

Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin
Arbeitsgruppe für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie

**Mechanismen der Apoptoseresistenz der Tumorzellen des
klassischen Hodgkin Lymphoms.**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Biochemie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Andreas Lietz**

Potsdam im April 2006

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	2
2	ABKÜRZUNGEN.....	7
3	ZUSAMMENFASSUNG.....	10
4	EINLEITUNG	13
4.1	Apoptose	13
4.1.1	Die Caspasekaskade	13
4.1.2	Aktivierung der Initiatorcaspasen	14
4.1.2.1	Caspase-8 und -10.....	14
4.1.2.2	Caspase-9	14
4.1.3	Apoptoseinhibitoren	16
4.1.4	Defekte in der Apoptoseregulation können zu Krankheiten führen.....	20
4.2	Die Geschichte des Hodgkin Lymphoms	21
4.3	Der zelluläre Ursprung der Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms.....	22
4.3.1	Untergruppen des Hodgkin Lymphoms	22
4.3.2	Die Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms stellen eine klonale B-Zellpopulation dar	23
4.3.3	HRS- und L&H-Zellen haben ihren Ursprung in B-Zellen aus unterschiedlichen Stadien der Keimzentrumsreaktion	24
4.3.3.1	Die Tumorzellen des NLPHL sind Keimzentrum-B-Zellen	25
4.3.3.2	Die Tumorzellen des kHL sind Keimzentrum- oder Post-Keimzentrum-B-Zellen	25
4.4	Die Bedeutung der Keimzentrumreaktion für die HRS-Zellen.....	25
4.4.1	c-FLIP schützt Keimzentrum-B-Zellen vor der CD95-vermittelten Negativselektion	25
4.4.2	HRS-Zellen sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose.....	26
4.4.3	EBV-Infektion als Erklärung für das Überleben der HRS-Zellen ohne BZR-Expression	27
4.5	Konstitutive NF-κB-Aktivität in HRS-Zellen.....	27
4.5.1	Die Funktion von NF- κ B	27
4.5.2	Das NF- κ B/I κ B-System.....	28
4.5.3	Die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen und ihre Ursachen.....	29
4.5.4	Die Folgen der konstitutiven NF- κ B-Aktivität für die HRS-Zellen	31
4.6	NF-κB-Inhibition als Therapieansatz	32

4.6.1	Verbindungen des Arsens können die Aktivierung von NF- κ B inhibieren.....	33
4.6.2	Die Geschichte der medizinischen Anwendung von Arsenverbindungen	34
4.7	Zielstellung der Arbeit	35
5	ERGEBNISSE.....	37
5.1	c-FLIP trägt zur Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose bei	37
5.1.1	Expression der DISC-bildenden Proteine in HRS-Zelllinien und in primären HRS-Zellen	37
5.1.2	c-FLIP Expression in HRS-Zellen.....	39
5.1.3	NF- κ B-Abhängigkeit der c-FLIP-Expression.....	41
5.1.4	c-FLIP wird in den DISC von HRS-Zellen integriert	43
5.1.5	Cycloheximid-Behandlung von HRS-Zellen bewirkt einen schnellen Verlust der c-FLIP-Expression und sensitiviert sie gegenüber CD95-vermittelter Apoptose	45
5.1.6	Durch siRNA-vermittelte Herunterregulation der c-FLIP-Expression werden HRS-Zellen für CD95 und TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose sensibilisiert	47
5.1.7	DISC-Formation in primären HRS-Zellen	52
5.2	Die NF-κB-Inhibition durch NaAsO₂/As₂O₃ induziert Apoptose in HRS-Zellen	55
5.2.1	NaAsO ₂ inhibiert die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen	55
5.2.2	Die NaAsO ₂ -vermittelte Inhibition des IKK-Komplexes führt zur Stabilisierung des I κ B α -Proteins.....	56
5.2.3	Die NaAsO ₂ -induzierte NF- κ B-Inhibition hängt von funktionellen I κ B-Proteinen ab.....	57
5.2.4	NaAsO ₂ verursacht eine Herunterregulation von NF- κ B-Zielgenen	58
5.2.5	NaAsO ₂ induziert Apoptose in HRS-Zellen.....	59
5.2.6	NaAsO ₂ -induzierte Apoptose korreliert mit der IKK/NF- κ B-Inhibition.....	61
5.2.7	Die ektope Expression von NF- κ B/p65 hebt die Apoptose induzierende Wirkung von NaAsO ₂ auf	63
5.2.8	Xenotransplantierte Hodgkintumore in NOD/SCID-Mäusen bilden sich durch Behandlung mit As ₂ O ₃ zurück.....	64
6	DISKUSSION.....	67
6.1	Die Inhibition des CD95-Systems in HRS-Zellen	67
6.1.1	In HRS-Zellen ist der CD95-Signalweg durch c-FLIP inhibiert	68
6.1.2	Die Bedeutung der CD95-Inhibition für das Hodgkin Lymphom	70
6.1.3	Die potentielle Bedeutung der starken CD95-Expression in den HRS-Zellen.....	72
6.1.4	Ausblick	77

6.2	Arsen-induzierte NF-κB-Inhibition und Apoptoseinduktion in HRS-Zellen	79
6.2.1	NaAsO ₂ -induzierte NF- κ B-Inhibition und Apoptose	79
6.2.2	Ursachen der NaAsO ₂ -induzierten Apoptose	82
6.2.3	Die potentielle klinische Bedeutung der Ergebnisse	83
6.3	Die Notwendigkeit neuer Therapieansätze für die Behandlung des Hodgkin Lymphoms	85
7	MATERIAL	86
7.1	Zelllinien	86
7.2	Bakterienstämme	86
7.3	Chemikalien und Reagenzien	86
7.4	Radioaktive Verbindungen	88
7.5	Antikörper	88
7.6	Enzyme und Peptide	90
7.7	Kits	90
7.8	Verbrauchsmaterialien	90
7.9	Plasmide	91
7.10	Oligonukleotide	91
7.10.1	PCR	91
7.10.2	EMSA	91
7.10.3	siRNA	92
7.11	Medien und Puffer	92
7.12	Geräte	93
7.13	Software	94
8	METHODEN	95
8.1	Zellkultur	95
8.1.1	Zellkulturbedingungen	95
8.1.2	Apoptose	95

8.1.2.1	Induktion von Apoptose durch NaAsO ₂ /As ₂ O ₃	95
8.1.2.2	Induktion von Apoptose durch CD95- oder TRAIL-R-Stimulation.....	95
8.1.2.3	Messung der Apoptoserate durch AnnexinV-FITC/PI-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie	96
8.1.2.4	Messung der Apoptoserate durch Acridinorangefärbung	96
8.1.2.5	Messung des Anteils toter Zellen durch PI-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie	96
8.1.3	Inhibition der Translation	96
8.1.4	Transiente Transfektion von Zellen.....	97
8.2	DNA	97
8.2.1	Generierung c-FLIP _S -Mut	98
8.3	RNA	98
8.3.1	RNA-Präparation.....	98
8.3.2	cDNA-Synthese.....	98
8.3.3	Northernblot	99
8.3.3.1	Generierung von Northernblotsonden	99
8.3.3.2	Radioktive Markierung der Northernblotsonden	99
8.3.3.3	RNA Agarosegelelektrophorese	100
8.3.3.4	RNA-Transfer auf eine Nylonmembran.....	100
8.3.3.5	Hybridisierung der Northernblotmembran	100
8.4	Protein.....	101
8.4.1	Lyse	101
8.4.2	Immunoblot	101
8.4.3	EMSA.....	102
8.4.3.1	Hybridisierung des Shift-Oligomers.....	102
8.4.3.2	Radioaktive Markierung des Shift-Oligomers.....	102
8.4.3.3	EMSA.....	103
8.4.4	IKK-Komplex-Kinaseassay.....	103
8.4.5	DISC-Immunpräzipitation	104
8.4.6	Durchflusszytometrie	105
8.5	Immunhistologie.....	105
8.5.1	Expression der DISC-Proteine	105
8.5.2	Analyse der Präformation eines DISCs in primären HRS-Zellen.....	105
8.6	Mausexperimente	106

9	LITERATURVERZEICHNIS	107
10	ANHANG	117
10.1	Lebenslauf	117
10.2	Publikationen	118
10.3	Summary	119
10.4	Allgemeinverständliche Zusammenfassung	121
10.5	Danksagung	123
10.6	Versicherung	125

2 Abkürzungen

α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gamma
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
ALPS	Autoimmun lymphoproliferatives Syndrom
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease-activating factor-1</i>
APL	Akute promyeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BZR	B-Zellrezeptor
BSA	bovines Serumalbumin
C	Caspase
CAD	Caspase aktivierte DNase
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD95L	CD95 Ligand
c-FLIP	<i>Cellular-FLICE inhibitory protein</i>
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
c-IAP	<i>Cellular-inhibitor of apoptosis</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
Cys	Cystein
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DISC	<i>Death inducing signaling complex</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid 5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBNA	EBV nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
FADD	<i>Fas associated death domain containing protein</i>
FCS	fetales Kälberserum
FDC	follikulär dendritische Zellen
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1β-converting enzyme</i>
FLIP	<i>Fllice inhibitory protein</i>
FU	Freie Universität
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde(n)

Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
HSP	Hitzeschockprotein
IB	Immunoblot
IC	Isotypkontrolle
ICAD	Inhibitor von CAD
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
KA	Kinaseassay
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kHL	klassisches Hodgkin Lymphom
l	Liter
L&H	lymphozytisch und histiozytisch
LMP	latentes Membranprotein
LMW	<i>Low molecular weight</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
M	Molar
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NB	<i>Northern blot</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NLPHL	nodulärlymphozyten prädominantes Hodgkin Lymphom
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
n.s.	nicht spezifisch
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
rh	<i>recombinant human</i>
RHD	Rel Homologie Domäne
RIP	<i>Receptor interacting protein</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TARC	<i>Thymus and activation related chemokine</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TZR	T-Zellrezeptor
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	<i>TNF-receptor associated death domain protein</i>
TRAF	<i>TNF-receptor associated factor</i>

TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UKBF	Universitätsklinikum Benjamin Franklin
UV	Ultraviolett

3 Zusammenfassung

Apoptose, der programmierte Zelltod, spielt eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Sterben von Zellen und ist außerdem an der Beseitigung von infizierten und geschädigten Zellen beteiligt. Apoptose kann durch Stimulation von Rezeptoren aus der Familie der TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptoren, wie z.B. CD95 (auch Fas), ausgelöst werden. Nach Liganden-induzierter Trimerisierung der Rezeptoren bindet FADD (*Fas associated death domain containing protein*) an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors und rekrutiert Caspase-8 (auch FLICE, *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme*) und/oder Caspase-10. Die räumliche Nähe der Caspasen in diesem als DISC (*death inducing signaling complex*) bezeichneten Komplex führt zu ihrer auto- und transkatalytischen Spaltung und damit Aktivierung. Diese Initiatorcaspasen aktivieren wiederum Effektorcaspasen. Dadurch wird das apoptotische Programm gestartet, welches zum Tod der Zelle führt. Kontrolliert wird dieser Vorgang von einer Vielzahl anti-apoptotischer Proteine, welche die Aktivierung von Caspasen oder deren aktivierte Formen inhibieren können. Störungen in diesem System sind an der Entstehung einer Reihe von Krankheiten beteiligt. Die Blockade der Apoptoseinduktion kann zur malignen Transformation von Zellen und damit zur Entstehung von Tumoren beitragen. Das klassische Hodgkin Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems. Die Tumorzellen sind große, einkernige Hodgkin- oder mehrkernige Reed/Sternbergzellen (HRS-Zellen). Sie leiten sich von Keimzentrum-B-Zellen ab. In HRS-Zellen fehlt die Expression einer Vielzahl von typischen B-Zellmarkern, darunter die des B-Zellrezeptors (BZR). Solche B-Zellen werden normalerweise während der Keimzentrumsreaktion negativ selektiert und sterben durch Apoptose. An diesem Prozess ist die Apoptoseinduktion durch CD95 beteiligt. In einer Reihe von malignen Erkrankungen wurden eine Herunterregulation der CD95-Expression oder Mutationen im CD95-Gen beobachtet. Es wird daher vermutet, dass CD95-induzierte Apoptose zur Entfernung von Tumorzellen beiträgt. Im Gegensatz dazu exprimieren sowohl primäre HRS-Zellen als auch etablierte HRS-Zelllinien in der Regel Wildtyp-CD95, sind aber trotzdem resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Komponenten des CD95-Systems, im Gegensatz zu anderen malignen Erkrankungen, in den HRS-Zellen hochreguliert sind, darunter CD95 selbst. In immunpräzipitierten DISCs von CD95-

stimulierten HRS-Zellen wurde neben FADD und Caspase-8/-10 auch c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) nachgewiesen. c-FLIP ist ein Caspase-8/-10-Homolog, das ebenfalls an FADD bindet, aber aufgrund fehlender katalytischer Aktivität die Aktivierung der Caspasen im DISC und damit die Apoptoseinduktion verhindert. Eine starke c-FLIP-Expression konnte in allen HRS-Zelllinien und in den HRS-Zellen nahezu aller untersuchter primärer Hodgkinfälle (55/59) gezeigt werden. Durch siRNA-vermittelte (*small interfering RNA*) Herunterregulation von c-FLIP war es möglich, HRS-Zelllinien gegenüber CD95-induzierter Apoptose zu sensitivieren. Dies zeigt, dass die CD95-Rezeptor-induzierte Apoptose in den HRS-Zellen nicht strukturell, sondern funktionell inhibiert ist und c-FLIP stark zu dieser Inhibition beiträgt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die c-FLIP-Expression in den HRS-Zellen von der konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear factor- κ B*) abhängt, die charakteristisch für diese Zellen ist. Normalerweise wird NF- κ B von einer Familie von Inhibitorproteinen, den I κ Bs (Inhibitoren von NF- κ B), im Zytoplasma zurückgehalten. Diverse Stimuli können den IKK (I κ B-Kinase)-Komplex aktivieren, der die I κ Bs an bestimmten Serinresten phosphoryliert. Dies hat die Ubiquitylierung und den Abbau der I κ Bs zur Folge, wodurch NF- κ B frei wird, in den Kern wandert und dort seine Zielgene aktiviert. Es wird angenommen, dass in HRS-Zellen ein konstitutiv aktiver IKK-Komplex und teilweise Mutationen der I κ B-Proteine zur konstitutiven NF- κ B-Aktivität beitragen. Zu den NF- κ B-abhängigen Genen in den HRS-Zellen gehören solche mit anti-apoptotischer und Zellzyklus-treibender Wirkung. Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen führt zu Apoptose und eingeschränkter Proliferation. Von dreiwertigem Arsen ist bekannt, dass es die Induzierbarkeit des IKK-Komplexes inhibieren kann und damit letztendlich die Aktivierung von NF- κ B. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Arsen in HRS-Zellen den konstitutiv aktiven IKK-Komplex inhibiert. In Zelllinien mit intakten I κ B-Proteinen führte dies zur NF- κ B-Inhibition und Apoptoseinduktion. Die Reduktion der NF- κ B-Aktivität ging mit der Herunterregulation von anti-apoptotischen und Proliferations-fördernden Zielgenen einher. Die ektope Überexpression von NF- κ B hob die Apoptose-induzierende Wirkung von Arsen teilweise auf. Durch Arsen-Behandlung von Mäusen konnte das Tumorstadium xenotransplantierte HRS-Zellen stark verlangsamt werden. In explantierten Tumorzellen konnte ebenfalls eine NF- κ B-Inhibition nachgewiesen werden.

Die NF- κ B-Inhibition durch Arsen trägt also stark zur Apoptoseinduktion in den HRS-Zellen bei.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Modulation der Apoptoseresistenz auf transkriptioneller Ebene oder auf Proteinebene neue therapeutische Ansätze für die Behandlung des Hodgkin Lymphoms bieten könnte. Der Einsatz von Arsen ist dabei besonders interessant, da Arsen schon für die Behandlung anderer maligner Erkrankungen eingesetzt wird.

4 Einleitung

4.1 Apoptose

Apoptose, der programmierte Zelltod, spielt in mehrzelligen Organismen eine wichtige Rolle, um das Gleichgewicht zwischen Zellbildung und Zelltod zu erhalten¹. Sie ist am Entfernen von Zellen beteiligt, die infiziert, mutiert oder beschädigt sind. Auch in der Kontrolle des Immunsystems ist die Apoptose wichtig. Sie spielt eine Rolle bei der Beseitigung von autoreaktiven Lymphozyten oder solchen mit nicht funktionellen Antigenrezeptoren und beim Beenden der Immunantwort². Apoptotische Zellen sind durch eine Reihe von Merkmalen gekennzeichnet: Membranausstülpungen, kondensierte Zellkerne und DNA-Fragmentierung. Dabei ist gewährleistet, dass der Inhalt der Zellen während dieses Vorganges nicht nach außen dringt und so eine ungewollte inflammatorische Immunreaktion ausgelöst wird. Die apoptotischen Zellen werden von phagozytischen Zellen aufgenommen^{3, 4}.

4.1.1 Die Caspasekaskade

Apoptose kann durch zytotoxischen Stress (intrinsischer Weg) oder durch Ligandeninduzierte Rezeptorsignale (extrinsischer Weg) ausgelöst werden⁵⁻⁷. In beiden Fällen kommt es letztlich zu einer Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind aspartatspezifische Cysteinproteasen^{8, 9}. Sie werden als inaktive Vorläuferproteine (Zymogene) exprimiert, den Procaspasen, und durch proteolytische Schritte von anderen Caspasen aktiviert. Dabei wird die N-terminale Prodomäne entfernt. Der C-terminale Teil wird in eine große (~20 kDa) und eine kleine (~10 kDa) Untereinheit gespalten. Vier Untereinheiten von zwei Procaspasen formen ein Heterotetramer, die aktive Caspase¹⁰. Die Caspasen sind dabei in zwei Gruppen unterteilt, die Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7), wobei die Initiatorcaspasen die Effektorcaspasen durch Spaltung aktivieren¹¹. Die Effektorcaspasen sind für die Aktivierung einer Reihe von Proteinen verantwortlich, die zum Zelltod führen. So aktiviert Caspase-3 z.B. die Caspase-aktivierte DNase (CAD). In lebenden Zellen ist CAD mit seinem Inhibitor ICAD (Inhibitor von CAD) assoziiert und inaktiv. Caspase-3-Aktivierung führt zum Abbau von ICAD und damit zur Aktivierung von CAD. CAD spaltet die genomische DNA zwischen den Nukleosomen¹²⁻¹⁴.

4.1.2 Aktivierung der Initiatorcaspasen

4.1.2.1 Caspase-8 und -10

Die Caspasen-8 (auch FLICE, *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme*) und -10 werden in der Regel durch Rezeptoren aus der TNF (Tumornekrose)-Rezeptorfamilie wie z.B. CD95 (auch Fas) und TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*)-Rezeptor aktiviert¹⁵. Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt durch die extrazelluläre Bindung der Liganden CD95L bzw. TRAIL, die in einer homotrimeren Form vorliegen. Nach Bindung der Liganden bilden auch die Rezeptoren Trimere. Dadurch wird eine Bindung des Adapterproteins FADD (*Fas associated death domain protein*) an den intrazellulären Teil der Rezeptoren möglich. Die Interaktion erfolgt durch die in beiden Proteinen enthaltene DD (*death domain*). An FADD wiederum binden Caspase-8 und/oder Caspase-10. Die Interaktion erfolgt über die sowohl in FADD als auch in den Caspasen vorhandene DED (*death effector domain*). Der gesamte Komplex wird DISC genannt (*death inducing signaling complex*). Durch die so induzierte räumliche Nähe der Caspasmoleküle werden diese auto- und transkatalytisch gespalten. Die Caspasefragmente verlassen den DISC und formen die aktive Caspase¹⁶⁻²⁰. Bei ausreichend starker Aktivierung können Caspase-8 und -10 die Effektorcaspasen aktivieren und das weitere apoptotische Programm starten. Solche Zellen werden Typ I Zellen genannt. In Typ II Zellen kommt es nach der Aktivierung des Rezeptors nur zu einer schwachen DISC-Bildung und damit auch schwachen Caspase-8/-10-Aktivierung. Diese Zellen sind auf eine Verstärkung des Apoptosesignals angewiesen, die über Mitochondrien-abhängige Caspase-9-Aktivierung verläuft²¹ (**Abb. 1**).

4.1.2.2 Caspase-9

Zytotoxischer Stress durch UV- und γ -Strahlung, genotoxische und zytotoxische Substanzen, oxidative freie Radikale und Wachstumsfaktorenentzug kann in Zellen Apoptose auslösen^{22, 23}. Dabei kommt es zu einer Destabilisierung der Mitochondrienmembran, an der Proteine aus der Bcl-2-Familie beteiligt sind. Diese Proteinfamilie ist in 3 Klassen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte nach funktionellen und strukturellen Merkmalen. Proteine der Klasse 1 wie z.B. Bcl-2 selbst und Bcl-x_L wirken anti-apoptotisch. Proteine der Klasse 2 wirken pro-apoptotisch. Sie weisen eine hohe strukturelle Homologie mit den Proteinen der Klasse 1 auf. Dazu gehören Bax und

Bak. Von Bax wird vermutet, dass es direkt mit der Mitochondrienmembran interagiert, dort Poren bildet und so zur Destabilisierung der Mitochondrienmembran beiträgt. Proteine der Klasse 3 wirken pro-apoptisch wie z.B. Bid und Bad. Sie weisen eine geringe strukturelle Homologie zu den Proteinen der Klasse 1 und 2 auf²⁴⁻²⁸. Proteine der Klasse 1 inhibieren durch Heterodimerbildung die pro-apoptischen Proteine der Klassen 2 und 3. Kommt es zur Destabilisierung der Mitochondrienmembran wird ein Gemisch von pro-apoptisch wirkenden Proteinen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol entlassen²⁹. Dazu gehören Cytochrom-c und Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor*). Cytochrom-c bindet an Apaf-1. Dadurch wird eine Konformationsänderung von Apaf-1 ausgelöst, welche die Bindung von dATP/ATP möglich macht. Dies führt zur Bildung eines heptameren Apaf-1/Cytochrom-c Komplexes^{30, 31}. Dieser rekrutiert Procaspase-9, die dadurch aktiviert wird. Der gesamte Komplex wird Apoptosom genannt. Die aktivierte Caspase-9 aktiviert die Effektorcaspasen^{32, 33}. Beim intrinsischen Weg spielt auch die Aktivierung von Caspase-2 eine Rolle, die zur Destabilisierung des Mitochondriums beiträgt. Der genaue Ablauf ist aber noch nicht bekannt³⁴ (**Abb. 1**).

Auch die Rezeptor-induzierte Apoptose kann zur Mitochondrien-abhängigen Aktivierung von Caspase-9 führen. Typ II Zellen sind auf diesen Weg angewiesen, da es hier nur zu einer schwachen DISC-Bildung und damit auch schwachen Caspase-8/-10-Aktivierung kommt. Der Mitochondrienweg dient hier als Verstärkung. Bei Rezeptor induzierter Apoptose wird die Mitochondriendestabilisierung durch Caspase-8/-10 vermittelte Spaltung von Bid induziert, einem Bcl-2-Protein der Klasse 3. Das trun-kierte Bid (tBid) vermittelt zusammen mit Bax oder Bak das Freilassen der schon genannten pro-apoptischen Proteine aus dem Mitochondrium. In Typ I Zellen wird ausreichend aktive Caspase-8/-10 gebildet um direkt die Effektorcaspasen zu aktivieren. Man unterscheidet Typ I von Typ II Zellen dadurch, dass in Typ II Zellen die Rezeptor-vermittelte Apoptose durch anti-apoptische Proteine der Bcl-2 Familie inhibiert werden kann, da sie stabilisierend auf das Mitochondrium wirken²¹ (**Abb. 1**).

