich auf aktivierten T-Zellen, Granulozyten, Makrophagen/Monozyten und auf normalen und bösartigen B Lymphozyten (Smith et al. 1993, Armitage et al. 1994, Younes et al. 1996). Außerdem konnte die Expression von CD30L mRNA bei 60% aller akuten myeloischen Leukämien (AML), bei 54% aller akuten lymphatischen Leukämien der B-Zellen und bei 68% aller Neoplasien, die von B-Zellen ausgehen, nachgewiesen werden (Gattei et al. 1997). Im Gewebe von ALCL kann im Allgemeinen keine Expression des CD30L detektiert werden. Im Gegensatz dazu sind die Mehrzahl der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen, die aus Gewebe von Hodgkin-Lymphomen entnommen werden, CD30L-positiv. Auf diesen Zellen findet man also eine Expression des CD30 Rezeptors und Liganden (Hsu et al. 2000).

1.3 TNFR assoziierte Proteine

Die Bindung des Liganden am Rezeptor führt bei allen TNF-Rezeptoren zur Bildung eines trimeren Komplexes (Smith et al. 1994). Die Trimerisierung der Rezeptoren kann zu Zellaktivierung, Proliferation, Differenzierung, Zellzyklusarrest oder Apoptose führen (Smith et al. 1994, Baker et al. 1998, Baker et al. 1996). Der gleiche Rezeptor vermittelt sowohl Aktivierung der Zelle als auch Apoptose (Smith et al. 1994).

Da die TNF-Rezeptoren keine katalytische Aktivität besitzen, erfolgt die Signaltransduktion über Adaptermoleküle. Zu diesen gehören die Mitglieder der „TNFR-associated factor“ (TRAF) Familie (Baker et al. 1996, 1998). Bisher sind sechs Mitglieder der TRAF-Familie identifiziert (Arch et al. 1998). Proteininteraktionen zwischen TRAF Molekülen und anderen Adapterproteinen wie TRADD (TNFR-associated death domain protein), FADD (Fas-associated death domain protein), RIPs (receptor-interacting proteins), NIK (NFκB-inducing kinase), TANK (TRAF-associated NFκB activator), cIAPs (cellular inhibitors of apoptosis) und TRIP (TRAF-interacting protein) wurden gezeigt (Arch et al. 1998).

Einige TNF-Rezeptoren wie TNFR1, CD95 (Fas), Apo 3 enthalten eine homologe, intrazelluläre Proteinbindungsdomäne. Diese so genannte „death domain“ führt über die

Interaktion mit Proteinen wie z.B. TRADD, FADD oder RIP, die weitere Adaptermoleküle und Caspasen aktivieren, zur Apoptose (Baker et al. 1996, 1998, Tartaglia et al. 1993, Ashkenazi et al. 1999). Interessanterweise induzieren RIP und TRADD nicht nur Apoptose, sondern erhöhen auch die NF κ B abhängige Genexpression und damit das Zellüberleben (McCarthy et al. 1998, Hsu et al. 1995).

Die Induktion von Zellüberleben und Zellaktivierung ist häufig mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor κ B) vergesellschaftet. TRAF2, TRAF5 und TRAF6 sind hauptsächlich für die Aktivierung von NF κ B verantwortlich, da sie die MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) NIK aktivieren. NIK kann einen Proteinkomplex, der aus den zwei I κ B (inhibitor of nuclear factor κ B) Kinasen IKK α und IKK β besteht, phosphorylieren. Dies führt zur Aktivierung der IKKs und der Phosphorylierung von I κ B, was wiederum zu dessen Degradierung und zur Translokation von NF κ B Heterodimeren in den Nucleus und der NF κ B-abhängigen Genexpression führt (Woronicz et al. 1997, Ling et al. 1998, Nakano et al. 1998, Rothe et al. 1995, Kaye et al. 1996, Lee et al. 1998).

Die NF κ B-abhängige Genexpression wird von den beiden Mitgliedern der IAP (inhibitor of apoptosis) Familie c-IAP-1 und c-IAP-2 gefördert. Beide Proteine interagieren mit TRAF1 und TRAF2 über ihre N-terminale „baculovirus IAP repeat“ (BIR) Domäne (Rothe et al. 1995, Uren et al. 1996). Die ersten IAP Proteine wurden 1993 von Crook et al. in Baculoviren identifiziert. Durch direkte Inhibition von Caspasen (hauptsächlich Caspase 3 und 7) und Pro-Caspasen sowie durch die Modulation des Transkriptionsfaktors NF κ B wirken sie Apoptose hemmend (Deveraux et al. 1999).

TRAF Proteine können aber auch einen der MAP (mitogen-activated protein) Kinase Signalwege aktivieren. MAP Kinasen sind Serin/Threonin Kinasen, welche die Zellantwort auf eine große Vielzahl an Stimuli vermitteln. Sowohl die Aktivierung der „jun N-terminal Kinase“ (JNK), als auch der „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) und der p38 MAP Kinase durch TRAF Proteine ist beschrieben (Reinhard et al. 1997, Dadgostar et al. 2000, Grammer et al. 1998, Hatzoglou et al. 2000).

Jede dieser MAP Kinasen wird von spezifischen MAP Kinase Kinasen (MKK) durch Phosphorylierung an einem Threonin und Tyrosin Rest aktiviert (Cobb et al. 1995, Cano et al. 1995). Die Aktivierung von MAP Kinasen führt zur Phosphorylierung von vielen Zielproteinen, darunter auch Proteinkinasen wie MAPKAP-K1, MAPKAP-K2/3, Mnk1/2 und

MSK1 und Transkriptionsfaktoren wie SAP-1, Elk-1, c-Jun, ATF-2, MEF2C und CHOP (Cohen 1997, New et al. 1998).

1.4 CD30-vermittelte Signalwege

Die Aktivierung von CD30 kann in Abhängigkeit des exprimierenden Zelltyps, kostimulatorischer Faktoren und/oder Versuchsbedingungen unterschiedliche Signalwege wie Zellwachstum, Differenzierung oder Apoptose induzieren. Bei CD3-aktivierten T-Lymphozyten und der Hodgkinzelllinie HDLM-2 findet sich eine erhöhte Proliferation nach CD30-Stimulation (Smith et al. 1993). Eine Stimulation des CD30 Rezeptors der Hodgkinzelllinien L482 und KM-H2 zeigt keinen Effekt bezüglich Proliferation und Überleben (Smith et al. 1993). Für die CD30-vermittelte Zellproliferation und das Überleben der Zellen ist eine Aktivierung des Transkriptionsfaktor NFκB verantwortlich (McDonald et al. 1995).

Da CD30 keine „death domain“ wie CD95 oder TNFR-1 besitzt, ist der Signalweg, über den CD30 Apoptose induziert, bisher umstritten. Die antiproliferativen, CD30-vermittelten Effekte sind weniger gut untersucht und teilweise sehr kontrovers beschrieben (Schneider et al. 2002 Review).

CD30-regulierte Apoptose bei CD3-aktivierten, murinen CD8 T-Zellen war unabhängig von CD95 (Fas) und TNFR-1 (Telford et al. 1997). Chiarle et al. 1999 untersuchten die CD30-induzierte Apoptose im Thymus und fanden eine Beteiligung der Caspasen 1 und 2 am CD30-induzierten Zelltod.

Andere Untersuchungen führen die antiproliferativen Effekte bei ALCL und anderen CD30 positiven Lymphomen auf eine CD30-abhängige Degradation von TRAF2 zurück. Die Degradation von TRAF2 vermindert die Fähigkeit der Zelle NFκB zu aktivieren und macht sie dadurch für TNFR-1 induzierte Apoptose anfälliger (Duckett et al. 1997).

CD30-vermittelter Zelltod wurde bei vielen CD30-positiven Lymphomen untersucht. Die Ergebnisse waren sehr unterschiedlich. Für die ALCL-Zelllinien PB-1 und McG-2 (Hsu et al. 2000) und JB6 (Hsu et al. 2000, Hübinger et al. 2001) wurde kein Wachstumsstopp unter CD30-Stimulation gefunden. Durch Stimulation mit immobilisiertem anti-CD30 Antikörper (M44 oder HeFi-1) wurde bei den ALCL-Zelllinien Karpas 299 und Michel dagegen eine Reduktion des Wachstums und eine Induktion von Zelltod erzielt (Tian et al. 1995, Mir et al. 2000, Grell et al. 1999, Smith et al. 1993).

Von Hübinger et al. werden jedoch für die ALCL-Zellen Karpas 299 keine Anzeichen für eine CD30-induzierte Apoptose gefunden. Die Stimulation mit CD30 induzierte die Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{WAF1/CIP1} und führte zu einem G0/G1 Zellzyklusarrest (Hübinger et al. 2001, Schneider et al. 2004).

Der „cyclin dependent kinase“ (CDK) Inhibitor p21 ist ein multifunktionales Protein. Das p21 Protein interagiert mit vielen Proteinen – „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), GADD45/MYD118, den MAP Kinasen p38 und JNK und Casein Kinase II (Ball reviewed 1997). Entdeckt wurde p21 1992 als ein Protein des CDK Komplexes. Dieser Komplex wird aus p21, Cyclin D, CDK4 und PCNA gebildet (Xiong et al. 1992).

Das p21 Protein ist selbst in der Lage zu einem Zellzyklusarrest zu führen, wird aber auch für die p53-abhängige Induktion eines Wachstumsarrests benötigt (Chen et al. 1995, Luo et al. 1995, El-Deiry et al. 1993). P21 hat zwei verschiedene inhibitorische Effekte auf den Zellzyklus. Zum einen inhibiert p21 die Phosphorylierung des „retinoblastoma protein“ (Rb) (Harper et al. 1993, Ball et al. 1996). Die Inhibition der Proliferation erfolgt über die Bindung von hypophosphoryliertem Rb an dem Transkriptionsfaktors E2F (Hiebert 1993, Qian et al. 1992). Zum anderen inhibiert es die DNA Replikation via Interaktion mit PCNA. Hierfür bindet p21 direkt an PCNA (Chen et al. 1995).

Die Stimulation mit immobilisiertem CD30-Antikörper (HeFi-1) führte bei den ALCL-Zelllinien Mac-1 und Mac-2 sogar zu einer vermehrten Proliferation, wobei das Zellwachstum stark beschränkt ist, wenn gleichzeitig die p38 MAP-Kinase inhibiert wird (Levi et al. 2000).

1.5 Aufgabenstellung

Der Zytokinrezeptor CD30 ist in der Induktion unterschiedlichster Signalkaskaden involviert. Während die CD30 vermittelten Effekte in Hodgkin Lymphom Zellen gut dokumentiert und charakterisiert wurden, sind die Informationen bezüglich der Signaltransduktion in ALCL Zellen sehr gegensätzlich und stützen sich häufig nur auf Beobachtungen von einzelnen Zelllinien. Besonders kontrovers wird die Möglichkeit einer CD30 induzierten Apoptose diskutiert.

Das Ziel der hier dokumentierten Arbeit ist eine detailliertere Charakterisierung der CD30 vermittelten Effekte in etablierten ALCL Zelllinien. Dabei wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf folgende Fragen gelegt:

Können Anzeichen eines CD30 induzierten Zelltodes in ALCL Zellen gefunden werden? Durch den Einsatz verschiedener Analysemethoden sowie der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien unter standardisierten Bedingungen sollte eine Beteiligung des Rezeptors an der Apoptoseregulation eindeutig bestätigt oder widerlegt werden.

Welchen Einfluss übt der Rezeptor auf die Zellproliferation aus? Neben Apoptoseregulation ist das Wachstumsverhalten von Krebszellen unter bestimmten Versuchsbedingungen eine wichtige Information. Die Analyse der Proliferation soll zudem Hinweise darauf geben, ob sich ALCL Zelllinien einheitlich bezüglich des CD30 regulierten Wachstums verhalten oder ob unterschiedliche Effekte in der gleichen Lymphomzelle vermittelt werden.

Können Signalmoleküle identifiziert werden, die in die CD30 induzierte Signaltransduktion in ALCL eine Rolle spielen? Dabei sollen sowohl bekannte Zielproteine von CD30 wie der Zellzyklusinhibitor p21 in bisher nicht analysierten Zelllinien untersucht werden als auch neue bisher unbekannte Zielproteine identifiziert und charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Standard-Chemikalien

7-Actinoaminomycin D, 5mg, 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin aus Rinderserum BSA	Serva, Heidelberg
6-Aminohexansäure	Sigma, Deisenhofen
APS	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin, Protease-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bromphenol Blau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
Chloroform-Isoamylalkohol, 24:1, RNase/DNase frei	Sigma, Deisenhofen
dNTP Mix, 10mM	Gibco, Eggenstein
DTT, 100mM	Promega, Heidelberg
DTT, 0,1M	Gibco, Eggenstein
ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
First Strand Buffer 5×	Gibco, Eggenstein
GEL 30 Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Biowhittaker, Walkersville
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Leupeptin, Protease-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Fluka, Buchs Schweiz
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂ Solution	Perkin Elmer
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Naphtol Blau Schwarz	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Fluka, Buchs Schweiz
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Gibco, Eggenstein
PBS, 10 x, steril	Gibco, Eggenstein
PBS, 1 x, steril	Gibco, Eggenstein
PCR-Buffer 10x	Perkin Elmer, Überlingen
Pepstatin, Protease-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
PMSF, Protease-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
Protein A-sepharose CL-4B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
SDS	Sigma, Deisenhofen
SEAKEM®LE agarose	BioProdukts, Maine, USA
Skim-Milk	Difco, Detroit, USA
TEMED, RNase/DNase frei	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	USB, Cleveland USA
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Trypan Blau	Seromed, Berlin
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Enzyme

AmpliTaq-DNA-Polymerase	PerkinElmer, Überlingen
DNase I, RNase frei	Boehringer, Mannheim
HPRI, Ribonuclease-Inhibitor	Amersham Pharmacia, Freiburg
RNase, DNase frei	Boehringer, Mannheim
Superscript II	Gibco, Eggenstein

2.1.3 Antikörper

anti-actin	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-caspase 3	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Pharmingen, Hamburg
anti-cIAP2	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-ERK 1	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-goat	HRP conjugated	400 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-IκB-α	rabbit polyclonal		Biolabs, Frankfurt
anti-JNK 1	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-JNK 2	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Ki-1/CD30	mouse monoclonal		Dako, Dänemark
anti-mouse	rabbit polyclonal		Dako, Dänemark
anti-mouse	HRP-conjugated		Amersham, Braunschweig
anti-NFκBα	rabbit polyclonal		Santa Cruz, Heidelberg
anti-ALK11	rabbit polyclonal		Dr. S. W. Morris, ST: Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
anti-p-ATF-2	rabbit-polyclonal		Biolabs, Frankfurt
anti-p-p38	rabbit polyclonal		Biolabs, Frankfurt
anti-p-IκB-α	rabbit polyclonal		Biolabs, Frankfurt
anti-p-JNK	rabbit polyclonal		Biolabs, Frankfurt
anti-p-ERK 1/2	rabbit polyclonal		Biolabs, Frankfurt
anti-p16	rabbit polyclonal		Santa Cruz, Heidelberg
anti-p21	mouse monoclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-p21	mouse monoclonal		Pharmingen, Hamburg
anti-p27	rabbit polyclonal		Santa Cruz, Heidelberg
anti-p38	rabbit polyclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-PARP	mouse monoclonal	10 µg/ml	Stratagene, Heidelberg
anti-PCNA	mouse monoclonal	200 µg/ml	Santa Cruz, Heidelberg
anti-rabbit	HRP-conjugated		Amersham, Braunschweig

2.1.4 Kulturmedien

FCS, Fetales Bovine Serum	Serva, Heidelberg
L-Glutamine	Biowhittaker, Walkersville
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Eggenstein
RPMI 1640 Medium, ohne Glutamin, 1 x	Seromed, Berlin

2.1.5 Zytostatika

Epirubicin	Sigma, Deisenhofen
Etoposid	Amersham, Braunschweig

2.1.6 Größenstandards

100 bp DNA-ladder	Amersham, Braunschweig
PCR Molecular Weight Marker	Amersham, Braunschweig
Rainbow Protein Molecular Weight Marker	Amersham, Braunschweig
Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker	Amersham, Braunschweig

2.1.7 Zelllinien (human)

Karpas 299	ALCL	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
DEL	ALCL	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
JB6	ALCL	Suspensionszellen	Dr. S. W. Morris, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
SU-DHL1	ALCL	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
SR 786	ALCL	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
SUP-M2	ALCL	Suspensionszellen	Dr. S. W. Morris, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
L82	ALCL	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
L-428	HD	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
HDLM2	HD	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig

KM-H2	HD	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
HD-MY-Z	HD	adhärente Zellen	DSMZ, Braunschweig
U937	Histiozytäres Lymphom	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig
MUTZ-1	MDS	Suspensionszellen	DSMZ, Braunschweig

2.1.8 PCR-Primer

CD30-sense	5'-GGC AGG GAT GAT TGT CAA GT-3'
CD30-anti-sense	5'-TTC AGA TCC AGG TCT GTC CC-3'
cIAP1-sense	5'-CTG GGA ACC AAA GGA TGA TG-3'
cIAP1-anti-sense	5'-GGG TAG AAC ATG CCA AGT GG-3'
cIAP2-sense	5'-CAA TTG GGA ACC GAA GGA TA-3'
cIAP2-anti-sense	5'-ATC CTG AGC AGC TTG CAA GT-3'
p14/p15-sense	5'-GGG AGG GTA ATG AAG CTG AG-3'
p14/p15-anti-sense	5'-CGA TCC AGG TCA TGA TGA TG-3'
p16-sense	5'-CTT CTT GGA CAC GCT GGT-3'
p16-anti-sense	5'-GGA TGT CTG AGG GAC CTT CC-3'
p18-sense	5'-CAG CCT GGT TAG GAG CAA AG-3'
p18-anti-sense	5'-GAG ATT GCC AGG AGA CTG CT-3'
p19-sense	5'-CTT CCA ATC CAT CTG GCA GT-3'
p19-anti-sense	5'-GTC ACC CTC TCC AGC AAG AG-3'
p21-sense	5'-ACT TCC TCC TCC CCA CTT GT-3'
p21-anti-sense	5'-ACT TTG GAG TCC CCT CAC CT-3'
p27-sense	5'-ACC CCT AGA GGG CAA GTA CG-3'
p27-anti-sense	5'-TGG TGG ACC CAA AGA CTG AT-3'
p53-sense	5'-AGG GGA AAT GCT TAC ACA GC-3'
p53-anti-sense	5'-TGA GCC AAG TGA GTA CAG CG-3'
Survivin-sense	5'-CAG ACT TGG CCC AGT GTT TC-3'
Survivin-anti-sense	5'-CGT GAA AGA AGC GTC AAA GG-3'
XIAP-sense	5'-GAC AGG CCA TCT GAG ACA CA-3'
XIAP-anti-sense	5'-CTG CCA TGG ATG GAT TTC TT-3'

2.1.9 Standard-Geräte

Centrifuge 5415 C		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Thermomixer 5436		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Horizon 11·14	Horizontale Gel-Kammer	Gibco, Eggenstein
Minifuge T		Heraeus Sepatech

2.1.10 Standard-Lösungen und Standard-Puffer

Annexin Bindungspuffer:	10 mM HEPES 70 mM NaCl 1,25 mM CaCl ₂
Amidoschwarz-Färbelösung:	0,2% Naphtol Blau Schwarz 25% Isopropanol 10% Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Blocking Puffer:	1×TBS oder 1×PBS 0,05 - 0,1% Tween 5% Magermilchpulver
Erstantikörper Lösungspuffer:	1×PBS 0,1% Tween-20 5% BSA
Kinase Puffer:	25 mM Tris Base (pH 7,5) 5 mM Glycerolphosphat 2 mM DTT 0,1 mM Na ₃ VO ₄ 10 mM MgCl ₂
Laemmlie-Puffer (4×)	2000 mM Tris HCl; pH 6,8 400 mM DTT 8% SDS 0,4% Bromphenol Blau 40% Glycerin
Lysispuffer I zur Proteinpräparation:	10 mM Tris-Puffer; pH 7,3 0,15 M NaCl 0,01 M MgCl ₂ 0,05% NP40 1 mM PMSF 0,1 mM PLA
Lysispuffer II für Immunpräzipitationen:	5% Triton X 100

	50 mM Tris Base; pH 7,4
	650 mM NaCl
	25 mM EDTA, pH 8,0
	1 mM PMSF
	0,1 mM PLA
Lysispuffer III für phosphorylierte Proteine:	10 mM Tris Base; pH 7,5
	130 mM NaCl
	5 mM EDTA
	1% Triton X-100
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1 mM PMSF
Protease-Inhibitoren:	
PMSF (100×)	5 mM in Ethanol
PLA (100×)	8,4 mM Pepstatin in Ethanol
	0,6 mM Leupeptin in Ethanol
	5,8 mM Aprotinin in H ₂ O
	0,25 Volumen Ethanol
SDS Sample Puffer (3×):	187,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	6% w/v SDS
	30% Glycerol
	150 mM DTT
	0,03% w/v Bromphenol Blau
TBE-Puffer (1×):	2,25 mM Tris-Borat
	1 mM EDTA; pH 8,0
TBS-Puffer (10×):	2,42% Tris Base
	8 % NaCl
	pH 7,6 mit HCl einstellen
Transferpuffer zum Semidry Blotting:	
Anoden I-Puffer (1×)	30 mM Tris-Base; pH 10,4
	20% Methanol
Anoden II-Puffer (1×)	300 mM Tris-Base; pH 10,4
	20% Methanol

Kathoden-Puffer (1×)	25 mM Tris Base; pH 9,7 40 mM 6-Aminohexansäure 20% Methanol
Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer (5×):	125 mM Tris Base; pH 8,3 1,25 M Glycin 0,5% SDS
Stripping-Puffer (10×):	2 M Glycin (pH 2,5) 0,5% Tween

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Agarose-Gele zur Gelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten dienen nichtdenaturierende Agarose-Gele. In Abhängigkeit der Fragmentgröße der zu untersuchenden DNA werden Gele mit 0,5% - 3% Agarose verwendet. Die Agarose wird in 1×TBE-Puffer gelöst. Das Gießen der Gele und die Elektrophorese erfolgt horizontal in IBI-Gelkammern. Die DNA-Proben werden vor dem Auftragen mit 5×Blue Run (Amersham Pharmacia, Freiburg) im Verhältnis 4:1 gemischt. Als Laufpuffer wird 1×TBE verwendet. Abhängig von der Gelkonzentration wird die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke zwischen 100 mA und 150 mA durchgeführt.