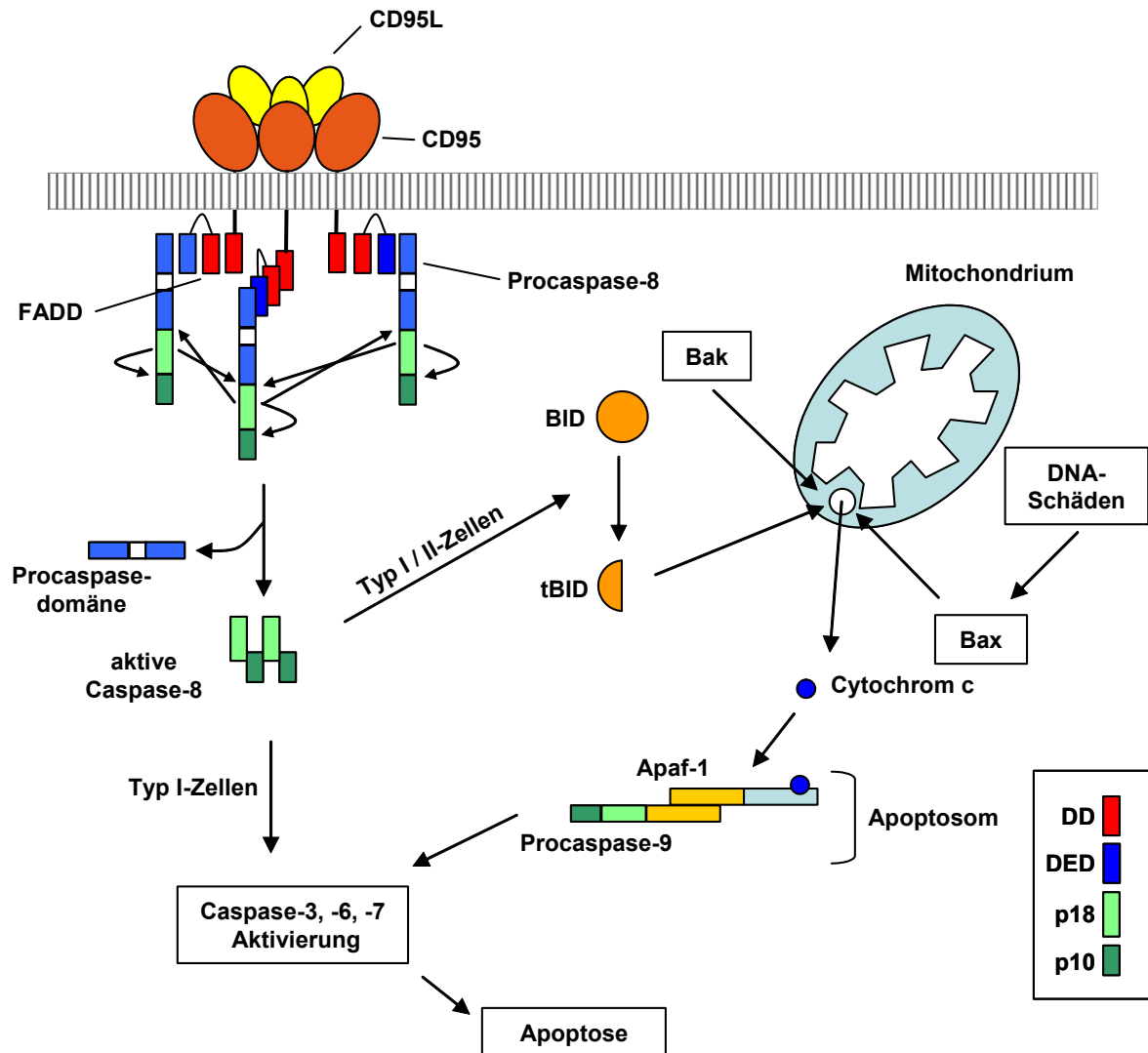


Abbildung 1
Apoptose-assoziierte Signalwege.

Oligomerisierung von Todesrezeptoren wie CD95 durch Ligandenbindung führt zur Bildung eines DISC und zur Aktivierung von Caspase-8 (oder -10). Im Fall von Typ I Zellen kommt es zur direkten Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7. In Typ I und II Zellen findet außerdem eine Spaltung von Bid statt, wodurch der mitochondriale Apoptoseweg aktiviert wird. Dieser wird auch durch zytotoxischen Stress aktiviert und führt zum Freilassen von u.a. Cytochrom c aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Cytochrom c bildet zusammen mit Apaf-1 und Procaspase-9 das Apoptosom. Dadurch kommt es auch hier zur Aktivierung der Effektorcaspasen. Die Aktivität der Effektorcaspasen führt letztlich zur Apoptose.

4.1.3 Apoptoseinhibitoren

Apoptose muss aufgrund der Unumkehrbarkeit des Zelltodes, ein gut kontrollierter Vorgang sein. Für praktisch jede Ebene der Apoptosekaskade gibt es Proteine, die dort inhibitorisch eingreifen. Im letzten Abschnitt wurden schon die anti-apoptischen Proteine der Bcl-2-Familie vorgestellt, die das Mitochondrium stabilisie-

ren und damit die Aktivierung von Caspase-9 verhindern. Darüber hinaus gibt es Proteine, welche die Aktivierung von Caspasen verhindern oder schon aktivierte Caspasen inhibieren (**Abb. 2**).

Eines der frühesten Ereignisse in der TNF-Rezeptor-induzierten Apoptose ist die Aktivierung von Caspase-8/-10. Hier kann c-FLIP (*FLICE-inhibitory protein*) die Aktivierung inhibieren. c-FLIP weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Caspase-8/-10 auf. Die Gene von c-FLIP, Caspase-8 und -10 liegen zusammen in einem Cluster auf Chromosom 2. Deshalb kann man annehmen, dass sie durch Duplikation entstanden sind³⁵. c-FLIP wird in zwei Spleißvarianten exprimiert, einer größeren (c-FLIP_L) und einer kleineren (c-FLIP_S)³⁶. c-FLIP_L ist strukturell homolog zur Caspase-8/-10. Es besitzt wie die Caspasen zwei N-terminale DEDs und zwei C-terminale Caspase-ähnliche, aber katalytisch inaktive Domänen (p20 und p12). c-FLIP_S verfügt nur über die zwei N-terminalen DEDs. Das C-terminale Ende weist keine Ähnlichkeiten mit Caspase-8 oder -10 auf. Beide Varianten von c-FLIP binden wie die Caspasen über eine DED an FADD und werden so in den DISC eingebaut³⁶⁻³⁹. Aufgrund der fehlenden katalytischen Aktivität von c-FLIP_{S/L} findet keine oder nur eine unvollständige Spaltung der Caspasen im DISC statt. Damit wird die Aktivierung der Initiatorcaspasen verhindert.³⁸ (**Abb. 2B**).

Die Inhibitoren der Apoptose (IAP) sind eine weitere Proteinfamilie, die in die Apoptose eingreift. Dazu gehören beispielsweise XIAP, c-IAP1 und c-IAP2. IAPs sind in der Lage, die bereits aktivierten Caspasen-3, -7 und -9 zu binden und dadurch zu inhibieren⁴⁰⁻⁴². Im Fall von Caspase-3 und -7 wird durch die Bindung die Substratbindungsstelle der Caspasen verdeckt und so die Substratbindung verhindert⁴³⁻⁴⁷. Bei Caspase-9 erfolgt durch die Bindung eine Konformationsänderung, die zur Inhibition führt^{48, 49} (**Abb. 2A**).

IAP-Proteine greifen auch in die Signalkaskade ein, die von den TNF-Rezeptoren TNF-RI und TNF-RII gestartet wird. Beide Rezeptoren werden durch den Liganden TNF α aktiviert⁵⁰. Die Stimulation von TNF-RI kann sowohl zum Start der Caspasekaskade und damit zur Apoptose führen, als auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) aktivieren⁵¹. NF- κ B induziert die Expression einer Reihe antiapoptotisch wirkender Gene, darunter auch c-IAP1, c-IAP2 und XIAP⁵². Die Art des intrazellulären Signals, das durch den TNF-RI induziert wird, hängt von den rekrutier-

ten Adapterproteinen ab. Die Aktivierung von TNF-RI führt zur intrazellulären Bindung von TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) an die DD des Rezeptors. TRADD dient als Plattform zur Rekrutierung weiterer Adapterproteine⁵³⁻⁵⁷. Die Bindung von FADD an TRADD führt zur Bindung von Caspase-8/-10 und zur Aktivierung der Caspasekaskade⁵⁸. c-IAP1 komplexiert TRADD mit dem Protein TRAF2 (*TNF-receptor associated factor 2*)⁵⁹. Die Bindung von TRAF2 an den Rezeptorkomplex vermittelt die NF- κ B-Aktivierung⁵². Durch den TNF-RII kann keine Caspasekaskade gestartet und damit auch keine Apoptose induziert werden. Die Aktivierung führt zur Bindung von TRAF1 und TRAF2 an seine DD. c-IAP1 und c-IAP2 wurden in diesem Komplex nachgewiesen⁶⁰. Es wird vermutet, dass sie die Bindung der TRAF-Proteine an den Rezeptorkomplex und damit die NF- κ B-Aktivierung erleichtern⁵² (**Abb. 2A**).

Die Entscheidung, ob in einer Zelle durch einen bestimmten Stimulus Apoptose induziert wird, ergibt sich daher aus einem komplexen Zusammenspiel aus pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Darüber hinaus hängt sie, wie man am Beispiel des TNF-RI und TNF-RII sieht, auch von der Konstellation der Rezeptoren ab, welche durch einen bestimmten Stimulus aktiviert werden.

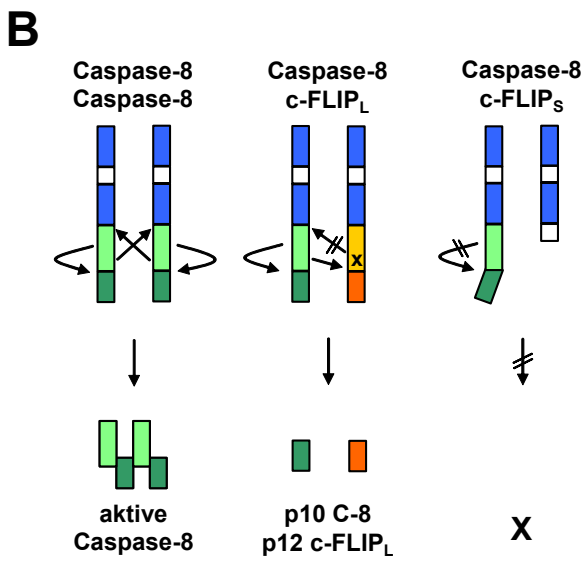
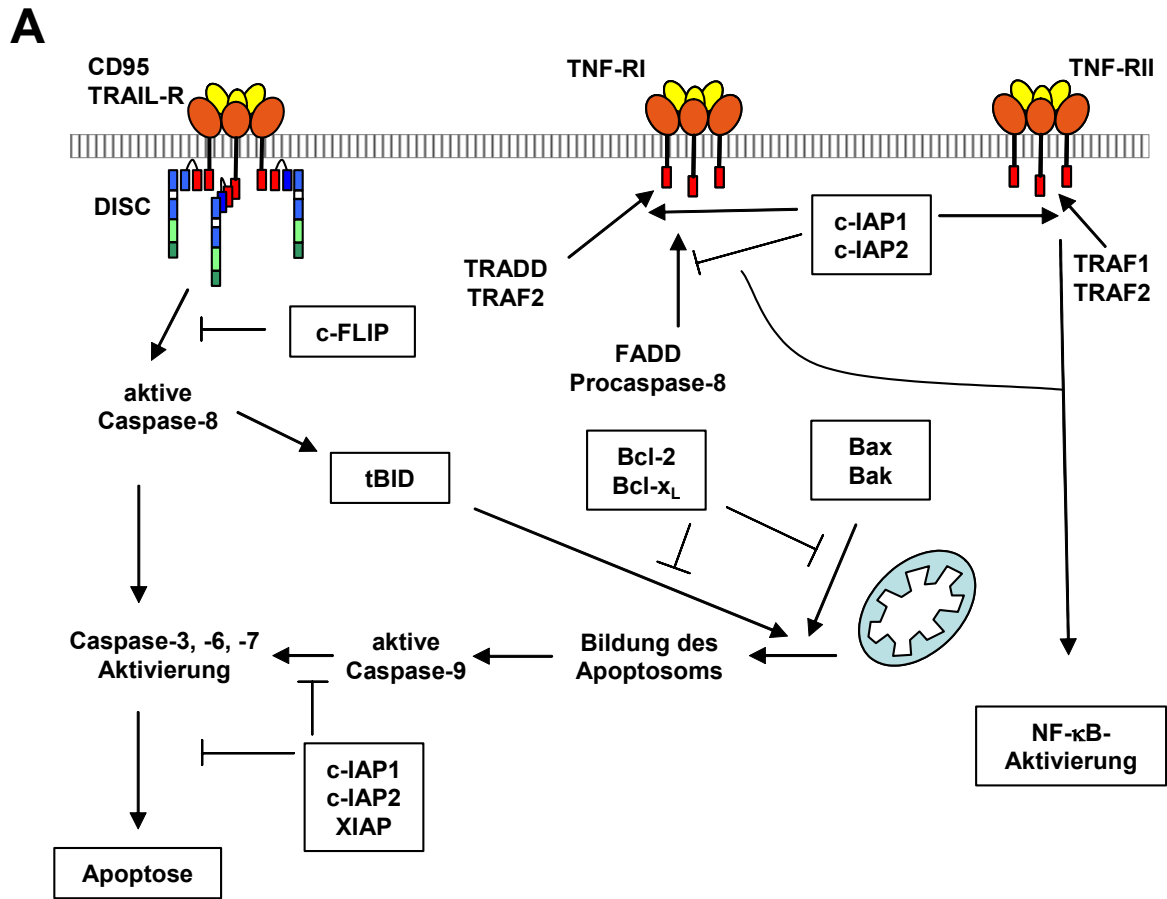


Abbildung 2 Apoptoseinhibitoren

(A) Darstellung der Angriffspunkte von Apoptoseinhibitoren. Anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L) inhibieren den mitochondrialen Apoptoseweg durch Dimerbildung mit den pro-apoptotischen Proteinen dieser Familie (z.B. tBID, Bax, Bak). So wird die Destabilisierung der Mitochondrienmembran und damit das Freilassen pro-apoptotischer Faktoren verhindert. Proteine der IAP-Familie (z.B. c-IAP1, c-IAP2, XIAP) interagieren mit den aktiven Caspasen-3, -7 und -9 und machen sie so unwirksam. Außerdem vermitteln c-IAP1 und 2 die Bindung von TRAF1 bzw. 2 an den TNF-RI und II und dadurch die Aktivierung von NF-κB. Durch NF-κB werden eine Reihe anti-apoptotischer Gene aktiviert. c-FLIP ist in der Lage, die Aktivierung von Caspase-8 bzw. -10 im DISC zu verhindern. Der Mechanismus wird im Teil (B) dieser Abbildung erklärt.

(B) In der Abbildung sind die Möglichkeiten dargestellt, durch die c-FLIP eine Caspase-8-Aktivierung verhindern kann. Bei der Interaktion Caspase-8/Caspase-8 im DISC kommt es zu einer ganz normalen Aktivierung der Caspase. Befindet sich c-FLIP_L im DISC findet noch die autokatalytische Spaltung der Caspase sowie eine transkatalytische Spaltung von FLIP_L statt. Aufgrund der fehlenden katalytischen Aktivität von FLIP_L (x) kommt es zu keinen weiteren Spaltvorgängen. Befindet sich FLIP_S im DISC findet keine Spaltung statt.

4.1.4 Defekte in der Apoptoseregulation können zu Krankheiten führen

Sowohl ein zu viel als auch ein zu wenig an Apoptose kann an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein. Eine überschießende Apoptose ist bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit oder der spinalen Muskelatrophie ein entscheidender Faktor. Sie führt in beiden Fällen zum Verlust von Neuronen⁶¹⁻⁶³. Bei einer Infektion mit dem HIV (*human immunodeficiency virus*) kommt es zu einem Verlust von CD4-T-Zellen. Die daraus resultierende Suppression des Immunsystems führt zur Entstehung von AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*). Der Großteil der verloren gegangenen T-Zellen sind dabei nicht-infizierte Zellen. In ihnen wird durch HIV-infizierte T-Zellen Apoptose induziert⁶⁴.

Apoptose ist wichtig für die Beseitigung von autoreaktiven Lymphozyten⁶⁵. Eine fehlende Aktivierbarkeit dieses Vorgangs kann zu Autoimmunkrankheiten führen. Ein Beispiel dafür ist das autoimmun lymphoproliferative Syndrom (ALPS). In Patienten mit diesem Syndrom wurden Keimbahnmutationen von Genen nachgewiesen, die an TNF-Rezeptor induzierter Apoptose beteiligt sind. Je nach Typ der Erkrankung sind das CD95 (Typ Ia), CD95L (Typ Ib) oder Caspase-10 (Typ II)⁶⁵.

Eine besondere Bedeutung hat eine deregulierte Apoptose bei der Entstehung von malignen Erkrankungen. In vielen Tumorzellen wurden Mechanismen nachgewiesen, die sie vor einer Apoptoseinduktion schützen. So kommt es beispielsweise in den Tumorzellen von Leukämien und des Neuroblastoms zur einer starken Herunterregulation von CD95^{66, 67}. Mutationen im CD95-Gen wurden in malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems und in soliden Tumoren nachgewiesen⁶⁸⁻⁷². Es wird postuliert, dass die Inhibition des CD95-Systems ein Mechanismus von Tumorzellen ist, einer Antwort des Immunsystems zu entgehen. Diese Antwort wird von zytotoxischen T-Zellen vermittelt, die auf ihrer Oberfläche den CD95L tragen und so in potentiellen Tumorzellen Apoptose induzieren könnten⁷³⁻⁷⁷.

Die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen ist an der malignen Transformation von Zellen beteiligt und trägt damit zur Entstehung von Krebs bei. In den Tumorzellen des follikulären Lymphoms wurde die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 nachgewiesen⁷⁸. Grund dafür ist eine Translokation zwischen den Chromosomen 14 und 18. Dabei gerät das Bcl-2-Gen unter die gleiche

transkriptionelle Kontrolle wie das Gen für die schwere Kette der Immunglobuline ⁷⁹. Die Überexpression von Bcl-2 inhibiert die Apoptoseinduktion durch eine Reihe von Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktorentzug oder den Kontakt mit zytotoxischen T-Zellen und trägt so zur malignen Transformation von Zellen bei ⁸⁰.

Neben Translokationen kann auch eine Deregulation von Transkriptionsfaktoren zur Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen und damit zur malignen Transformation von Zellen beitragen. So führt der deregulierte Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-x_L und c-IAP2 beim Hodgkin Lymphom ⁸¹.

Da Störungen im Gleichgewicht zwischen anti- und pro-apoptotischen Faktoren an der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt sind, stellt die Beeinflussung dieses Gleichgewichts einen möglichen Ansatzpunkt für neue Therapien dar.

4.2 Die Geschichte des Hodgkin Lymphoms

Thomas Hodgkin berichtete 1832 in seinem Artikel *"On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen"* von sieben verstorbenen Patienten mit abnorm vergrößerten Lymphknoten und vergrößerter Milz ⁸². Viele Forscher seiner Zeit hielten diese Symptome für Folgeerscheinungen anderer Erkrankungen. Thomas Hodgkin war der Meinung, dass es sich dabei um eine eigenständige Krankheit handelt. Er verwies darauf, dass die gleiche oder ähnliche Krankheit bereits 1666 von Malpighi beschrieben wurde. Die Arbeit von Thomas Hodgkin fand anfangs nicht viel Anerkennung. 1856 veröffentlichte Sir Samuel Wilks einen Artikel über eine schweinefettartige (*Jardaceous*) Krankheit. In dieser Arbeit beschrieb er zehn Patienten mit Lymphknotenschwellungen, darunter drei aus der Originalarbeit von Thomas Hodgkin. 1865 beschrieb er die Krankheit genauer und verwies darauf, dass die ersten Beschreibungen von Thomas Hodgkin stammten ⁸³. Seitdem trägt diese Krankheit seinen Namen. Ab 1860 berichteten europäische Forscher im Zusammenhang mit der Hodgkinkrankheit über die Entdeckung von vergrößerten Zellen mit zwei oder mehr Zellkernen. 1878 wurde die erste Zeichnung solcher Riesenzellen von Greenfield angefertigt. Aber es waren Dorothy Reed (1902) ⁸⁴ und Carl Sternberg (1898) ⁸⁵, denen die erste genaue histopathologische Beschreibung der Hodgkinkrankheit, wie sie damals genannt wurde, zugeschrieben wird. Die malignen Zellen des Hodgkin Lymphoms er-

hielten deshalb die Namen der drei entscheidenden Personen: einkernige Riesenzellen von Thomas Hodgkin und mehrkernige Zellen von Dorothy Reed und Carl Sternberg (HRS-Zellen).

Die Ursachen für das Hodgkin Lymphom wurden lange diskutiert. Thomas Hodgkin hielt die Krankheit für eine Hypertrophie des lymphatischen Systems. Viele Forscher waren der Meinung, dass eine Infektion als Ursache in Frage kommt, da das Hodgkin Lymphom oft zusammen mit einer Tuberkulose beobachtet wurde. Die Suche nach einem "infektiösen Agens" hielt lange an. 1915 fokussierten Bunting und Yates ihr Interesse auf das Diphtheriebakterium, Parson und Posten auf Brucella, ein weiteres Bakterium. 1932 entdeckte Gordon, dass er mit Extrakten von befallenen Lymphknoten bei Kaninchen eine Enzephalitis auslösen konnte. Er rückte damit Viren als mögliche Krankheitserreger in das Zentrum des Interesses ⁸⁶. Erst ab 1990 gelang der Nachweis, dass es sich beim Hodgkin Lymphom um eine maligne Erkrankung handelt ⁸⁷.

4.3 Der zelluläre Ursprung der Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms

4.3.1 Untergruppen des Hodgkin Lymphoms

Das Hodgkin Lymphom ist eine maligne Erkrankung sekundärer lymphatischer Organe. Der zelluläre Ursprung der Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms war lange unbekannt. Erschwert wurden die Untersuchungen dadurch, dass die für diese Krankheit typischen Zellen nur ca. 1 % der Zellen eines befallenen Lymphknotens ausmachen. Sie sind von einer Reihe benigner Zellen wie T-Zellen, Histiozyten, Eosinophilen und Plasmazellen umgeben. Dieses Begleitinfiltrat erschwerte es, eine reine Tumorzellpopulation aufzureinigen ⁸⁸.

Um den zellulären Ursprung der Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms zu ermitteln, wurde die Expression von Zelllinienmarkern in diesen Zellen immunhistochemisch untersucht. Dabei ergab sich zunächst, dass das Hodgkin Lymphom in zwei große Gruppen unterteilt werden kann:

- das klassische Hodgkin Lymphom (kHL)
- das nodulärlymphozyten prädominante Hodgkin Lymphom (NLPHL).

Die malignen Riesenzellen des NLPHL werden lymphozytische und histiozytische (L&H) Zellen genannt, die des kHL behalten den Namen HRS-Zellen.

Die L&H-Zellen des NLPHL exprimieren eine Reihe von B-Zellmarkern wie z.B. den B-Zellrezeptor (BZR), CD19, CD20 und CD79a. Das machte es wahrscheinlich, dass sie ihren Ursprung in B-Zellen haben. Den HRS-Zellen des kHL fehlt in der Regel die Expression dieser B-Zellmarker. Im Gegensatz dazu exprimieren sie Marker einer Reihe anderer Zelltypen so z.B. das Chemokin TARC (dendritische Zellen), CD15 (Granulozyten, Monozyten) und CD30 (aktivierte Lymphozyten)^{89, 90}. Dies machte die Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp schwer. Unabhängig davon wurde das kHL je nach Zusammensetzung des Begleitinfiltrats, das die HRS-Zellen umgibt, in vier Untergruppen eingeteilt:

- nodulär sklerosierendes kHL
- gemischt zelluläres kHL
- lymphozytenreiches kHL
- lymphozytenarmes kHL⁸⁸.

4.3.2 Die Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms stellen eine klonale B-Zellpopulation dar

Um eine Abstammung der HRS-Zellen von B-Zellen zu beweisen, wurde in einzelnen primären Tumorzellen die Sequenz der Immunglobulingene ermittelt. In B-Zellen findet eine Umstellung dieser Gene statt. Diese Umstellung ist für die Diversität der Antikörper verantwortlich und einmalig für jede B-Zelle.

Die Diversität der Antikörper entsteht während der Differenzierung von B-Zellen. Dabei kommt es zu einer Reihe von Umlagerungen in verschiedenen Gen-Abschnitten, die für die variable (V) Region der Antikörper kodieren. Bei den schweren Ketten (H-Ketten) der Antikörper handelt es sich um die drei Gen-Segmente V_H , D_H und J_H , bei den leichten Ketten (L-Ketten) κ und λ um die zwei Gen-Segmente V_L und D_L . Da es eine Reihe von Gen-Segmenten von jedem Typ gibt und es bei der Umlagerung außerdem an den Schnittpunkten zur Entfernung und/oder Addition von Nukleotiden kommt, ergibt sich eine sehr große Vielfalt an verschiedenen Antikörpermolekülen. Jede B-Zelle verfügt über eine einzigartige Umstellung der Genseg-

mente. Daher lässt sich anhand der Sequenz der V-Regionen die Klonalität einer B-Zellpopulation untersuchen⁹¹.

Sowohl für L&H-Zellen als auch für die HRS-Zellen konnten Neuaneordnungen der Immunglobulingene nachgewiesen werden, was ihren B-Zellursprung beweist. Da die Tumorzellen eines Patienten immer über die gleiche Neuaneordnung der Immunglobulingene verfügen, konnte gezeigt werden, dass sie die klonale Expansion einer B-Zelle darstellen^{87, 92, 93}.

4.3.3 HRS- und L&H-Zellen haben ihren Ursprung in B-Zellen aus unterschiedlichen Stadien der Keimzentrumsreaktion

B-Zellen, die durch spezifische Antigenerkennung und gleichzeitige Kostimulation von T-Helferzellen aktiviert wurden, wandern in die Lymphknoten und etablieren dort Keimzentren. Das Keimzentrum ist dabei in eine dunkle und eine helle Zone aufgeteilt. In der dunklen Zone proliferieren die B-Zellen und die somatische Hypermutation wird aktiviert. Dadurch kommt es in den B-Zellen zu einer Erhöhung der Mutationsrate in der variablen Region der Immunglobulingene. Ziel dieser zufallsgesteuerten Vielfalt sind Immunglobuline mit einer erhöhten Affinität zu ihrem Antigen⁹¹. Ist dieser Vorgang abgeschlossen, wandern die B-Zellen in die helle Zone des Keimzentrums, in der die Affinität des BZR gestestet wird. B-Zellen, die aufgrund der somatischen Hypermutation einen niedrig-affinen oder nicht mehr funktionstüchtigen BZR entwickelt haben, werden negativ selektiert und sterben durch Apoptose⁹¹. Zellen mit vorteilhaften Mutationen werden durch extrazelluläre Signale positiv selektiert. In der dunklen Zone des Keimzentrums, während der somatischen Hypermutation, erhalten sie Überlebenssignale von follikulär dendritischen Zellen (FDC). Die Art der Signale oder der Wechselwirkungen ist zurzeit noch unbekannt. Der Schutz erfolgt wahrscheinlich auch ohne die Präsentation eines BZR. In der hellen Zone erfolgt das Überlebenssignal durch Stimulation des BZR durch Antigen, das von FDCs präsentiert wird. Nur B-Zellen mit einem hoch-affinen BZR erhalten ausreichende Signale, um zu überleben. Ein zweites Überlebenssignal stammt von T-Zellen. Das vom BZR erkannte Antigen wird von der B-Zelle aufgenommen und zu Peptiden prozessiert, die zusammen mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*) wieder auf der Oberfläche präsentiert werden. Dort wird es vom T-

Zellrezeptor (TZR) der T-Helferzellen in der hellen Zone erkannt und gebunden. Gleichzeitig wird CD40 der B-Zellen, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, durch CD40L auf der Oberfläche der T-Zellen stimuliert. Ist durch die somatische Hypermutation ein BZR gegen Autoantigene entstanden erfolgt diese Stimulation nicht, da die mit dem MHC präsentierten Peptide von den T-Zellen nicht erkannt werden⁹¹.

4.3.3.1 Die Tumorzellen des NPLHL sind Keimzentrum-B-Zellen

In den L&H-Zellen konnten somatische Hypermutationen in den Immunglobulinen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dieser Vorgang in den Tumorzellen noch nicht abgeschlossen ist. Sie weisen also gleich umgestellte Immunglobuline auf, unterscheiden sich aber im Muster der Hypermutationen. Dies führt zu einer intraklonalen Diversität. So konnte gezeigt werden, dass die L&H-Zellen von Keimzentrum-B-Zellen abstammen^{92, 93}.

4.3.3.2 Die Tumorzellen des kHL sind Keimzentrum- oder Post-Keimzentrum-B-Zellen

Auch in HRS-Zellen wurden somatische Hypermutationen nachgewiesen. Im Gegensatz zu den L&H-Zellen ist dieser Vorgang aber abgeschlossen. Deshalb tritt beim kHL keine intraklonale Diversität auf. Das lässt den Schluss zu, dass HRS-Zellen die Keimzentrumreaktion durchlaufen haben und somit von Keimzentrum- oder Post-Keimzentrum-B-Zellen abstammen^{87, 94}.

4.4 Die Bedeutung der Keimzentrumreaktion für die HRS-Zellen

4.4.1 c-FLIP schützt Keimzentrum-B-Zellen vor der CD95-vermittelten Negativselektion

Bei Eintritt in das Keimzentrum kommt es in den B-Zellen zu einer Herunterregulation von anti-apoptotischen und einer Hochregulation von pro-apoptotischen Proteinen⁹⁵. Um zu überleben benötigen die B-Zellen Signale, die sie nur bei Expression eines hochaffinen, nicht autoreaktiven BZR erhalten⁹⁶. B-Zellen mit mangelhafter BZR-Expression sterben durch Apoptose. An diesem Vorgang ist CD95-induzierte Apoptose beteiligt^{96, 97}.

In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass frisch isolierte Keimzentrum-B-Zellen nach kurzer Zeit durch Apoptose sterben. In ihnen wurde ein aktivierter CD95-DISC nachgewiesen, der für die Apoptoseinduktion verantwortlich gemacht wird. Dabei wird vermutet, dass diese DISC-Induktion ohne Anwesenheit des CD95L-unabhängig verläuft, da dieser in dem DISC nicht nachweisbar war^{98, 99}. Durch verschiedene Stimuli kann aber die Apoptose in diesen Zellen unterdrückt werden. Dazu gehören die gemeinsame Kultivierung mit FDCs, die Stimulation des BZR durch quervernetzende Antikörper oder von CD40 durch den entsprechenden Liganden^{98, 99}, also die Signale, die im Keimzentrum für das Überleben der B-Zellen notwendig sind. Frisch isolierte Keimzentrum-B-Zellen exprimieren c-FLIP_L, das zusammen mit CD95, FADD und Caspase-8 in dem aktivierten CD95-DISC nachgewiesen wurde. Dadurch wird die Aktivierung der Caspase und damit die Apoptoseinduktion inhibiert. Die Expression von c-FLIP_L geht nach der Isolation der Keimzentrum-B-Zellen verloren, so dass die CD95-vermittelte Apoptose nicht mehr blockiert wird. Die Stimulation von CD40, des BZR oder die Kultivierung mit FDCs kann die Expression von c-FLIP_L aufrechterhalten oder wieder induzieren. Damit ist die Expression von FLIP_L sehr eng mit dem Apoptoseschutz dieser Stimuli verbunden^{98, 99}.

4.4.2 HRS-Zellen sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose

Da HRS-Zellen von Keimzentrum-B-Zellen abstammen, stellt sich die Frage, warum sie trotz fehlender BZR-Expression überleben können. Da bei der Beseitigung BZR-negativer B-Zellen CD95-induzierte Apoptose eine Rolle spielt, müssen die HRS-Zellen dagegen einen Schutzmechanismus entwickelt haben. In Tumorzellen anderer maligner Erkrankungen wurden Mutationen im CD95-Gen oder die Herunterregulation der CD95-Expression nachgewiesen, die eine Resistenz gegenüber CD95-Stimulation vermitteln⁶⁶⁻⁷². Aus diesem Grund wurde das Auftreten solcher Defekte auch in den HRS-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die etablierten HRS-Zelllinien resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose sind. Aber sowohl in den Zelllinien als auch in primären HRS-Zellen konnten Mutationen des CD95-Gens nur selten nachgewiesen werden, so dass solche Defekte keine ausreichende Erklärung für die CD95-Resistenz der HRS-Zellen bieten¹⁰⁰⁻¹⁰². Neben der Überexpression von anti-apoptischen Pro-

teinen aus der IAP- und der Bcl-2-Familie, die die Aktivierung von Caspasen inhibieren können^{81, 103}, wurde in primären HRS-Zellen eine abgeschwächte Expression der Caspase-8 gezeigt¹⁰⁴. Es ist aber unklar, inwieweit diese Befunde zur CD95-Resistenz der HRS-Zellen beitragen.

4.4.3 EBV-Infektion als Erklärung für das Überleben der HRS-Zellen ohne BZR-Expression

In ca. 50% der Fälle des kHL weisen die HRS-Zellen eine latente Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) auf. Sie exprimieren die vom EBV kodierten Gene latentes Membranprotein (LMP)-1 und -2a sowie das nukleäre Antigen (EBNA)-1¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Von LMP-1 ist bekannt, dass es einen konstitutiv aktiven CD40 imitiert¹⁰⁸. LMP-2a hat die Wirkung eines stimulierten BZR¹⁰⁹. Das entspricht den Signalen, die für ein Überleben der B-Zellen im Keimzentrum nötig sind. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine EBV-Infektion von Keimzentrum-B-Zellen diese unabhängig von der Expression eines BZR macht und sie vor Apoptose schützt¹¹⁰.

In den Fällen des kHL mit latenter EBV-Infektion könnte diese das Überleben der HRS-Zellen trotz fehlender BZR-Expression erklären. Vermutet wird zudem, dass die EBV-Infektion an der malignen Transformation der Keimzentrum-B-Zellen zu EBV-positiven-HRS-Zellen beteiligt ist¹¹⁰.

4.5 Konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen

4.5.1 Die Funktion von NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen sowie während der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr. Außerdem gibt es Hinweise, dass eine deregulierte und konstitutive NF- κ B-Aktivität zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren beiträgt^{111, 112}.

Im Verlauf der angeborenen Immunabwehr gegen Mikroorganismen findet in Zellen am Ort der Infektion eine NF- κ B-Aktivierung statt. Diese Aktivierung führt zur Expression einer Reihe von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, welche für die Migration von inflammatorischen und phagozytotischen Zellen an den Ort der Infektion notwendig sind^{111, 113}. Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch die Bakterien selbst, bakterielle Produkte oder auch durch Bestandteile von Viren. Eine Rolle

spielen dabei z.B. die verschiedenen Toll ähnlichen Rezeptoren (TLR, *Toll like receptor*)¹¹⁴. Dabei wird beispielsweise der TLR4 durch das LPS (Lipopolysaccharid) von Gram-negativen Bakterien aktiviert, der TLR2 durch Peptidoglykane und Lipoproteine von Gram-positiven Bakterien¹¹⁴ und der TLR3 durch doppelsträngige RNA von Viren¹¹⁵.

Auch in der adaptiven Immunantwort spielt NF- κ B eine wichtige Rolle. Eine defekte NF- κ B-Aktivierung kann zu einer gestörten Organisation von Keimzentren in den sekundären lymphatischen Organen führen^{116, 117}. Dies zeigt sich z.B. in einer gestörten Ausbildung des Netzwerkes von Antigen-präsentierenden FDCs in den Keimzentren¹¹⁷⁻¹²⁰. Ein Block in der NF- κ B-Aktivierung resultiert auch in einer gestörten Bildung von Keimzentrum-B-Zellen^{121, 122}.

NF- κ B spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Die Zielgene von NF- κ B umfassen inflammatorische, immunregulatorische, anti-apoptotische und Zellzyklus-treibende Gene, die alle zur Entstehung von Krebs beitragen können. Eine konstitutive NF- κ B-Aktivität wurde in den Tumorzellen einer Reihe von malignen Erkrankungen nachgewiesen. Sie führt zur Apoptoseresistenz, verstärkter Proliferation und Metastasenbildung der Tumorzellen. Zu den anti-apoptotisch wirkenden Zielgenen gehören z.B. solche aus der Bcl-2 Familie und IAP-Proteine. Zu den Zellzyklus-treibenden Zielgenen von NF- κ B gehören CyclinD1 und CyclinD2¹¹².

4.5.2 Das NF- κ B/I κ B-System

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der sich aus den Untereinheiten p50, p52, p65 (RelA), RelB oder cRel zusammensetzt, welche Homo- oder Heterodimere bilden können. p50 und p52 werden als größere Vorläuferproteine, p105 bzw. p100, exprimiert, in denen sie den N-terminalen Bereich bilden. Zum Freisetzen von p50 und p52 werden diese Proteine posttranslational prozessiert. Alle NF- κ B-Untereinheiten besitzen eine Rel Homologie Domäne (RHD), über die die Interaktion untereinander erfolgt. Die RHD enthält außerdem eine Kernlokalisationssequenz, vermittelt die sequenzspezifische Bindung der Dimere an die DNA und ist für die Interaktion mit den Inhibitoren von NF- κ B verantwortlich. Im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten besitzen p50 und p52 keine Transaktivierungsdomäne. Daher können p50 und p52 Homodimere als transkriptionelle Repressoren wirken^{111, 113}. Im inaktiven Zu-

stand werden die NF- κ B-Dimere von einer Proteinfamilie, den Inhibitoren von NF- κ B (I κ B), im Zytoplasma zurückgehalten. Bekannt sind I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ und I κ B γ . Diese verfügen über 6-7 Ankyrindomänen, mit denen sie an die RHD von NF- κ B binden^{111, 123}. Durch Stimulation von Zellen z.B. durch TNF α oder LPS wird eine Kinasekaskade gestartet. Dadurch wird letztlich der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex aktiviert. Dieser besteht meist aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ . Durch den IKK-Komplex werden die I κ B-Proteine an N-terminalen Serinresten phosphoryliert. Das wiederum führt zu deren Ubiquitylierung und einer nachfolgenden proteasomalen Degradation. Dadurch werden die NF- κ B-Komplexe freigesetzt, wandern in den Zellkern und interagieren mit den Promotoren ihrer Zielgene¹²⁴. Eines der Zielgene ist I κ B α selbst. Durch diese Rückkoppelung ist gewährleistet, dass eine NF- κ B-Aktivierung wieder beendet werden kann¹²⁵ **(Abb. 3)**.

4.5.3 Die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen und ihre Ursachen

In HRS-Zellen ist das NF- κ B/I κ B-System derart dereguliert, dass es zu einer ständigen Kernaktivität von NF- κ B kommt. Die Kernlokalisation von NF- κ B konnte sowohl in primären HRS-Zellen als auch in den HRS-Zelllinien nachgewiesen werden^{126, 127}. Zu der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen tragen mehrere molekulare Defekte bei **(Abb. 3)**.

- (1) Sowohl in primären HRS-Zellen als auch in HRS-Zelllinien wurden mutierte Formen von I κ B α - und I κ B ϵ -Genen bzw. den entsprechenden Proteinen nachgewiesen. Diese mutierten I κ B-Proteine sind nicht mehr in der Lage NF- κ B zu binden und damit zu inhibieren. Derartige Mutationen kommen aber nicht in allen primären HRS-Zellen und HRS-Zelllinien vor¹²⁸⁻¹³¹ und können nicht in jedem Fall die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen erklären.
- (2) In allen untersuchten Zelllinien ist der IKK-Komplex konstitutiv aktiv. Es wird angenommen, dass dies zu einem ständigen Abbau der I κ B-Proteine führt und eine effiziente NF- κ B-Inhibition verhindert¹³².
- (3) In ca. 50 % der Fälle des kHL weisen die HRS-Zellen eine latente Infektion mit dem EBV auf⁸⁸. Die vom EBV kodierte und von den HRS-Zellen exprimierte

Gene latentes Membranprotein (LMP)-1 und -2a imitieren die Wirkung eines aktiven CD40¹⁰⁸ bzw. BZR¹⁰⁹. Sowohl durch den BZR als auch durch CD40 kann NF- κ B aktiviert werden. Damit könnten auch LMP-1 und LMP-2a zur NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen beitragen⁸⁸.

- (4) In den HRS-Zellen werden Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie stark exprimiert, so z.B. CD40 und CD30, die jeweils NF- κ B aktivieren können^{133, 134}. Für CD30 konnte in den HRS-Zellen eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors gezeigt werden, die zur NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen beiträgt¹³³.
- (5) Als eine weitere Aberration wurde in HRS-Zellen eine Amplifikation einer Region des Chromosoms zwei gezeigt, welche das Gen für c-Rel kodiert. Diese Amplifikation kann eine Erklärung für die c-Rel-Überexpression in den HRS-Zellen darstellen¹³⁵⁻¹³⁷.

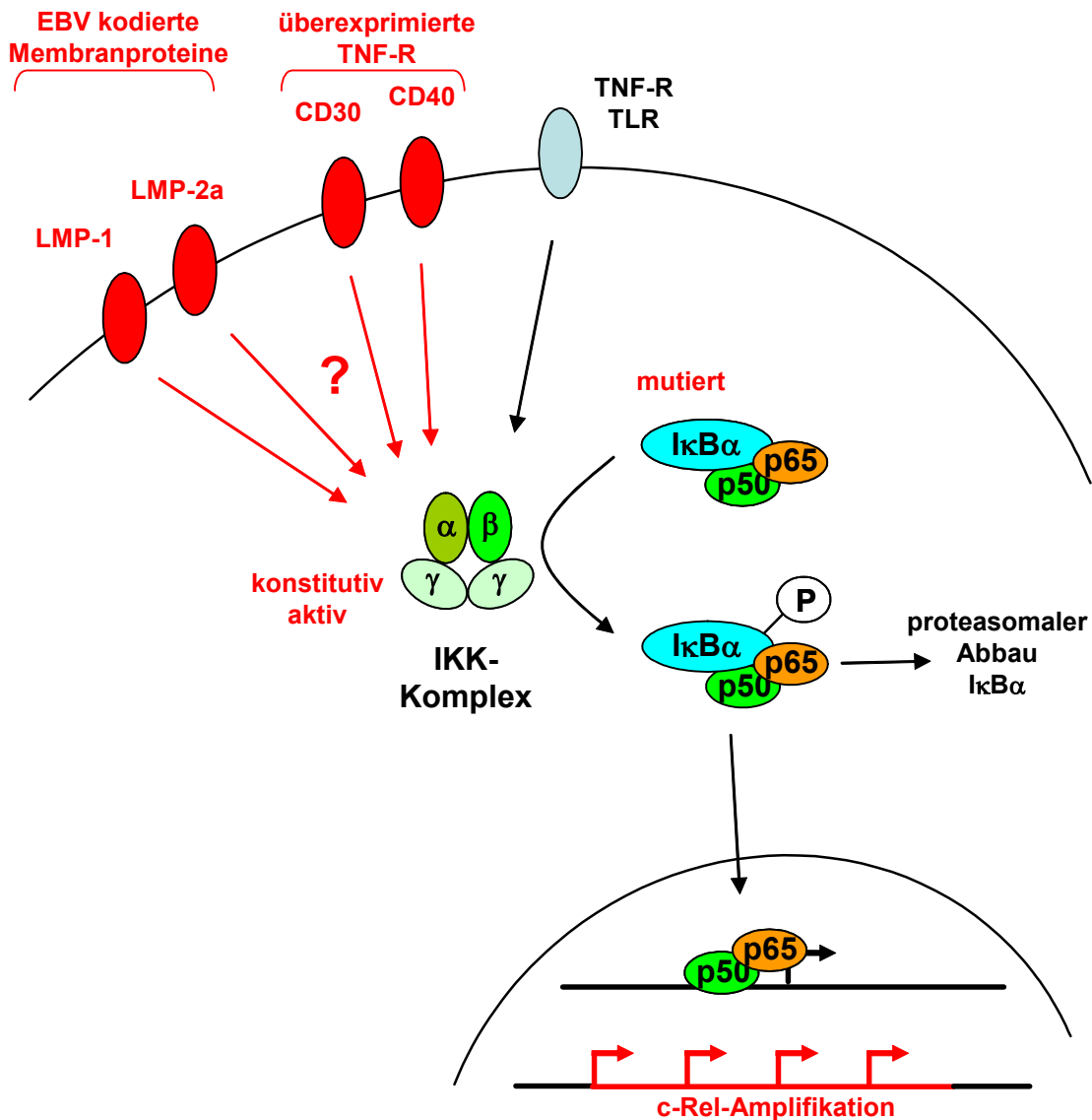


Abbildung 3
Konstitutive NF-κB-Aktivität in den HRS-Zellen.

TNF-R und TLR können den IKK-Komplex aktivieren. Das führt zur Phosphorylierung von IκBs. Diese werden anschließend ubiquitinyliert und vom Proteasom abgebaut. Dadurch werden die von den IκBs gebundenen NF-κB-Dimere freigesetzt und wandern in den Zellkern, wo sie ihre Zielgene aktivieren. In rot sind die Möglichkeiten dargestellt, die in HRS-Zellen zu der typischen konstitutiven NF-κB-Aktivität führen können. Dazu gehören ein konstitutiv aktiver IKK-Komplex, der zu einem ständigen Abbau der IκB-Proteine führt, mutierte und dadurch funktionsunfähige IκB-Proteine und die Amplifikation des c-Rel-Gens. Ebenfalls zu einer Aktivierung von NF-κB können die überexprimierten TNF-Rezeptoren CD30 und CD40 beitragen sowie die durch das EBV kodierten Membranproteine LMP-1 und -2a.

4.5.4 Die Folgen der konstitutiven NF-κB-Aktivität für die HRS-Zellen

Die Auswirkungen der konstitutiven NF-κB-Aktivität in den HRS-Zellen wurden durch Experimente an Zelllinien mit dem NF-κB-Super-Repressor IκBαΔN untersucht. IκBαΔN ist eine N-terminal trunke Variante von IκBα, der die Serinreste fehlen,

die nach Phosphorylierung und anschließender Ubiquitylierung des Proteins zur Degradation von I κ B α führen. Durch eine ektope Expression von I κ B α Δ N lässt sich NF- κ B in den HRS-Zellen effizient inhibieren. Die NF- κ B-Inhibition verursachte eine reduzierte Proliferation der HRS-Zellen und induzierte Apoptose. Diese Untersuchungen belegen die zentrale Bedeutung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität für die Proliferation und den Apoptoseschutz der HRS-Zellen^{81, 103, 127}. Durch eine solche I κ B α Δ N-vermittelte NF- κ B-Inhibition wurden eine Reihe von NF- κ B regulierten Genen in den HRS-Zellen identifiziert, die diesen Effekt erklären können. Darunter sind Gene, welche eine anti-apoptische Funktion haben, z.B. Bcl-x_L, c-IAP2 und TRAF1. So kann z.B. eine ektope Überexpression von Bcl-x_L den apoptotischen Effekt einer NF- κ B-Inhibition in HRS-Zellen wieder aufheben^{81, 103}.

NF- κ B-regulierte Gene sind für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig. Eine Inhibition von NF- κ B führt zu einem stark verzögerten Eintritt in die Synthese (S)-Phase, in der die Verdopplung der DNA stattfindet¹³⁸. Mit Cyclin D2 wurde in den HRS-Zellen ein NF- κ B abhängiges Gen identifiziert, dass an der Zellzyklusregulation beteiligt ist⁸¹. Cycline vom D-Typ fördern den Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus^{139, 140}. Ihre Überexpression führt zu einer Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und zur malignen Transformation von Zellen¹⁴¹. Auch CD40 wird in den HRS-Zellen positiv von NF- κ B reguliert. Interessant dabei ist, dass CD40 selbst NF- κ B aktivieren kann und so möglicherweise eine positive Rückkopplung entsteht⁸¹. Zu den identifizierten NF- κ B-Zielgenen gehören auch Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Oberflächenrezeptoren, deren Expression Einfluss auf die Zusammensetzung des Begleitinfiltrats ausüben kann. Dadurch kommt es zur Rekrutierung von Eosinophilen, Plasmazellen und T-Helferzellen vom Typ 2 (T_{H2})^{103, 142-144}.

4.6 NF- κ B-Inhibition als Therapieansatz

Eine konstitutive NF- κ B-Aktivität wurde nicht nur im Hodgkin Lymphom, sondern auch bei anderen malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems oder epithelialen Tumoren festgestellt. Sie vermittelt Apoptoseresistenz, Resistenz gegenüber chemotherapeutischer Behandlung, verstärkte Proliferation und Metastasenbildung der Tumorzellen^{112, 145}.