2.2.2 Längenstandards für DNA-Fragmente

Zur Bestimmung der Länge der DNA-Fragmente wird der PCR Molekular Weight Marker (50 – 1000 bp; Amersham Pharmacia, Freiburg) und der 100 Base Pair-Marker (Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet.

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration einer Nukleinsäure wird durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Hierzu wird die RNA-Lösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl 1:100 verdünnt und die optische Dichte (OD_{260}) gemessen.

2.2.4 Trizol-Isolation von RNA

Für die Isolation von Gesamt-RNA werden 1×10^7 Zellen aus der Kultur entnommen und zweimal mit $1 \times$ PBS gewaschen. Anschließend resuspendiert man das Zellpellet in 1 ml Trizol. Die Probe kann bei -80°C verwahrt werden. Vor der Extraktion der RNA wird die Probe für mindestens 24 h eingefroren. Nach dem Auftauen wird die Probe 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit $200\mu\text{l}$ Chloroform 30sec kräftig geschüttelt. Die Probe wird 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie 15 min bei $12000\times g$ bei 4°C zentrifugiert wird. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von $500\mu\text{l}$ Isopropanol für 10min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ($1200\times g$, 10 min, 4°C) wird der Überstand verworfen und das RNA-Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen. Es folgt eine 5 minütige Zentrifugation mit $7500\times g$ bei 4°C . Der Überstand wird verworfen und das RNA-Pellet auf dem Thermomixer bei 60°C für 10 min getrocknet und in $50\mu\text{l}$ H_2O resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgt bei -80°C .

2.2.5 Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA aus RNA werden $3\mu\text{g}$ RNA in $18,8\mu\text{l}$ H_2O aufgenommen. Die Reinigung der RNA von DNA erfolgt mit $0,2\mu\text{l}$ DNase, die 30 min bei 37°C inkubiert wird. Durch 5 minütiges Erhitzen auf 90°C wird die Reaktion beendet. Nach Zugabe von $1\mu\text{l}$ Oligo-dT wird das Gemisch 5 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Pro Probe werden $10\mu\text{l}$ Pre-Mix zugegeben, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

- 6 μl RT-Puffer
- 1 μl RNase-Inhibitor
- 1 μl dNTP
- 1 μl Superscript II
- 1 μl 0,1 M DTT

Der Ansatz wird 30min bei 42°C inkubiert und die reverse Transcriptase wird danach 5 min bei 90°C inaktiviert. Das Volumen wird mit Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) auf $50\mu\text{l}$ aufgefüllt. Die Reinigung der Probe erfolgt mit $1\mu\text{l}$ RNase, DNase frei für 30 min bei 37°C , die daraufhin bei 90°C inaktiviert wird. Mittels β -actin-PCR wird die Effizienz der reversen Transkription überprüft.

2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion ist die Anreicherung definierter DNA-Abschnitte aus kleinsten DNA-Mengen möglich. Durch mehrfache Denaturierung, Primer-Bindung (Hybridisierung) und DNA-Synthese (Extension) mit hitzebeständiger DNA-Polymerase erfolgt die Anreicherung des DNA-Abschnitts.

Die β -actin-PCR wird mit einem Perkin Elmer Gene Amp System durchgeführt. Das Reaktionsvolumen beträgt 47,4 μ l. Für jeden Ansatz wird eine Negativkontrolle mitgeführt.

Zu 3 μ l cDNA wird der folgende Pre-Mix gegeben:

- 36 μ l H₂O
- 5 μ l 10 \times Reaktionspuffer mit MgCl₂
- je 1 μ l Primer (20 μ M)
- 1 μ l dNTP (10 mM)
- 0,4 μ l Ampli Taq

Temperaturzyklus:

- | | | |
|---------|--------|--------------|
| 1. 95°C | 5 min | |
| 2. 95°C | 30 sec | |
| 3. 64°C | 30 sec | 28-35 Zyklen |
| 4. 72°C | 45 sec | |
| 5. 72°C | 10 min | |

Die übrigen PCR-Reaktionen werden mit Trio-Thermoblöcken von Biometra durchgeführt. Das Reaktionsvolumen von 30 μ l wird mit 30 μ l Mineralöl überschichtet. Der Pre-Mix setzt sich wie folgt zusammen:

- 18,75 μ l H₂O
- 3 μ l 10 \times Reaktionspuffer ohne MgCl₂
- 1,5 μ l MgCl₂ (25 mM)
- je 1,5 μ l Primer (x μ M)
- 0,6 μ l dNTP (10 mM)
- 0,15 μ l Ampli Taq

Temperaturzyklus:

- | | | |
|---------|-------|--------------|
| 1. 96°C | 2 min | |
| 2. 96°C | 1 min | |
| 3. 62°C | 1 min | 28-35 Zyklen |

4. 73°C 1 min
5. 73°C 5 min

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung humaner Zelllinien erfolgt im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Das Kulturmedium der Suspensionszellen wird dreimal pro Woche erneuert. Abhängig von der Zellkonzentration pro Milliliter Medium wird entweder ein Teil der Zellsuspension geerntet bzw. verworfen und die übrigen Zellen mit frischem Medium auf eine Konzentration von circa $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt oder die Zellsuspension wird 5min bei 400×g zentrifugiert, der Überstand zu 90% verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert.

Die adhärent wachsenden Zellen der Zelllinie HD-MYZ werden mit Hilfe eines Schabers von der Plastikoberfläche der Kulturflaschen gelöst.

Die verwendeten Zelllinien werden in RPMI 1640 Medium (Seromed, Berlin) kultiviert. Dieses enthält zusätzlich 1% L-Glutamin (Biowhittaker, Walkersville) und 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Eggenstein) sowie FCS (Serva, Heidelberg). Bis auf die ALCL Zelllinie SR-786 und die Hodgkin Zelllinien HDLM2 und KM-H2, die 20% FCS benötigen, werden alle anderen Zelllinien mit 10% FCS kultiviert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wird die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypan Blau (Seromed, Berlin) versetzt. Der Farbstoff markiert tote Zellen und Zelltrümmer. Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und nach folgender Formel die Konzentration bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = 10^4 \times \frac{\text{Anzahl der Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der ausgezählten 16er - Felder der Zählkammer}}$$

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Dauerkulturen

Zum Einfrieren von viablen Zellen werden 1×10^7 Zellen aus der Kultur entnommen und zweimal mit sterilem $1 \times \text{PBS}$ gewaschen. Hierzu wird die Zellsuspension bei $400 \times g$ 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird auf Eis in 1,8 ml Einfriermedium (20% DMSO und 80% FCS) aufgenommen und in einem Einfriercontainer (Nalgene, Neerijse, Belgien) bei -80°C eingefroren. Hierdurch wird ein kontinuierliches Abkühlen von etwa $1^\circ\text{C}/\text{h}$ ermöglicht. Nach 24 h kann die Probe in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Für die erneute Kultivierung werden die Dauerkulturen zweimal in sterilem $1 \times \text{PBS}$ bei 4°C gewaschen, bevor sie in 37°C warmem Medium resuspendiert werden.

2.3.4 Separierung von viablen und toten Zellen

Die Zellsuspension wird 5 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml sterilem $1 \times \text{PBS}$ resuspendiert. 5 ml Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala Schweden) werden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und mit der Zellsuspension überschichtet. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei $500 \times g$ ohne Bremse können die viablen Zellen aus der Interphase entnommen werden.

2.3.5 Anti-CD30-IgG Stimulation der Zellen

Die Stimulation erfolgt über die Vernetzung des Zelloberflächen-Rezeptors CD30 mit an der Plastikoberfläche immobilisierten anti-CD30-IgG.

Die Petrischalen werden vor der Stimulation mit $1 \times \text{PBS}$ und $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ M44 (anti-CD30-IgG, Immunex, Seattle, Washington, USA) oder $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ HeFi (anti-CD30-IgG, NCI-Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, MD) für 12 h unter der Sterilbank lichtgeschützt inkubiert. Die Schalen werden drei Mal mit sterilem $1 \times \text{PBS}$ gewaschen und mit der Zellsuspension überschichtet. Die Zellsuspension enthält eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml, die in frischem Medium aufgenommen wurden. Nach der gewünschten Inkubationszeit werden die Zellen mit einem sterilen Plastischaber gelöst, und zweimal mit sterilem $1 \times \text{PBS}$ gewaschen und pelletiert. Die Lagerung der Zellpellets erfolgt bei -80°C .

2.3.6 ³H-Thymidinassay

Zur Proliferationsanalyse werden auf einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen (Nalgene Neerijse, Belgien) pro Ansatz 12 Vertiefungen mit anti-CD30 beschichtet (siehe 1.4.5). Jede beschichtete Vertiefung sowie die gleiche Anzahl an unbeschichteten Vertiefungen werden mit 200 µl einer $0,05 - 0,1 \times 10^6$ Zellen/ml Zellsuspension gefüllt und 8 – 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden pro Vertiefung 1 µl ³H-Thymidin (1 µCi/µl, Amersham, Braunschweig) in 25 µl Medium zugegeben. Mit dem Filtermate 196 Harvester (Packard, Groningen) werden die Platten nach 6 – 8 h Inkubation bei 37°C gespült und die markierte DNA auf die Filtermembran (Glass Fiber Filters, Packard, Groningen) aufgebracht. Anschließend wird die Membran getrocknet. Die radioaktiv markierte DNA wird in je 3 ml Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit (Packard, Groningen) aufgenommen. Mit Hilfe des Wallac 1410 Szintillationszähler (Pharmacia, Uppsala, Schweden) erfolgt die anschließende Messung.

2.3.7 Durchflußzytometrie (FACS)

Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgt mit einer Doppelfärbung mit 7AAD und Annexin V-PE.

Es werden 1×10^6 Zellen aus der Kultur entnommen und mit 1×PBS gewaschen (Zentrifugation 3 min, 400×g, Raumtemperatur). Das Zellpellet wird in 1 ml Annexin Bindungspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment erneut mit Annexin Bindungspuffer gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wird dann in 1 ml Annexin Bindungspuffer aufgenommen und mit 5 µl Annexin V-PE versetzt. Die Lösung inkubiert lichtgeschützt 15 min bei Raumtemperatur bevor zwei weitere Waschschrte mit Annexin Bindungspuffer durchgeführt werden. Nach dem zweiten Waschschrte wird das Sediment in 200 µl Bindungspuffer resuspendiert und mit 40 µl 7-Actinoaminomycin D (7AAD) versetzt. Die Inkubation erfolgt lichtgeschützt für 20 min bei 4°C. Vor der Messung wird die Lösung in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 200 – 400 µl Annexin Bindungspuffer verdünnt. Anschließend werden die Apotoseraten mit Hilfe des FACS Calibur Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Hierfür misst man mit der Cell Quest Software (Becton Dickinson, Heidelberg) 10000 Zellen pro Analyse. Durch einen Filter werden Zelltrümmer von der Zählung ausgeschlossen. Zur Berechnug der durch CD30 induzierten Apoptose (reale

0,02-0,1% Temed
Sammelgel: 5,1% PAA
12 mM Tris Base (pH 6,8)
0,1% SDS
0,1% APS
0,1% Temed

Nach dem Gießen wird das Trenngel mit 400µl Butanol überschichtet. Nach ca. 20 – 30 min ist das Gel polymerisiert und das Butanol wird verworfen. Daraufhin wird das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet.

Die Protein-Proben werden mit der entsprechenden Menge an Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert. Als Laufpuffer dient 1×Tris-Glycin-Elektrophorese-Puffer. Die Gelelektrophorese wird mit 80 V gestartet. Sobald die Proben ins Trenngel eingelaufen sind, wird die Spannung auf 120 – 140 V erhöht. Die Elektrophorese kann aber auch bei konstanten 35-45V über Nacht erfolgen.

2.4.3 Transfer von Proteinen durch Semidry Blotting

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine darstellen zu können, müssen sie auf eine Membran übertragen werden. Dieser Vorgang erfolgt, abhängig von der Proteingröße, durch Semidry oder Tank Blotting.

Der Transfer von Proteinen aus 10%-15%igen Gelen erfolgt mittels Semidry Blotting. Zu diesem Vorgang werden jeweils drei Chromatographie-Papiere in Anoden I-, Anoden II-, oder Kathoden-Puffer getränkt. Auf die Graphitoberfläche der Apparatur werden zunächst die mit Anoden II-Puffer und dann die Anoden I-Puffer getränkten Chromatographie-Papiere gestapelt. Darauf werden zuerst die in Methanol angefeuchtete Transfermembran und dann das Trenngel gelegt. Die oberste Schicht bilden die drei mit Kathoden-Puffer angefeuchteten Chromatographie-Papiere. Um für einen gleichmäßigen Transfer zu sorgen, dürfen sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befinden. Aus diesem Grund wird der Stapel mit einer Plastikpipette glattgerollt. Der Transfer erfolgt für 1h bei einer Stromstärke von 200 mA.

2.4.4 Transfer von Proteinen mittels Tank Blotting

Der Transfer von Proteinen, die über 80 kDa groß sind, erfolgt mittels Tank Blotting. Für diesen Vorgang wird Tank Blotting-Puffer verwendet. Die Chromatographie-Papiere werden

in Blotting-Puffer getränkt. Zwischen die Gitter der Halterung werden zuerst zwei Chromatographie-Papiere und dann die in Methanol getränkte Membran gelegt. Darauf werden das Trenngel und zwei weitere Chromatographie-Papiere geschichtet. Dieser Vorgang erfolgt in einer mit Blotting-Puffer gefüllten Wanne. Es dürfen sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befinden, da dies einen gleichmäßigen Transfer behindern würde. Geblottet wird bei einer Stromstärke von 1000 mA für 2 h. Aufgrund der Wärmeentwicklung muss eine konstante Kühlung erfolgen.

2.4.5 Amidoschwarz-Färbung der Transfermembran

Mit Amidoschwarz können die auf die Membran transferierten Proteine angefärbt werden. Die Transfermembran wird für 15 min in Amidoschwarz inkubiert und anschließend mit Amidoschwarz-Entfärbelösung entfärbt.

2.4.6 Antikörper-Markierung der Transfermembran

Die Inkubation der Transfermembran in einer Antikörperlösung dient der Detektion einzelner Proteine.

Um eine unspezifische Hintergrund-Markierung durch die verwendeten Antikörper zu reduzieren, wird die Transfermembran zunächst mit Milch-Proteinen geblockt. Dies erfolgt mit Blocking Puffer 1h bei Raumtemperatur oder 30 min bei 37°C oder bei 4°C über Nacht. Die verwendeten Antikörper werden in Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:10000 eingesetzt. Der Verdünnungsgrad ist abhängig von der Spezifität und der Konzentration der Antikörper. Die Antikörper werden in 1×PBS und 0,05% Tween verdünnt. Die Inkubation erfolgt auf einem Schüttler um eine gleichmäßige Benetzung der Transfermembran während der Inkubationszeit zu gewährleisten. Dieser Vorgang dauert bei Raumtemperatur 1 – 2 h oder über Nacht bei 4°C. Als Waschlösung wird 1×PBS und 0,05% - 0,2% Tween (PBST) verwendet. Während des ersten Waschvorgangs wird die Membran 1× ca. 5 min und 2× ca. 15 min mit PBST gewaschen. Die optimale Inkubationszeit sowie die Tween-Konzentration müssen für jeden Antikörper ausgetestet werden. Es folgt eine weitere Inkubation mit einem zweiten HRP (Horse-Radish-Peroxidase) gekoppelten Antikörper, der spezifisch gegen den FC-Anteil des Erstantikörpers gerichtet ist. Die Verdünnung des Zweitantikörpers beträgt 1:5000 bis 1:10000 und erfolgt wieder mit 1×PBS und 0,05% Tween. Die Inkubationszeit

entspricht der des Erstantikörpers. Der folgende Waschvorgang dauert 1× ca. 5 min und 3× ca. 15 min. Die Detektion erfolgt mit ECL-Lösung.

2.4.7 Entfernen von Antikörpern von der Transfermembran

Wenn eine Transfermembran mit weiteren Antikörpern der gleichen Tierart markiert werden soll, muss zuerst der zuvor verwendete Antikörper entfernt werden.

Die mit Methanol befeuchtete Membran wird 30 min bei 56°C in 1×Stripping-Puffer inkubiert. Die Membran wird kurz in 1×PBS + 0,05% Tween gewaschen. Vor erneuter Antikörper-Markierung wird die Membran in 1×PBS + 0,05% Tween + 5% Milchpulver geblockt, um eine unspezifische Hintergrund-Markierung zu reduzieren.

2.4.8 Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation von Proteinen

Mit spezifischen Antikörpern können durch Immunpräzipitation einzelne Proteine aus einem Zelllysat isoliert werden. Liegt das Protein als Komplex in der Zelle vor, so wird der ganze Komplex isoliert und man spricht von einer Koimmunpräzipitation.

Für die Immunpräzipitation und für die Koimmunpräzipitation werden jeweils 1×10^7 Zellen verwendet. Die Zellen werden in 1×PBS gewaschen und in 1 ml Lysispuffer II resuspendiert. Die Lyse erfolgt unter ständiger Rotation für 30 min bei 4°C. Die Probe wird anschließend für 15 min mit 10000×g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern erfolgt bei 4°C bei ständiger Rotation. Handelt es sich bei dem spezifischen Antikörper um einen monoklonalen Antikörper, inkubiert man das Lysat für 1 h. Nach Zugabe eines polyklonalen Zweitantikörpers erfolgt eine 3-stündige Inkubation. Die Inkubationszeit mit einem polyklonalen Erstantikörper beträgt 4h. Kontrollen werden mit einem unspezifischen Antikörper in gleicher Konzentration durchgeführt. Entsprechend dem spezifischen Antikörper muß der Kontroll-Antikörper polyklonalen oder monoklonalen Ursprungs sein. Anschließend werden 30 µl einer 75%-igen Protein A-Sepharose-Lösung zugegeben. Die Lysate werden 1h bei 4°C rotiert. Durch Zentrifugation (10000×g, 5 min, 4°C) wird der Immunkomplex von anderen Proteinen im Überstand getrennt. Das Sepharose-Pellet wird 3× mit Lysispuffer II gewaschen. Die präzipitierten Proteine werden in 10 µl Laemmli-Puffer

resuspendiert, bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.5 Statistik

Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen werden durch die jeweiligen Einzelwerte bzw. die Mittelwerte aus mehreren Experimenten dargestellt. Zur statistischen Analyse von Unterschieden zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen werden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Selbiges gilt für die Berechnung der Apoptoseraten.

3 Ergebnisse

3.1 CD30 und NPM-ALK Expression in ALCL Zelllinien

3.1.1 Untersuchung der CD30 Expression in Zelllinien mittels RT-PCR

Mittels RT-PCR wird die Expression des CD30 Zytokinrezeptors in sieben verschiedenen ALCL Zelllinien untersucht. Außerdem werden noch die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien HDLM-2, L428, KM-H2, HD-MY-Z, die Histiocytäre-Lymphom Zelllinie U937 und die Myelodysplastisches Syndrom Zelllinie MUTZ-1 analysiert.

Für die Synthese von cDNA werden je 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA Synthese wird zunächst eine β-Aktin PCR durchgeführt. Alle Zelllinien zeigen eine gleichmäßig starke Expression des 490 bp großen Amplifikationsproduktes (Abb. 3.1)

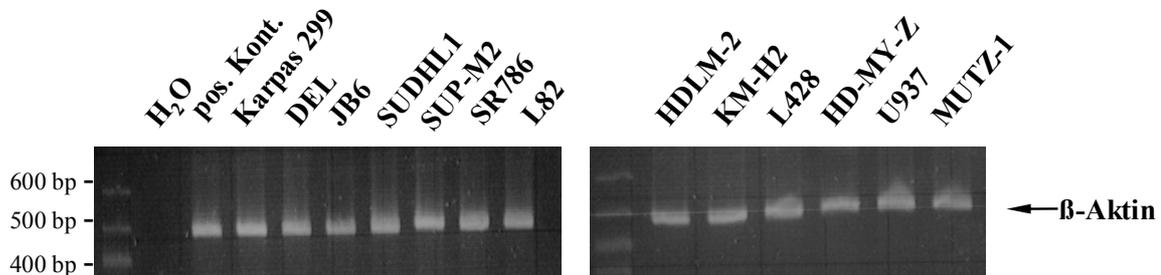


Abb. 3.1: Expression von β-Aktin in verschiedenen Zelllinien

Gesamt-RNA wird nach der Extraktion in definierten Mengen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die β-Aktin-PCR werden je 3 µl cDNA verwendet. Die Amplifikation erfolgt über 30 Zyklen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5%igen Agarose-Gel, zeigt das Amplifikationsprodukt die erwartete Größe von 490 bp. Als Größenstandard wird der 100 bp DNA-Marker benützt. Als Negativkontrolle dient H₂O. Die Positivkontrolle(BJAB) wird mit „pos. Kont.“ bezeichnet.

Unter Verwendung der CD30-Primer kann ein 290 bp Fragment amplifiziert werden. Für die Amplifikation werden ebenfalls 3 µl der synthetisierten cDNA verwendet. Alle ALCL zeigen eine deutliche Expression des CD30 Zytokinrezeptors. Bei den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien HDLM-2, L428 und KM-H2 sind ebenfalls starke Signale zu erkennen. CD30 wird dagegen

von HD-MY-Z und MUTZ-1 Zellen nur schwach exprimiert. U937 Zellen zeigen ein kaum erkennbares Signal (Abb. 3.2)

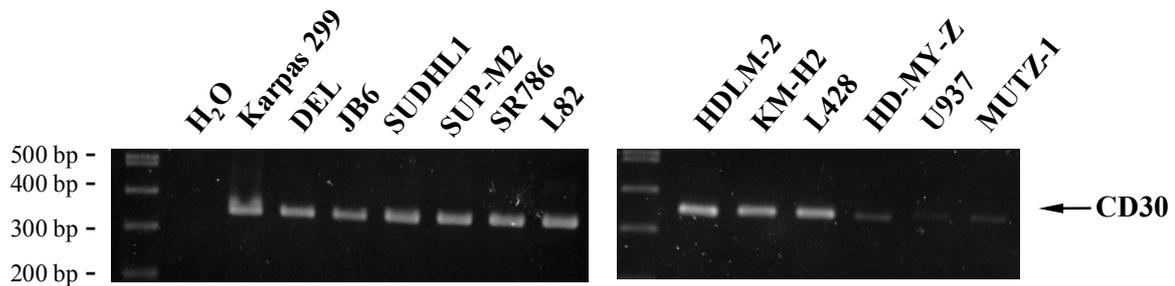


Abb. 3.2: Expression von CD30 in verschiedenen Zelllinien

Gesamt-RNA wird nach der Extraktion in definierten Mengen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die CD30-PCR werden 3 μ l cDNA verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2,5%igen Agarose-Gel, zeigt das Amplifikationsprodukt die erwartete Größe von 290 bp. Als Größenstandard wird der 100 bp DNA-Marker verwendet. Als Negativkontrolle dient H₂O.

3.1.2 Untersuchung verschiedener Zelllinien auf CD30 Expression mittels Western Blot Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Analyse ist eine quantitative Untersuchung der CD30 Expression möglich.

Je 1×10^7 Zellen werden in Lysispuffer I lysiert und die Proteinmenge nach Bradford bestimmt. Je 20 μ g Proteinlysate werden mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) elektrophoretisch aufgetrennt und mit anti-CD30-IgG markiert. Als Positivkontrolle wird eine CD30 Immunpräzipitation aus 1×10^7 Karpas 299 Zellen verwendet. Der CD30 Zytokinrezeptor wird von den ALCL unterschiedlich stark exprimiert. Der Rezeptor besitzt die erwartete Größe von 120 kDa. Die Zelllinien Karpas 299, DEL, JB6 und SR-786 zeigen ein deutlich stärkeres Signal als SUDHL-1, SUP-M2 und L82 Zellen. Die Hodgkin Lymphom Zelllinie HDLM-2 zeigt ebenfalls ein deutliches Signal. Bei den anderen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien kann nur ein sehr schwaches Signal nachgewiesen werden. Weder bei U937 noch bei MUTZ-1 Zellen wird ein Signal detektiert (Abb. 3.3 a).

Zur Kontrolle der Proteinladung wird sowohl eine Markierung der Membran mit anti-Aktin-IgG durchgeführt (Abb. 3.3 c) als auch eine Färbung mit Amidoschwarz (Daten nicht gezeigt). Beide Markierungen zeigen eine etwas geringere Proteinmenge bei SUDHL-1 und SUP-M2 Zellen. L82 Zellen dagegen zeigen sowohl im Western Blot mit anti-Aktin-IgG ein deutliches Signal als auch bei der Färbung mit Amidoschwarz. Die Markierung mit anti-Aktin-IgG zeigt eine fast gleichmäßige Ladung für die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Das

schwache Signal bei Markierung mit anti-CD30-IgG bei KM-H2, L428 und HD-MY-Z Zellen detektiert eine schwächere Expression des Rezeptors im Vergleich zu HDLM-2 Zellen.

3.1.3 Untersuchung verschiedener Zelllinien auf NPM-ALK Expression

Mittels Western Blot Analyse wird die NPM-ALK Expression verschiedener Zelllinien quantifiziert. Hierzu wird die gleiche Membran verwendet, die zur Untersuchung der CD30-Expression diente. Nach Entfernung der Antikörper wird die Membran mit anti-NPM-ALK-IgG inkubiert. Das erwartete Protein hat ein Größe von 80 kDa. Als Positivkontrolle dient eine NPM-ALK Immunpräzipitation mit Karpas 299 Zellen.

Das 80 kDa NPM-ALK-Protein wird in den untersuchten ALCL Zelllinien in unterschiedlicher Menge exprimiert. DEL und JB6 Zellen zeigen ein deutliches Signal. Die restlichen ALCL-Zelllinien exprimieren NPM-ALK nur schwach. Trotz deutlichem Signal bei Färbung mit Amidoschwarz und Markierung mit anti-Aktin-IgG exprimieren Karpas 299, SR786 und L82 Zellen NPM-ALK nur schwach. Die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, die Histiocytaire Lymphom Zelllinie und die Myelodysplastisches Syndrom Zelllinie exprimieren wie erwartet kein NPM-ALK (Abb. 3.3 b).

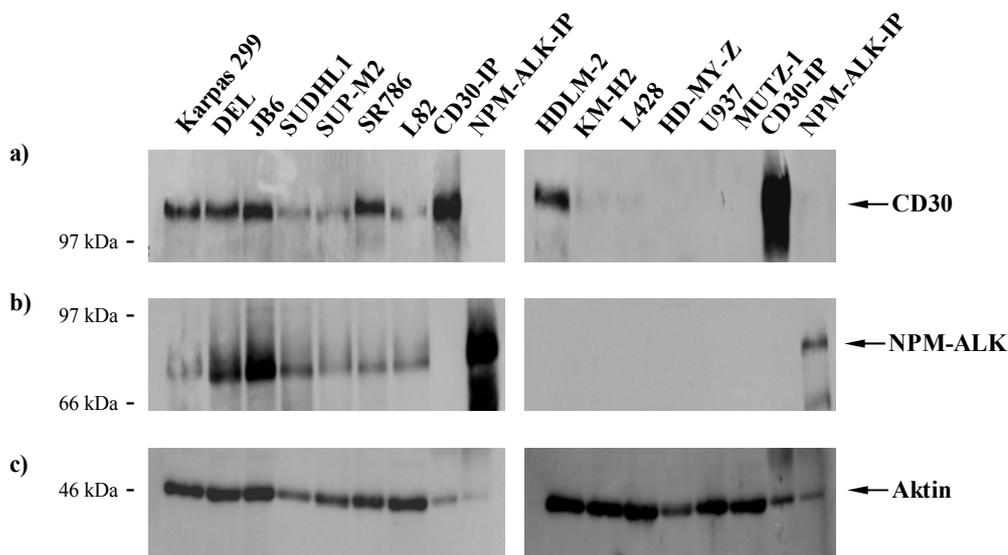


Abb. 3.3: Quantitative Analyse der CD30 und NPM-ALK Expression

Je 20 µg Zelllysat werden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. a) CD30 Expression: Antikörper: anti-CD30-IgG (1:500) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) b) NPM-ALK Expression: Antikörper: anti-NPM-ALK-IgG (1:2000) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) c) Aktin Expression: Antikörper: anti-Aktin-IgG (1:500) und anti-goat-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000)

3.2 Wachstumsverhalten verschiedener ALCL Zelllinien und der Hodgkin-Lymphom Zelllinie HDLM2 während CD30-Stimulation

Das Wachstumsverhalten von sieben CD30-positiven Zelllinien wird über einen Zeitraum von 72h analysiert. Als Kontrolle wird das Wachstumsverhalten der Zelllinien ohne Stimulation untersucht.

3.2.1 Untersuchung des Wachstumsverhalten mit Trypanblau Färbung

Je $0,5 \times 10^6$ Zellen werden über einen Zeitraum von 72h mit anti-CD30-IgG stimuliert und ihr Wachstumsverhalten mit dem von unstimulierten Zellen verglichen. Hierfür werden zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h und 72 h stimulierte und unstimulierte Zellen entnommen und mittels Trypanblaufärbung und Zählung in einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration bestimmt.

Alle Zelllinien wachsen ohne CD30-Stimulation exponentiell. Innerhalb von 72 h steigt die Zellkonzentration im Kulturmedium von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf etwa $1,4-2,0 \times 10^6$ Zellen/ml (Abb. 3.4).

Bei Karpas 299 Zellen wird ein antiproliferativer Effekt unter CD30-Stimulation beobachtet. Die Zellkonzentration steigt innerhalb des Versuchszeitraumes von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf nur etwa $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml im Vergleich zu 2×10^6 Zellen/ml bei unstimulierten Zellen (Abb. 3.4 a).

Ein antiproliferativer Effekt unter CD30-Stimulation wird auch bei der ALCL Zelllinie L82 beobachtet. Die Zellkonzentration beträgt nach 72 h $0,9 \times 10^6$ Zellen/ml. Im Gegensatz zu einer Konzentration von $1,7 \times 10^6$ Zellen/ml bei unstimulierten L82 Zellen (Abb. 3.4 f).

Das Wachstumsverhalten der ALCL Zelllinien DEL, JB6, SUDHL-1 und SR-786 sowie der Hodgkin-Lymphom Zelllinie HDLM2 wird durch die Stimulation mit CD30 wenig beeinflusst. Die Zelllinien wachsen auch unter Stimulation exponentiell. Geringfügige Unterschiede in der Zellkonzentration der stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind experimentell bedingt.

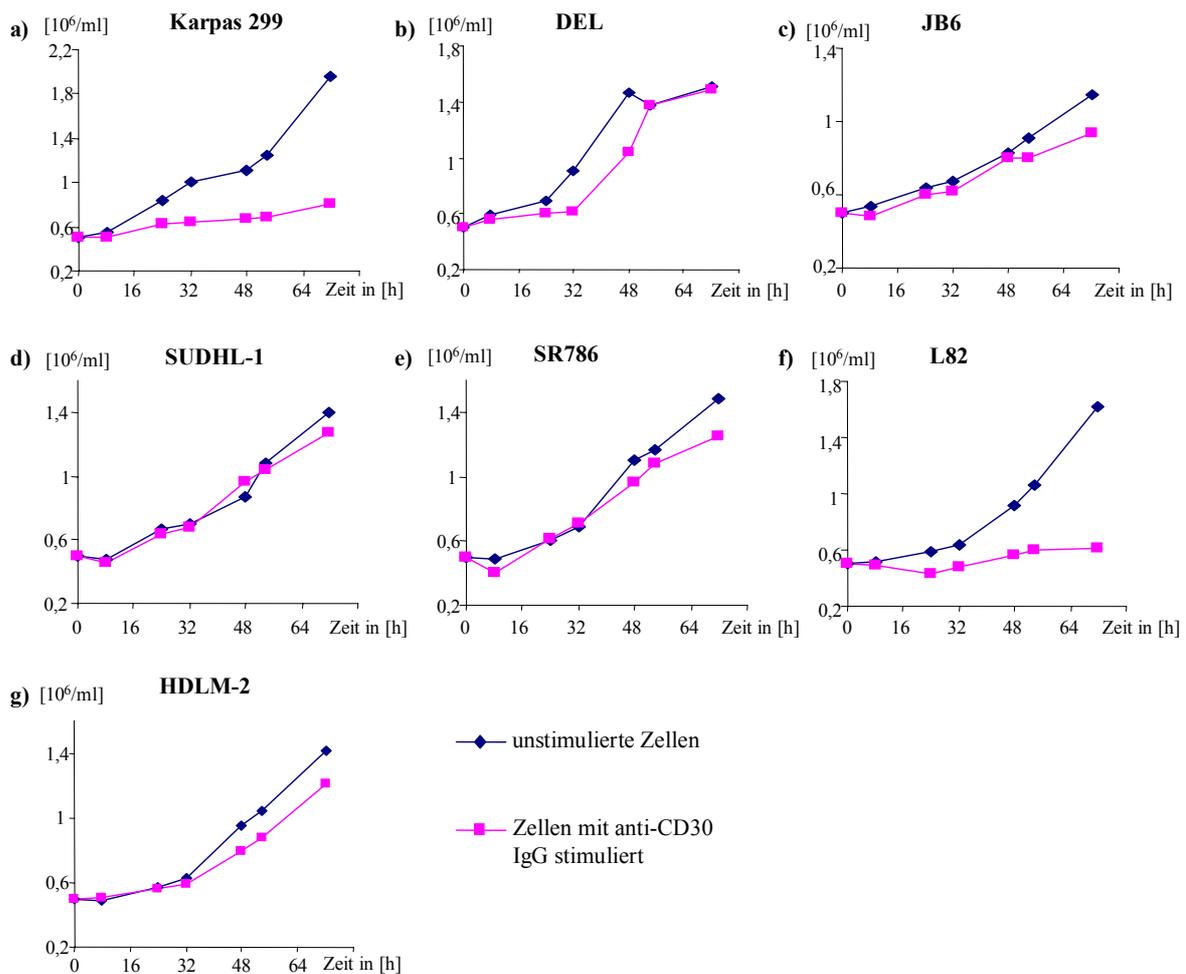


Abb. 3.4: Proliferation von Zelllinien mit und ohne CD30-Stimulation.

Je $0,5 \times 10^6$ Zellen werden über einen Zeitraum von 72 h mit anti-CD30-IgG stimuliert und mit nicht stimulierten Zellen im Wachstumsverhalten verglichen. Zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h und 72 h werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und die Zellkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Tote Zellen und Zelltrümmer werden durch die Färbung mit Trypanblau markiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen. a) Karpas 299 b) DEL c) JB6 d) SUDHL-1 e) SR786 f) L82 g) HDLM-2

3.2.2 Untersuchung des Wachstumsverhaltens mittels Thymidin-Assays

Für die Untersuchung werden je $0,01 \times 10^6$ Zellen für 8 h – 12 h mit anti-CD30 IgG inkubiert. Anschließend wird zu den stimulierten und den unstimulierten Zellen je $1 \mu\text{l}$ ^3H -Thymidin zugegeben. Nach 6 h – 8 h Inkubation erfolgt die Messung in je 3 ml Szintillationsflüssigkeit. Bei Karpas 299 Zellen wird ein ausgeprägter antiproliferativer Effekt beobachtet. Bei der Messung werden durchschnittlich bis zu 57% weniger Signale gemessen als bei unstimulierten Zellen.

Auch L82, JB6, SR786 und DEL zeigen einen antiproliferativen Effekt, der bei L82 sehr deutlich ausgeprägt ist. Die stimulierten L82 Zellen zeigen eine um 47% reduzierte Aktivität. Bei JB6, SR786 und DEL liegen die Aktivitäten der stimulierten Zellen 15%-42% tiefer als bei unstimulierten Zellen.

Die ALCL-Zelllinie SUDHL-1 und die Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 werden durch die Stimulation wenig beeinflusst (Abb. 3.5).

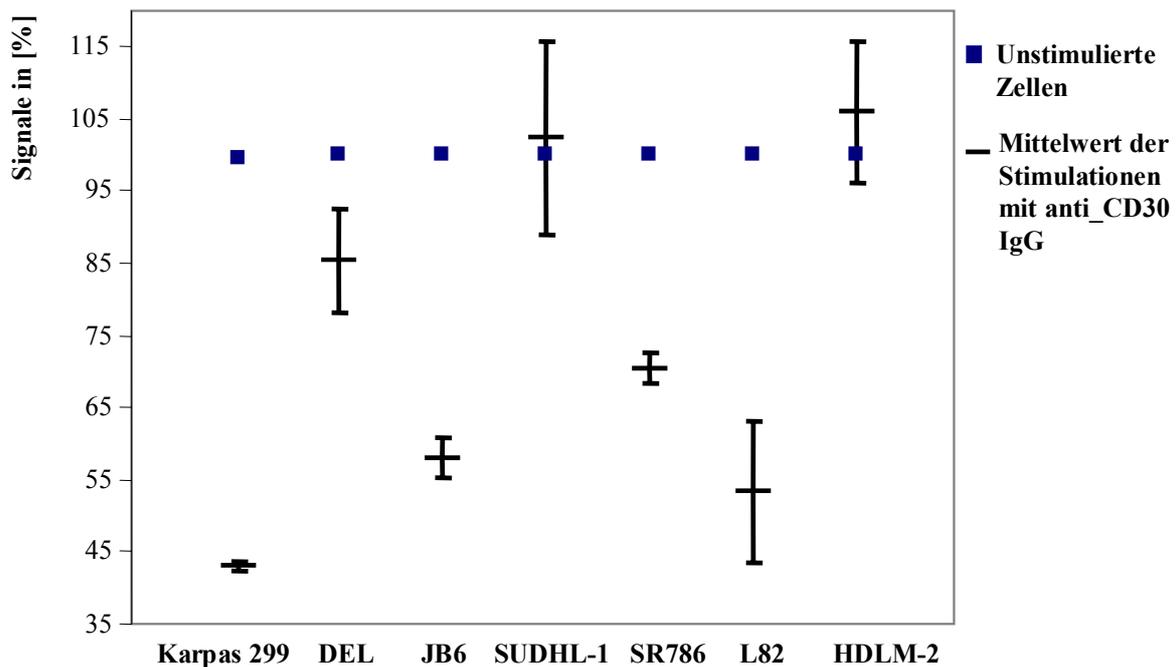


Abb. 3.5: Untersuchung des Wachstumverhaltens mittels Thymidinassay

Je $0,01 \times 10^6$ Zellen für 8 h – 12 h mit anti-CD30 IgG inkubiert. Anschließend werden zu den stimulierten und den unstimulierten Zellen $1 \mu\text{l}$ ^3H -Thymidin zugegeben. Nach 6 h – 8 h Inkubation erfolgt die Messung in je 3 ml Szintillationsflüssigkeit. Gezeigt werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 12 Messungen für die stimulierten und die unstimulierten Zellen.

3.3 Expression von Zellzyklus inhibierenden Proteinen unter CD30-Stimulation

3.3.1 Untersuchung der Expression von p16, p18, p19, p21 und p27 in verschiedenen Zelllinien mittels RT-PCR

Mittels RT-PCR wird die Expression von p16, p18, p19, p21 und p27 in sieben verschiedenen ALCL Zelllinien untersucht. Außerdem werden die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien HDLM-2,

L428, KM-H2, HD-MY-Z, die Histiocytäre-Lymphom Zelllinie U937 und die Myelodysplastische Syndrom Zelllinie MUTZ-1 untersucht.

Für die RT-PCR wird wieder die unter 3.1.1 beschriebene cDNA verwendet.

Mit den verwendeten Primern zeigen alle Zelllinien bei der Amplifikation mit 35 Zyklen gleichmäßig starke Signale. Die Amplifikationsprodukte besitzen die erwartete Größe von 200 bp (p16), 249 bp (p18), 265 bp (p19), 207 bp (p21) und 205 bp (p27) (Abb. 3.6). Das schwache Signal der MUTZ-1 Zellen unter Verwendung des p19 Primers ist nicht repräsentativ, da in weiteren Versuchen ein starkes Signal des Amplifikationsprodukts erzielt wurde (Daten nicht gezeigt).

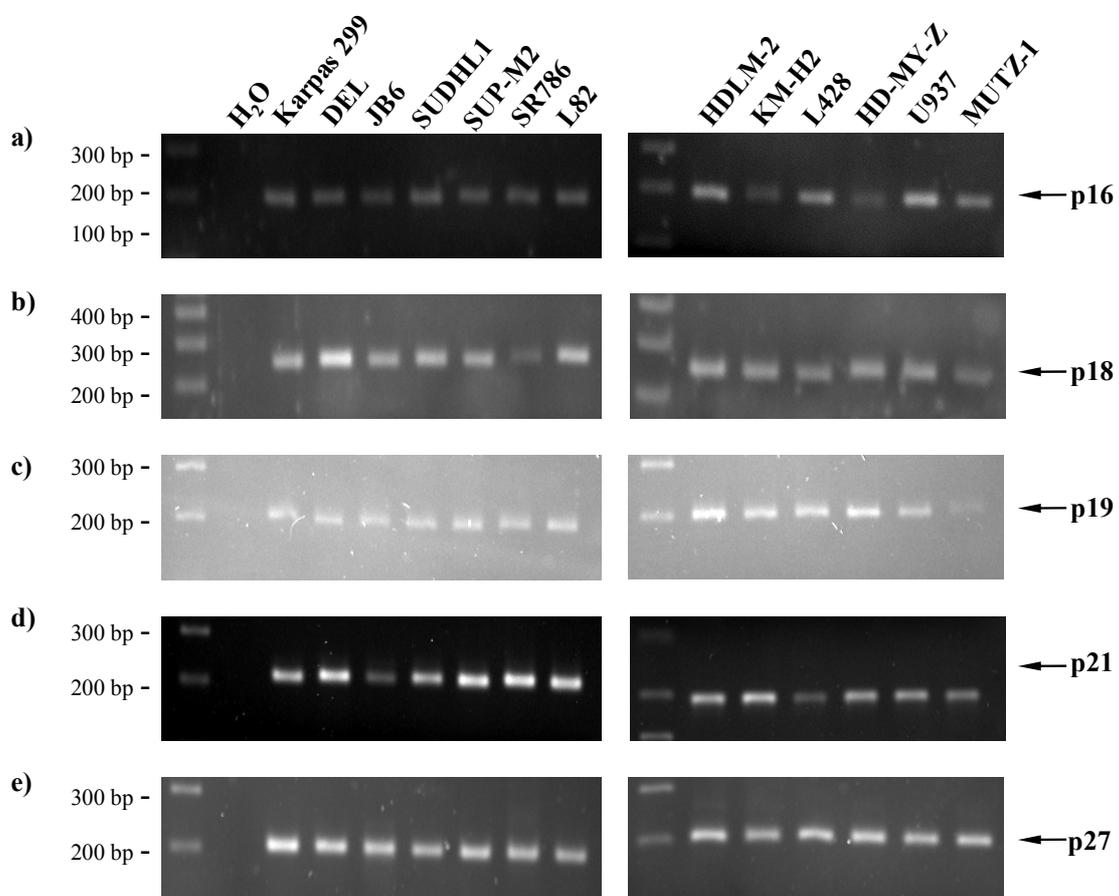


Abb. 3.6: Expression von p16, p18, p19, p21 und p27 in verschiedenen Zelllinien

Gesamt-RNA wird nach der Extraktion in definierten Mengen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die PCR werden 3 μ l cDNA verwendet. Die Amplifikation erfolgt über 35 Zyklen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2,5%igen Agarose-Gel, zeigen die Amplifikationsprodukte die Größen von: a) p16: 200 bp b) p18: 249 bp c) p19: 265 bp d) p21: 207 bp e) p27: 205 bp. Als Größenstandard wird der 100 bp DNA-Marker verwendet.