In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte z.B. in einem Mausmodell für chemisch induzierten Dickdarmkrebs die Abhängigkeit der Tumorbildung von einer NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden. Dabei wurde eine chronische inflammatorische Reaktion erzeugt, die die Entstehung von Dickdarmkrebs begünstigt. Das Ausschalten der Expression einer Untereinheit des IKK-Komplexes (IKK β) in den Ursprungszellen des Tumors (Enterozyten) führte zu einem sehr viel selteneren Auftreten von Tumoren. Dieser Effekt wird auf den fehlenden NF- κ B-abhängigen Apoptoseschutz durch anti-apoptotische Proteine zurückgeführt. Darüber hinaus führt das Ausschalten der IKK β -Expression in umliegenden Zellen, hier den myeloiden Zellen, ebenfalls zu einem selteneren Auftreten von Tumoren und zu einem verlangsamten Tumorwachstum. Dieser Effekt wird auf fehlende Ausschüttung von Tumor-fördernden Faktoren durch die myeloiden Zellen, die von einer NF- κ B-Aktivierung abhängen, zurückgeführt. Damit wurde ein Zusammenhang zwischen inflammatorischen Reaktionen, Tumorentstehung und NF- κ B-Aktivierung hergestellt ¹⁴⁶.

Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität könnte deshalb eine Behandlung solcher Erkrankungen zumindest unterstützen. Es gibt eine Vielzahl natürlicher Substanzen, die eine NF- κ B-Aktivierung inhibieren können, so z.B. Extrakte von grünem Tee, Gingseng oder Resveratrol, ein Polyphenol des Rotweins ^{112, 147}. Azetylsalizylsäure (Aspirin) und andere nicht steroidale Entzündungshemmer verringern das Risiko für die Entstehung von Darm-Karzinomen im Tiermodell und von Magen-Karzinomen beim Menschen ^{148, 149}. Dies lässt sich möglicherweise mit ihrer IKK-Komplex-inhibierenden Eigenschaft erklären ^{150, 151}. Ein anderer Ansatz, NF- κ B zu inhibieren, ist der Einsatz von Proteasominhibitoren. Dadurch werden die I κ B-Proteine stabilisiert, da sie trotz entsprechender Markierung für die proteasomale Degradation nicht mehr abgebaut werden können ¹⁵². Außerdem wurde eine NF- κ B-inhibierende Eigenschaft für Arsenderivate gezeigt ¹⁵³.

4.6.1 Verbindungen des Arsens können die Aktivierung von NF- κ B inhibieren

Dreiwertiges Arsen in den Formen NaAsO₂ und As₂O₃ dissoziiert in wässrigen Lösungen zu AsO₃³⁻, dem Arsenitanion. Es interagiert mit den Thiolgruppen von Cysteinen in Proteinen und kann so auf die Aktivität von Enzymen einwirken ¹⁵³. Beide katalyti-

schen Einheiten des IKK-Komplexes, $\text{IKK}\alpha$ und $\text{IKK}\beta$, besitzen in ihrer Aktivierungsdomäne ein Cystein (Cys-179), mit dem das Arsenitanion interagieren kann. Werden Zellen mit NaAsO_2 inkubiert, wird eine Aktivierung des IKK-Komplexes durch $\text{TNF}\alpha$ inhibiert. Dadurch bleibt auch der Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und die Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ aus. Mutationsanalysen mit $\text{IKK}\beta$, in denen das Cys-179 durch ein Alanin ersetzt wurde, zeigten, dass der Effekt von diesem Cysteinrest abhängt. Die Aktivierung des mutierten $\text{IKK}\beta$ konnte durch das Arsenitanion nicht mehr inhibiert werden¹⁵⁴.

4.6.2 Die Geschichte der medizinischen Anwendung von Arsenverbindungen

Arsenverbindungen sind natürlich vorkommende Substanzen. Sie treten in anorganischer und organischer Form auf. Als Medikament weist Arsen eine lange Geschichte von mehr als 2400 Jahren auf. So setzte schon Hippokrates die Sulfide Realgar (As_2S_2) und Orpiment (As_2S_3) zur Behandlung von Geschwüren ein. Im 18. und 19. Jahrhundert war die Verwendung von Arsen besonders stark verbreitet. Es wurde u.a. gegen Fieber, als Enthaarungsmittel oder Antiseptikum eingesetzt, oft in sehr hohen Dosen. Als Anzeichen einer Heilungsaktivität sah man eine Erwärmung oder Trockenheit der Haut, deren ungewaschenes und schmutzibraunes Aussehen sowie Jucken der Augenlider und Bindhautentzündungen an. Im 18. Jahrhundert entwickelte Thomas Fowler eine Lösung von As_2O_3 in Natriumbicarbonat. Fowlers Lösung wurde die Standardbehandlung für das Hodgkin Lymphom und von Leukämien. 1878 wurde das erste Mal die Wirkung von As_2O_3 auf Leukozyten beschrieben. Damals wurde entdeckt, dass, im Gegensatz zu gesunden Menschen, in Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) die Zahl der weißen Blutzellen dramatisch durch Behandlung mit Fowlers Lösung reduziert wurde. Bis zum 20. Jahrhundert war deshalb die Behandlung von Leukämien mit Arsen der Standard. Dann wurde diese Art der Behandlung durch die Strahlentherapie abgelöst. 1910 führte Paul Ehrlich mit Salvarsan eine organische Arsenverbindung ein, mit der Trypanosomiasis (afrikanische Schlafkrankheit) und Syphilis behandelt wurden. Wegen seiner toxischen und karzinogenen Wirkung verlor Arsen aber stark an Bedeutung. 1979 wurden im Rahmen der Klassifizierung der karzinogenen Substanzen Arsen und einige seiner Verbindungen in die Gruppe 1 der sehr karzinogenen Stoffe eingeordnet¹⁵⁵.

Zurzeit erlebt As_2O_3 eine Renaissance in der Behandlung von hämatopoetischen malignen Erkrankungen. Auslöser waren Untersuchungen aus China mit einer traditionellen Rezeptur namens Ailing-1, einer Mischung aus pflanzlichen Extrakten und As_2O_3 . Sie wurde erfolgreich zur Behandlung der akuten promyeloischen Leukämie (APL) eingesetzt. Zur Zeit wird As_2O_3 vor allem in Kombination mit anderen Medikamenten in klinischen Studien zur Therapie der APL, des multiplen Myeloms oder der CML getestet^{156, 157}.

4.7 Zielstellung der Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass in HRS-Zellen eine Störung der Apoptoseinduktion vorliegt. Zum einen weisen die HRS-Zellen eine Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose auf zum anderen verfügen sie über eine konstitutive NF- κ B-Aktivität, die ebenfalls einen Apoptoseschutz vermittelt.

Die Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose könnte sowohl an der Entstehung als auch am Fortbestand des Hodgkin Lymphoms beteiligt sein. Für diese Resistenz sind zwei Gründe vorstellbar. Zum einen kann eine Störung in der DISC-Bildung nach der Stimulation von CD95 vorliegen. Die Ursache dafür können Mutationen in den beteiligten Proteinen oder die fehlende Expression dieser Proteine sein. Eine zweite mögliche Ursache ist die Überexpression anti-apoptotischer Proteine, die die Aktivierung oder die Aktivität von Caspasen inhibieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, den Mechanismus der Resistenz gegenüber der CD95-induzierten Apoptose in den HRS-Zellen zu untersuchen. Dies sollte Expressionsstudien über die an der CD95-induzierten Apoptose beteiligten Proteine als auch mögliche Apoptose-inhibierenden Proteine in den HRS-Zelllinien und primären HRS-Zellen beinhalten. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob in den HRS-Zellen eine Störung in der Ausbildung des signalübertragenden Rezeptorkomplexes (DISC) vorliegt.

Die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen spielt eine wichtige Rolle für die Proliferation und die Apoptoseresistenz dieser Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Inhibition der NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen Apoptose und einen Wachstumsarrest induziert. Als ein Grund für die NF- κ B-Aktivität wird der konstitutiv aktive IKK-Komplex vermutet. Dieser führt zu einer ständigen Degradation der I κ B-Proteine, die

dadurch NF- κ B nicht mehr hinreichend inhibieren können. Von NaAsO₂ war bekannt, dass es die Induzierbarkeit des IKK-Komplexes inhibieren kann. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob NaAsO₂ die konstitutive Aktivität des IKK-Komplexes und damit auch die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen inhibieren kann. Zusätzlich sollte die Auswirkung einer potentiellen NF- κ B-Inhibition auf die Expression von NF- κ B-Zielgenen in den HRS-Zellen untersucht werden. Da schon gezeigt wurde, dass die Inhibition von NF- κ B in HRS-Zellen Apoptose auslösen kann sollte eine dahingehende Wirkung von NaAsO₂ untersucht werden. Wenn sinnvoll sollten die Ergebnisse in einem Mausmodell überprüft werden.

5 Ergebnisse

5.1 c-FLIP trägt zur Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose bei

5.1.1 Expression der DISC-bildenden Proteine in HRS-Zelllinien und in primären HRS-Zellen

HRS-Zellen sind resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Voraussetzung für CD95-induzierte Apoptose ist die Expression der DISC-formenden Proteine. Deshalb wurde in HRS- und Non-Hodgkinzelllinien die Expression von CD95, FADD, Caspase-8 (C-8) und Caspase-10 (C-10) durch Immunoblotanalyse untersucht. Für CD95 ergab sich in den HRS-Zelllinien eine starke Überexpression. Dabei sind die im Gel unterschiedlich schnell laufenden Formen wahrscheinlich auf unterschiedlich starke Glykosylierungen des Proteins zurückzuführen¹⁵⁸ (**Abb. 4A**). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde zusätzlich die Oberflächenpräsentation von CD95 untersucht. Es zeigte sich, dass sich die starke Expression von CD95 in den HRS-Zelllinien auch in einer verstärkten Oberflächenpräsentation widerspiegelt (**Abb. 4B**). FADD wurde in allen untersuchten Zelllinien ähnlich stark exprimiert. C-8 zeigte in den Zelllinien Namalwa und L540Cy eine schwächere Expression. Die Expression von C-10 fehlte in den Linien Namalwa und L540 (**Abb. 4A**). Die Detektion der Proteine FADD, C-8 und C-10 ergab jeweils Doppelbanden. Im Fall von FADD stellen diese beiden Banden unterschiedlich stark phosphorylierte Formen dar¹⁵⁹. Dagegen repräsentieren die Doppelbanden von C-8 und C-10 verschiedene Spleißvarianten der Proteine^{15, 160}.

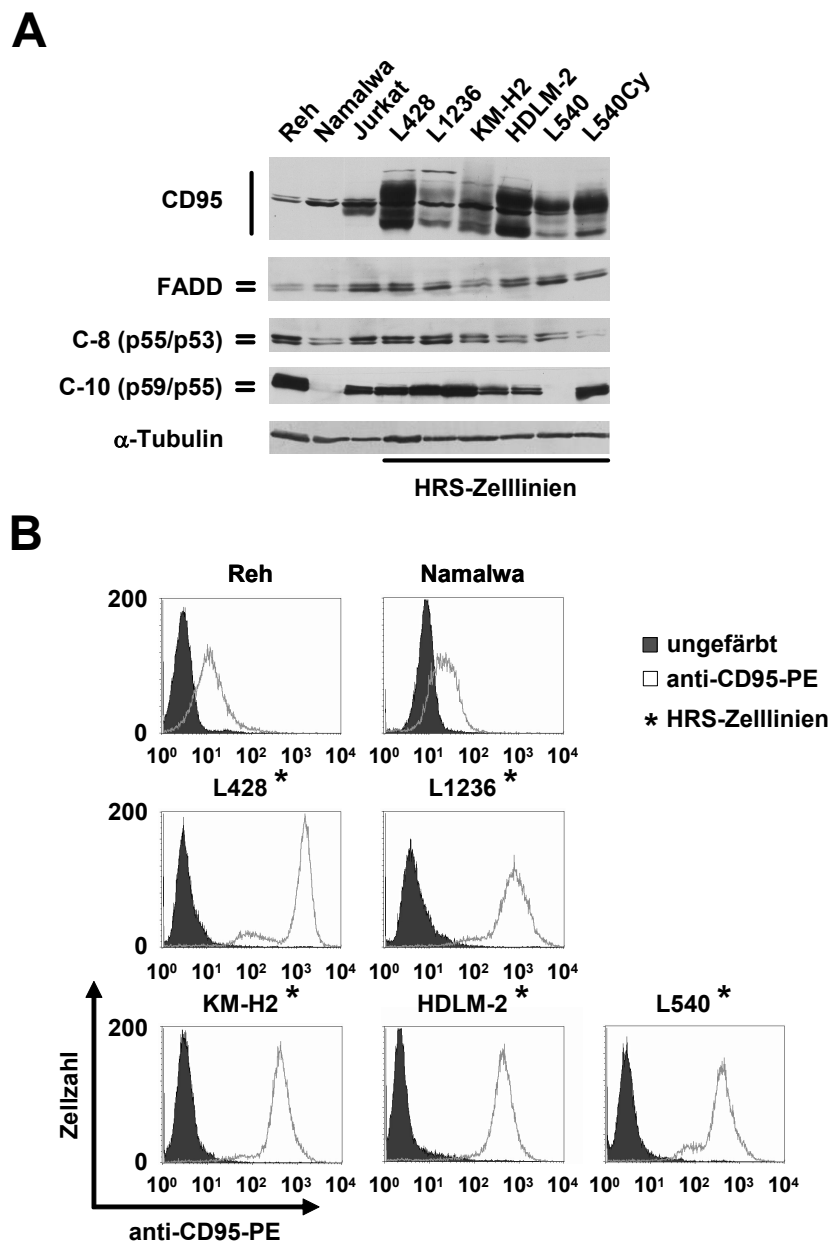


Abbildung 4
Expression der DISC-Proteine in HRS-Zelllinien.

(A) Gesamtzelllysate von HRS- und Non-Hodgkinzelllinien wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließenden Immunoblot auf die Expression von CD95, FADD, Caspase-8 (C-8 (p55/53)) und Caspase-10 (C-10 (p59/55)) untersucht. Die Detektion von α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

(B) Zur Untersuchung der Oberflächenpräsentation von CD95 wurden HRS- und Non-Hodgkinzelllinien mit einem Phycoerythrin (PE)-konjugierten anti-CD95-Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch mit ungefärbten Zellen verglichen.

Zur Untermauerung der Zelliniendaten wurde der Expressionsstatus der DISC-bildenden Proteine immunhistochemisch in primären Hodgkin Lymphomen untersucht. Dazu wurden aus paraffinierten Lymphknoten von 59 Hodgkinfällen repräsentative Gebiete mit HRS-Zellen herausgestanzt und auf einem Paraffinblock gesam-

melt. Die Antikörperreaktionen wurden dann auf diesem *multi-tissue array* durchgeführt. Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF) der Freien Universität (FU) Berlin von I. Anagnostopoulos und K. Jöhrens-Leder durchgeführt.

Verglichen mit den umliegenden Zellen wurde CD95 in den HRS-Zellen des Primärmaterials in 58 von 59 Fällen stark exprimiert. Die FADD-Expression war in allen Fällen vorhanden. In einigen Fällen konnte eine Überexpression beobachtet werden. C-8 war immer nachweisbar, in 32 von 59 Fällen allerdings nur schwach (**Abb. 5**).

Die Expression der DISC-formenden Proteine legt nahe, dass die Induktion dieses Komplexes prinzipiell möglich sein sollte.

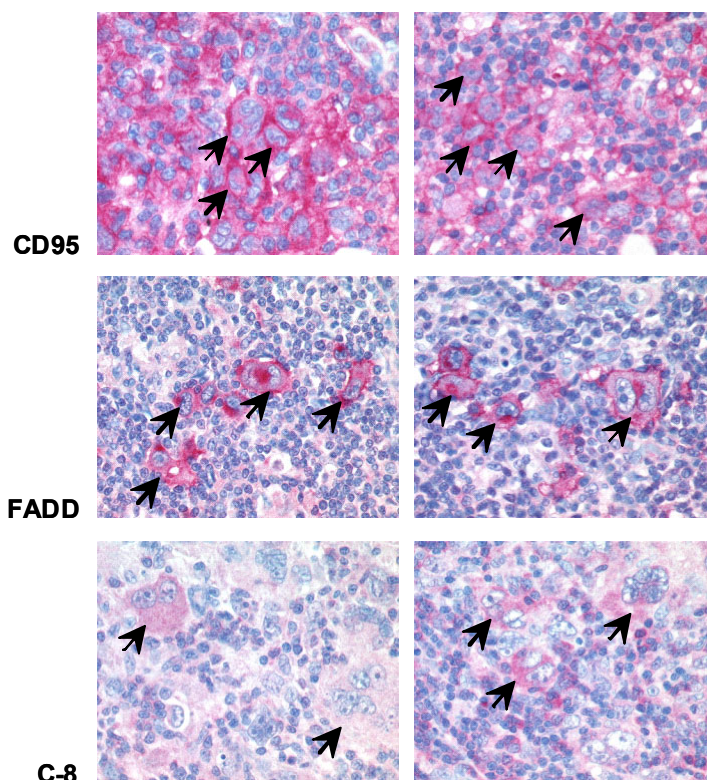


Abbildung 5
Expression der DISC-Proteine in primären HRS-Zellen.

Die Expression von CD95, FADD und C-8 wurde in paraffinierten Biopsien von 59 Fällen des klassischen Hodgkin Lymphoms untersucht. Je zwei repräsentative Fälle sind hier dargestellt. Rot zeigt eine spezifische Proteinfärbung an, blau die Kernfärbung. Beispiele für HRS-Zellen sind durch schwarze Pfeile markiert.

CD95: Mit Ausnahme von einem Fall zeigten HRS-Zellen eine starke Färbung für CD95.

FADD: In allen Fällen zeigten HRS-Zellen eine FADD-Färbung. In einigen Fällen zeigten die HRS-Zellen eine FADD-Überexpression im Vergleich zu den umliegenden Zellen.

C-8: C-8-Expression konnte in allen Fällen in den HRS-Zellen nachgewiesen werden. In 32 Fällen war die Expression allerdings nur schwach.

Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom DKFZ in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am UKBF der FU Berlin von I. Anagnostopoulos und K. Jöhrens-Leder durchgeführt.

5.1.2 c-FLIP Expression in HRS-Zellen

Eines der Rezeptor-nahesten Ereignisse der von CD95 induzierten Signalkaskade ist die Aktivierung von C-8 oder C-10. Dieser Schritt kann durch Anwesenheit von c-FLIP

im DISC inhibiert werden. Da HRS-Zellen CD95-resistent sind, wurde die Expression von c-FLIP auf mRNA- und Proteinebene in HRS- und Non-Hodgkinzelllinien untersucht.

Auf RNA-Ebene existiert c-FLIP in multiplen Spleißvarianten, auf Proteinebene in den beiden Varianten c-FLIP_L und c-FLIP_S³⁷. Wie die Northernblotanalyse zeigte, treten die multiplen Spleißvarianten auch in den HRS-Zelllinien auf und wurden im Vergleich zu den anderen Zelllinien überexprimiert (**Abb. 6A**). Besonders auffällig war die Überexpression des kleinsten Transkripts, dessen Translation auf Proteinebene mit c-FLIP_S korrespondiert³⁷. Die Ergebnisse der Northernblotanalyse spiegelten sich auf der Proteinebene wider. c-FLIP_L, aber besonders c-FLIP_S, wurden in den HRS-Zelllinien überexprimiert (**Abb. 6B**).

Auch die c-FLIP Expression sollte auf dem *multi-tissue array* des Primärmaterials untersucht werden. Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom DKFZ in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am UKBF der FU Berlin von I. Anagnostopoulos und K. Jöhrens-Leder durchgeführt. In 55 der 59 schon für die anderen DISC-Proteine untersuchten Fälle konnte eine starke Überexpression von c-FLIP im Vergleich zu den umliegenden Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 6C**). Die c-FLIP-Expression stellt damit eine mögliche Ursache für die Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose dar.

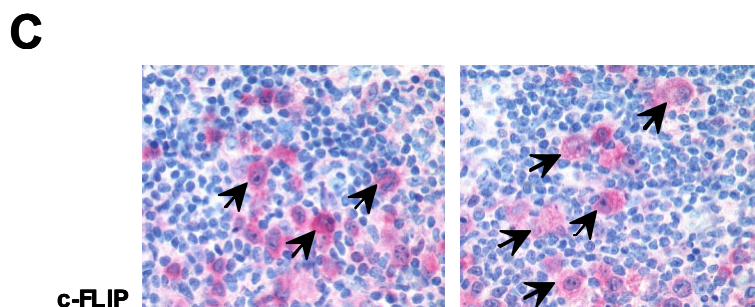
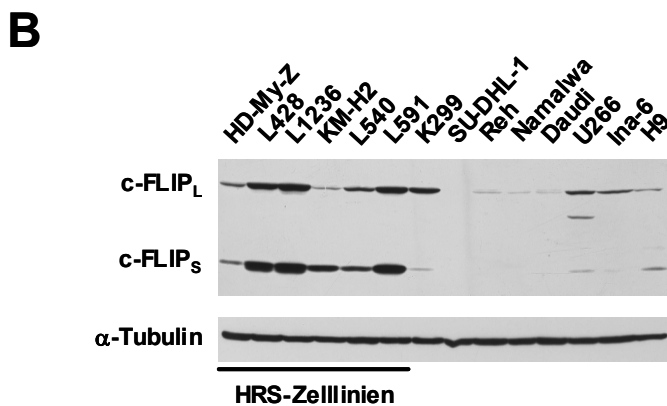
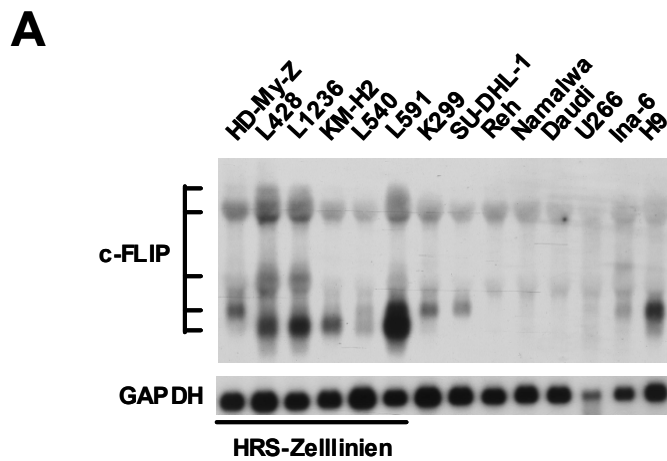


Abbildung 6

Expression von c-FLIP in HRS-Zelllinien und in primären HRS-Zellen.

(A) Gesamt-RNA von HRS- und Non-Hodgkinzelllinien wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde mit Hilfe einer spezifischen Sonde die Expression der c-FLIP-mRNA untersucht. Die anschließende Detektion von GAPDH auf der gleichen Membran diente als Ladekontrolle.

(B) In Gesamtzelllysaten von HRS- und Non-Hodgkinzelllinien wurde durch SDS-PAGE und anschließenden Immunoblot die Expression von c-FLIP_{S/L} untersucht. Der verwendete Erstantikörper erkannte sowohl c-FLIP_L als auch c-FLIP_S. Die anschließende Detektion von α-Tubulin auf der selben Membran diente als Ladekontrolle.

(C) Die Expression von c-FLIP wurde in paraffinierten Biopsien von 59 Fällen des klassischen Hodgkin Lymphoms untersucht. In 55 von 59 Fällen konnte die c-FLIP-Expression in den HRS-Zellen nachgewiesen werden. Zwei repräsentative Fälle sind hier dargestellt. Der verwendete Erstantikörper war spezifisch für c-FLIP_L und c-FLIP_S, so dass eine Unterscheidung der beiden Spleißvarianten hier nicht möglich war. Rot zeigt eine spezifische Proteinfärbung an, blau die Kernfärbung. Beispiele für HRS-Zellen sind durch schwarze Pfeile markiert. Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom DKFZ in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am UKBF der FU Berlin von I. Anagnostopoulos und K. Jöhrens-Leder durchgeführt.

5.1.3 NF-κB-Abhängigkeit der c-FLIP-Expression

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass NF-κB an der Regulation der induzierbaren c-FLIP-Expression beteiligt ist^{103, 161}. Da HRS-Zelllinien über eine kon-

stitutive NF- κ B-Aktivität verfügen, sollte untersucht werden ob diese zur c-FLIP-Expression beiträgt.

Zellen der HRS-Zelllinie L428 wurden mit einem Adenovirus infiziert, der für den NF- κ B-Superrepressor I κ B α Δ N kodiert. Diese N-terminal trunke I κ B α -Variante ist trotz des konstitutiven IKK-Komplexes in den HRS-Zelllinien stabil. Die Proteinextrakte wurden von M. Hinz aus der Arbeitsgruppe von C. Scheidereit vom MDC zur Verfügung gestellt.

24 h nach der Infektion konnte eine effiziente Reduktion der NF- κ B-Bindungsaktivität im Vergleich mit kontrollinfizierten und unbehandelten L428-Zellen durch einen EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) nachgewiesen werden (**Abb. 7A**). Ebenfalls 24 h nach der Infektion wurde die Expression von c-FLIP_{S/L} überprüft. In den L428-Zellen, die mit I κ B α Δ N infiziert waren und in denen gleichzeitig eine Reduktion der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität nachgewiesen wurde, kam es zu einer kompletten Herunterregulation der c-FLIP_{S/L}-Expression (**Abb. 7B**). Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch für die Linie HDLM-2 erzielt (Daten nicht gezeigt). Das zeigt, dass die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen stark zur c-FLIP-Expression beiträgt. Außerdem legt die komplette Herunterregulation der c-FLIP_{S/L}-Expression schon 24 h nach der Infektion mit I κ B α Δ N eine kurze Halbwertszeit der c-FLIP_{S/L}-Proteine nahe.

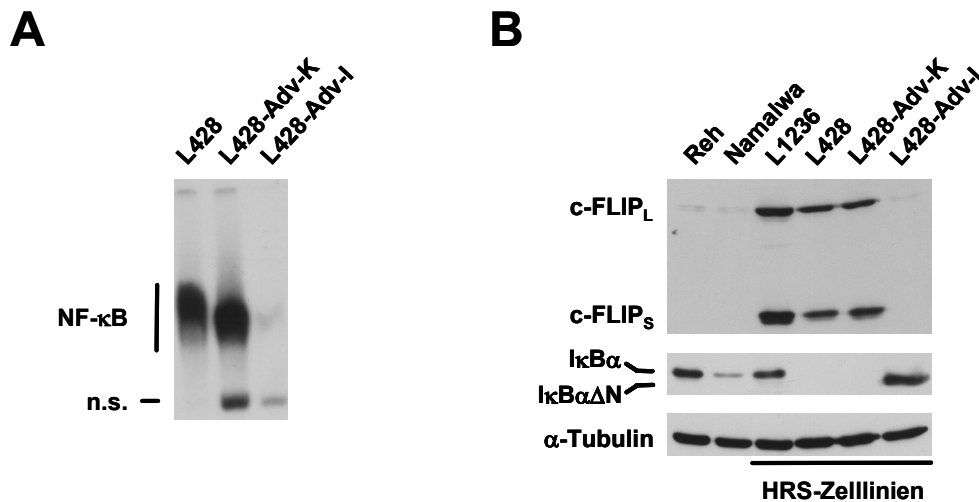


Abbildung 7

Die c-FLIP-Expression ist NF-κB abhängig.

(A) Die HRS-Zelllinie L428 wurde mit einem Adenovirus, welcher für den NF-κB-Superrepressor IκBαΔN (Adv-I) kodiert, oder mit einem Kontrollvirus (Adv-K) infiziert. Nach 24 h wurden Gesamtzelllysate von diesen infizierten Zellen und von unbehandelten L428-Zellen präpariert und durch einen EMSA auf die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB überprüft. Die NF-κB-Komplexe sowie eine nicht spezifische (n.s.) Bande sind markiert.

(B) In Gesamtzelllysaten der Virus-infizierten Zellen aus (A) wurde 24 h nach der Infektion durch Immunoblot die Expression von c-FLIP, IκBα und IκBαΔN überprüft und mit den Linien Reh, Namalwa und L1236 verglichen. Es ist zu beachten, dass L428-Zellen kein Wildtyp-IκBα exprimieren.

5.1.4 c-FLIP wird in den DISC von HRS-Zellen integriert

In einem nächsten Schritt wurde die DISC-Induktion in HRS-Zellen untersucht. Das erfolgte aus zwei Gründen. Zum einen ist die DISC-Bildung eine Voraussetzung für CD95-induzierte Apoptose. Zum anderen sollte festgestellt werden, ob c-FLIP_S und/oder c-FLIP_L in den DISC integriert werden. Das ist wiederum eine Voraussetzung für die Inhibition der Caspaseaktivierung durch c-FLIP.

Um eine DISC-Bildung zu zeigen, wurde CD95 von CD95-stimulierten HRS-Zellen immunpräzipitiert. Im Falle einer DISC-Induktion sollten weitere DISC-formende Proteine wie FADD, C-8, C-10 oder c-FLIP_{S/L} mit CD95 ko-immunpräzipitieren, in unstimulierten Zellen bzw. bei gestörter DISC-Bildung dagegen nicht. Für diese Untersuchung wurden Zellen mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper Apo-1 inkubiert. Nach einer 10-minütigen Stimulation wurden die Zellen lysiert und der induzierende Antikörper immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde durch Immunoblot auf ko-präzipitierte Proteine hin untersucht. Als Kontrolle diente die CD95-Immunpräzipitation unstimulierter Zellen. Hier erfolgte die Zugabe des agonistischen

anti-CD95-Antikörpers erst nach der Lyse der Zellen und konnte somit nicht mehr zu einer CD95-Stimulation und damit DISC-Induktion führen.

Durch den Nachweis von FADD, C-8 und/oder C-10 im CD95-Immunpräzipitat der CD95-stimulierten HRS-Zelllinien L428, HDLM-2 und L540Cy, konnte eine Assoziation dieser Proteine mit CD95 und damit eine DISC-Bildung gezeigt werden (**Abb. 8**). In Übereinstimmung mit den Expressionsdaten (**Abb. 4A**) fehlte C-10 in den DISC-Präzipitaten von L540Cy-Zellen. Als Kontrolle diente die DISC-Präzipitation der Zelllinie H9, in der durch Stimulation von CD95 ein DISC und Apoptose induziert werden kann. Verglichen mit dieser Linie konnte in den HRS-Zelllinien ein DISC präzipitiert werden, dessen Zusammensetzung eine Apoptoseinduktion erlauben sollte. Im Gegensatz zur Linie H9 findet man in den HRS-Zelllinien zusätzlich c-FLIP_L und c-FLIP_S im DISC. Die Integration von c-FLIP_{S/L} in den DISC könnte eine Erklärung für die Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose darstellen. Neben den vollständigen Proteinen traten auch die N-terminalen Spaltprodukte von C-8 (p43/41), C-10 (p47/43) und in den HRS-Zellen von c-FLIP_L (p43) in den präzipitierten DISCs auf. In den Präzipitaten der nicht induzierten Zellen ließen sich FADD, C-8, C-10 oder c-FLIP_{S/L} nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt). Das zeigt, dass die Assoziation dieser Proteine mit CD95 von der CD95-Stimulation abhängt.

Eine Ausnahme unter den HRS-Zelllinien bildete die Linie L1236, in der keine DISC-Bildung nach Stimulation des CD95 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

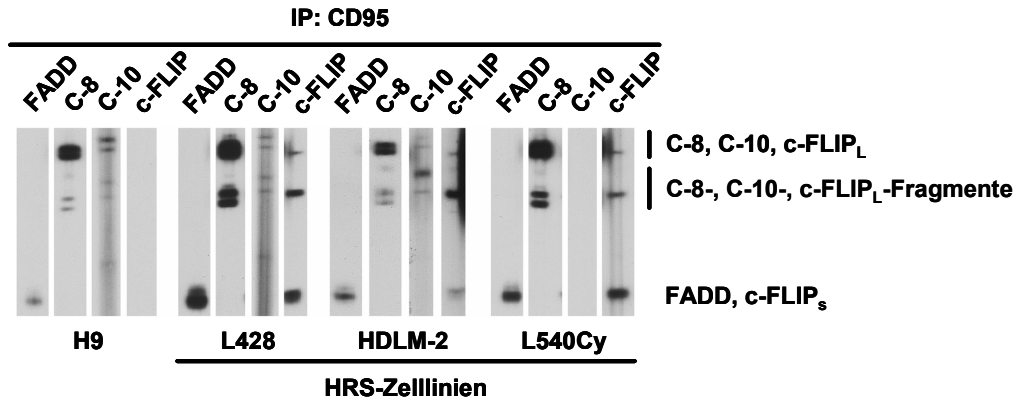


Abbildung 8

Analyse der DISC-Induktion in HRS-Zellen durch CD95-Koimmunpräzipitation.

HRS-Zelllinien und die Linie H9 wurden zur Induktion des DISC für 10 min mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper Apo-1 inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden dann für die Immunpräzipitation von CD95 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Präzipitate durch SDS-PAGE und zum Nachweis der DISC-Induktion die Detektion von FADD, C-8, C-10 und c-FLIP durch Immunoblot. Die Positionen von FADD, C-8, C-10 (jeweils Doppelbanden) sowie c-FLIP_{S/L} sind markiert. Außerdem sind die primären Spaltprodukte von C-8 (p43/p41), C-10 (p47/p43) (jeweils Doppelbanden) und c-FLIP_L (p43) angegeben.

5.1.5 Cycloheximid-Behandlung von HRS-Zellen bewirkt einen schnellen Verlust der c-FLIP-Expression und sensitiviert sie gegenüber CD95-vermittelter Apoptose

Die c-FLIP_{S/L}-Expression ist in den HRS-Zellen stark von der NF- κ B-Aktivität abhängig. Schon 24 h nach einer NF- κ B-Inhibition war kein c-FLIP_{S/L} auf Proteinebene mehr nachweisbar (**Abb. 7**). Dies kann durch eine kurze Halbwertszeit der c-FLIP-Proteine bedingt sein. Mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) hat man die Möglichkeit, die Halbwertszeit von Proteinen abzuschätzen. Inkubiert man Zellen mit CHX, wird die Translation gestoppt, d.h. mRNA wird nicht mehr in das entsprechende Protein translatiert. Da jedes Protein eine andere Halbwertszeit besitzt, nimmt der noch vorhandene Proteinvorrat unterschiedlich schnell ab. Diese Abnahme kann man durch Immunoblot mit Zellextrakten von verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der CHX-Behandlung verfolgen.

Zum Ermitteln der Stabilität von c-FLIP_{L/S} wurden L428-Zellen mit CHX inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Expression von c-FLIP_S und c-FLIP_L untersucht. Schon 1 h nach Beginn der CHX-Behandlung konnte eine Abnahme der Expression von FLIP_S beobachtet werden, von c-FLIP_L nach 2 h (**Abb. 9A**). Im Gegensatz dazu

war die Expression von C-8, Bcl-x_L und NF-κB/p65 6 h nach der CHX-Inkubation unverändert. Dieses Experiment zeigt, dass c-FLIP_S und c-FLIP_L im Vergleich zu anderen Proteinen kurzlebig sind (**Abb. 9A**).

Durch den raschen Abbau von c-FLIP_{S/L} durch CHX-Inkubation könnte sich ein Zeitfenster ergeben, in denen die Zellen durch den nun fehlenden Schutz von c-FLIP für CD95-induzierte Apoptose anfällig werden. Deshalb wurden L428-Zellen 2 h nach dem Beginn der CHX-Behandlung mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 oder mit einem IgM-Kontrollantikörper inkubiert. Als Kontrolle dienten IgM/CH-11-induzierte Zellen, die nicht mit CHX inkubiert wurden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde durch Immunoblot überprüft, ob es zur Spaltung und damit Aktivierung von C-8 kommt. Die Inkubation mit der IgM-Isotypkontrolle oder CH-11 ohne CHX führte zu keiner Caspasespaltung. Auch die alleinige CHX-Inkubation oder die gleichzeitige Behandlung mit der IgM-Isotypkontrolle führten zu keinem Auftreten von C-8-Spaltprodukten. Die kombinierte Inkubation der Zellen mit CHX und dem CH-11-Antikörper führte zu einer Spaltung von Caspase-8 und dem Auftreten der Spaltprodukte p43/p41 und p18. Das Auftreten des Spaltproduktes p18 deutet auf eine aktivierte C-8 hin (**Abb. 9B**).

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Aktivierung der Caspase-8 mit einer Apoptoseinduktion in den HRS-Zellen einhergeht. L428-, KM-H2- und L1236-Zellen wurden für 14 h mit CHX und CH-11 oder CHX und der IgM-Kontrolle inkubiert und anschließend der Anteil der apoptotischen Zellen ermittelt. Alle drei Zelllinien waren resistent gegenüber alleiniger Stimulation durch den CH-11-Antikörper oder der IgM-Kontrolle. Die IgM/CHX-Inkubation führte in allen Zelllinien zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate. Die gleichzeitige Inkubation mit CHX und dem CH-11-Antikörper erhöhte die Apoptoserate der KM-H2- und L428-Zellen deutlich um 25% bzw. 60%. Wie bei der DISC-Induktion bildete die HRS-Zelllinie L1236 auch hier eine Ausnahme. Im Gegensatz zu den anderen beiden Linien konnte nur ein sehr geringer Anstieg der Apoptoserate (10%) nach CHX/CH-11-Inkubation festgestellt werden (**Abb. 9C**).

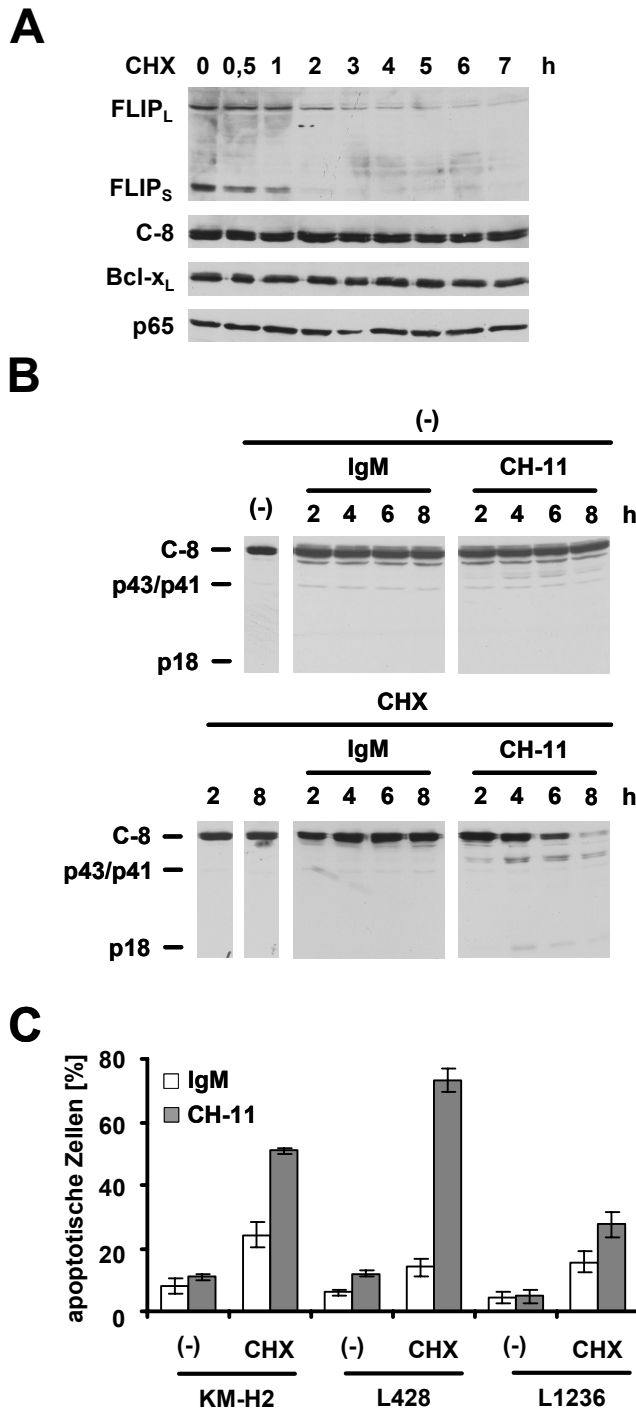


Abbildung 9
CHX reguliert c-FLIP herunter und sensitiviert HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose.

(A) L428-Zellen wurden mit dem Translationsinhibitor CHX inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten Gesamtzelllysate hergestellt. In diesen wurde durch Immunoblot die Expression von c-FLIP_{S/L}, C-8, Bcl-x_L und p65 untersucht.

(B) L428 Zellen blieben unbehandelt (-) oder wurden für 2 h mit CHX behandelt und anschließend mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 oder einer IgM-Isotypkontrolle inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Gesamtzelllysate präpariert und durch Immunoblot die Expression von C-8 kontrolliert. Die Positionen der C-8-Spaltprodukte, p43/p41 und p18, sind markiert. Als Kontrolle dienten Extrakte von unbehandelten Zellen sowie von Zellen, die für 2 und 8 h nur mit CHX inkubiert worden waren.

(C) L428-, KM-H2- und L1236-Zellen wurden für 14 h mit CHX und dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 oder einer IgM-Isotypkontrolle inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Acridinorange-färbung und Zählen der Zellen mit fragmentierten Zellkernen ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

5.1.6 Durch siRNA-vermittelte Herunterregulation der c-FLIP-Expression werden HRS-Zellen für CD95 und TRAIL-Rezeptor-vermittelte Apoptose sensibilisiert

Die Behandlung der HRS-Zellen mit CHX führte zu einer raschen Abnahme von c-FLIP_{S/L} und einer Sensitivierung gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Deshalb

konnte vermutet werden, dass die CD95-Sensitivierung zumindest teilweise durch die verringerte c-FLIP-Expression begründet ist. Es war aber nicht ausgeschlossen, dass dieser Effekt durch Expressionsverlust anderer Proteine verursacht wurde. Aussagekräftiger wäre es, die c-FLIP-Expression spezifisch auszuschalten. Diese Möglichkeit bietet der Einsatz von siRNAs (*small interfering RNA*). siRNAs sind doppelsträngige RNA-Oligonukleotide mit 21-28 Basenpaaren. Ein Strang der siRNA entspricht einer bestimmten Zielsequenz der mRNA des Proteins, das reguliert werden soll. Der zweite Strang ist komplementär dazu. Transfiziert man Zellen mit dieser siRNA bindet der Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) an den RNA-Doppelstrang, trennt ihn auf und benutzt den komplementären Strang zu Erkennung und Bindung der mRNA. Die Bindung an die mRNA führt zu deren Degradation. Als Folge davon wird kein neues Protein mehr translatiert¹⁶². Die verwendeten siRNAs wurden von H.-P. Vornlocher von der Ribopharma AG aus Kulmbach zur Verfügung gestellt.

Für das Experiment wurden Zellen der Linien L428 und L540Cy mit einer c-FLIP_{S/L}-spezifischen siRNA (siFLIP) transfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit einer siRNA, die gegen die mRNA der Neomycinphosphotransferase (siK3) gerichtet ist, welche in den Zellen nicht exprimiert wird. Die Zellen der Linie L428 wurden gleichzeitig mit einem Plasmid für die Expression des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) transfiziert. Das machte es möglich, transfizierte Zellen durchflusszytometrisch anzureichern. Das geschah 24 h nach der Transfektion. Die Linie L540Cy musste aufgrund einer ausreichenden Transfektionseffizienz nicht angereichert werden. Anschließend wurde in einem Teil der Zellen die Expression von c-FLIP_{S/L} sowie, als Kontrolle, von C-8 untersucht. In beiden Zelllinien wurde durch die Transfektion mit der siFLIP die Expression von c-FLIP_L und c-FLIP_S stark reduziert. Dabei blieb die Expression von C-8, trotz hoher Homologie zu c-FLIP, unverändert (**Abb. 10A, 10B**).

Mit dem anderen Teil der Zellen wurde die Auswirkung der c-FLIP-Herunterregulation getestet. Zum einen erfolgte dazu die Stimulation von CD95 durch den agonistischen anti-CD95 Antikörper CH-11. Als Kontrolle diente hier die Inkubation der Zellen mit einer IgM-Isotypkontrolle. Mit dem TRAIL-Rezeptor sollte ein weiterer Apoptose-induzierender Rezeptor getestet werden. Der TRAIL-Rezeptor ist wie CD95 ein Rezeptor aus der Familie der TNF-Rezeptoren mit einer ähnlichen Funktionsweise. Die Stimulation erfolgte durch rekombinanten humanen TRAIL (rhTRAIL) sowie durch

einen Antikörper, der für die nötige TRAIL-Quervernetzung sorgte (Enhancer). Die Kontrolle war hier die alleinige Inkubation mit dem quervernetzenden Antikörper.

Nach 14-stündiger Stimulation wurde der Anteil der apoptotischen Zellen ermittelt. Bei der Linie L428 geschah dies nach Anfärbung mit Acridinorange durch Auszählen des Anteils von Zellen mit fragmentierten Zellkernen. Bei der Linie L540Cy wurde der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch nach AnnexinV-FITC (Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat) /PI (Propidiumiodid)-Färbung ermittelt (für eine Erläuterung siehe Methodenteil).

L428-Zellen, welche mit der siK3 transfiziert waren, zeigten sich resistent gegenüber der Stimulation von CD95 und des TRAIL-Rezeptors. Die alleinige Herunterregulation von c-FLIP durch die siFLIP erhöhte die Apoptoserate in L428-Zellen leicht. Sowohl die Stimulation von CD95 als auch des TRAIL-Rezeptors führten in siFLIP-transfizierten L428-Zellen zu einem Anstieg der Apoptoserate. Im Fall von CD95 betrug der Anstieg im Vergleich zur Kontrollinkubation mit der höchsten Apoptoserate (siFLIP+IgM) ca. 20%. Im Fall des TRAIL-Rezeptors betrug der Anstieg gegenüber der adäquaten Kontrolle (siFLIP+Enhancer) ca. 10% (**Abb. 10A**).

Ähnlich wie bei den L428-Zellen führte die Transfektion der L540Cy-Zellen mit der siFLIP zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate. Im Gegensatz zu den L428-Zellen konnte schon in siK3-transfizierten L540Cy-Zellen durch Stimulation von CD95 und des TRAIL-Rezeptors Apoptose induziert werden. Jedoch ließ sich dieser Effekt durch die Herunterregulation von c-FLIP mittels siRNA verstärken. Für CD95 bedeutete das einen Anstieg gegenüber der Kontrollinkubation mit der höchsten Apoptoserate (siK3+CH-11) von ca. 25%. Im Fall des TRAIL-Rezeptors betrug der Anstieg gegenüber der entsprechenden Kontrolle (siK3+Enh.+rhTRAIL) ca. 15% (**Abb. 10B**).

Um die Spezifität des von der c-FLIP-siRNA vermittelten Effekts zu zeigen, wurde eine mutierte Variante der c-FLIP_S-cDNA kloniert (FLIP_S-Mut). Diese verfügt im Bereich der Erkennungssequenz der siRNA über je eine stille Mutation in 7 Triplets. Es wird folglich ein Wildtyp-FLIP_S-Protein exprimiert, dessen mRNA aber nicht mehr von der siFLIP erkannt werden kann. L540Cy-Zellen wurden mit FLIP_S-Mut oder einem Kontrollplasmid (Mock) und jeweils mit der siFLIP oder der siK3 transfiziert. Durch anschließende Stimulation von CD95 wurde getestet, ob die Expression von c-FLIP_S-Mut die Zellen zumindest teilweise vor der induzierten Apoptose schützt.

Die Transfektion mit der c-FLIP-siRNA reduzierte erwartungsgemäß die endogene c-FLIP-Expression. Dagegen blieb die Expression des ektop exprimierten c-FLIP_S-Mut davon unbeeinflusst. Die c-FLIP_S-Mut-Expression schützte die Zellen, trotz Herunterregulation des endogenen c-FLIP_{S/L} teilweise vor der CD95-induzierten Apoptose. Somit ließ sich der siFLIP vermittelte Effekt revertieren und dessen Spezifität zeigen (**Abb. 10C**).