3.3.2 Untersuchung der Expression von p16, p21 und p27 in stimulierten Karpas 299 Zellen unter CD30-Stimulation mittels RT-PCR

Da sich die Stimulation von CD30 antiproliferativ auf das Wachstum von Karpas 299 Zellen auswirkt, wird die Expression von p16, p21 und p27 über einen Zeitraum von 32 h analysiert. Für die Analyse wird aus je 1×10^7 unstimulierten Zellen sowie 8 h und 32 h CD30 stimulierte Zellen Gesamt-RNA extrahiert und zur cDNA Synthese verwendet.

Zur Kontrolle der cDNA Synthese wird eine β -Aktin PCR mit 28 Zyklen durchgeführt. Das 490bp große Amplifikationsprodukt zeigt eine gleichmäßig Expression (Abb. 3.7 d).

Durch schrittweise Verminderung der PCR-Zyklen von 35 auf 28 wird versucht eine Regulation der Expression von p16, p21 und p27 zu detektieren. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen kann durch RT-PCR keine Regulation detektiert werden (Abb. 3.7).

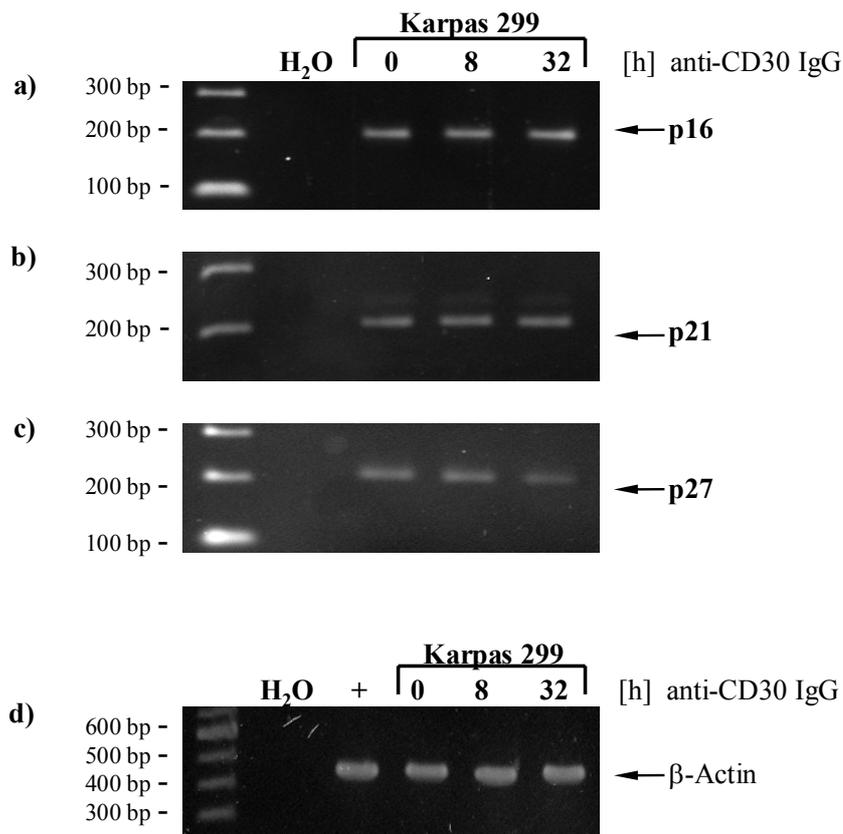


Abb. 3.7: Expression von p16, p21 und p27 in CD30 stimulierten Karpas 299 Zellen

Gesamt-RNA wird nach der Extraktion in definierten Mengen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die PCR werden 3 μ l cDNA verwendet. Die Amplifikation erfolgt über 28 Zyklen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2,5%igen Agarose-Gel, zeigen die Amplifikationsprodukte die Größen von: a) p16: 200 bp b) p21: 207 bp c) p27: 205 bp d) β -Aktin: 490 bp, Gel: 1,5% Agarose. Als Größenstandard wird der 100 bp DNA-Marker verwendet.

3.3.3 Quantitative Untersuchung der Expression von p16, p21 und p27 Protein in stimulierten Karpas 299 Zellen mittels Western Blot Analyse

Für die Analyse werden 1×10^7 Zellen jeweils 8 h und 32 h mit immobilisiertem anti-CD30-IgG stimuliert, lysiert und in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Markierung der Membranen erfolgt mit den entsprechenden Antikörper. Die Ladung des Blots mit gleichen Proteinmengen zu den einzelnen Zeitpunkten wird mit einer anti- β -Aktin Markierung der Membran gesichert (Abb. 3.8 d). Hierzu wird die Membran nach Entfernung der Antikörper mit anti- β -Aktin inkubiert.

In unstimulierten Karpas 299 Zellen ist in der Western Blot Analyse nur eine geringe Menge an p21 Protein nachweisbar. Auch nach einer 8-stündigen Stimulation mit anti-CD30-IgG ist

nur wenig p21 Protein detektierbar. Eine deutliche Vervielfachung der p21 Proteinmenge ist dagegen nach 32 Stunden Stimulation zu sehen (Abb. 3.8 a).

Die Stimulation von Karpas 299 Zellen mit CD30-IgG hat keinen mit Western Blot Analysen nachweisbaren Effekt auf die Expression von p16 und p27 Protein. Die Proteinmenge in den Zelllysaten bleibt über den Versuchszeitraum von 32 Stunden konstant.

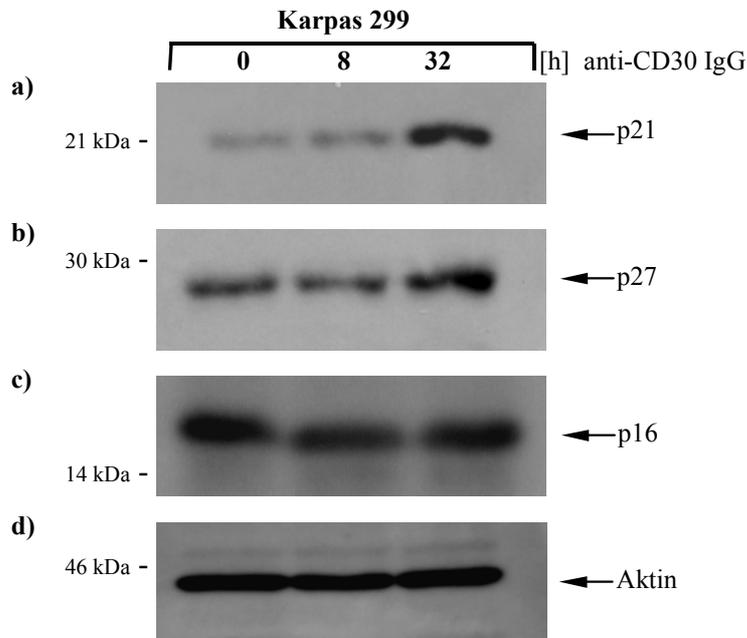


Abb. 3.8: Quantitative Analyse der Expression von p16, p21 und p27 Protein in stimulierten Karpas 299 Zellen

Je 20 µg Zelllysate von unstimulierten, 8 h und 32 h stimulierten Zellen wird in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Einsatz gleicher Proteinmengen pro Spur des SDS-Gels wird durch anti-β-Aktin Markierung überprüft. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. a) p21 Expression: Antikörper: anti-p21-IgG (1:500) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) b) p27 Expression: Antikörper: anti-p27-IgG (1:500) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) c) p16 Expression: Antikörper: anti-p16-IgG (1:2000) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) d) Aktin Expression: Antikörper: anti-Aktin-IgG (1:500) und anti-goat-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

3.3.4 Expression von p21 in DEL, JB6, SUDHL-1, SR-786, L82 und HDLM-2

Die p21 Protein Expression wird anschließend in weiteren CD30-positiven Zellen getestet. Die Zellen werden ebenfalls 8 h und 32 h mit immobilisiertem anti-CD30-IgG stimuliert und zur Western Blot Analyse verwendet.

Nach 32-stündiger Stimulation mit CD30 kann in den ALCL Zelllinien DEL und SR-786 kein Effekt auf die Expression von p21 nachgewiesen werden (Abb. 3.9. a). Die p21 Proteinmenge wird mit der von Karpas 299 Zellen, die 32 Stunden stimuliert wurden, verglichen. DEL und

SR-786 Zellen zeigen eine ähnlich starke p21 Expression wie 32h stimulierte und wachstumshinhibierte Karpas 299 Zellen.

Die p21 Protein ist in unstimulierten SUDHL-1 Zellen nachweisbar. Nach 8h und 32h stündiger Stimulation hat sich die p21 Proteinmenge um ein vielfaches verringert (Abb 3.9 c). Eine geringe Abnahme der CD30 Proteinmenge nach 32-stündiger Stimulation kann auch bei SR786 Zellen beobachtet werden (Abb. 3.9 d).

Bei L82 Zellen führt eine 8-stündige CD30-Stimulation zu einer deutlichen Zunahme des Signals im Vergleich zu unstimulierten L82 Zellen. Nach 32 Stunden nimmt die p21-Proteinmenge wieder ab (Abb. 3.9 e).

Die Ladung der Blots mit gleichen Proteinmengen zu den einzelnen Zeitpunkten wird durch die Markierung der Membran mit anti- β -Aktin-IgG gesichert.

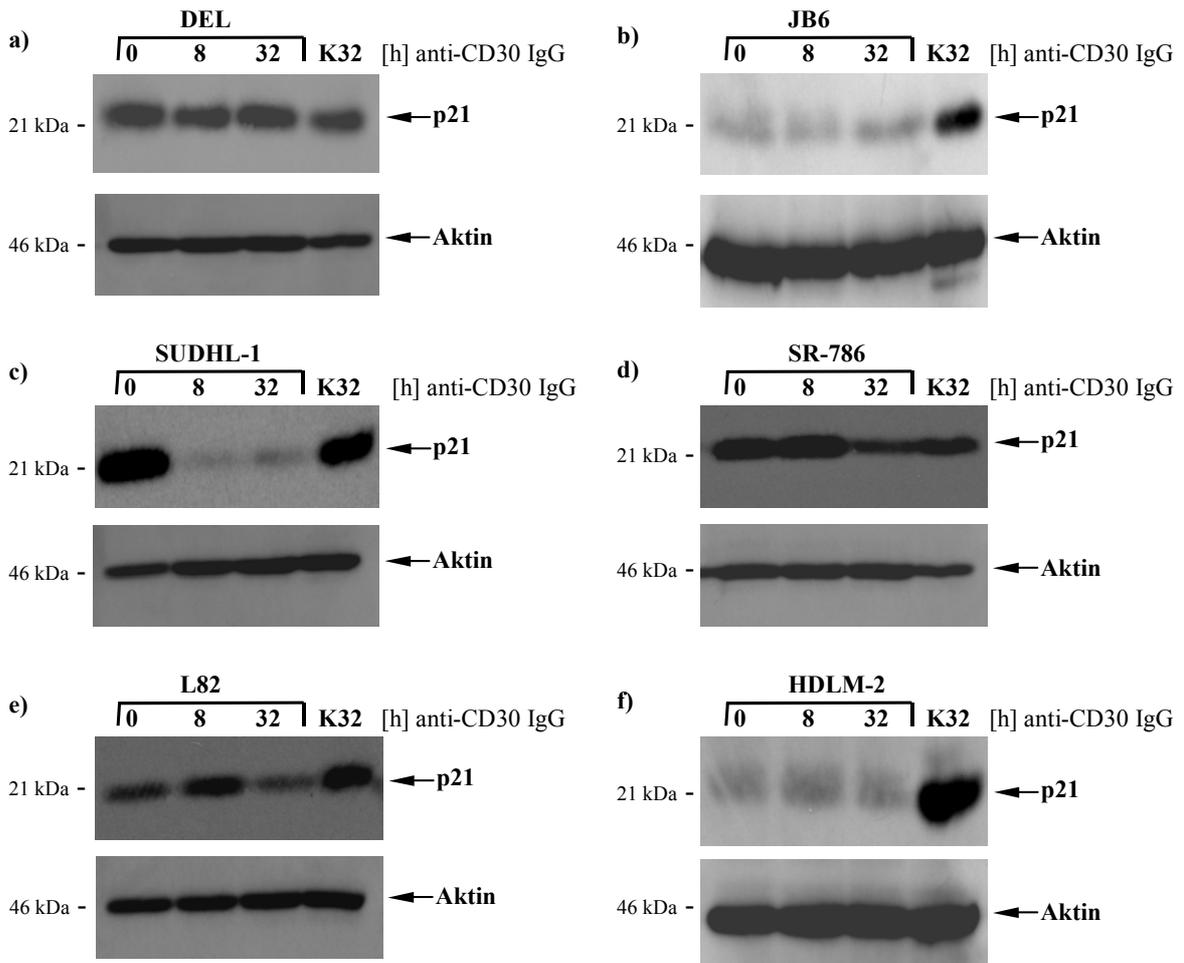


Abb. 3.9: Quantitative Analyse der Expression von p21 Protein in stimulierten DEL, JB6, SUDHL-1, SR-786, L82 und HDLM-2 Zellen

Je 20 µg Zelllysat von unstimulierten, 8 h und 32 h stimulierten Zellen werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wird mit anti-p21-IgG (1:500) inkubiert. Als Zweitantikörper wird ein anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) verwendet. Der Einsatz gleicher Proteinnengen pro Spur des SDS-Gels wird durch anti-β-Aktin Markierung überprüft. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. Karpas 299 Zellen die 32h mit anti-CD30 stimuliert wurden, werden mit K32. a) DEL b) JB6 c) SUDHL-1 d) SR786 e) L82 f) HDLM-2. abgekürzt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

3.4 Koimmunpräzipitation von PCNA3

Expression von PCNA3 in stimulierten Karpas 299 Zellen

Das p21 Protein wird unter CD30 Stimulation in Karpas 299 Zellen nach 32 h deutlich stärker exprimiert als in unstimulierten Zellen. Im Vergleich dazu findet keine Regulation von

PCNA3 unter CD30 Stimulation statt (Abb. 3.10 a). Die Proteinmenge bleibt während der 32-stündigen Stimulation gleich.

Die Ladung der Blots mit gleichen Proteinmengen zu den einzelnen Zeitpunkten wird durch die Markierung der selben Membran mit anti- β -Aktin-IgG gesichert (Daten nicht gezeigt).

3.4.1 Assoziation von p21 und PCNA3

Um die Interaktion zwischen p21 und PCNA3 in stimulierten und unstimulierten Karpas 299 Zellen zu untersuchen, wird eine Koimmunpräzipitation mit dem p21 Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle dient eine Koimmunpräzipitation mit einem Cyclin D3 Antikörper. Pro Präzipitat werden 1×10^7 Zellen von unstimulierten und 32 h stimulierten Karpas 299 Zellen verwendet. Die Proben werden in einer Western Blot Analyse auf präzipitiertes p21 und kopräzipitiertes PCNA3 untersucht. Bei Karpas 299 Zellen zeigt sich, wie erwartet, eine deutliche Zunahme der p21 Expression nach 32 h.

Bei 32 h stimulierten Karpas 299 Zellen ist ein deutliche Signal des kopräzipitierten PCNA Proteins detektierbar (Abb. 3.10 b).

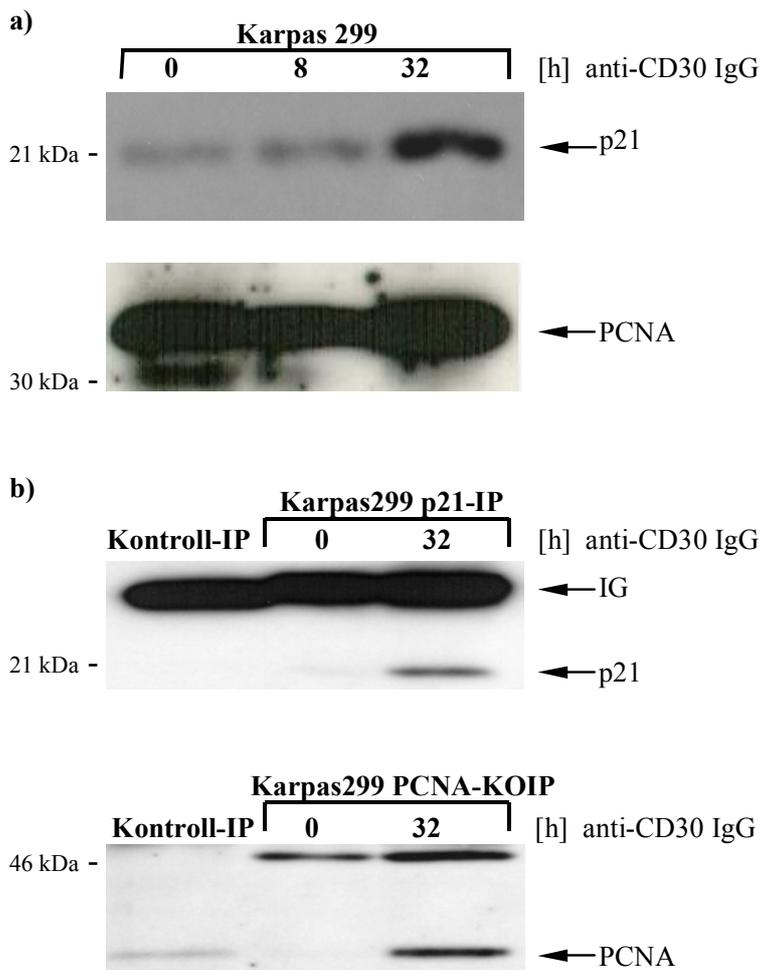


Abb. 3.10: Expression und Proteininteraktion von p21 und PCNA3 in stimulierten Karpas 299 Zellen

Je 20 μg Zelllysate von unstimulierten, 8 h und 32 h stimulierten Zellen werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wird mit anti-p21-IgG (1:500) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) sowie anti-PCNA3 (1:1000) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) inkubiert.

Je 1×10^7 unstimulierte und 32 h stimulierte Zellen werden für die Immunpräzipitation von p21 (p21-IP) und Koimmunpräzipitation von PCNA (PCNA-KOIP) verwendet. Die IP erfolgt mit 2 μg anti-p21 Antikörper. Als Kontrolle dient ein 2 μg anti-Cyclin D3 Antikörper. Das Zelllysate wird mit 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wird mit anti-p21-IgG (1:500) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) inkubiert. Die Detektion des kopräzipitierten PCNA Proteins erfolgt mit anti-PCNA3 (1:1000) und Protein A-HRP (1:10000). Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet.

3.5 CD30 vermittelte Apoptose in ALCL-Zelllinien

3.5.1 Messung der CD30-induzierten Apoptose durch FACS Analysen

Zur Messung der Apoptoserate wird bei unbehandelten und CD30-stimulierten Zellen eine Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-Actinoaminomycin D (7-AAD) durchgeführt (Abb. 3.11). Hierfür werden je 5×10^6 Zellen für 8 h, 32 h und 56 h mit immobilisiertem CD30-IgG inkubiert. Die Apoptoserate der stimulierten Zellen wird mit der Spontanapoptoserate von unstimulierten Zellen verglichen und die reale Apoptoserate nach der Formel von Friesen et al. (1996) berechnet. Sowohl in allen sechs ALCL-Zelllinien als auch in der Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 konnte keine signifikante Änderung der Apoptoserate durch CD30-Stimulation nachgewiesen werden. Die reale Apoptoserate in ALCL-Zelllinien reichte von –2,4% bis +7,0%, in der Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 von –2,4 bis +2,5% (Abb. 3.12).

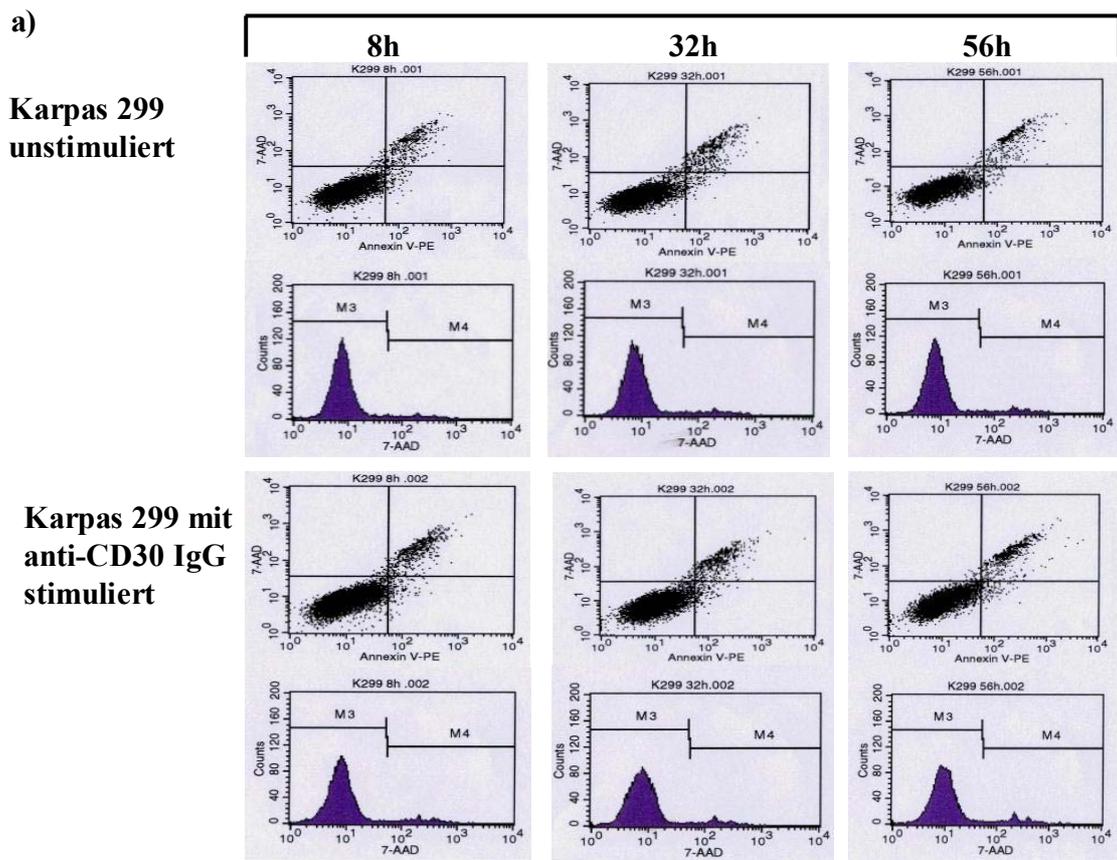


Abb. 3.11: FACS-Analyse der CD30-induzierten Apoptose durch CD30-Stimulation in ALCL und Hodgkin Lymphom Zellen

Je 5×10^6 Zellen werden für 8 h, 32 h und 56 h mit immobilisiertem CD30-IgG stimuliert. Die FACS-Analyse wird mit einer Annexin V-PE/7-AAD Doppelfärbung durchgeführt. Viable Zellen befinden sich in dem Bereich M3, apoptotische Zellen im Bereich M4 der 7-AAD Färbung. Früh- und spätapoptische Zellen gehören zum rechten unteren (7-AAD neg. und Annexin V-PE pos.) und rechten oberen (7-AAD pos. und Annexin V-PE pos.) Quadranten. Die reale Apoptoserate wird nach der Formel von Friesen et al. berechnet. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

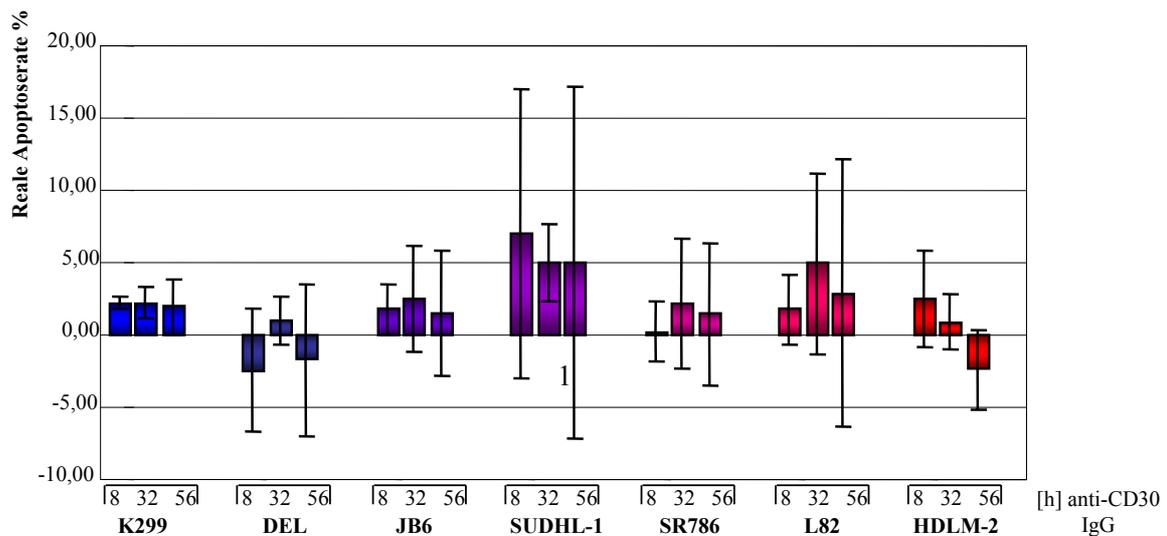


Abb. 3.12: Reale Apoptoserate in ALCL-Zelllinien und der Hodgkin-Zelllinie HDLM-2

Je 5×10^6 Zellen werden für 8 h, 32 h und 56 h mit immobilisiertem CD30-IgG stimuliert. Die FACS-Analyse wird mit einer Annexin V-PE/7-AAD Doppelfärbung durchgeführt. Mittelwerte der durch CD30-induzierten Apoptoserate aus drei unabhängigen Experimenten werden dargestellt. Zusätzlich ist die Standardabweichung eingetragen.

3.5.2 Aktivierung der Pro-Caspase-3 in ALCL-Zelllinien unter CD30 Stimulation

Sechs verschiedene ALCL-Zelllinien und die Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 werden mit immobilisiertem anti-CD30-IgG 8 h und 32 h stimuliert und zur Western-Blot Analyse verwendet.

Mit dem anti-Caspase-3 Antikörper kann sowohl das 33 kDA große Proenzym als auch die 20 kDA große, aktive Untereinheit erkannt werden. Durch die Stimulation kommt es zu keiner Aktivierung des Caspase-3-Proenzym.

Als Positivkontrolle dienen Karpas 299 Zellen, die 24 h lang mit $7,5 \mu\text{g/ml}$ Etoposid behandelt werden. Diese apoptotischen Zellen zeigen ein deutlich stärkeres Signal der p20 Untereinheit (Abb. 3.13).

Die Ladung der Blots mit gleichen Proteinmengen zu den einzelnen Zeitpunkten wird durch der Markierung der Membran mit anti- β -Aktin-IgG gesichert.

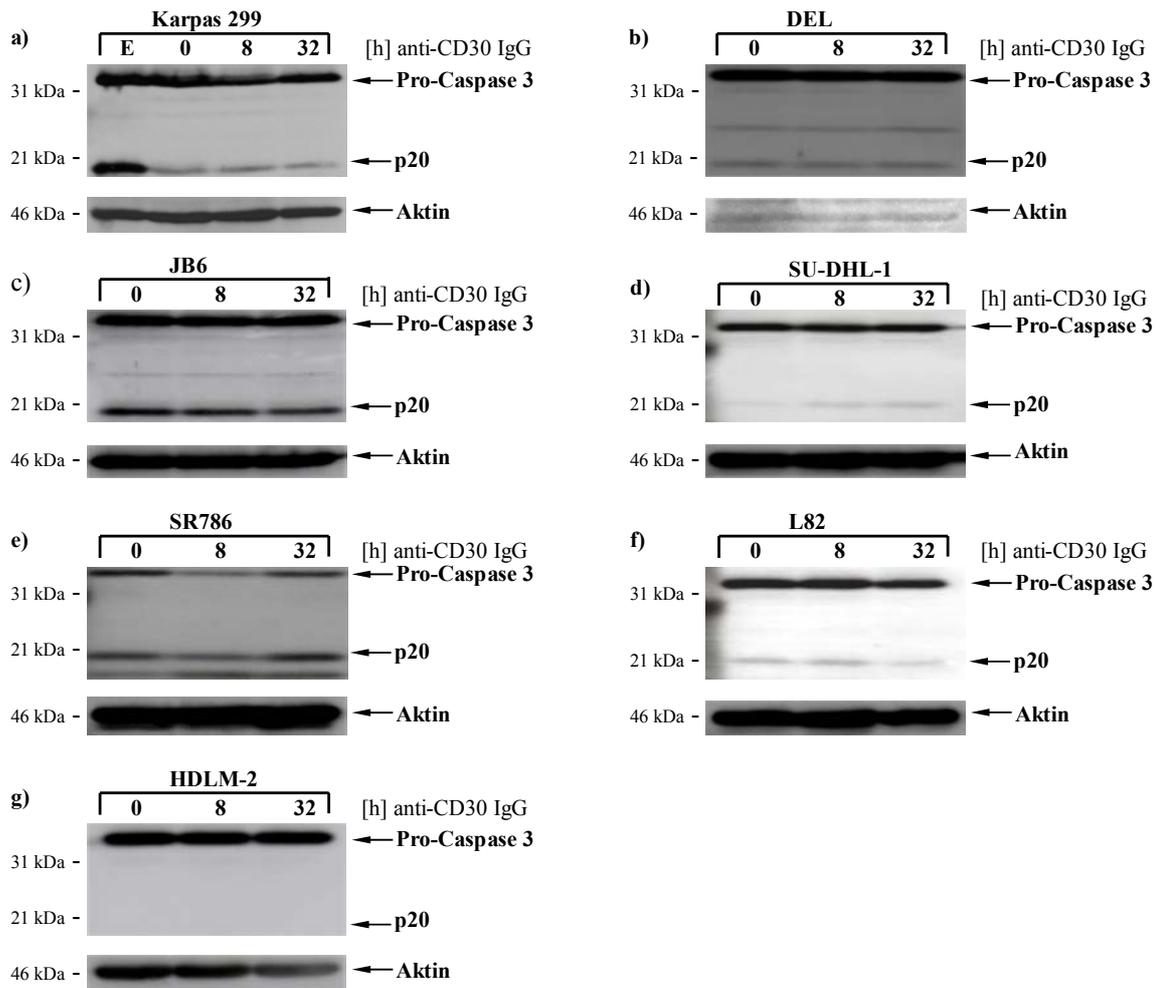


Abb. 3.13: Aktivierung der Pro-Caspase-3 in ALCL-Zelllinien unter CD30 Stimulation

Je 20 μ g Zelllysat von unstimulierten, 8 h und 32 h stimulierten Zellen werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle (in der Abbildung mit «E» bezeichnet werden Karpas 299 Zellen mit 7,5 μ g/ml Etoposid über 24h inkubiert. Die Membran wird mit anti-Caspase-3-IgG (1:500) inkubiert. Als Zweitantikörper wird ein anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) verwendet. Der Einsatz gleicher Proteinmengen pro Spur des SDS-Gels wird durch anti- β -Aktin Markierung überprüft. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. a) Karpas 299 b) DEL c) JB6 d) SUDHL-1 e) SR786 f) L82 g) HDLM-2.

3.6 Expression von Apoptose inhibierenden Proteinen in ALCL-Zelllinien

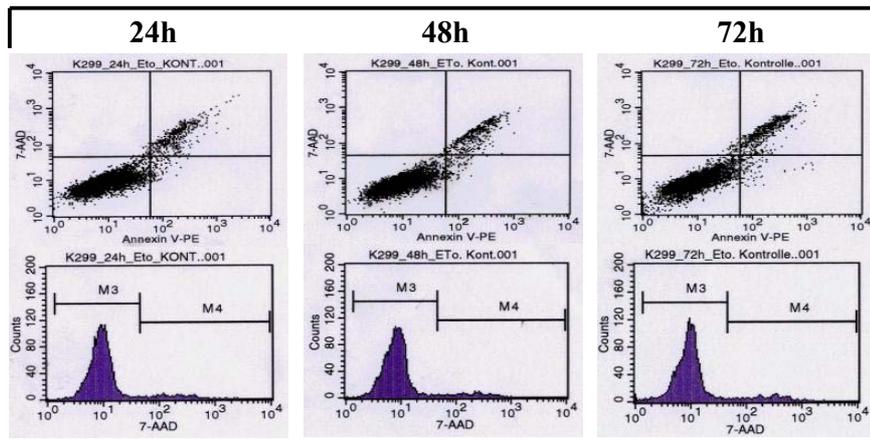
3.6.1 CD30-Stimulation als Schutz vor Etoposid-induzierter Apoptose in Karpas 299 Zellen

Karpas 299 Zellen werden 24h bis 72h mit Etoposid in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die medikamenten-induzierte Apoptoserate wird mittels FACS-Analyse nach einer Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD bestimmt. Die Apoptoserate zeigt eine Dosis-

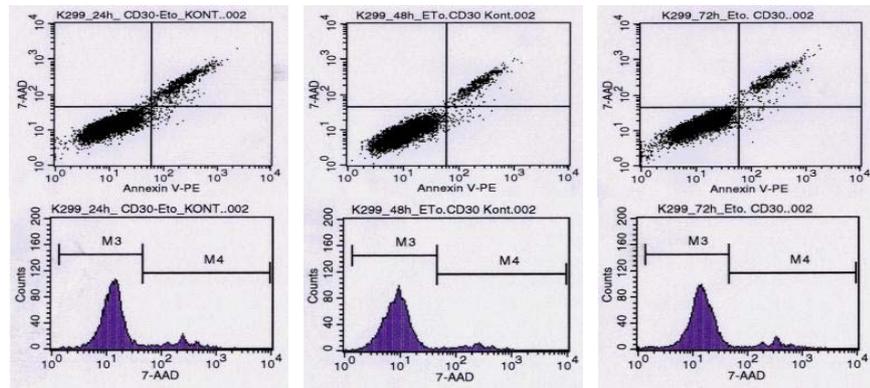
und Zeitabhängigkeit (Daten nicht gezeigt). CD30-stimulierte und unstimulierte Zellen werden dann mit 15µg/ml Etoposid für 72h behandelt. Während Karpas 299 Zellen, die nur mit immobilisiertem anti-CD30 Antikörper stimuliert werden, im Vergleich zu nicht behandelten Karpas 299 Zellen keine Zunahme der Apoptoserate zeigen, ist die Apoptoserate in Karpas 299 Zellen, die mit Etoposid behandelt werden, deutlich erhöht. Bei Karpas 299 Zellen, die gleichzeitig mit anti-CD30 Antikörper stimuliert werden und mit Etoposid behandelt werden, ist die Apoptoserate deutlich geringer erhöht als bei Karpas 299 Zellen, die nur mit Etoposid behandelt wurden. In Abb. 3.14 b werden die Apoptoseraten aus 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Im Durchschnitt wird die Etoposid-induzierte Apoptoserate durch CD30-Aktivierung um bis zu 45% reduziert. Ähnliche Ergebnisse werden mit Etoposidkonzentrationen zwischen 5 µg/ml und 20 µg/ml erzielt (Daten nicht gezeigt).

a)

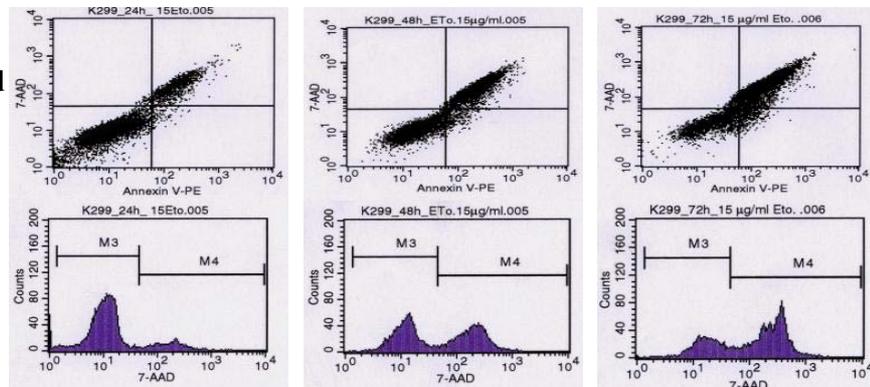
**Karpas 299
unstimuliert**



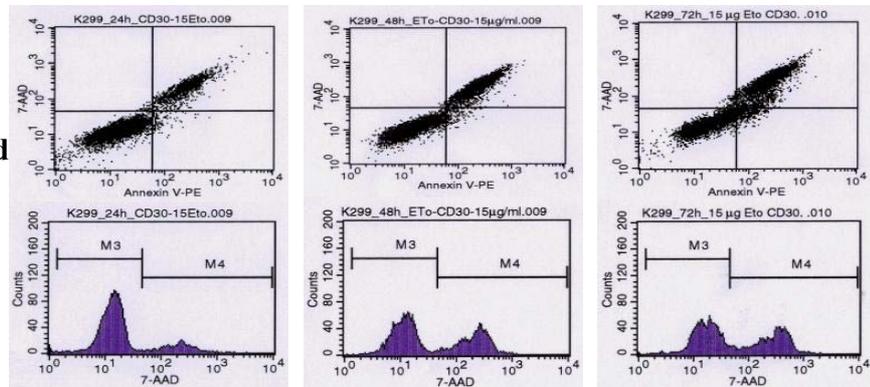
**Karpas 299 mit
anti-CD30 IgG
stimuliert**



**Karpas299 mit
15µg/ml Etoposid**



**Karpas299 mit
anti-CD30 IgG
stimuliert und
15µg/ml Etoposid**



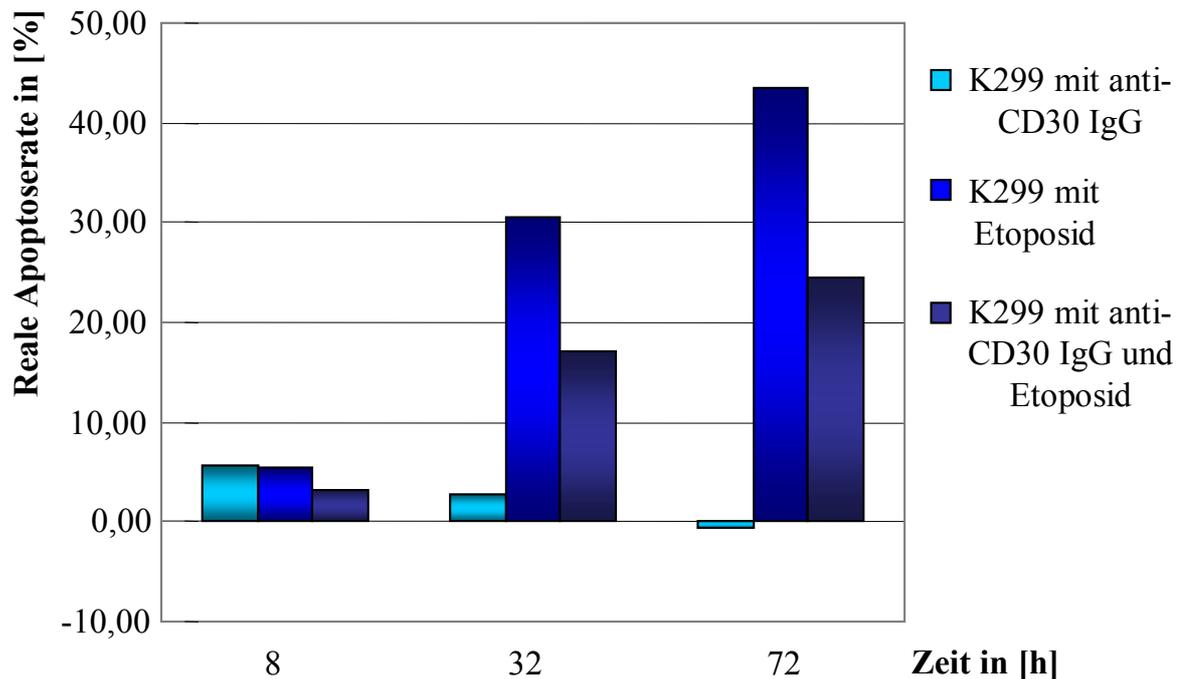


Abb. 3.14: Verminderte Etoposid-induzierte Apoptose durch CD30-Stimulation in Karpas 299 Zellen

Karpas 299 Zellen werden 72 h entweder mit anti-CD30 Antikörper oder 15 µg/ml Etoposid oder mit anti-CD30 Antikörper und 15 µg/ml Etoposid inkubiert.

Die FACS-Analyse wird nach 24 h, 48 h und 72 h mittels Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD durchgeführt. Viable Zellen befinden sich in dem Bereich M3, apoptotische Zellen im Bereich M4 der 7-AAD Färbung. Früh- und spätapoptotische Zellen gehören zum rechten unteren (7-AAD neg. und Annexin V-PE pos.) und rechten oberen (7-AAD pos. und Annexin V-PE pos.) Quadranten.

Die reale Apoptoserate wird nach der Formel von Friesen et al. 1996 berechnet. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

3.6.2 Untersuchung der Expression von IAP1, IAP2, XIAP und Survivin mittels RT-PCR

Die Expression von IAP1, IAP2, XIAP und Survivin wird in sieben verschiedenen ALCL Zelllinien untersucht. Außerdem werden die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien HDLM-2, L428, KM-H2, HD-MY-Z, die Histiocytaire-Lymphom Zelllinie U937 und die Myelodysplastisches Syndrom Zelllinie MUTZ-1 analysiert.

Für die RT-PCR wird die unter 3.1.1 beschriebene cDNA verwendet.

Mit den verwendeten Primern zeigen alle Zelllinien bei der Amplifikation mit 35 Zyklen gleichmäßig starke Signale. Die Amplifikationsprodukte besitzen die erwartete Größe von 301 bp, 196 bp, 409 bp, und 248 bp. Das schwache Signal der JB6 Zellen in Abb. 3.15 a ist

nicht repräsentativ, da in weiteren Versuche ein starkes Signal des Amplifikationsprodukt erzielt wurde (Daten nicht gezeigt).