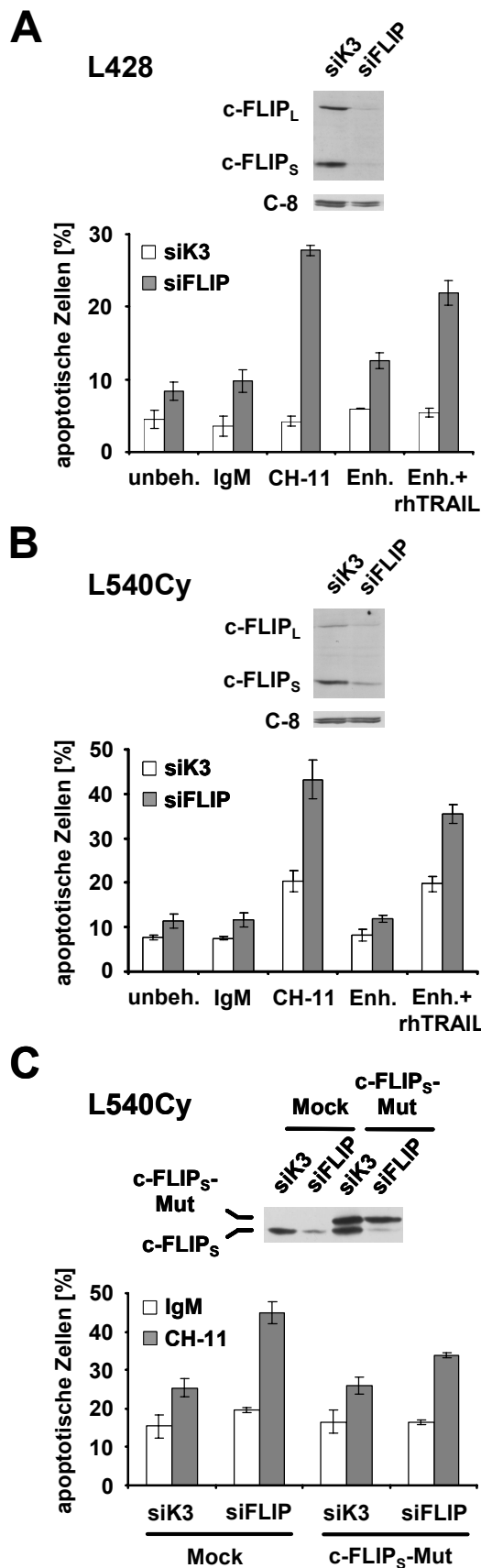


Abbildung 10
Spezifisches Ausschalten der c-FLIP-Expression sensibilisiert HRS-Zellen für CD95- und TRAIL-Rezeptor-induzierte Apoptose.

(A) L428-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (siK3) oder einer c-FLIP spezifischen siRNA (siFLIP) zusammen mit pEGFP-N3 transfiziert. Nach 24 h wurden die GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch angereichert. In Gesamtzellextrakten wurde die Expression von c-FLIP und, zur Kontrolle, von C-8 untersucht. Die Zellen wurden unbehandelt gelassen, mit einer IgM-Isotypkontrolle oder dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11, mit dem quervernetzenden Antikörper (Enh.) für rekombinanten humanen (rh)TRAIL oder mit dem Enh. und rhTRAIL zusammen inkubiert. Nach 14-stündiger Inkubation wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Färbung mit Acridinorange und Zählen der Zellen mit fragmentierten Kernen ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

(B) L540Cy-Zellen wurden wie in (A) beschrieben ohne pEGFP-N3 transfiziert und behandelt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durchflusszytometrisch nach Anfärben mit Annexin-FITC/PI ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

(C) L540Cy-Zellen wurden mit der siK3 oder der siFLIP zusammen mit einem Mockplasmid oder einem Plasmid mit der cDNA für ein mutiertes c-FLIP_S (c-FLIP_S-Mut) transfiziert, das in 7 Triplets je eine stille Mutation enthält und so nicht mehr von der siFLIP erkannt wird. Nach 24 h wurde die Expression des endogenen und des ektop exprimierten c-FLIP_S-Mut nach SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten durch Immunoblot überprüft. Ein anderer Teil der Zellen wurde für 14 h mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 oder einer IgM-Isotypkontrolle inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des Anteils apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch nach Anfärbung mit Annexin-FITC/PI. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

5.1.7 DISC-Formation in primären HRS-Zellen

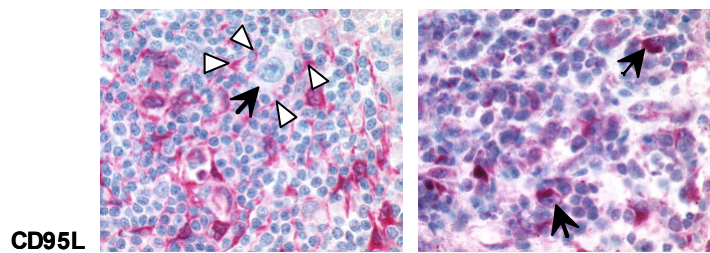
Die Experimente haben gezeigt, dass eine DISC-Induktion in HRS-Zelllinien möglich ist (**Abb. 8**). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95-induzierter Apoptose zumindest teilweise durch c-FLIP begründet ist (**Abb. 10**). Als nächstes sollte untersucht werden, ob primäre HRS-Zellen auf den Schutz durch c-FLIP angewiesen sind. Dieser Nachweis ist nur indirekt möglich. Ein Hinweis auf einen notwendigen Schutz durch c-FLIP ist die Expression des CD95L auf den umliegenden Zellen, da dieser den auf den HRS-Zellen exprimierten CD95 aktivieren könnte. Deshalb wurde zuerst die CD95L-Expression in primären Fällen des Hodgkin Lymphoms untersucht. Dies geschah in den gleichen 59 Fällen, in denen schon die Expression der DISC-Proteine untersucht wurde. Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom DKFZ in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am UKBF der FU Berlin von I. Anagnostopoulos und K. Jöhrens-Leder durchgeführt. In 56 von 59 Fällen konnte eine CD95L-Expression in umliegenden Plasma- und Endothelzellen nachgewiesen werden. In einem Fall zeigten die HRS-Zellen eine Anfärbung für den CD95L (**Abb. 11A**). Die Expression von CD95L auf den Zellen des Begleitinfiltrats könnte bedeuten, dass die primären HRS-Zellen auf einen Schutz vor CD95-induzierter Apoptose angewiesen sind. Dieser Schutz könnte, wie für die HRS-Zelllinien gezeigt, durch c-FLIP vermittelt werden (**Abb. 10**).

Ein anderer Hinweis für eine Beteiligung von c-FLIP am Apoptoseschutz der primären HRS-Zellen wäre ein formierter DISC in diesen Zellen unter Beteiligung von c-FLIP. In diesem Fall könnte eine Untersuchung der Lokalisation von c-FLIP ein vorrangig membranständiges Signal ergeben. Dies sollte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie festgestellt werden.

Als Beispiel für ein membranassoziiertes Protein sowie als Kontrollfärbung für HRS-Zellen wurde CD30 gefärbt. Dabei handelt es sich um einen Rezeptor aus der TNF-Rezeptor-Familie, der spezifisch in HRS-Zellen überexprimiert wird. Die Vermessung der gefärbten Schnitte am konfokalen Lasermikroskop wurde von B. Wiesner vom Institut für molekulare Pharmakologie vorgenommen. In drei von acht untersuchten Fällen konnte eine Färbung von CD30 und c-FLIP erreicht werden. In den anderen untersuchten Fällen war überhaupt keine Färbung möglich. Die drei für die Färbung

zugänglichen Fälle ergaben ein membranständiges CD30-Signal. Daneben wurden auch perinukleäre Strukturen angefärbt, was durch Golgiapparat assoziiertes CD30 erklärt werden kann. Die Färbung für c-FLIP ergab in den HRS-Zellen ein vorrangiges Signal im Bereich der Membran. Die Färbung mit der Isotypkontrolle ergab kein membranständiges Signal (**Abb. 11B**).

A



B

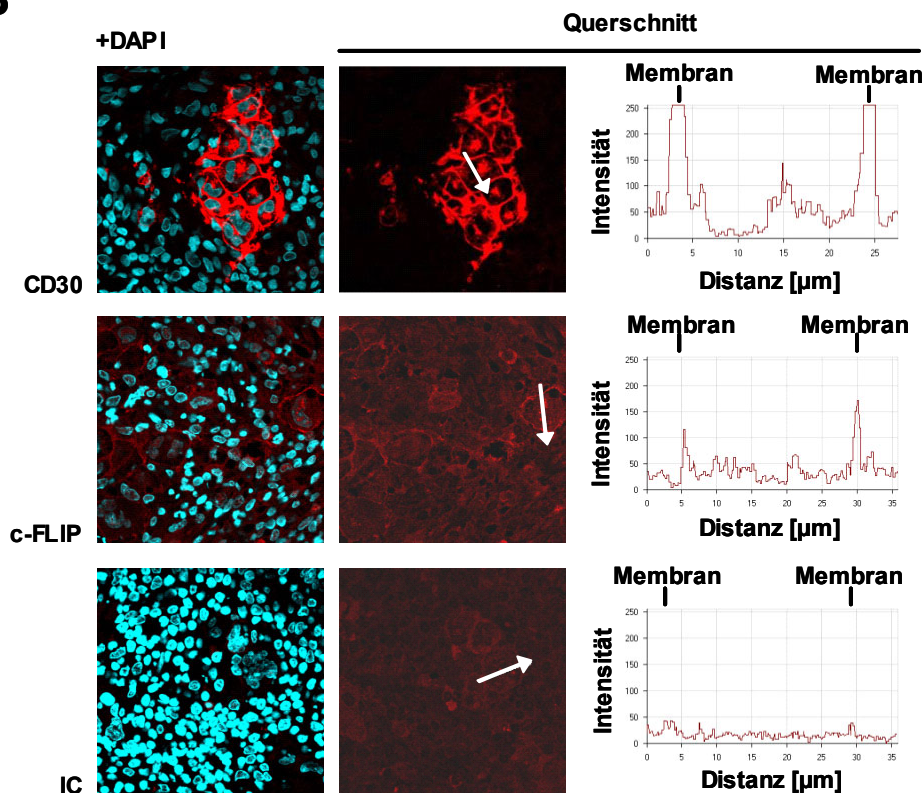


Abbildung 11

CD95L-Expression und konstitutive DISC-Bildung beim kHL.

(A) Untersuchung der CD95L-Expression in 59 Biopsien des kHL. In 56 von 59 Fällen konnte die CD95L-Expression auf Plasma- und Endothelzellen, die die HRS-Zellen umgeben, nachgewiesen werden. In einem Fall (rechts) zeigten die HRS-Zellen selbst eine Färbung für CD95L. Schwarze Pfeile zeigen auf HRS-Zellen, weiße auf Zellen des Begleitinfiltrats. Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom DKFZ in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am UKBF der FU Berlin von I. Anagnostopoulos und K. Jöhrens-Leder durchgeführt.

(B) Biopsien von Fällen des kHL wurden mit einem anti-CD30-, einem anti-c-FLIP-Antikörper oder der entsprechenden Isotypkontrolle (IC, alle Maus-IgG1) gefärbt. Spezifische Bindung des Erstantikörpers wurde durch Anfärben mit einem Cy3-konjugiertem anti-Maus-IgG1-Antikörper und anschließender konfokaler Lasermikroskopie detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Für je eine HRS-Zelle ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität von Cy3 für den Querschnitt der Zelle dargestellt. Der Verlauf des Querschnitts ist durch weiße Pfeile angegeben. Die Vermessung der gefärbten Schnitte am konfokalen Lasermikroskop wurde von B. Wiesner vom Institut für molekulare Pharmakologie vorgenommen.

5.2 Die NF- κ B-Inhibition durch NaAsO₂/As₂O₃ induziert Apoptose in HRS-Zellen

5.2.1 NaAsO₂ inhibiert die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HRS-Zellen

Um die Auswirkung von NaAsO₂ auf die NF- κ B-Aktivität in HRS-Zelllinien zu testen, wurden L540- und HDLM-2-Zellen mit verschiedenen NaAsO₂-Konzentrationen über die angegebenen Zeiträume inkubiert. Die Änderung der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität wurde durch EMSAs festgestellt.

Nach einer 8-stündigen Inkubation mit NaAsO₂ konnte in der Linie L540 eine Reduktion der NF- κ B-Aktivität ab einer Konzentration von 20 μ M festgestellt werden. In der Linie HDLM-2 konnte dieser Effekt erst ab 50 μ M nachgewiesen werden. In beiden Zelllinien nahm der Effekt bis 200 μ M zu. Da für die niedrigen NaAsO₂-Konzentrationen von 1-5 μ M kein Effekt festzustellen war, wurde für diese die Inkubationszeit auf 24 bzw. 48 h ausgedehnt. Die 48-stündige Inkubation zeigte in der Linie L540 eine Reduktion der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität in Abhängigkeit von der NaAsO₂-Dosis. Bei der Linie HDLM-2 war das schon nach 24 h der Fall (**Abb. 12**).

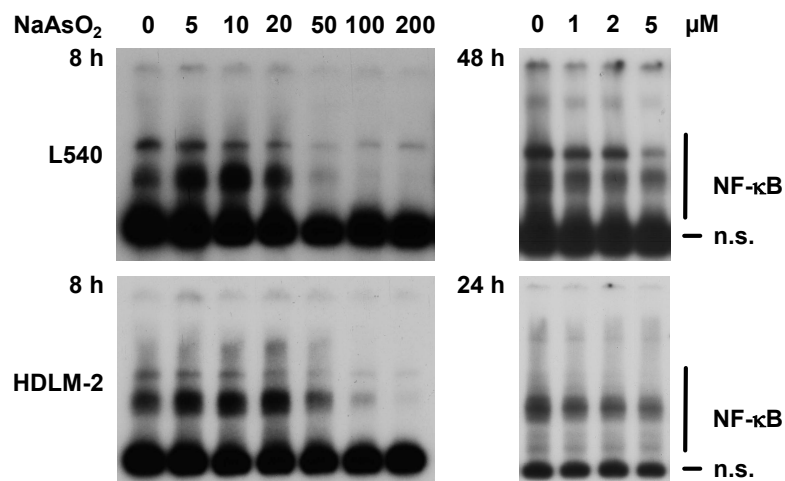


Abbildung 12

NaAsO₂ induziert eine Inhibition von NF- κ B.

L540- und HDLM-2-Zellen wurden mit den angegebenen NaAsO₂-Konzentrationen inkubiert. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden Gesamtproteinextrakte präpariert und durch einen EMSA auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B überprüft. Die NF- κ B-Komplexe sowie eine nicht spezifische (n.s.) Bande sind markiert.

5.2.2 Die NaAsO₂-vermittelte Inhibition des IKK-Komplexes führt zur Stabilisierung des I κ B α -Proteins

Es ist vorgeschlagen worden, dass das Arsenitanion die Aktivierung des IKK-Komplexes inhibieren kann und dass die Inhibition auf einer Bindung des Arsenitani- ons an ein Cystein in der Aktivierungsdomäne von IKK β beruht ¹⁵⁴. Weiterhin wird vermutet, dass der konstitutiv aktive IKK-Komplex in den HRS-Zelllinien zu der stän- digen NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen beiträgt ¹³². Deshalb sollte untersucht werden, ob die Reduktion der NF- κ B-Aktivität durch NaAsO₂ ihre Ursache in einer Inhibition des IKK-Komplexes hat.

Hierzu wurden Zellen der Linien L540 und HDLM-2 8 h mit 50 μ M oder 48 h mit 1, 2 und 5 μ M NaAsO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität des IKK-Komplexes durch einen Kinaseassay getestet. Nach 8 h Inkubation mit 50 μ M NaAsO₂ war eine starke Abnahme der IKK-Aktivität in beiden Zelllinien festzustellen. Auch die 48- stündige Inkubation mit den Konzentrationen von 1-5 μ M bewirkte eine dosisabhän- gige Abnahme der Aktivität des IKK-Komplexes in beiden Zelllinien. In den für die Kinaseassays eingesetzten Lysaten wurde zur Kontrolle die Expression des IKK α - Proteins durch Immunoblot untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Verlauf der NaAsO₂-Inkubation die Expressionsstärke von IKK α abnahm. Dieser Effekt trat am stärksten bei der Inkubation mit 50 μ M NaAsO₂ auf, wurde aber auch bei den niedri- geren Dosierungen von 1-5 μ M beobachtet. Diese Abnahme trägt daher zur reduzier- ten Aktivität des IKK-Komplexes bei (**Abb. 13A**).

Ein aktivierter IKK-Komplex führt zur Phosphorylierung von I κ B-Proteinen, die an- schließend ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut werden ¹²⁴. Daher bestand die Möglichkeit, dass die Inhibition des IKK-Komplexes mit einer Stabilisierung der I κ B- Proteine in den HRS-Zellen einhergeht. Deshalb wurden Zellen der Linien L540 und HDLM-2 für 8 h mit 20 und 50 μ M NaAsO₂ inkubiert, um anschließend die Expressi- onsstärke von I κ B α sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu untersuchen.

Auf Proteinebene blieb die I κ B α -Expression mit zunehmender NaAsO₂-Konzentration unverändert (L540) oder stieg sogar an (HDLM-2), obwohl die I κ B α -mRNA in beiden Linien mit steigender NaAsO₂-Konzentration abnahm (**Abb. 13B**). Die wahrschein- lichste Ursache für die mRNA-Abnahme ist, dass I κ B α selbst ein Zielgen von NF- κ B ist. Durch die Inhibition der NF- κ B-Aktivität wird deshalb die Transkription des I κ B α -

Gens abgeschwächt. Das konstant bleibende oder zunehmende I κ B α -Proteinniveau kann durch eine posttranslationale Stabilisierung erklärt werden, die ihren Grund in der Inhibition des IKK-Komplexes hat. Dadurch findet die Phosphorylierung des I κ B α -Proteins nicht mehr statt, die den proteasomalen Abbau zur Folge hat.

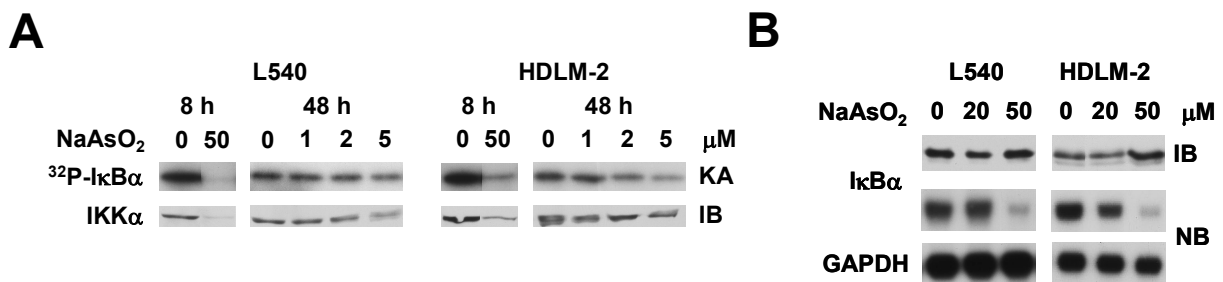


Abbildung 13

NaAsO₂ inhibiert den IKK-Komplex und stabilisiert I κ B α posttranslational.

(A) L540- und HDLM-2-Zellen wurden für 8 h mit 0 und 50 μ M oder für 48 h mit 0, 1, 2 und 5 μ M NaAsO₂ inkubiert. Nach diesen Zeiträumen wurde die IKK-Komplex-Aktivität durch einen Kinaseassay (KA) ermittelt. Der IKK-Komplex wurde mit einem monoklonalen anti-IKK α -Antikörper und Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde zusammen mit rekombinantem I κ B α und [γ -³²P]ATP bei 37°C inkubiert und dann durch SDS-PAGE und Autoradiographie auf ³²P-markiertes I κ B α untersucht (KA). Als Kontrolle wurde die Expression des IKK α -Proteins durch SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot in den Lysaten untersucht, die auch für die Kinaseassays verwendet wurden (IB).

(B) L540- und HDLM-2-Zellen wurden für 8 h mit den NaAsO₂-Konzentrationen 0, 20 und 50 μ M inkubiert. Danach wurde aus den Zellen Gesamtprotein und Gesamt-RNA gewonnen und jeweils die Expression von I κ B α untersucht, im Gesamtprotein nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Immunoblot (IB) und in der Gesamt-RNA nach Auftrennung im Agarosegel und Transfer auf eine Nylonmembran (NB). Auf der gleichen Membran wurde anschließend die Expression von GAPDH als Ladekontrolle untersucht (NB).

5.2.3 Die NaAsO₂-induzierte NF- κ B-Inhibition hängt von funktionellen I κ B-Proteinen ab

Neben der konstitutiven Aktivität des IKK-Komplexes tragen Mutationen der I κ B-Proteine zur ständigen NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen bei. So werden in der Linie L428 keine funktionellen I κ B α - und I κ B ϵ -Proteine exprimiert. In der Linie KM-H2 fehlt die Expression von Wildtyp-I κ B α . Die Linien HDLM-2, L540 und L1236 verfügen dagegen über funktionelle (Wildtyp) I κ B-Proteine^{128, 131}. Um die Abhängigkeit der NF- κ B/IKK-inhibierenden Wirkung des NaAsO₂ von funktionellen I κ B-Proteinen zu untersuchen, wurden Zellen der Linien HDLM-2, KM-H2 und L428 für 24 h mit 1, 2, 5 und

10 μM NaAsO_2 inkubiert. Danach wurde die NF- κ B-Aktivität durch einen EMSA bestimmt.

Es zeigte sich, dass nur in HDLM-2-Zellen mit funktionellen I κ B-Proteinen eine NaAsO_2 -induzierte Abnahme der NF- κ B-Aktivität nachweisbar war. In den Linien L428 und KM-H2 mit den defekten I κ B-Proteinen blieb die NF- κ B-Aktivität unverändert (**Abb. 14**). Die Wirkung des NaAsO_2 auf die NF- κ B-Aktivität hängt somit von funktionellen I κ B-Proteinen ab.

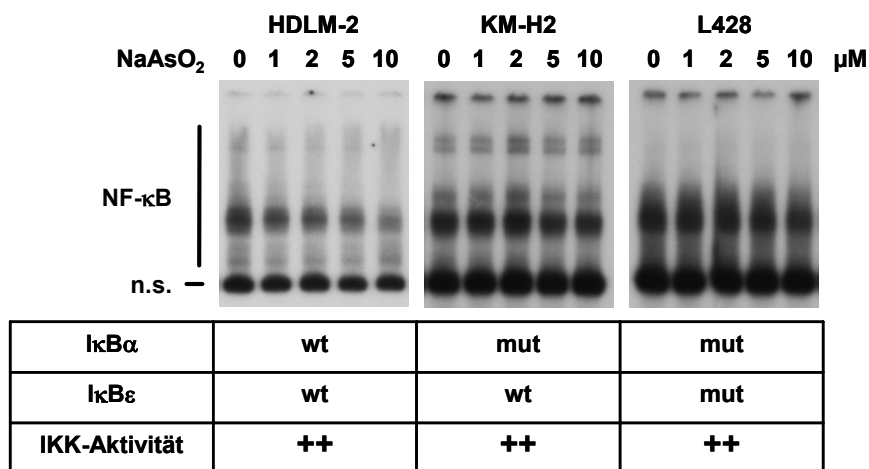


Abbildung 14

NaAsO_2 -induzierte NF- κ B-Inhibition hängt von funktionellen I κ B-Proteinen ab.

HDLM-2, KM-H2 und L428 Zellen wurden für 24 h mit 0, 1, 2, 5 und 10 μM NaAsO_2 inkubiert und anschließend im Gesamtprotein die Bindungsaktivität von NF- κ B durch EMSA untersucht. In der Tabelle ist der Status von I κ B α und I κ B ϵ aufgeführt: wt, Wildtyp; mut, mutiert. Außerdem ist die Aktivität des IKK-Komplexes symbolisiert: ++, stark.

5.2.4 NaAsO_2 verursacht eine Herunterregulation von NF- κ B-Zielgenen

Die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen ist für die Expression einer Reihe von Zielgenen verantwortlich, u.a. Regulatoren des Zellzykluses und der Apoptose^{81, 103}.

Deshalb sollte untersucht werden, ob die NaAsO_2 -induzierte NF- κ B-Inhibition auch zu einer Herunterregulation solcher Gene führt. Dazu wurden HDLM-2-Zellen für 20 h mit 5, 10 und 20 μM NaAsO_2 inkubiert. Für c-IAP2 und TRAF1 konnte auf Proteinebene eine dosisabhängige Herunterregulation gezeigt werden. Im Fall von Bcl-x_L war nur ein geringer Effekt festzustellen. Für CCR7 und IL-13 konnte eine Herunter-

regulation auf mRNA-Ebene gezeigt werden (**Abb. 15**). Daraus folgt, dass die NaAsO₂-induzierte NF-κB-Inhibition auch zu einer abgeschwächten Expression von NF-κB-Zielgenen führt.