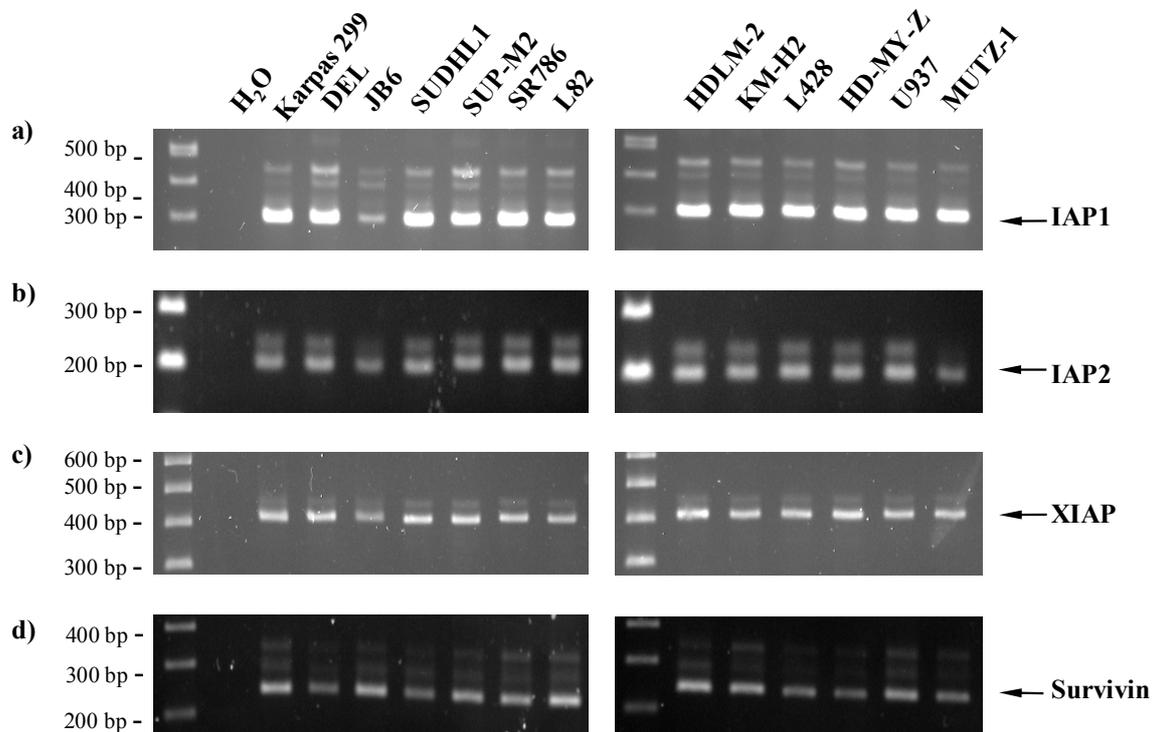


Abb. 3.15: Expression von IAP1, IAP2, XIAP und Survivin in verschiedenen Zelllinien

Gesamt-RNA wird nach der Extraktion in definierten Mengen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die PCR werden 3 μ l cDNA verwendet. Die Amplifikation erfolgt über 35 Zyklen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2,5%igen Agarose-Gel, zeigen die Amplifikationsprodukte die Größen von: a) IAP1: 301 bp b) IAP2: 196 bp c) XIAP: 409 bp d) Survivin: 248 bp. Als Größenstandard wird der 100 bp DNA-Marker verwendet

3.6.3 Untersuchung der Expression von IAP1, IAP2, XIAP und Survivin in CD30-stimulierten Karpas 299 Zellen mittels RT-PCR

Für die Analyse wird die unter 3.3.2 verwendete Gesamt-RNA benützt.

Zur Kontrolle der cDNA Synthese wird eine β -Aktin PCR mit 28 Zyklen durchgeführt. Das 490 bp große Amplifikationsprodukt zeigt eine gleichmäßig Expression (Abb 3.16 b).

Durch schrittweise Verminderung der PCR-Zyklen von 35 auf 28 wird versucht eine Regelung der Expression von IAP1, IAP2, XIAP und Survivin zu detektieren. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen kann durch RT-PCR für IAP1, XIAP und Survivin keine Regulation detektiert werden. Bei IAP2 ist eine leichte Hochregulation zu erkennen (Abb. 3.16 a).

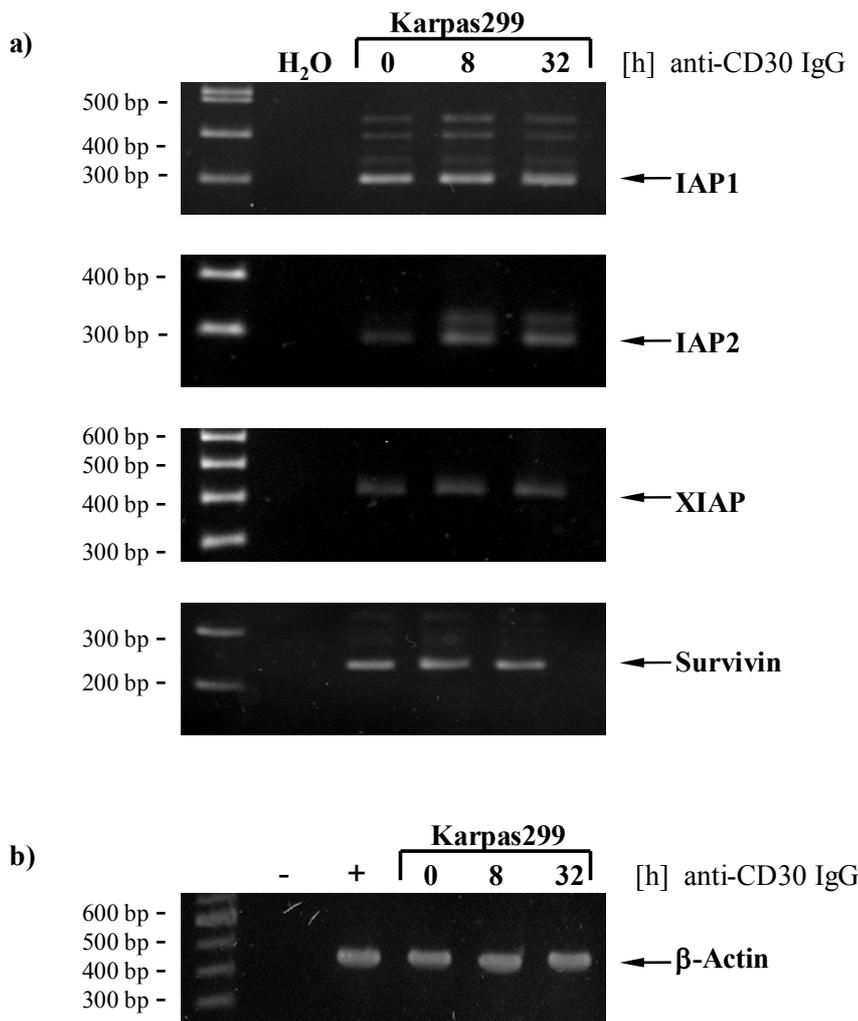


Abb. 3.16: Expression von IAP1, IAP2, XIAP und Survivin in CD30 stimulierten Karpas 299 Zellen.

Gesamt-RNA wird nach der Extraktion in definierten Mengen für die cDNA-Synthese eingesetzt. Für die PCR werden 3 μ l cDNA verwendet. Die Amplifikation erfolgt über 28 Zyklen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 2,5%igen Agarose-Gel, zeigen die Amplifikationsprodukte die Größen von: a) IAP1: 301 bp IAP2: 196 bp XIAP: 409 bp Survivin: 248 bp. b) β -Aktin: 490 bp, Gel: 1,5% Agarose. Als Größenstandard wird der 100 bp DNA-Marker verwendet. Für die Negativkontrolle «-» wird H₂O verwendet. Die Positivkontrolle wird mit «+» bezeichnet.

3.6.4 Quantitative Untersuchung der Expression von IAP2 Protein in stimulierten Karpas 299 mittels Western Blot Analyse

Für die Untersuchung der IAP2 Expression wird das Proteinlysate von unstimulierten sowie 8 h und 32 h stimulierten Karpas 299 Zellen in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch

aufgetrennt. Die Ladung gleichmäßige Proteinladung des Blots zu den einzelnen Zeitpunkten wird durch eine anti- β -Aktin Markierung der Membran gesichert (Abb. 3.17 b).

In unstimulierten Karpas 299 Zellen wird nur eine geringe Menge an IAP2 Protein exprimiert. Nach einer 8-stündigen Stimulation mit anti-CD30-IgG ist deutlich mehr IAP2 Protein detektierbar. Eine erhebliche Zunahme der IAP2 Proteinmenge ist nach 32-stündiger Stimulation zu sehen (Abb. 3.17 a).

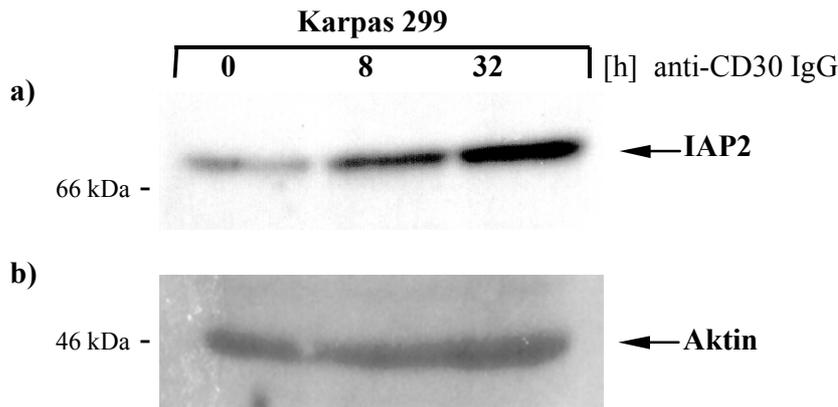


Abb. 3.17: Quantitative Analyse der IAP2 Proteinexpression in stimulierten Karpas 299 Zellen

Je 20 μ g Zelllysate von unstimulierten, 8h und 32h stimulierten Zellen werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Einsatz gleicher Proteinmengen pro Spur des SDS-Gels wird durch anti- β -Aktin Markierung überprüft. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. a) IAP2 Expression: Antikörper: anti-IAP2-IgG (1:1000) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) b) Aktin Expression: Antikörper: anti-Aktin-IgG (1:500) und anti-goat-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000).

3.6.5 Aktivierung von NF κ B durch CD30-Stimulation in Karpas 299 Zellen

Karpas 299 Zellen werden über Nacht in Kulturmedium mit 0,5% FCS inkubiert und dann für 0 min bis 120 min mit immobilisiertem anti-CD30-Antikörper stimuliert. Um phosphoryliertes I κ B α (Ser32) Protein, den Inhibitor von NF κ B, nachzuweisen, wird ein phospho-spezifischer Antikörper benützt. In unstimulierten Zellen ist die Menge an phosphoryliertem I κ B α gering. Die Menge an Ser32-phosphoryliertem I κ B α nimmt nach 15- und 30-minütiger Stimulation mit anti-CD30-Antikörper stark zu und fällt nach 60- und 120-minütiger Stimulation wieder ab (Abb. 3.18 a). Gleichzeitig wird die Expression von I κ B α mit einem Antikörper, der I κ B α unabhängig vom Phosphorylierungsstatus erkennt, analysiert (Abb. 3.18 b). Unter CD30-Stimulation nimmt die Menge an I κ B α Protein deutlich ab.

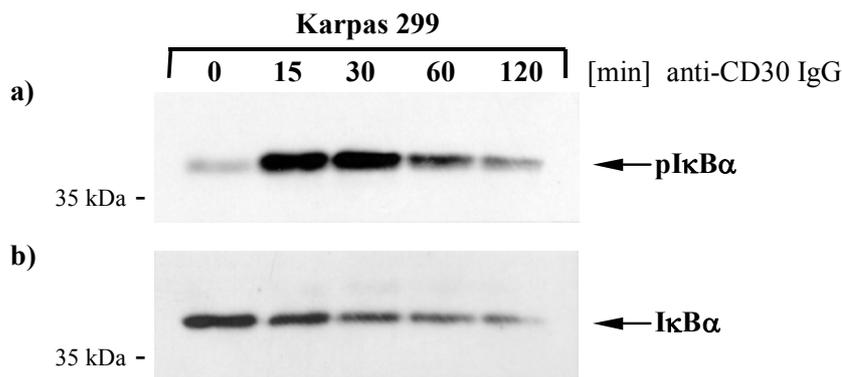


Abb. 3.18: Aktivierung von NFκB in CD30-stimulierten Karpas 299 Zellen

Karpas 299 Zellen werden in Kulturmedium, das 0,5% FCS enthält, über Nacht gehungert und anschließend 0 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min mit immobilisiertem anti-CD30-Antikörper stimuliert. Je 20 µg des Zelllysats werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wird mit a) anti-p-IκBα (1:1000) inkubiert. Als Zweitantikörper wird ein anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) verwendet. Anschließend wird der Antikörper entfernt und die Membran mit b) anti-IκBα (1:1000) inkubiert. Als Zweitantikörper wird ein anti-rabbit-IgG Antikörper (HRP-gekoppelt, 1:5000) verwendet. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet.

3.6.6 Inhibition von NFκB in Karpas 299 Zellen

Um zu analysieren, ob die antiapoptotischen Effekte unter CD30 Stimulation über den NFκB-Signalweg laufen, werden Karpas 299 Zellen mit dem NFκB-Inhibitor PG490 (Pharmagenesis, Palo Alto, CA, USA) behandelt. Karpas 299 werden entweder mit CD30 oder PG490 oder mit CD30 und PG490 inkubiert. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgt zum Zeitpunkt 8 h mittels Annexin V-Pe / 7-AAD Doppelfärbung. Wie erwartet wird bei Karpas-Zellen, die 8 h mit CD30 stimuliert werden keine Apoptose induziert. Die Inkubation mit 20 ng/ml PG490 führt nach 8 h zu einer Apoptoserate von ca. 19%. Wenn NFκB inhibiert wird, führt eine Stimulation mit anti-CD30-IgG bei den Karpas 299 Zellen zu einer Apoptoserate von ungefähr 38% (Abb. 3.19)

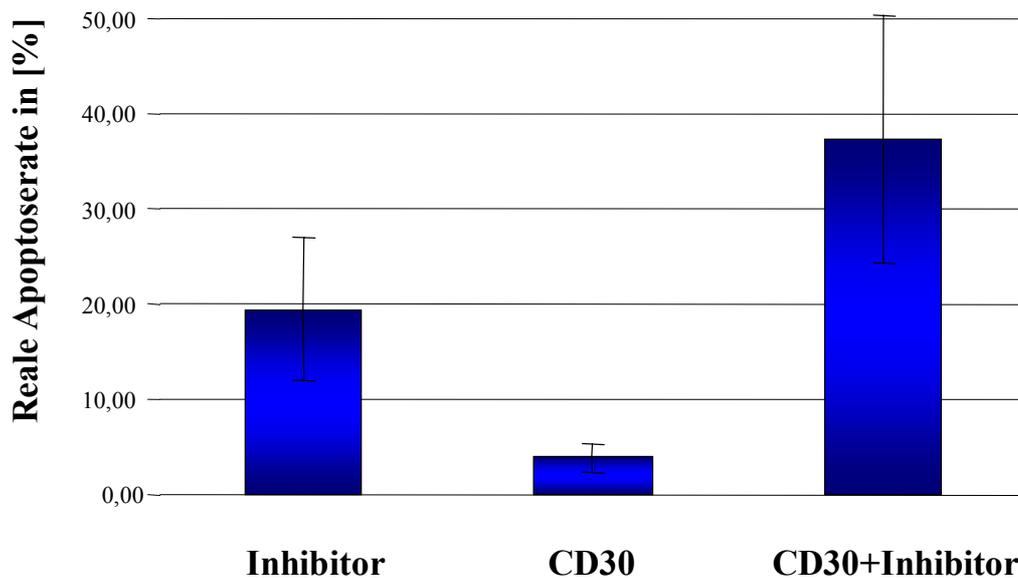


Abb. 1.19: Inhibition von NF κ B in stimulierten Karpas 299 Zellen

Karpas 299 Zellen werden entweder mit anti-CD30-IgG, PG490 oder anti-CD30 und PG490 stimuliert. Die FACS-Analyse wird nach 8h mittels Doppelfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD durchgeführt. Die reale Apoptoserate wird nach der Formel von Friesen et al. 1996 berechnet. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

3.7 Aktivierung von MAP Kinasen in Karpas 299 Zellen in Abhängigkeit von der CD30 Stimulation

3.7.1 p38 MAP Kinase Aktivität in CD30 stimulierten Karpas 299 Zellen

Karpas 299 Zellen werden über Nacht in Kulturmedium, das 0,5% FCS enthält, inkubiert und anschließend 0min bis 120min mit immobilisiertem anti-CD30-Antikörper stimuliert. Die Zellen werden mit Lysispuffer III, der Orthovanadat enthält, lysiert um die zellulären Phosphatasen zu inhibieren. Das Zelllysate wird in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Western Blot Analyse werden ein phospho-spezifischer Antikörper, der nur die phosphorylierte und somit aktivierte p-p38 MAP-Kinase erkennt, und ein Antikörper, der die p38 MAP Kinase unabhängig von der Phosphorylierung erkennt, verwendet.

In unstimulierten Karpas 299 Zellen kann nur eine sehr geringe Menge an phosphorylierter p38 (p-p38) MAP Kinase nachgewiesen werden. Nach 15-minütiger Stimulation nimmt die Menge an p-p38 MAP Kinase deutlich zu und nimmt nach 120 minütiger Stimulation wieder ab (Abb. 3.20 a).

Um die gleichmäßige Proteinladung des Blot zu überprüfen, wird die Membran mit anti-p38-Antikörper inkubiert (Abb. 3.21 b).

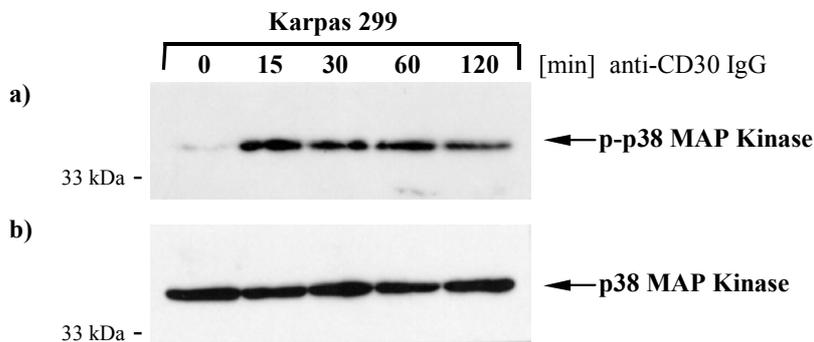


Abb. 3.20: Aktivität der p38 MAP Kinase in 0min bis 120min stimulierten Karpas 299 Zellen

Karpas 299 werden in Kulturmedium, das 0,5% FCS enthält, über Nacht gehungert und anschließend 0min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min mit immobilisiertem anti-CD30-Antikörper stimuliert. Je 20 µg des Zelllysats werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Einsatz gleicher Proteinmengen pro Spur des SDS-Gels wird durch anti-p38 Markierung überprüft. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. a) p-p38 Expression: Antikörper: anti-p-p38-IgG (1:1000) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) b) p38 Expression: Antikörper: anti-p38-IgG (1:500) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000).

3.7.2 Untersuchung der ERK und JNK MAP Kinase

Karpas 299 Zellen werden, wie unter 3.7.1 beschrieben, behandelt und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Mit den phosphospezifischen Antikörpern werden gleiche Mengen an phosphoryliertem ERK2 (p-p42), JNK1 (p-p46) und JNK2 (p-p54) in unstimulierten und in 15min bis 120min stimulierten Karpas 299 Zellen festgestellt (Abb. 3.21 a, c). Die gleichmäßige Proteinladung der Blots wird mit anti-ERK und anti-JNK Antikörpern überprüft, die gleiche Mengen an ERK1, ERK2, JNK1 und JNK2 nachweisen.

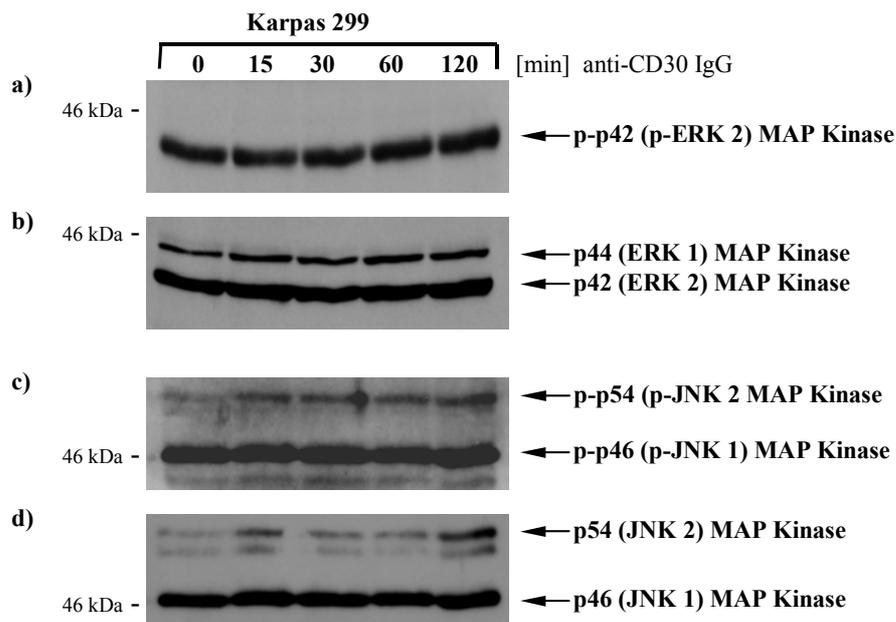


Abb. 3.21: Aktivität der ERK und JNK MAP Kinasen in 0min bis 120min stimulierten Karpas 299 Zellen

Karpas 299 werden in Kulturmedium, das 0,5% FCS enthält, über Nacht gehungert und anschließend 0min, 15min, 30min, 60min und 120min mit immobilisiertem anti-CD30-Antikörper stimuliert. Je 20µg des Zellysats werden in einem 12%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Einsatz gleicher Proteinmengen pro Spur der SDS-Gele wird durch anti-ERK oder anti-JNK Markierung überprüft. Als Größenstandard wird der Rainbow Protein Molecular Weight Marker verwendet. a) p-ERK Expression: Antikörper: anti-p-p42-IgG (1:1000) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) b) ERK $\frac{1}{2}$ Expression: Antikörper: anti-ERK $\frac{1}{2}$ -IgG (1:500) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000). c) p-JNK $\frac{1}{2}$ Expression: Antikörper: anti-pp46-IgG und anti-p-p54-IgG (1:250) und anti-mouse-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000) b) JNK $\frac{1}{2}$ Expression: Antikörper: anti-JNK $\frac{1}{2}$ -IgG (1:500) und anti-rabbit-IgG (HRP-gekoppelt, 1:5000).

4 Diskussion

Großzellig anaplastische Lymphome (ALCL) gehören zur Gruppen der aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome (Stein et al. 1985). Sie sind durch die Expression des Zytokinrezeptors CD30 charakterisiert. Ungefähr 36% der systemischen ALCL weist die chromosomale Translokation t(2;5) auf, die zur Expression der chimären Tyrosinkinase NPM-ALK führt (Stein et al. 2000, Harris et al. 1994). Die NPM-ALK positiven ALCL haben charakteristische immunphänotypische Merkmale und eine gute Prognose (Gascoyne et al. 1999, Falini et al. 1999, Shiota et al. 1995).

Da ein Teil der ALCL nicht auf die aktuell verfügbaren Therapien anspricht (Falini et al. 1999), wird nach alternativen Therapien gesucht. Eine weitere molekulare Charakterisierung von ALCLs ist daher wünschenswert, um die bestehenden Unterschiede zu erklären, einen möglichen Therapieerfolg vorauszusagen und die Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten zu unterstützen.

Zunächst wurden in dieser Arbeit mehrere ALCL Zelllinien mittels RT-PCR (Abb. 3.2) und Western-Blotting (Abb. 3.3) auf die Expression von CD30 und NPM-ALK untersucht. Alle ALCL Zelllinien exprimierten sowohl NPM-ALK als auch CD30. Bei der quantitativen Analyse mittels Western-Blotting zeigten die verschiedenen ALCL Zelllinien eine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression des Rezeptors und der Tyrosinkinase. Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass besonders die Expression des CD30-Rezeptors eine Rolle bei der Therapie spielen kann. Radioaktiv markierte anti-CD30 Antikörper wurden z.B. viel versprechend in vorklinischen und klinischen Studien eingesetzt (Koon et al. 2000). Andere Studien berichteten über Apoptoseinduktion mittels anti-CD30 Antikörpern (Tian et al. 1995, Pfeiffer et al. 1999). Die Inkubation der ALCL Zelllinien Karpas 299 und Michel mit den anti-CD30 Antikörpern Hefi-1 und M44 führte z.B. zu einer signifikanten Reduktion des Zellüberlebens. Außerdem wurde das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Überleben von SCID Mäusen mit Metastasen von ALCL durch die Behandlung mit anti-CD30 Antikörpern deutlich verlängert (Tian et al. 1995, Pfeiffer et al. 1999).

In den vorliegenden in vitro Untersuchungen von sechs ALCL Zelllinien und der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie HDLM-2 zeigte sich bei Trypanblaufärbung bei zwei (Karpas 299 und L82) der sechs Zelllinien ein anti-proliferativer Effekt (Abb. 3.4). Die anderen Zelllinien

wiesen bei den CD30-stimulierten Zellen das gleiche bzw. ein nicht signifikant verringertes Wachstum wie die entsprechenden nicht stimulierten Zellen auf. Geringfügige Unterschiede in der Zellkonzentration der stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen sind sehr wahrscheinlich experimentell bedingt. Hinweise auf einen CD30 vermittelten Zelltod zeigten sich in diesem Experiment dagegen nicht. Jedoch könnten unterschiedliche anti-CD30-Antikörper zu kongruenten Effekten in den Zelllinien führen. In dieser Arbeit wurden mit den anti-CD30-Antikörpern Hefi-1 und M44 die gleichen Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

Einen sehr weit verbreiteten Assay zur Untersuchung von Zellproliferation stellt die Messung der H^3 -Thymidin-Aufnahme im proliferierenden Zellpool dar. Durch diese Methode besteht die Möglichkeit der direkten und nicht-invasiven Untersuchung des Zellwachstums (Naito et al. 1987). Der anti-proliferative Effekt der Stimulation mit anti-CD30 auf Karpas 299 und L82 Zellen konnte durch den H^3 -Thymidinassay bestätigt werden (Abb. 3.5). Mit der sensitiveren Methode wurde auch ein anti-proliferativer Effekt der Stimulation mit anti-CD30 auf JB6, SR786 und DEL Zellen detektiert. Dieser war in den Wachstumsuntersuchungen durch Trypanblau Färbung nicht sichtbar. Für Hodgkin-Lymphom-Zelllinien wird in der Literatur sehr einheitlich ein das Überleben fördernder Effekt durch CD30-Stimulation und die damit verbundene NF κ B beschrieben (Smith et al. 1993, McDonald et al. 1995). Sehr unterschiedlich sind dagegen die Daten bei den ALCL. Smith et al. 1993 beschreibt für Karpas 299 Zellen einen CD30-vermittelten Zelltod. Tian et al. 1995 und Hübinger et al. 2001 beschreiben für die selbe Zelllinie einen Wachstumsarrest.

Alle eukaryotischen Zellen besitzen die Fähigkeit zur Regulation ihres Zellzyklus. Hiermit wird ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Wachstumsarrest und programmiertem Zelltod erreicht. Die Regulation erfolgt über eine Familie von Protein-Kinase-Komplexen, die aus einer katalytischen Untereinheit (CDK) und dem dazugehörigen Cyclin aufgebaut sind. Die Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren (CKI) können in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich in Sequenzhomologien und Interaktionsmechanismen unterscheiden (Hunter et al. 1994, Coats et al. 1996).

Für die ALCL Zelllinie Karpas 299 konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit anti-CD30 Antikörpern nicht zur Induktion von Apoptose führt, sondern zu einem G0/G1 Zellzyklusarrest (Hübinger et al. 2001, Schneider et al. 2004). Die Induktion von p21 wird in

vielen Zellen durch das Tumorsuppressor Protein p53 reguliert (Zuo et al. 1998, Bunz et al. 1998).

P21 inhibiert verschiedene Cyclin/Cyclin-abhängige Kinase Komplexe, was unter anderem zu einer Nicht-Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (RB) und dadurch zur Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F führt (Hiebert 1993, Qian et al. 1992). Durch Western Blot Analysen wurde in dieser Arbeit eine Hochregulation von p21 Protein in Karpas 299 Zellen gezeigt, nachdem diese für 32h mit anti-CD30-IgG stimuliert wurden. Dies bestätigt die Daten von Hübinger et al. (2001). Für p16 und p27 findet dagegen keine Regulation statt. In der Abbildung 3.8 ist eine geringe Regulation von p27 zu erkennen. Weitere Versuche mit stimulierten Karpas 299 Zellen haben jedoch ergeben, dass p27 unter Stimulation mit anti-CD30-IgG nicht reguliert wird (Daten nicht gezeigt). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll konnte mittels RT-PCR keine Regulation von p16, p21 und p27 nachgewiesen werden (Abb. 3.7), da möglicherweise durch die nicht quantitative Amplifikation Expressionsunterschiede überlagert wurden.

Die Untersuchung der Expression des p21 Proteins in den anderen ALCL Zelllinien führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich, bleibt die p21 Proteinmenge in JB6, DEL und HDLM-2 Zellen während der Stimulation unverändert. Die Menge an p21-Protein ist in JB6 und HDLM-2 Zellen im Vergleich zu Karpas 299 Zellen äußerst gering. SUDHL-1 und SR786 Zellen reagieren dagegen auf die Stimulation mit einer Herunterregulierung der p21 Proteinmenge. L82, die einzige ALCL Zelllinie, die wie Karpas 299 auf die Stimulation mit anti-CD30-IgG mit einer verminderten Proliferation reagiert, reguliert p21 nach 8-stündiger Inkubation mit anti-CD30-IgG hoch. Bei L82 Zellen wird p21 Protein nach 32h jedoch schon wieder herunterreguliert. Außer durch die Stimulation des CD30 Oberflächenrezeptors kann eine Regulation des p21-Proteins auch über andere Rezeptoren erfolgen. Marches et al. (1999) beschreibt eine Hochregulation von p21 in der Burkitt Lymphom Zelllinie Daudi mittels IgM Crosslinking. In einer Vielzahl von Zellen führt die Überexpression des Cyclin-abhängige Kinase Inhibitors zur Induktion eines Zellzyklusarrests (Givol et al. 1998, Boulaire et al. 2000). Diese Regulation von p21 kann sowohl p53-abhängig als auch p53-unabhängig verlaufen (Macleod et al. 1995).

P21 Protein kann das „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) binden (Chen et al. 1995). Hübinger et al. zeigen eine Koimmunpräzipitation von PCNA und p21 in stimulierten Karpas 299 Zellen (Hübinger et al. 2001). Western Blot Analysen zeigten keine Regulation der

PCNA Expression unter CD30-Stimulation. Dagegen konnte nach 32 stündiger Stimulation mit anti-CD30-IgG eine vermehrte Bindung von p21 und PCNA gezeigt werden. Die Assoziation von p21 und PCNA führt zur Inhibition von PCNA, das zur DNA-Synthese benötigt wird (Cayrol et al. 1998, Waga et al. 1994).

In der Literatur sind widersprüchliche Angaben zu finden, ob eine Stimulation des CD30-Rezeptors in ALCL zu Apoptose führt. Eine sehr gut etablierte und häufig angewendete Methode zur Detektion von Apoptose ist die Durchflusszytometrie (Derby et al. 2001) mit 7AAD und Annexin V-PE Doppelfärbung. Diese ermöglichen die Unterscheidung von früh- und spät-apoptotischen Zellen (Hasper et al. 2000). In keiner der ALCL-Zelllinien wurde eine signifikante Steigerung der Apoptoserate durch CD30-Stimulation gefunden (Abb. 3.12). Die etwas erhöhte Apoptoserate der stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen dürfte experimentell bedingt sein, da diese Zellen mechanisch von der Kulturschale gelöst werden müssen. Dies steht in Gegensatz zu den Daten von Mir et al. 2000, der mittels Durchflusszytometrie für Karpas 299 und Michel Zellen eine Apoptoseinduktion durch Stimulation des CD30-Rezeptors mit dem anti-CD30 Antikörper M67 (Immunex) zeigte. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten experimentell, durch die Verwendung verschiedener anti-CD30-Antikörper bedingt sein.

In apoptotischen Zellen kommt es zu einer Aktivierung von Cystein Proteasen (Degterev et al. 2003). Diese Proteasen gehören zur Familie der Caspasen (Alnemri et al. 1996). Die meisten Caspasen werden als inaktive Zymogene produziert, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Dabei kann es sowohl zur autokatalytischen Aktivierung der Procaspase als auch zur Aktivierung durch eine zuvor aktivierte Caspase kommen (Thornberry et al. 1997). Die Aktivierung der Procaspase-8, -9 und -10 führt zu einer Aktivierung der Caspase-3, -6 und -7, die wiederum spezifische Substrate durch proteolytische Spaltung aktivieren (Herr und Debatin 2001). Zur Induktion von Apoptose wurde in dieser Arbeit der Topoisomerase II-Hemmer Etoposid verwendet. Chemotherapeutika können sowohl über eine Regulierung des Rezeptorsignalwegs und/oder eine Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs und der Aktivierung von Caspase 3 zur Apoptose führen (Milner et al. 2002). Epirubicin führt über eine Aktivierung der Caspase 8 und Caspase 3 zur Apoptose (Wieder et al. 2001). Ein Substrat der Caspase-3 ist z.B die „Caspase-aktivierte Dnase (CAD)“. Diese Nuklease schneidet die genomische DNA und ist für die Entstehung der „DNA Ladder“ in apoptotischen Zellen verantwortlich (Fischer et al. 2003, Degterev et al. 2003).

Durch die Stimulation der untersuchten Zelllinien mit anti-CD30-IgG kam es zu keiner Aktivierung der Procaspase-3. Im Gegensatz zur Stimulation mit anti-CD30-IgG, erfolgte bei Karpas 299 Zellen nach Behandlung mit Etoposid eine Aktivierung Caspase-3 und die Induktion von Apoptose (Abb. 3.13).

In dieser Arbeit wurden keine Anzeichen gefunden, dass eine CD30-Stimulation in ALCL zu Apoptoseinduktion führen würde. Die widersprüchlichen Ergebnisse darüber, ob eine Stimulation des CD30 Oberflächenrezeptors bei ALCL zur Induktion von Apoptose führt, hängt sehr wahrscheinlich von vielen Faktoren ab. Dazu gehören neben unterschiedlichen Antikörpern auch äußere Umstände wie z.B. Kulturbedingungen, Mutationen oder kostimulatorischen Effekte.

Die CD30 vermittelte Signaltransduktion und ihr Einfluss auf Apoptose von ALCL Zellen wurde anschließend, unter Einbeziehung der Mitglieder der „Inhibitors of caspases (IAPs)“-Familie, näher charakterisiert. Diese werden in vielen verschiedenen Neoplasien überexprimiert. Die IAP XIAP, IAP1 und IAP2 inhibieren die aktive Caspase-3 und -7 und die Aktivierung der Caspase-9 durch Apaf-1 und Cytochrom-C. Survivin ist dagegen in die Regulation von Zellzyklus und Mitose verwickelt (Fesik et al. 2000, Kaso et al. 2001).

Mittels RT-PCR konnte für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien eine Expression von cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin gezeigt werden. Um CD30-vermittelte Interaktionen noch weiter zu untersuchen, wurden Karpas 299 Zellen 8h bzw. 32h mit anti-CD30-IgG stimuliert. Die stimulierten Zellen exprimierten cIAP2 stärker als unstimulierte Zellen. Dies deutet auf einen CD30 vermittelten Schutz gegen eine Induktion von Apoptose hin. Ein CD30 vermittelter Schutz vor Apoptose durch Hochregulation von cIAP2 wurde ebenfalls von Muta et. al (2000) und Hübinger et al. 2004 beschrieben.

Um zu analysieren, ob die Stimulation mit anti-CD30-IgG tatsächlich ALCL Zelllinien vor Apoptose schützt, wurden die Zelllinien mit dem Zytostatikum Etoposid behandelt. Etoposid ist ein Topoisomerase II Hemmer und führt zur DNA Schädigung, Aktivierung von Caspasen und zum Zelltod (Martinsson et al. 2001). Etoposid vermittelter Zelltod wurde durch FACS-Analysen bestätigt (Abb. 3.14). Die Stimulation mit anti-CD30-IgG reduzierte die Apoptoseraten um bis zu 77,4% nach 24h und 55,2% nach 72h im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Roy et al. 1997 erzielt. Sie zeigte, dass eine Überexpression von cIAP1 und cIAP2 in 293 Zellen zu einer Inhibition der Caspasen führt und deshalb vor Etoposid-induzierter Apoptose schützt. Da Etoposid in der

Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt wird, ist die Inhibition von Etoposid-vermittelter Apoptose durch Aktivierung von CD30 von möglicher Bedeutung. Weitere Studien müssen klären, ob unter Umständen eine Stimulation des CD30-Oberflächenrezeptors zu einer Progression der Erkrankung oder einem Versagen der Therapie führen können.

In Hodgkin Zellen funktionieren CD30-vermittelte Effekte, die das Überleben fördern, hauptsächlich über NF κ B, das konstitutiv aktiviert ist (Bargou et al. 1997). Mir et al. (2000) beschreiben, dass Karpas 299 Zellen in ihrer Fähigkeit NF κ B zu aktivieren, beeinträchtigt sind. Die Aktivierung von NF κ B erfolgt über die Phosphorylierung von I κ B und p105 (Baeuerle et al. 1994, Baldwin 1996, Cohen et al. 1998). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine starke Phosphorylierung und Degradation von I κ B α gefunden werden. Dies zeigt, dass eine CD30-vermittelte Aktivierung von NF κ B in Karpas 299 Zellen möglich ist. Dieses Ergebnis ist besonders relevant, da die Expression von Proteinen aus der IAP Familie hauptsächlich über NF κ B reguliert wird (LaCasse et al. 1998).

Um zu überprüfen, ob der anti-apoptotische Effekt in ALCL Zelllinien über NF κ B reguliert wird, wurde der spezifische NF κ B-Inhibitor PG490 verwendet (Liu et al. 2000). Die Inhibition von NF κ B sensibilisierte Karpas 299 Zellen gegenüber Apoptose. Zellen, die mit PG490 und CD30 behandelt wurden, zeigten einen additiven apoptotischen Effekt im Vergleich zu Zellen, die nur mit PG490 behandelt wurden. Dieses Ergebnis bestätigt die Rolle von NF κ B in der Vermittlung anti-apoptotischer Effekte in ALCL-Zelllinien.

Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie, zu denen CD30 gehört, übertragen extrazelluläre Signale durch Bindung der so genannten TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren (TRAFs) (Baker et al. 1998, Baker et al. 1996) und durch die Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP) (Wendtner et al. 1995).

Die MAP (mitogen-activated protein) Kinase Signalwege übertragen extrazelluläre Signale in zelluläre Antworten (Elion 1998). Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch Phosphorylierung. Mit anti-CD30-IgG stimulierte Karpas 299 Zellen zeigen eine Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase. Die MAP-Kinasen ERK1, ERK2 und JNK werden durch eine Stimulation des CD30 Rezeptors nicht beeinflusst.

Die p38 und JNK Kaskade wird durch Stress wie z.B. UV Strahlung, Hitze, Röntgenstrahlung, Proteinsyntheseinhibitoren und proinflammatorische Zytokine aktiviert (Derijard et al. 1994, Freshney et al. 1994, Wang et al. 1996). Durch diese Arten von Stress und durch proinflammatorische Zytokine wird Apoptose induziert (Verheij et al. 1996).

Andererseits aktivieren viele hämatopoetische Zytokine, Interleukine und Koloniestimulierende Faktoren, die das Wachstum, das Überleben und die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen regulieren, nicht nur die MAP Kinase ERK sondern auch p38 und JNK (Nagata et al. 1997, Flotz et al. 1997).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten deuten darauf hin, dass der CD30 Rezeptor neben den NF κ B-Signalweg auch die Aktivierung von p38 MAP-Kinase nutzt, um externe Signale in intrazelluläre Effekte umzuwandeln. Ob dies ein allgemeiner CD30-induzierter Signalweg in ALCL Zellen ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

5 Zusammenfassung

Ein typisches Merkmal der anaplastischen großzelligen Lymphome (ALCL) ist die Expression des Oberflächenantigens CD30. In ca. 60% - 80% der ALCL findet man die Translokation $t(2;5)(p23;q35)$, die zu einer Fusion der Tyrosinkinase ALK und Nucleophosmin/B23 (NPM) führt.

In dieser Arbeit wurden CD30 vermittelte Signalwege in ALCL-Zelllinien untersucht. Die CD30-vermittelte Signaltransduktion erfolgt über Mitglieder der TRAF-Familie (TNFR-associated factor) und andere Adapter-Proteine. In der Literatur variieren die Effekte, die durch eine Stimulation des CD30-Oberflächenrezeptors erzielt werden, von Zellproliferation bis zur Induktion von Apoptose.

In den ALCL-Zelllinien Karpas 299 und L82 löste die Stimulation von CD30 einen antiproliferativen Effekt aus. Dieser korrelierte mit der Induktion des Zellzyklus-inhibierenden Proteins p21. In den anderen ALCL-Zelllinien führte die CD30-Stimulation zu keiner Inhibition der Zellproliferation.

Des Weiteren konnte für die ALCL-Zelllinie Karpas 299 nach CD30-Stimulation eine vermehrte Proteinmenge des antiapoptotischen Proteins cIAP2 (inhibitor of apoptosis), sowie eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor kappa-B) gezeigt werden. Eine Involvierung der MAP-Kinase (mitogen-activated protein) p38 in das „CD30-Signaling“ konnte ebenfalls gezeigt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der CD30-Stimulation auf die Induktion von Apoptose. Anzeichen einer CD30-vermittelten Apoptoseinduktion wurde für keine der untersuchten ALCL Zelllinien gefunden. Die Untersuchung an Karpas 299 Zellen zeigte einen Schutz vor der Induktion von Apoptose durch Etoposid bei Stimulation mit anti CD30-IgG. Die hier gezeigten Daten widersprechen in der Literatur dargestellten Ergebnissen.

Sehr wahrscheinlich spielen der verwendete Antikörper, kostimulatorische Faktoren und spezifische Kulturbedingen eine zusätzliche Rolle, so dass in der Selben Zelllinie durch CD30-Stimulation sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte erzielt werden können.