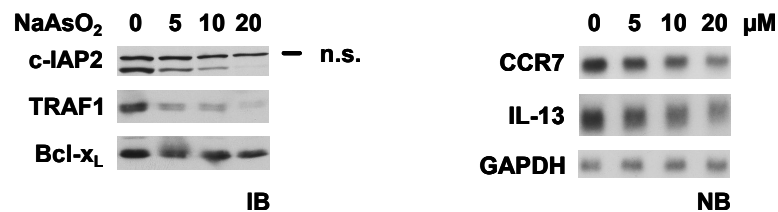


Abbildung 15
Regulation von NF-κB-Zielgenen durch NaAsO₂.

HDLM-2-Zellen wurden für 20 h mit den angegebenen NaAsO₂-Konzentrationen inkubiert und anschließend Gesamtzelllysate und Gesamt-RNA präpariert. In den Gesamtzelllysaten wurde durch SDS-PAGE und anschließenden Immunoblot (IB) die Proteinexpression von c-IAP2, TRAF1 und Bcl-x_L untersucht (n.s., nicht spezifisch). In der Gesamt-RNA wurde nach Auftrennung im Agarosegel und Transfer auf eine Nylonmembran die Expression von CCR7, IL-13 und, als Kontrolle, von GAPDH untersucht (NB).

5.2.5 NaAsO₂ induziert Apoptose in HRS-Zellen

Die konstitutive NF-κB-Aktivität schützt HRS-Zellen durch Aktivierung einer Reihe anti-apoptotischer Zielgene vor Apoptose^{81, 103}. Deshalb wurde untersucht, ob die Inhibition der NF-κB-Aktivität und der daraus resultierende Expressionsverlust anti-apoptotischer Proteine durch NaAsO₂ zur Induktion von Apoptose in den HRS-Zellen führt.

Zellen der Linie L540 wurden für 8 h mit 20 und 200 μM NaAsO₂ inkubiert und anschließend der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch nach AnnexinV-FITC/PI ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit NaAsO₂ in den Zellen zu einem starken Anstieg der Apoptoserate auf 31 % (20 μM) bzw. 80 % (200 μM) führte, was durch das Auftreten von AnnexinV-FITC- und AnnexinV-FITC-positiven Zellen angezeigt wird (**Abb. 16A**).

In diesen hohen Konzentrationen kann NaAsO₂ allerdings aufgrund seiner Toxizität nicht therapeutisch eingesetzt werden. Deshalb sollten Konzentrationen getestet werden, die auch im Serum von Patienten ohne schwerwiegende Nebenwirkungen erreichbar wären^{157, 163, 164}. Zellen der Linien L540 und HDLM-2 wurden für 24, 48 und 72 h mit den NaAsO₂-Konzentrationen 1 und 2 μM inkubiert. Auch hier konnte

eine Apoptoseinduktion beobachtet werden, die sowohl von der Dosis als auch von der Dauer der Inkubation abhing (**Abb. 16B**).

Die Apoptoseinduktion führt in der Regel zur Spaltung von Caspasen, die dadurch aktiviert werden. Mit Caspase-3 sollte die Spaltung einer Effektorcaspase untersucht werden. Dafür wurden Zellen der Linien L540 und HDLM-2 mit 20 μM NaAsO_2 inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten das Auftreten von Caspase-3-Spaltprodukten durch Immunoblot untersucht. Es zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Abnahme des vollständigen Proteins mit der Dauer der Inkubation verstärkt Spaltprodukte der Caspase-3 auftraten (**Abb. 16C**).

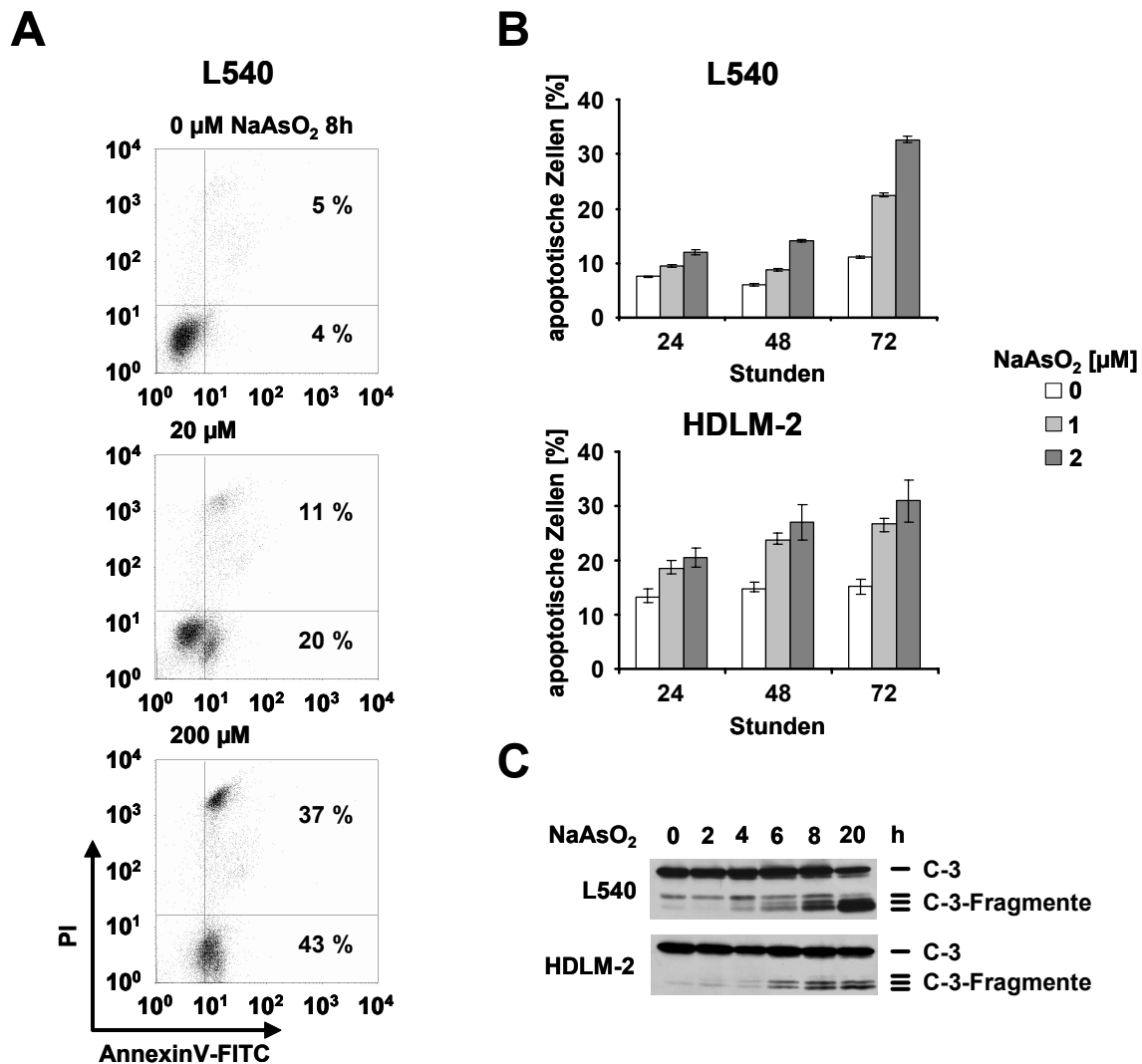


Abbildung 16

NaAsO₂ induziert Apoptose in HRS-Zellen.

(A) L540-Zellen wurden für 8 h mit den angegebenen NaAsO₂-Konzentrationen inkubiert. Nach Anfärbung mit AnnexinV-FITC/PI wurde durchflusszytometrisch der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt. In den FACS-Abbildungen sind die prozentualen Anteile der AnnexinV-FITC (rechts unten)- und AnnexinV-FITC/PI (rechts oben)-positiven Zellen angegeben.

(B) L540- und HDLM-2-Zellen wurden mit den NaAsO₂-Konzentrationen 1 und 2 μM inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde nach AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchflusszytometrisch der Anteil der apoptotischen Zellen ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

(C) L540- und HDLM-2-Zellen wurden mit 20 μM NaAsO₂ inkubiert. Nach den angegebenen Zeiträumen wurde in Gesamtzelllysaten durch SDS-Page und anschließendem Immunoblot die Expression von Caspase-3 (C-3) und deren Fragmente untersucht.

5.2.6 NaAsO₂-induzierte Apoptose korreliert mit der IKK/NF- κ B-Inhibition

Wie schon gezeigt ist die IKK/NF- κ B inhibierende Wirkung des NaAsO₂ von funktionellen I κ B-Proteinen abhängig (**Abb. 14**). Um einen Zusammenhang zwischen

IKK/NF- κ B-Inhibition und Apoptoseinduktion durch NaAsO₂ herzustellen, sollte die Apoptoseinduktion in Zelllinien mit funktionellen I κ B-Proteinen und solchen mit mutierten Varianten bzw. geringer IKK/NF- κ B-Aktivität verglichen werden. Dazu wurden die HRS-Zelllinien HDLM-2, L540, L428, KM-H2 und HD-My-Z für 24 h mit den NaAsO₂-Konzentrationen 2, 5 und 10 μ M inkubiert.

In den Zelllinien mit Wildtyp-I κ B-Proteinen (L428, L540) konnte eine dosisabhängige Apoptoseinduktion beobachtet werden (**Abb. 17**). In der Linie KM-H2, die über kein funktionelles I κ B α , aber über Wildtyp-I κ B ϵ verfügt, war nur ein schwacher Anstieg der Apoptose feststellbar^{131, 132}. Die Linien L428 und HD-My-Z waren dagegen apoptoseresistent. In der L428 fehlt die Expression von funktionellem I κ B α und I κ B ϵ ^{131, 132}. Die Linie HD-My-Z verfügt nur über eine geringe IKK/NF- κ B-Aktivität¹⁶⁵. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Stabilisierung von I κ B α durch die Inhibition des IKK-Komplexes und die daraus resultierende NF- κ B-Inhibition mit der Apoptoseinduktion durch NaAsO₂ zusammenhängen.

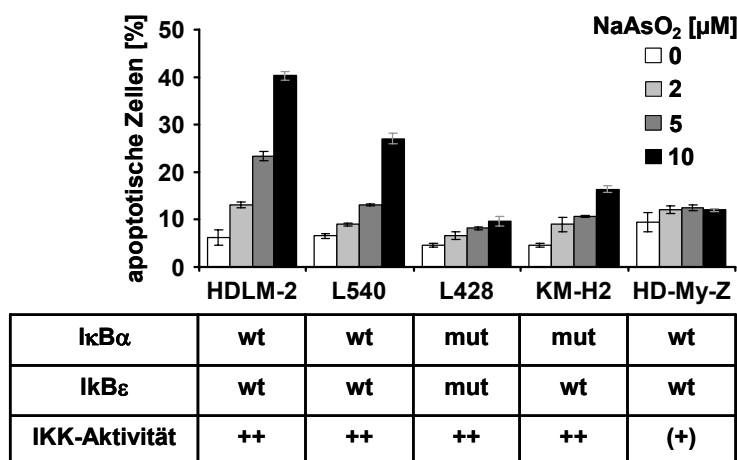


Abbildung 17

Die Apoptoseinduktion durch NaAsO₂ hängt in HRS-Zellen von Wildtyp-I κ B-Proteinen und einem konstitutiv aktiven IKK/NF- κ B-System ab.

Zelllinien mit unterschiedlichem Status des IKK/NF- κ B-Systems wurden für 24 h mit den angegebenen NaAsO₂-Konzentrationen inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch nach Färbung mit AnnexinV-FITC/PI auf den Anteil apoptotischer Zellen untersucht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Der Status der I κ B-Proteine ist in der Tabelle angegeben: wt, Wildtyp; mut, mutiert. Außerdem ist die Aktivität des IKK-Komplexes symbolisiert: ++, stark; (+), sehr schwach.

5.2.7 Die ektope Expression von NF- κ B/p65 hebt die Apoptose induzierende Wirkung von NaAsO₂ auf

Falls die Annahme stimmt, dass die Apoptose-induzierende Wirkung des NaAsO₂ von seiner IKK/NF- κ B-inhibierenden Eigenschaft abhängt, sollte sich diese durch eine Überexpression von NF- κ B in den HRS-Zellen aufheben oder wenigstens abschwächen lassen.

Dazu wurden L540Cy-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, auf dem die cDNA eines p65-GFP-Fusionsproteins kodiert ist. p65 ist eine der Untereinheiten, aus denen sich die NF- κ B-Dimere zusammensetzen können. Durch die Expression dieses Proteins wird eine zusätzliche NF- κ B-Aktivität in den transfizierten Zellen induziert. Zudem lassen sich transfizierte Zellen durchflusszytometrisch durch die Fluoreszenz des GFPs detektieren. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert, das nur für GFP kodiert. 24 h nach der Transfektion wurde in einem Teil der Zellen die Expression des p65-GFPs untersucht, was eine Expressionsstärke ergab, die der des endogenen p65 entsprach (**Abb. 18A**). Ebenfalls 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Inkubation mit den NaAsO₂-Konzentrationen 5, 10 und 20 μ M für 16 h. Anschließend wurde der Anteil viabler, GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch nach Anfärbung mit PI detektiert (**Abb. 18B**).

Es konnte festgestellt werden, dass die Expression von p65-GFP die Apoptose-induzierende Wirkung des NaAsO₂ teilweise aufhebt. Im Ansatz mit 20 μ M NaAsO₂ waren ca. 30% mehr viable p65-GFP-transfizierte Zellen detektierbar als solche, die nur mit GFP transfiziert waren (**Abb. 18C**). Das macht einen Zusammenhang zwischen der NF- κ B-inhibierenden und der Apoptose-induzierenden Wirkung des NaAsO₂ wahrscheinlich. Da auch das p65-GFP durch I κ B-Proteine inhibiert werden kann, konnte der Apoptose-induzierende Effekt des NaAsO₂ nicht vollständig aufgehoben werden.

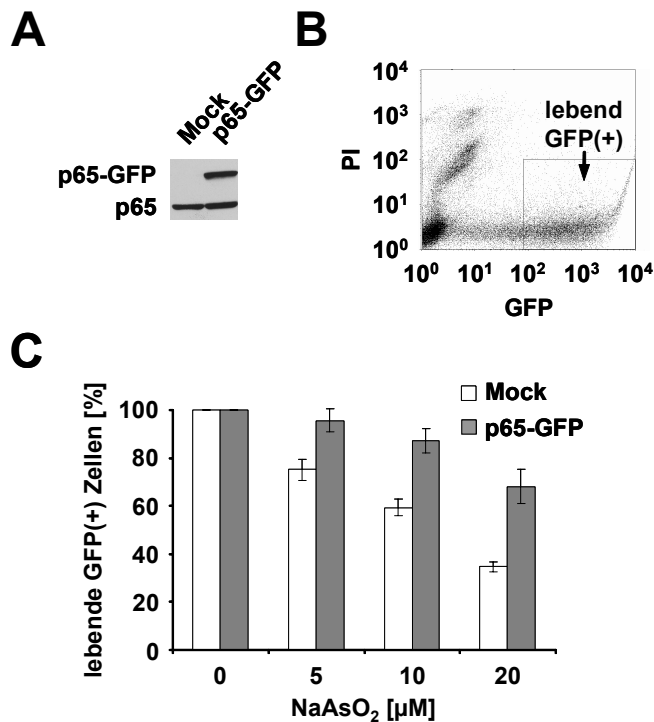


Abbildung 18

Ektope p65-Expression schützt HRS-Zellen vor NaAsO₂-induzierter Apoptose.

(A) L540Cy wurden mit einem p65-GFP- oder mit einem GFP-Expressionsplasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Expression von p65-GFP durch Immunoblot mit einem anti-p65-Antikörper überprüft.

(B) L540Cy-Zellen aus (A) wurden 24 h nach der Transfektion für 16 h mit 0, 5, 10, 20 μM NaAsO₂ inkubiert. Durch anschließende Färbung mit PI wurden tote Zellen markiert und die Ansätze durchflusszytometrisch vermessen.

(C) Auswertung des Anteils der durch Durchflusszytometrie als lebend und GFP(+) ermittelten Zellen (siehe (B)). Die Anzahl der lebenden/GFP(+) Zellen im Ansatz ohne NaAsO₂ wurde jeweils 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

5.2.8 Xenotransplantierte Hodgkintumore in NOD/SCID-Mäusen bilden sich durch Behandlung mit As₂O₃ zurück

In Mausexperimenten sollte die Aktivität von Arsen *in vivo* an HRS-Zellen untersucht werden. In klinischen Anwendungen wird nicht NaAsO₂, sondern As₂O₃ verwendet, das daher auch in den Mausexperimenten eingesetzt wurde. Zur Generierung von Tumoren in den Mäusen wurde mit der Linie L540Cy ein Subklon der Linie L540 verwendet. Dieser Subklon wurde auf ein effektives Etablieren von Tumoren in Mäusen hin selektiert. Die Xenotransplantation der Tumoren, die Behandlung der Mäuse und das Vermessen der Tumorgößen wurde von I. Fichtner und C. Nowak von der Firma Experimentelle Pharmakologie & Onkologie (EPO) GmbH durchgeführt.

Zunächst wurde die NF-κB-Aktivität und die NF-κB-Inhibition durch As₂O₃ in den Linien L540 und L540Cy verglichen. Dazu wurden Zellen beider Linien für 8 h mit 20 und 200 μM As₂O₃ inkubiert und anschließend die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB durch einen EMSA überprüft. Dabei zeigte sich, dass L540- und L540Cy-Zellen eine vergleichbare NF-κB-Aktivität besitzen, die in beiden Zelllinien durch As₂O₃ dosisabhängig in gleicher Weise reduziert wurde (**Abb. 19A**). Das As₂O₃ erwies sich dabei im Vergleich zum NaAsO₂ als stärkerer Inhibitor der NF-κB-Aktivität (**Abb. 12**). Der

wahrscheinlichste Grund dafür ist, dass As_2O_3 in Bezug auf die AsO_3^{3-} -Aktivität gegenüber NaAsO_2 die doppelte Normalität besitzt.

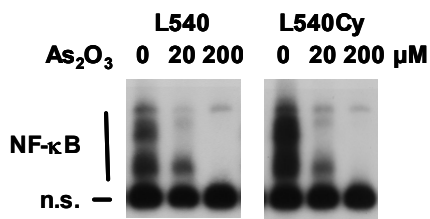
Für das erste Mausexperiment wurden NOD/SCID (*non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*)-Mäusen Zellen der HRS-Zelllinie L540Cy subkutan transplantiert. Mäuse mit tastbaren Tumoren wurden von Tag 3 bis 17 mit 3,75 mg/kg/d As_2O_3 intravenös behandelt. Es war keine Verlangsamung des Tumorwachstums feststellbar. Deshalb wurde die Dosis auf 7,5 mg/kg/d verdoppelt. Zwei Tage einer Behandlung mit dieser Dosierung reichten aus, um eine komplette Tumorregression zu induzieren. Die Behandlung wurde bis Tag 25 fortgesetzt. Nach dem Beenden der As_2O_3 -Behandlung blieben die Tiere für weitere 10 Tage tumorfrei (**Abb. 19B**). Danach wurde ein Wiederauftreten von Tumoren registriert (Daten nicht gezeigt).

Um sicherzugehen, dass die Zurückbildung der Tumoren von der IKK/NF- κ B-Inhibition abhängt, sollte im Tierversuch die Zelllinie L540Cy mit der NaAsO_2 -unempfindlichen Linie HD-My-Z verglichen werden (**Abb. 7**). Mäuse mit tastbaren Tumoren wurden ab Tag 8 nach der subkutanen Transplantation mit 5 oder 7,5 mg/kg/d As_2O_3 behandelt. Für die Linie L540Cy konnte eine dosisabhängige Verlangsamung des Tumorwachstums gegenüber den unbehandelten Tieren beobachtet werden. Allerdings wurde bei diesem Experiment keine komplette Zurückbildung der Tumoren erreicht. Im Gegensatz dazu sprachen die HD-My-Z-Tumoren nicht signifikant auf die Behandlung an (**Abb. 19C**).

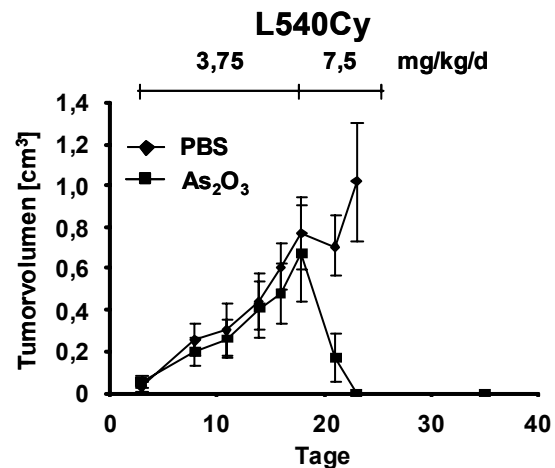
Von L540Cy- und von HD-My-Z-Tumoren wurden Proben explantiert und die so gewonnenen Zellen auf ihre NF- κ B-Aktivität überprüft. Dabei zeigten Zellen aus As_2O_3 -behandelten L540Cy-Tumoren eine stark reduzierte NF- κ B-Aktivität gegenüber Tumoren aus unbehandelten Mäusen. In Zellen von HD-My-Z-Tumoren war die NF- κ B-Aktivität zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen gleich (**Abb. 19D**).

Diese Daten spiegeln sowohl die *in vitro*-Ergebnisse der Inhibition der IKK/NF- κ B-Aktivität als auch die der Apoptoseinduktion in diesen Zellen wider und zeigen, dass die Inhibition des IKK-Komplexes ein möglicher therapeutischer Ansatz ist.

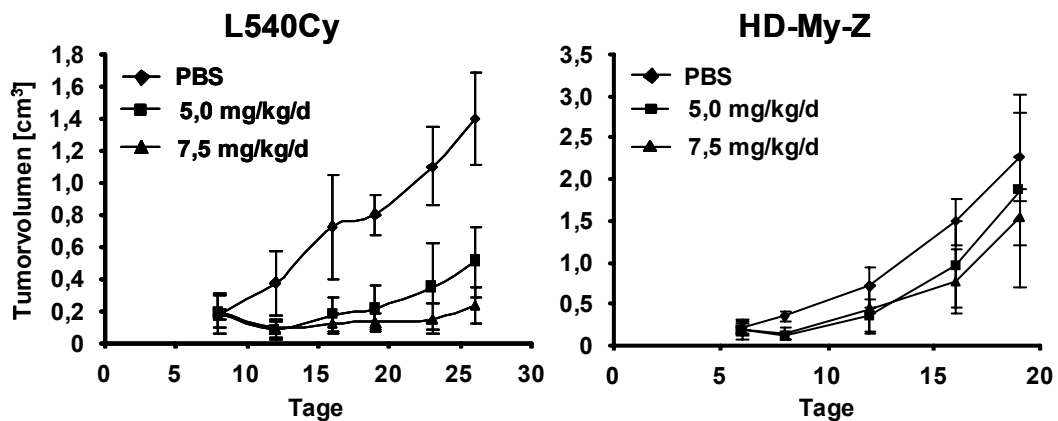
A



B



C



D

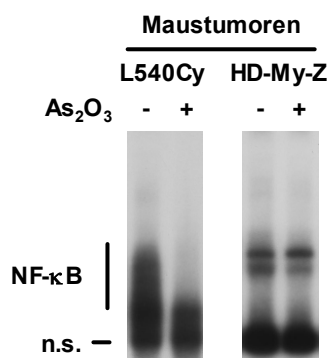


Abbildung 19

Zurückbildung von L540Cy-Tumoren in NOD/SCID-Mäusen durch As₂O₃.

(A) L540- und L540Cy-Zellen wurden für 8 h mit den angegebenen As₂O₃-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde durch EMSA die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB überprüft.

(B) L540Cy-Zellen wurden subkutan in NOD/SCID-Mäuse transplantiert. Mäuse mit tastbaren Tumoren wurden ab Tag 3 für 15 Tage mit PBS (Kontrolle, Tieranzahl (n)=6) oder mit 3,75 mg/kg/d As₂O₃ (n=6) intravenös behandelt. Danach anschließend wurden die Mäuse mit 7,5 mg/kg/d behandelt. Die Entwicklung der Tumorumfänge ist angegeben.