6 Literaturverzeichnis

1. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87:171
2. Arch R.H., Gedrich R.W., Thompson C.B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev*. 12:2821-2830
3. Armitage R.J. (1994) Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr. Opin. Immunol*. 6:407-413
4. Ashkenazi A., Dixit V.M. (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol*. 11:255-260
5. Baeuerle P.A., Henkel T. (1994) Function and activation of NF κ B in immune system. *Annu. Rev. Immunol*. 12:149-179
6. Bai R.Y., Dieter P., Peschel C., Morris S.W., Duyster J. (1998) 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*. 18:6951-6961
7. Baker S.J., Reddy E.P. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12:1-9
8. Baker S.J., Reddy E.P. (1998) Modulation of life and death by TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261-3270
9. Baldwin A.S.Jr (1996) the NF κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Ann. Rev. Immunol*. 14:649-683
10. Ball K.L., Lain S., Fahraeus R., Smythe C., Lane D.P. (1996) Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1. *Current Biol*. 7:71-80
11. Ball K.L.(1997) p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. *Prog. In Cell Research* 3:125-134

12. Bargou R.C., Emmerich F., Krappmann D., Bommert K., Mapara M.Y., Arnold W., Royer H.D., Grinstein E., Greiner A., Scheidereit C., Dorken B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest.* 100:2961-2969
13. Bischof D., Pulford K., Mason D.Y., Morris S.W. (1997) Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17:2312-2325
14. Bitter M.A., Franklin W.A., Larson R.A., McKeithan T.W., Rubin C.M., LeBeau M.M., Stephens J.K., Vardiman J.W. 1990 Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). *Am J Surg Pathol.* 14:305-316
15. Boulaire J., Fotedar A., Fotedar R. (2000) The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol. Biol. (Paris)* 48:190-202
16. Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501
17. Cano E., Mahadevan L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem.* 20:117-122
18. Cayrol C., Ducommun B. (1998) Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene.* 17:2437-2444
19. Chadburn A., Cesarman E., Jagirdar J., Subar M., Mir R.N., Knowles D.M. (1993) CD30 (Ki-1) positive anaplastic large cell lymphomas in individuals infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer* 72:3078-3090
20. Chan J.K., Ng C.S., Hui P.K., et al. (1989) Anaplastic large cell Ki-1 lymphoma: delineation of two morphological types. *Histopathology* 15:11-34
21. Chen J., Jackson P.K., Kirschner M.W., Dutta A. (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374:386-388

22. Chiarle R., Podda A., Prolla G., Podack E.R., Thorbecke G.J., Inghirami G. (1999) CD30 overexpression enhances negative selection in the thymus and mediates programmed cell death via a Bcl-2-sensitive pathway. *J. Immunol.* 163:194-205
23. Chott A., Kaserer K., Augustin I., Vesely M., Heinz R., Oehlinger W., et al. (1990) Ki-1 positive large cell lymphoma. A clinico-pathologic study of 41 cases. *American Journal of Surgical Pathology* 14:439-448
24. Coats S., Flanagan W.M., Nourse J., Roberts J.M. (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272:877-880
25. Cobb M.H., Goldsmith E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270:14843-14846
26. Cohen L., Henzel W.J., Bauerle P.A. (1998) IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature* 395:292-296
27. Cohen P. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Cell Biol.* 7:353-361
28. Croager E.J., Gout A.M., Abraham L.J. (2000) Involvement of SP1 and microsatellite repressor sequences in the transcriptional control of the human CD30 gene. *Am. J. Pathol.* 156:1723-1731
29. Crook N.E., Clem R.J., Miller L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 67:2168-2174
30. Dadgostar H., Cheng G. (2000) Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation. *J. Biol. Chem.* 275:2539-2544
31. Degtarev A., Boyce M., Yuan J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-8567
32. Derby E., Reddy V., Kopp W., Nelson E., Baseler M., Sayers T., Malyguine A. (2001) Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett.* 78:35-39

33. Derijard B., Hibi M., Wu I.H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R.J. (1994) JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025
34. Deveraux Q.L., Reed J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13:239-252
35. Duckett CS and Thompson CB. (1997) CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev.* 11:2810-2821
36. Dummer W., Brocker E.B., Bastian B.C. (1997) Elevated serum levels of soluble CD30 are associated with atopic dermatitis, but not with respiratory atopic disorders and allergic contact dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 137:185-137
37. Durkop H., Latza U., Hummel M., Eitelbach F., Seed B., Stein H. (1992) Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 68:421-427
38. Durkop H., Anagnostopoulos I., Bulfone-Paus S., Stein H. (1997) Expression of several members of the TNF-ligand and receptor family on the tonsillar lymphoid B cells. *Br. J. Haematol.* 98:863-868
39. Durkop H., Foss H.D., Eitelbach F., Anagnostopoulos I., Latza U., Pileri S., Stein H. (2000) Expression of the CD30 antigen in non-lymphoid tissues and cells. *J.Pathol.* 190:613-618
40. El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer E., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825
41. Elion E. (1998) Routing MAP Kinase Cascade. *Science* 281:5383:1625-1626
42. Falini B., Pileri S., Zinzani P.L., Carbone A., Zagonel V., Wolf-Peeters C., Verhoef G., Menestrina F., Todeschini G., Paulli M., Lazzarino M., Giardini R., Aiello A., Foss H.D., Araujo I., Fizzotti M., Pelicci P.G., Flenghi L., Martelli M.F., Santucci A. (1999) ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood.* 93:2697-2706
43. Fesik S.W. (2000) Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103:273-282

44. Fischer U., Jänicke R. U., Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 10:76-100
45. Foltz I.N., Schrader J.W. (1997) Activation of the stress activated protein kinases by multiple hematopoietic growth factors with the exception of interleukin-4. *Blood* 89:3092-3096
46. Foon K.A. (1982) Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med.* 307:686-687
47. Freshney N.W., Rawlinson L., Guesdon F., Jones E., Cowley S., Hsuan J., Saklatvala J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78:1039-1049
48. Friesen C., Herr I., Krammer P.H., Debatin K.M. (1996) Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med.* 2:574-577
49. Froese P., Lemke H., Gerdes J., Havsteen B., Schwarting R., Hansen H., Stein H. (1987) Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines. *J. Immunol.* 139:2081-2087
50. Gascoyne R.D., Aoun P., Wu D., Chhanabhai M., Skinnider B.F., Greiner T.C., et al. (1999) Prognostic significance of anaplastic lymphoma Kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 93:3913-3921
51. Gattei V., Celetti A., Cerrato A., Degan M., De Iuliis A., Rossi F.M., Chiappetta G., Consales C., Improta S., Zagonel V., Aldinucci D., Agosti V., Santoro M., Vecchio G., Pinto A., Grieco M. (1997) Expression of the RET receptor tyrosine kinase and GDNFR-alpha in normal and leukemic human hematopoietic cells and stromal cells of the bone marrow microenvironment. *Blood.* 89:2925-2937

52. Gerli R., Muscat C., Bistoni O., Falini B., Tomassini C., Agea E., Tognellini R., Biagini P., Bertotto A. (1995) High levels of the soluble form of CD30 molecule in rheumatoid arthritis (RA) are expression of CD30+ T cell involvement in the inflamed joints. *Clin. Exp. Immunol.* 102:547-550
53. Giacomelli R., Cipriani P., Lattanzio R., Di Franco M., Locanto M., Parzanese I., Passacantando A., Ciocci A., Tonietti G. (1997) Circulating levels of soluble CD30 are increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and correlate with serological and clinical features of the disease. *Clin. Exp. Immunol.* 108:42-46
54. Givol I., Givol D., Hughes S.H. (1998) Overexpression of p21^{waf1/cip1} arrests the growth of chicken embryo fibroblasts that overexpress E2F1. *Oncogene* 16:3115-3122
55. Grammer A.C., Swantek J.L., McFarland R.D., Miura Y., Geppert T., Lipsky P.E. (1998) TNF receptor-associated factor-3 signaling mediates activation of p38 and Jun N-terminal kinase, cytokine secretion, and Ig production following ligation of CD40 on human B cells. *J. Immunol.* 161:1183-1193
56. Greer J.P., Kinney M.C., Collins R.D., Salhany K.E. Wolff S.N., Hainsworth J.D., Flexner J.M., Stein R.S. (1991) Clinical features of 31 patients with Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 9:539-47.
57. Grell M., Zimmermann G., Gottfried E., Chen C.M., Grunwald U., Huang D.C., Wu Lee Y.H., Durkop H., Engelmann H., Scheurich P., Wajant H., Strasser A. (1999) Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 18:3034-3043
58. Hansen H.P., Kisseleva T., Kobarg J., Horn-Lohrens O., Havsteen B., Lemke H. (1995) A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines. *Int. J. Cancer.* 63:750-756
59. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomasi K., Elledge S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816

60. Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H., Banks P.M., Chan J.K.C., Cleary M.L., Delsol G., De Wolf-Peters C., Falini B., Gatter K.C., Grogan T.M., Isaacson P.G., Knowels D.M., Mason D.Y., Müller-Hermelink H.K., Pileri S.A., Ralfkiaer E., Warnke R.A. (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84:1361
61. Hasper H. J., Weghorst R. M., Richel D. J., Meerwaldt J. H., Olthuis F. M., Schenkeveld C. E. (2000) A new four-color flow cytometric assay to detect apoptosis in lymphocyte subsets of cultured peripheral blood cells. *Cytometry* 40:167-171
62. Hatzoglou A., Roussel J., Bourgeade M.F., Rogier E., Madry C., Inoue J., Devergne O., Tsapis A. (2000) TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Immunol.* 165:1322-1330
63. Herr I., Debatin K.M. (2001) Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98:2603-2614
64. Hiebert S.W. (1993) Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with E2F transcription factor are necessary for E2 promotor repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* 13:3384-3391
65. Higgins J.P., Warnke R.A. (1999) CD30 expression is common in mediastinal large B-cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 112:241-247
66. Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504
67. Hsu P.L., Hsu S.M. (2000) Autocrine growth regulation of CD30 ligand in CD30-expressing Reed-Sternberg cells: distinction between Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Lab. Invest.* 80:1111-1119

68. Hübinger G., Scheffrahn I., Müller E., Bai R., Duyster J., Morris S.W., Schrezenmeier H., Bergmann L. (1999) 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.* 27:1796-805
69. Hübinger G., Müller E., Scheffrahn I., Schneider C., Hildt C., Singer B.B., Sigg I., Graf J., Bergmann L. (2001) CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21 CIP1/WAF1 in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene* 20:590-59
70. Hübinger G., Schneider C., Stohr D., Ruff H., Kirchner D., Schwanen C. Schmid M., Bergmann L., Müller E. (2004) CD30-induced up-regulation of the inhibitor of apoptosis genes cIAP1 and cIAP2 in anaplastic large cell lymphoma cells. *Exp. Hematol.* 32:382-389
71. Hunter T., Pines J. (1994) Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* 79:573-582
72. Iwagaki H., Hizuta A., Kohka H., Kobashi K., Nitta Y., Isozaki H., Takakura N., Tanaka N. (1999) Circulating levels of soluble CD30 and other markers in colorectal cancer patients. *J. Med.* 30:111-121
73. Iwahara T., Fujimoto J., Wen D., Cupples R., Bucay N., Arakawa T., Mori S., Ratzkin B., Yamamoto T. (1997) Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene.* 14:439-449
74. Jones T.J., Coad N.A., Muir K.R., Parkes S.E., Evans C.D., Mann J.R. (1995) Immunophenotypic analysis of childhood Burkitt's lymphoma in the West Midlands 1957-1986. *J. Clin. Pathol.* 48:22-25
75. Kadin M.E., Sako D., Berliner N. (1986) Childhood Ki-1 lymphoma presenting with skin lesions and peripheral lymphadenopathy. *Blood* 66:1042-1049

76. Kaye K.M., Devergne O., Harada J.N., Izumi K.M., Yalamanchili R., Kieff E., Mosialos G. (1996) Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11085-11090
77. Koon H.B., Junghans R.P. (2000) Anti-CD30 antibody-based therapy. *Curr Opin Oncol.* 12:588-93
78. LaCasse E.C., Baird S., Korneluk R., MacKenzie A.E. (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17:3247-3259
79. Latza U., Foss H.D., Eitelbach F., Dieckmann K.P., Loy V., Unger M., Pizzolo G., Stein H. (1995) Cd30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of soluble molecule. *Am. J. Pathol.* 146:463-471
80. LeBeau M.M., Bitter M.A., Larson R.A., Doane L.A., Ellis E.D., Franklin W.A., Rubin C.M., Kadin M.E., Vardiman J.W. (1989) The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia.* 3:866-70
81. Lee S.Y., Kaufman D.R., Mora A.L., Santana A., Boothby M., Choi Y. (1998) Stimulus-dependent synergism of the antiapoptotic tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) and nuclear factor kappaB pathways. *J. Exp. Med.* 188:1381-1384
82. Levi E., Wang Z., Petrogiannis-Haliotis T., Pfeifer W.M., Kempf W., Drews R., Kadin M.E. (2000) Distinct effects of CD30 and Fas signaling in cutaneous anaplastic lymphomas: a possible mechanism for disease progression. *J. Invest. Dermatol.* 115:1034-1040
83. Ling L., Cao Z., Goeddel D.V. (1998) NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:3792-3797
84. Liu H., Liu Z.H., Chen Z.H., Yang J.W., Li L.S. (2000) Triptolide: a potent inhibitor of NF-kappa B in T-lymphocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 21:782-786

85. Lopategui J.R., Sun L.H., Chan J.K., Gaffey M.J., Frierson H.F.Jr., Glackin C., Weiss L.M. (1995) Low frequency association of the t(2;5)(p23;q35) chromosomal translocation with CD30+ lymphomas from American and Asian patients. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am J Pathol.* 146:323-8
86. Luo Y., Hurwitz J., Massague J. (1995) Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21^{Cip1}. *Nature* 375:159-161
87. Macleod K. F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B., Jacks T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 9:935-944
88. Marches R., Hsueh R., Uhr J. W. (1999) Cancer dormancy and cell signalling: Induction of p21^{waf1} initiated by membrane IgM engagement increases survival of B lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8711-8715
89. Martinsson P., Liminga G., Nygren P., Larsson R., (2001) Characteristics of etoposide-induced apoptotic cell death in the U-937 human lymphoma cell line. *Anti-Cancer Drugs.* 12:699-705
90. Mason D.Y., Bastard C., Rimokh R., Dastugue N., Huret J.L., Kristoffersson U., Magaud J.P., Nezelof C., Tilly H., Vannier J.P., et al. (1990) CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol.* 74:161-168
91. McCarthy J.V., Ni J., Dixit V.M. (1998) RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* 273:16968-16975
92. McDonald P.P., Cassatella M.A., Bald A., Maggi E., Romagnani S., Gruss H.J., Pizzolo G. (1995) CD30 ligation induces nuclear factor-kappa B activation in human T cell lines. *Eur. J. Immunol.* 25:2870-2876
93. Milner A.E., Palmer D.H., Hodgkin E.A., Elipoulos A.G., Knox P.G., Poole C.J., Kerr D.J., Young L.S. (2002) Induktion of apoptosis by chemotherapeutic drugs: the role of FADD in activation of caspase-8 and synergy with death receptor ligands in ovarian carcinoma cells. *Cell Death and Differentiation* 9:287-300

94. Mir S.S., Richter B.W., Duckett C.S. (2000) Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood* 96:4307-4312
95. Mora J., Filippa D.A., Thaler H.A.T., Polyak T., Cranor M.L., Wollner N. (2000) Large cell non-Hodgkin lymphoma of childhood: analysis of 78 consecutive patients enrolled in 2 consecutive protocols at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *Cancer* 88:186
96. Morgan R; Hecht B.K., Sandberg A.A., Hecht F., Smith S.D. (1986) Chromosome 5q35 breakpoint in malignant histiocytosis. *N Engl J Med.* 314:1322
97. Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L., Look A.T. (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281-1284
98. Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, Witte DP (1997) ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* 14:2175-2188
99. Muta Boise LH, Fang L, Podack ER. (2000) CD30 signals integrate expression of cytotoxic effector molecules, lymphocyte trafficking signals, and signals for proliferation and apoptosis. *J Immunol.* 165:5105-5111
100. Nadali G., Tavecchia L., Zanolin E., Bonfante V., Viviani S., Camerini E., Musto P., Di Renzo N., Carotenuto M., Chilosi M., Krampera M., Pizzolo G. (1998) Serum level of the soluble form of the CD30 molecule identifies patients with Hodgkin's disease at high risk of unfavorable outcome. *Blood* 91:3011-3016
101. Nagat Y., Moriguchi T., Nishida E., Todokoro K. (1997) Activation of p38 MAP kinase pathway by erythropoietin and interleukin-3. *Blood* 90:929-934
102. Nagat Y., Nishida E., Todokoro K. (1997) Activation of JNK signaling pathway by erythropoietin, thrombopoietin, and interleukin-3. *Blood* 89:2664-2669

103. Naito K., Skog S., Tribukait B., Andersson L., Hisazumi H. (1987) Cell cycle related [³H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet.* 20:447-457.
104. Nakano H., Shindo M., Sakon S., Nishinaka S., Mihara M., Yagita H., Okumura K. (1998) Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:3537-3542
105. Nawrocki J.F., Kirsten E.S., Fisher R.I. (1988) Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. *J. Immunol.* 141:672-680
106. New L., Jiang Y., Zhao M., Liu K., Flood L.J., Kato Y., Parry G.C., Han J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* 17:3372-84.
107. Pallesen G., Hamilton-Dutoit S.J. (1988) Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. *Am. J. Pathol.* 133:446-450
108. Pfeifer W., Levi E., Petrogiannis-Haliotis T., Lehmann L., Wang Z., Kadin M.E. (1999) A murine xenograft model for human CD30+ anaplastic large cell lymphoma. Successful growth inhibition with an anti-CD30 antibody (HeFi-1). *Am J Pathol.* 155:1353-1359.
109. Pileri S. (1994) Controversies on Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. Hematopathology Study Group of the Societa Italiana di Anatomia Patologica. *Haematologica.* 79:299-310
110. Pulford K., Lamant L., Morris S.W., Butler L.H., Wood K.M., Stroud D., Delsol G., Mason D.Y. (1997) Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood.* 89:1394-1404

111. Qian Y., Luckey C., Horton L., Esser M., Templeton D.J. (1992) Biological function of the retinoblastoma protein requires distinct domains for hyperphosphorylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 12:5363-5372
112. Reinhard C., Shamon B., Shyamala V., Williams L.T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J.* 16:1080-1092
113. Rothe M., Pan M.G., Henzel W.J., Ayres T.M., Goeddel D.V. (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83:1243-1252
114. Rothe M., Sarma V., Dixit V.M., Goeddel D.V. (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269:1424-1427
115. Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914-6925
116. Schneider C., Hubinger G. (2002) Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma* 43:1355-1366
117. Schneider C., Stohr D., Merz H., Hubinger G. (2004) Signal transduction in anaplastic large cell lymphoma cells (ALCL) mediated by the tumor necrosis factor CD30. *Leuk Lymphoma* 45:1009-1015
118. Schwab U., Stein H., Gerdes J., Lemke H., Kirchner H., Schaadt M., Diehl V. (1982) Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 299:65-67
119. Shiota M., Fujimoto J., Semba T., Satoh H., Yamamoto T., Mori S. (1994) Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*. 9:1567-1574

120. Shiota M., Nakamura S., Ichinohasama R., Abe M., Akagi T., Takeshita M., et al. (1995) Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80 NPM/ALK a distinct clinicopathologic entity. *Blood* 86:1954-1960
121. Smith C.A., Gruss H.J., Davis T., Anderson D., Farrah T., Baker E., Sutherland G.R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., et al. (1993) CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 73:1349-1360
122. Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. (1994) the TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76:959-962
123. Stansfeld A.G., Diebold J., Kapanci G., Lennert K., Mioduszevska O., Noel R., Rike F., Sundstorm C., van Unnik, J.A.M., Wright D.H. (1988) Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1:292-603
124. Stein H., Mason D.Y., Gerdes J., O'Connor N., Wainscoat J., Pallesen G., et al. (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence the Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 66:848-858
125. Stein H., Foss H.D., Durkop H., Marafioti T., Delsol G., Pulford K., Pileri S., Falini B. (2000) CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 96:3681-3695
126. Tartaglia L.A., Weber R.F., Figari I.S., Reynolds C., Palladino M.A., Goeddel D.V. (1991) The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:9292-9296
127. Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., Goeddel D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74:845-853
128. Telford W.G., Nam S.Y., Podack E.R., Miller R.A. (1997) CD30-regulated apoptosis in murine CD8 T cells after cessation of TCR signals. *Cell. Immunol.* 182:125-136

129. ten Berge R.L., Oudejans J.J., Ossenkuppele G.J., Pulford K., Willemze R., Falini B., Chott A., Meijer C.J. (2000) ALK expression in extranodal anaplastic large cell lymphoma favours systemic disease with (primary) nodal involvement and a good prognosis and occurs before dissemination. *J. Clin. Pathol.* 53:445-450
130. Thornberry N.A., Rosen A., Nicholson D. (1997) Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol.* 41:155-177
131. Tian Z.G., Longo D.L., Funakoshi S., Asai O., Ferris D.K., Widmer M., Murphy W.J. (1995) In vivo antitumor effects of unconjugated CD30 monoclonal antibodies on human anaplastic large-cell lymphoma xenografts. *Cancer Res.* 55:5335-5341
132. Uren A.G., Pakusch M., Hawkins C.J., Puls K.L., Vaux D.L. (1996) Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:4974-4978
133. Verheij M., Bose R., Lin X.H., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Zon L.I., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedmann A., Fuks Z., Kolesnick R.N. (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380:75-79
134. Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillmann B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574-578
135. Wang X.Z., Ron D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transkription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* 272:1347
136. Wendtner C.M., Schmitt B., Gruss H.J., Druker B.J., Emmerich B, Goodwin RG, Hallek M. (1995) CD30 ligand signal transduction involves activation of a tyrosine kinase and of mitogen-activated protein kinase in a Hodgkin's lymphoma cell line. *Cancer Res.* 55: 4157-4161

137. Wieder T., Essmann F., Prokop A., Schmelz K., Schulze-Osthoff K., Beyaert R., Dörken B., Daniel P.T. (2001) Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase 3. *Blood* 97:1378-1387
138. Willemze R., Kerl H., Sterry W., et al. (1997) EORTC classification of primary cutaneous lymphomas: a proposal from the cutaneous study group of the European Organisation for the Research and Treatment of Cancer. *Blood* 90:354-371
139. Woronicz J.D., Gao X., Cao Z., Rothe M., Goeddel D.V. (1997) I κ B kinase-beta: NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase-alpha and NIK. *Science* 278:866-869
140. Xiong Y., Zhang H, Beach D. (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71:505-514
141. Younes A., Consoli U., Zhao S., Snell V., Thomas E., Gruss H.J., Cabanillas F., Andreeff M. (1996) CD30 ligand is expressed on resting normal and malignant human B lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 93:569-571
142. Zinzani P.L., Pileri S., Bendandi M., Buzzi M., Sabbatini E., Ascani S., Gherlinzoni F., Magagnoli M., Albertini P., Tura S. (1998) Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients. *J. Clin. Oncol.* 16:1532-1537
143. Zuo Z., Dean N.M., Honkanen R.E. (1998) Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest. *J. Biol. Chem.* 273:12250-12258.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir beim Erstellen der Dissertationsschrift mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner, Direktor der Abteilung Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Frau Dr. Gabriele Hübinger danke ich für die Vergabe des interessanten Themas, die sorgfältige Einarbeitung in die umfangreiche Problematik, für die Zuverlässigkeit und Hilfsbereitschaft sowie die guten Ratschläge und Hinweise zur Durchführung der Experimente danken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern für das Verständnis, die Geduld und die Unterstützung bedanken, die sie mir während des Studiums entgegenbrachten.