(C) Mäuse mit tastbaren L540Cy- oder HD-My-Z-Tumoren wurden 8 Tage nach der Transplantation mit PBS, 5,0 oder 7,5 mg/kg/d intravenös behandelt (jeweils n=6). Die Entwicklung der Tumorumfänge ist angegeben.

(D) Mäuse aus der Kontrollgruppe (PBS) wurden am Tag 24 (L540Cy) oder Tag 18 (HD-My-Z) mit PBS oder mit 7,5 mg/kg As₂O₃ intravenös behandelt und 6 h nach der Behandlung Tumoren explantiert. In Gesamtzelllysaten des Tumormaterials wurde die DNA-Bindungsaktivität von NF-κB untersucht.

Die Xenotransplantation der Tumoren, die Behandlung der Mäuse und das Vermessen der Tumormengen wurde von I. Fichtner und C. Nowak von der Firma Experimentelle Pharmakologie & Onkologie (EPO) GmbH durchgeführt.

6 Diskussion

6.1 Die Inhibition des CD95-Systems in HRS-Zellen

An vielen Krankheiten ist eine deregulierte Apoptosekontrolle beteiligt. In Tumorzellen wurden Mechanismen nachgewiesen, die diese vor einer Apoptoseinduktion schützen, so z.B. Mutationen von Proteinen, die an der CD95-induzierten Apoptose beteiligt sind, oder die Herunterregulation der CD95-Expression⁶⁶⁻⁷². Es wird angenommen, dass die Tumorzellen auf diese Weise einer Antwort des Immunsystems durch zytotoxische T-Zellen entgehen⁷⁴⁻⁷⁷. Auch die Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose. Doch nur in ca. 10 % der untersuchten primären HRS-Zellen wurden Mutationen des CD95-Gens nachgewiesen, die eine Apoptoseinduktion über diesen Rezeptor einschränken können. Von den etablierten HRS-Zelllinien weist nur die Linie L1236 eine solche Mutation auf, welche allerdings monoallelisch auftritt¹⁰⁰⁻¹⁰². Mutationen des CD95-Gens sind somit seltene Ereignisse in den HRS-Zellen und können daher nicht die CD95-Resistenz dieser Zellen erklären. Neben der Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen aus der IAP- und der Bcl-2-Familie, die die Aktivierung von Caspasen in HRS-Zellen inhibieren können^{81, 103}, wurde in primären HRS-Zellen eine abgeschwächte Expression der C-8 gezeigt¹⁰⁴. Inwieweit diese Befunde zur CD95-Resistenz der HRS-Zellen beitragen, ist bislang unbekannt.

Die Expressionsstudien dieser Arbeit haben gezeigt, dass, im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, Komponenten des CD95-Systems in den HRS-Zellen hochreguliert sind. Sowohl in den HRS-Zelllinien (**Abb. 4**) als auch in den primären HRS-Zellen konnte eine ungewöhnlich starke CD95-Überexpression gezeigt werden (**Abb. 5**). FADD wurde in den HRS-Zellen von allen untersuchten primären Fällen exprimiert. In einigen Fällen zeigten primäre HRS-Zellen eine FADD-Überexpression (**Abb. 5**). Dieser Befund ist überraschend, da *in vitro* gezeigt wurde, dass eine FADD-Überexpression in unterschiedlichen Zelltypen Apoptose auslösen kann⁵⁷. Faktoren, die eine solche Apoptoseinduktion in den primären HRS-Zellen verhindern könnten, sind unbekannt.

6.1.1 In HRS-Zellen ist der CD95-Signalweg durch c-FLIP inhibiert

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das CD95-System in den HRS-Zellen in der Regel funktionell und nicht strukturell inhibiert ist. Die folgenden Fakten zeigen, dass c-FLIP an dieser Inhibition beteiligt ist.

c-FLIP wird sowohl in den HRS-Zelllinien als auch in primären HRS-Zellen stark exprimiert. Eine solche c-FLIP-Expression in HRS-Zellen wurde mittlerweile auch in anderen Arbeiten gezeigt^{166, 167}. Durch Ko-Immunpräzipitationen konnte hier nachgewiesen werden, dass in fast allen untersuchten HRS-Zelllinien die DISC-Bildung nach CD95-Stimulation möglich ist. Sowohl c-FLIP_L als auch c-FLIP_S sind in diesen Komplex integriert, eine Voraussetzung für die Inhibition der CD95-induzierten Apoptose durch c-FLIP (**Abb. 8**). Die Herunterregulation der c-FLIP_{S/L}-Expression führt in den HRS-Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber CD95-induzierter Apoptose. Dies wurde zuerst mit Hilfe des Translationsinhibitors CHX nachgewiesen (**Abb. 9C**). Obwohl CHX nicht spezifisch wirkt, ist es nahe liegend, dass die CD95-Sensitivierung auf der c-FLIP-Reduktion beruht, da in dem untersuchten Zeitraum die Expression von Proteinen wie C-8, Bcl-x_L und p65 konstant blieb (**Abb. 9A**). In weiteren Experimenten erfolgte die Herunterregulation von c-FLIP_{S/L} spezifisch durch siRNAs. Zusätzlich zum CD95-Signalweg wurde dabei auch die Apoptoseinduktion über den TRAIL-Rezeptor untersucht. Sowohl für CD95 als auch für den TRAIL-Rezeptor wurde eine Apoptose-sensitivierung durch die c-FLIP-Herunterregulation erreicht (**Abb. 10**). Diese Daten zeigen, dass die c-FLIP_{S/L}-Überexpression zur Resistenz der HRS-Zellen gegenüber CD95- und TRAIL-Rezeptor-induzierter Apoptose beiträgt. Für andere Zelltypen wurde gezeigt, dass c-FLIP auch die Apoptoseinduktion durch TNF α über den TNF-R1 inhibieren kann¹⁶⁸. Das lässt die Vermutung zu, dass c-FLIP auch die Apoptoseinduktion über andere TNF-Rezeptoren in den HRS-Zellen inhibiert.

Trotz der starken Herunterregulation von c-FLIP_{S/L} in den siRNA-Experimenten, vor allem in der Linie L428, kam es zu keiner vollständigen Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber CD95- oder TRAIL-Rezeptor-induzierter Apoptose. Ein möglicher Grund dafür ist, dass bei Transfektionen eine heterogene Population von stark und schwach transfizierten Zellen entsteht. In schwach transfizierten Zellen ist die c-FLIP-Reduktion möglicherweise nicht ausreichend, um eine Apoptoseinduktion über CD95 oder den TRAIL-Rezeptor zu ermöglichen. Ein anderer Grund könnte die Expression

weiterer anti-apoptotisch wirkender Proteine aus der Familie der IAP- und Bcl-2-Proteine in den HRS-Zellen sein. IAP-Proteine können aktivierte Effektorcaspasen oder die über das Mitochondrium aktivierte Caspase-9 inhibieren⁴⁰⁻⁴². c-IAP2 und XIAP werden in HRS-Zellen stark exprimiert. Für beide Proteine wurde gezeigt, dass sie zur Apoptoseinhibition in den HRS-Zellen beitragen^{169, 170}. Anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, wie das in den HRS-Zellen exprimierte Bcl-x_L^{81, 103}, verhindern wiederum die Verstärkung der Apoptoseinduktion über das Mitochondrium. Der Mechanismus der Apoptoseinhibition von c-FLIP_S und c-FLIP_L im DISC ist unterschiedlich. Beiden gemeinsam ist, dass sie aufgrund ihrer fehlenden katalytischen Aktivität die vollständige Spaltung und damit Aktivierung von C-8 bzw. C-10 verhindern (**Abb. 2B**). Bei Anwesenheit von c-FLIP_S im DISC ist die Spaltung der Caspasen vollständig blockiert. Der Grund dafür ist, dass c-FLIP_S nicht die Konformation der Caspasen zulässt, die diese für ihre katalytische Aktivität benötigen. Im Gegensatz dazu erlaubt c-FLIP_L die entsprechende Caspasekonformation und damit die autokatalytische Abspaltung der C-terminalen p10-Domäne der C-8 bzw. der C-terminalen p12-Domäne der C-10. Zusätzlich wird die C-terminale p12-Domäne von c-FLIP_L durch die anwesenden Caspasen abgespalten. Alle C-terminalen Fragmente verlassen den DISC, während die N-terminalen Proteinreste in dem Komplex verbleiben³⁸. Dieses Fragmentmuster konnte in den DISC-Immunpräzipitationen der HRS-Zelllinien gezeigt werden. Sowohl die vollständigen C-8, C-10 und FLIP_L-Moleküle waren nachweisbar als auch deren N-terminale Proteinreste p43/41, p47/43 bzw. p43 (**Abb. 8**). Da die für die Heterodimerbildung nötigen weiteren Caspasedomänen auf Grund der fehlenden katalytischen Aktivität von c-FLIP_L nicht abgespalten werden, findet keine Caspaseaktivierung statt. Das wird durch das fehlende Auftreten der p18-Domäne der Caspase-8 im Zytosol nach CD95-Stimulation bestätigt (**Abb. 9B**). Zusammengefasst untermauern diese Daten die Annahme, dass in HRS-Zellen die Inhibition der Caspaseaktivierung im DISC durch c-FLIP_S und c-FLIP_L erfolgt.

In einigen Untersuchungen wurde für c-FLIP_L eine pro-apoptotische Wirkung gezeigt, die von der Expressionsstärke bzw. vom Verhältnis C-8/c-FLIP_L abzuhängen scheint. Dieser Effekt konnte nur bei sehr niedrigen und sehr hohen, unphysiologischen c-FLIP_L-Konzentrationen beobachtet werden. In der sehr niedrigen Konzentration er-

leichtert c-FLIP_L die vollständige C-8-Spaltung im DISC und damit deren Aktivierung¹⁷¹. Bei sehr hohen, unphysiologischen c-FLIP_L-Konzentrationen findet eine Heterodimerbildung von Caspase-8 und c-FLIP_L im Zytosol statt. In diesem Heterodimer findet die unvollständige, autokatalytische Spaltung der Caspase-8 statt. Für dieses Heterodimer wurde nachgewiesen, dass es eine aktive Caspase darstellt¹⁷². Dadurch, dass diese Aktivierung im Zytosol stattfindet, wird Apoptose induziert¹⁷¹. In dem Konzentrationsbereich zwischen diesen beiden Extremen wirkt c-FLIP_L als Apoptoseinhibitor. Zum einen verdrängt es die Caspase aus dem DISC und vermindert so die Wahrscheinlichkeit, dass Caspasmoleküle die für ihre Aktivierung ausreichende räumliche Nähe erreichen. Zum anderen verbleiben die Produkte unvollständiger Caspasespaltungen, die c-FLIP_L zulässt, im DISC. Auch wenn diese Caspasen aktiv sein sollten, können sie nur lokal wirken und deshalb keine Apoptose induzieren¹⁷¹⁻¹⁷³.

Für eine anti-apoptotische Wirkung von c-FLIP_L in den HRS-Zellen spricht dessen starke Expression. Sie sollte ausreichen, um die für niedrige Expressionsstärken beschriebene pro-apoptotische Wirkung von c-FLIP_L zu verhindern. Die Expression von c-FLIP_L ist aber noch nicht so stark, dass eine Caspaseaktivierung im Zytosol stattfindet. In diesem Fall würde die Apoptose spontan ohne Stimulation von CD95 oder des TRAIL-Rezeptors auftreten¹⁷¹. Eine anti-apoptotische Wirkung von c-FLIP_L in den HRS-Zellen ergibt sich außerdem aus Untersuchungen an Keimzentrum-B-Zellen, in denen die HRS-Zellen ihren Ursprung haben. Werden frisch isolierte Keimzentrum-B-Zellen *ex vivo* kultiviert, sterben diese nach kurzer Zeit durch Apoptose^{98, 99}. Gleichzeitig verlieren sie die Expression von c-FLIP_L. Erhalten die Keimzentrum-B-Zellen Überlebenssignale durch die Stimulation des BZRs, des CD40 oder der gemeinsamen Kultivierung mit FDCs, wird die Apoptose verhindert. Gleichzeitig ist die Induktion oder Aufrechterhaltung der c-FLIP_L-Expression zu beobachten^{98, 99}. Eine Schlussfolgerung ist, dass die Wirkung von c-FLIP_L nicht nur von der Expressionsstärke, sondern möglicherweise auch vom Zelltyp abhängt.

6.1.2 Die Bedeutung der CD95-Inhibition für das Hodgkin Lymphom

HRS-Zellen stammen von Keimzentrum-B-Zellen ab, welche die Fähigkeit zur Expression des BZRs verloren haben. Sie müssen daher einen Mechanismus entwickelt haben, der sie vor der Negativselektion im Keimzentrum schützt. An diesem Vorgang

ist CD95-induzierte Apoptose beteiligt. Es gibt Hinweise, dass die Inhibition des CD95-Systems zur Entstehung und zum Fortbestand des Hodgkin Lymphoms beiträgt.

Patienten mit der Autoimmunkrankheit ALPS weisen Keimbahnmutationen in Genen auf, deren Produkte an CD95-induzierter Apoptose beteiligt sind, darunter auch CD95 selbst. Lymphozyten solcher Patienten sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose^{65, 174}. Gegenüber der Normalbevölkerung besteht für Menschen mit dieser Erkrankung ein erhöhtes Risiko, an Lymphomen zu erkranken. Für das Hodgkin Lymphom besteht das höchste Risiko, welches um den Faktor 51 erhöht ist⁶⁵. Dies lässt einen Zusammenhang zwischen der Inhibition des CD95-Signalweges und der Entstehung des Hodgkin Lymphoms vermuten.

Diese Situation wird eventuell in der Linie L1236 widergespiegelt. Hier erfolgt nach der CD95-Stimulation keine DISC-Bildung. Darüber hinaus konnte in L1236-Zellen nach CHX-Behandlung im Gegensatz zu den Linien L428 und KM-H2 keine gesteigerte CD95-induzierte Apoptose beobachtet werden (**Abb. 9C**). Für diese Linie wurde eine monoallelische Mutation von CD95 in der DD gezeigt, die zur Expression eines trunkeierten CD95-Proteins führt¹⁰⁰. Die gemeinsame Expression einer trunkeierten und einer Wildtypvariante von CD95 ist ausreichend, um eine DISC-Bildung und damit eine Apoptoseinduktion zu verhindern¹⁷⁴. Es ist aber auch möglich, dass L1236-Zellen zum Typ II gehören. In solchen Zellen erfolgt nach CD95-Stimulation nur eine schwache DISC-Bildung, so dass das apoptotische Signal über das Mitochondrium verstärkt werden muss²¹. Diese Verstärkung wäre in HRS-Zellen inhibiert, da sie anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie überexprimieren^{81, 103}, die das Mitochondrium stabilisieren. Die Inhibition der CD95-induzierten Apoptose durch Proteine der Bcl-2-Familie ist eine Eigenschaft von Typ II, die sie von Typ I Zellen unterscheidet²¹.

Auf den Zellen des Begleitinfiltrats, das die HRS-Zellen umgibt, wurde die Expression des CD95L nachgewiesen (**Abb. 11A**). Gleichzeitig konnte durch konfokale Mikroskopie eine Membranständigkeit von c-FLIP in den HRS-Zellen von Biopsien des Hodgkin Lymphoms gezeigt werden (**Abb. 11B**). Eine Erklärung dafür ist, dass es in einen DISC integriert. Dies legt eine ständige Induktion von TNF-Rezeptoren in HRS-Zellen nahe, für die es mehrere Ursachen geben kann. Eine ist der auf den umlie-

genden Zellen nachgewiesene CD95L, der den in den HRS-Zellen stark exprimierten CD95 stimuliert. Es kann aber nicht die Induktion anderer TNF-Rezeptoren ausgeschlossen werden, die ebenfalls zu einer DISC-Bildung führen kann. Eine weitere mögliche Ursache ist eine Liganden-unabhängige DISC-Bildung, wie sie für das CD95-System von Keimzentrum-B-Zellen nachgewiesen wurde⁹⁸. In jedem Fall verhindert c-FLIP eine Apoptoseinduktion durch einen so geformten DISC und schützt die HRS-Zellen vor Apoptose. Da in den HRS-Zelllinien nach Reduktion der c-FLIP-Expression eine Wiederherstellung der CD95- und TRAIL-Rezeptor-Sensitivität zu beobachten war, ist es wahrscheinlich, dass ohne c-FLIP-Expression auch in den primären HRS-Zellen Apoptose induziert werden würde. Das würde bedeuten, dass die HRS-Zellen auf den Apoptoseschutz durch c-FLIP angewiesen sind. Diese Befunde legen nahe, dass die CD95-Inhibition am Fortbestand des Hodgkin Lymphoms beteiligt ist.

6.1.3 Die potentielle Bedeutung der starken CD95-Expression in den HRS-Zellen

Obwohl HRS-Zellen durch die Expression von c-FLIP und wahrscheinlich auch von anderen anti-apoptotischen Proteinen vor CD95-induzierter Apoptose geschützt sind, stellt sich die Frage, warum CD95 so stark von diesen Zellen exprimiert wird. Die hohe CD95-Expression wird in den HRS-Zelllinien auch nach einer Vielzahl von Passagen aufrechterhalten und zeigte sich auch in den primären HRS-Zellen (**Abb. 4, 5**). Wie gezeigt, führt schon der Verlust nur eines anti-apoptotischen Proteins (c-FLIP) dazu, dass HRS-Zellen wieder sensitiv gegenüber CD95-induzierter Apoptose werden. Obwohl in dieser Arbeit nicht im gleichen Ausmaß nachgewiesen (**Abb. 10A, 10B**), genügte in einer anderen Arbeit das alleinige Ausschalten der c-FLIP-Expression für eine starke Apoptoseinduktion in den HRS-Zelllinien L428 und L591. Diese Apoptoseinduktion wurde auf eine CD95-Stimulation durch den auf den Zellen selbst exprimierten CD95L zurückgeführt¹⁶⁶. Die hohe CD95-Expression erzwingt also die Expression von c-FLIP und wahrscheinlich anderer anti-apoptotischer Proteine wie z.B. aus der IAP- und Bcl-2-Familie. Darüber hinaus wird angenommen, dass CD95-induzierte Apoptose an der Beseitigung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen beteiligt ist⁷⁴⁻⁷⁶. Deshalb stehen Tumorzellen unter dem Selektions-

druck, gegenüber CD95-induzierter Apoptose eine Resistenz zu entwickeln^{73, 74}. Daher stellt sich die Frage, ob die HRS-Zellen von der energieaufwendigen Expression dieser Proteine weitere Vorteile erlangen. Obwohl CD95 als Prototyp eines Apoptose-induzierenden Rezeptors gilt, zeigen neue Experimente, dass durch CD95-Stimulation in bestimmten Zelltypen auch Proliferation und Differenzierung ausgelöst werden kann. So führt die Stimulation von CD95 zur Proliferation von T-Zellen, zur Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen oder zum Auswachsen von Neuriten sensorischer Neuronen¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. An Tumorzellen wurde gezeigt, dass eine Stimulation von CD95 deren Beweglichkeit und Invasivität erhöhen kann⁷³. Es besteht also die Möglichkeit, dass HRS-Zellen aus der hohen CD95-Expression einen ähnlichen Wachstumsvorteil erlangen.

C-8- oder FADD-defiziente Mäuse sterben in der Embryonalphase durch Defekte in der Herzentwicklung. In T-Zellen führt das Fehlen dieser beiden Proteine zu einer Blockade in der Entwicklung von T-Lymphozyten und einer gehemmten Stimulierbarkeit der T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Interessanterweise führt eine c-FLIP-Defizienz zu sehr ähnlichen Phänomenen. Die Mäuse sterben ebenfalls in der Embryonalphase an Herzfehlern, und T-Lymphozyten zeigen Defekte in der Stimulierbarkeit über den T-Zell-Rezeptor^{182, 183}. Das zeigt, dass FADD, C-8 und c-FLIP nicht nur an den gegensätzlichen Signalwegen von Apoptose und anti-Apoptose beteiligt sind, sondern in einigen nicht-apoptotischen Signalwegen kooperieren. Sowohl die starke c-FLIP-Expression in den HRS-Zelllinien und primären HRS-Zellen als auch die starke FADD-Expression in einigen primären HRS-Zellen könnten solche nicht-apoptotischen Signale begünstigen (**Abb. 4, 5, 6**).

Was sind die Mechanismen, durch die eine CD95-Induktion Zellen stimulieren kann? Es wurde gezeigt, dass die Induktion von CD95 die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 aktivieren kann^{174, 175}. Die Bedeutung einer NF- κ B-Aktivität, auch für die HRS-Zellen, wurde schon in der Einleitung beschrieben. AP-1 ist an Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Induktion oder Inhibition von Apoptose beteiligt^{174, 175}. AP-1 ist ebenfalls in den HRS-Zellen konstitutiv aktiv und reguliert die Expression von wachstumsfördernden Zielgenen, teilweise zusammen mit NF- κ B¹⁶⁵. In diesem Zusammenhang scheint c-FLIP_L eine Rolle als Adapterprotein bei der Rekrutierung weiterer Proteine an den zytoplasmatischen Teil von CD95 zu spielen, die dann zur

Aktivierung der Transkriptionsfaktoren führen. Zu den von FLIP_L rekrutierten Proteinen gehören TRAF1 und 2, RIP (*receptor interacting protein*) und Raf-1, eine MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase Kinase Kinase. Die Rekrutierung von TRAF1 und 2 sowie RIP sind an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt. Die Rekrutierung von Raf-1 ist verantwortlich für die Aktivierung der MAP Kinase Kinase Mek, die wiederum die MAP Kinase Erk aktiviert und damit letztendlich AP-1¹⁸⁴. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch das im DISC entstehende und verbleibende N-terminale Fragment von c-FLIP_L (p43) mit TRAF2 interagiert und so NF- κ B aktiviert¹⁸⁵.

In ersten Versuchen im Verlauf dieser Arbeit konnte in den HRS-Zellen allerdings keine Modulation der NF- κ B-Aktivität nach Reduktion der c-FLIP-Expression gezeigt werden. Das gleiche gilt für die Proliferation der HRS-Zellen nach einer CD95-Stimulation (jeweils Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung könnte sein, dass c-FLIP für beide Sachverhalte in den HRS-Zellen keine Rolle spielt. Ein anderer Grund wäre, dass andere Mechanismen wie z.B. überexprimierte TNF-Rezeptoren (CD30 und CD40)^{133, 134} den Ausfall von c-FLIP kompensieren.

Patienten mit ALPS vom Typ Ia weisen heterozygote Keimbahnmutationen in der DD des CD95-Gens auf. Es wird daher jeweils eine trunkierte und eine Wildtypvariante von CD95 exprimiert. Nach CD95-Stimulation wird in Lymphozyten dieser Patienten nur sehr ineffizient ein DISC gebildet, was zu einer Apoptoseresistenz führt. Interessanterweise ist aber die Induktion von NF- κ B durch CD95 nicht gestört¹⁷⁴. In Zellen wie der L1236 mit monoallelischer CD95-Mutation in der DD könnte so die Apoptose inhibiert sein, nicht aber die für die Zelle vorteilhaften Signale.

Die Membranständigkeit von c-FLIP in primären HRS-Zellen lässt vermuten, dass in diesen Zellen eine konstitutive DISC-Induktion vorliegt. Es ist anzunehmen, dass bei der hohen CD95-Expression in den HRS-Zellen und bei gleichzeitiger CD95L-Expression der umliegenden Zellen ein Teil dieser DISC-Bildung auf CD95 zurückgeführt werden kann. Es existieren also Bedingungen, welche die Stimulation nicht-apoptotischer Signale durch CD95 zulassen könnten. Eine weitere Möglichkeit ist die Liganden-unabhängige DISC-Bildung, wie sie in frisch isolierten Keimzentrum-B-Zellen beobachtet wurde⁹⁸. Eine solche spontane DISC-Bildung wird möglicherweise durch die starke CD95-Expression begünstigt.

Ein anderer interessanter Aspekt ist, dass auch der CD95L in seiner membrangebundenen Form Ausgangspunkt für intrazelluläre Signale sein kann. Wenn CD95 an den CD95L bindet, kann das in der CD95L tragenden Zelle die Proliferation steigern oder auch inhibieren¹⁷⁵. HRS-Zellen rekrutieren durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen eine Reihe von Zellen^{103, 142-144}, auf denen die Expression von CD95L nachgewiesen wurde (**Abb. 11A**). Auf diese Weise könnten die HRS-Zellen durch die hohe CD95-Expression Einfluss auf die Zusammensetzung des zellulären Begleitfiltrats nehmen (**Abb. 20**).

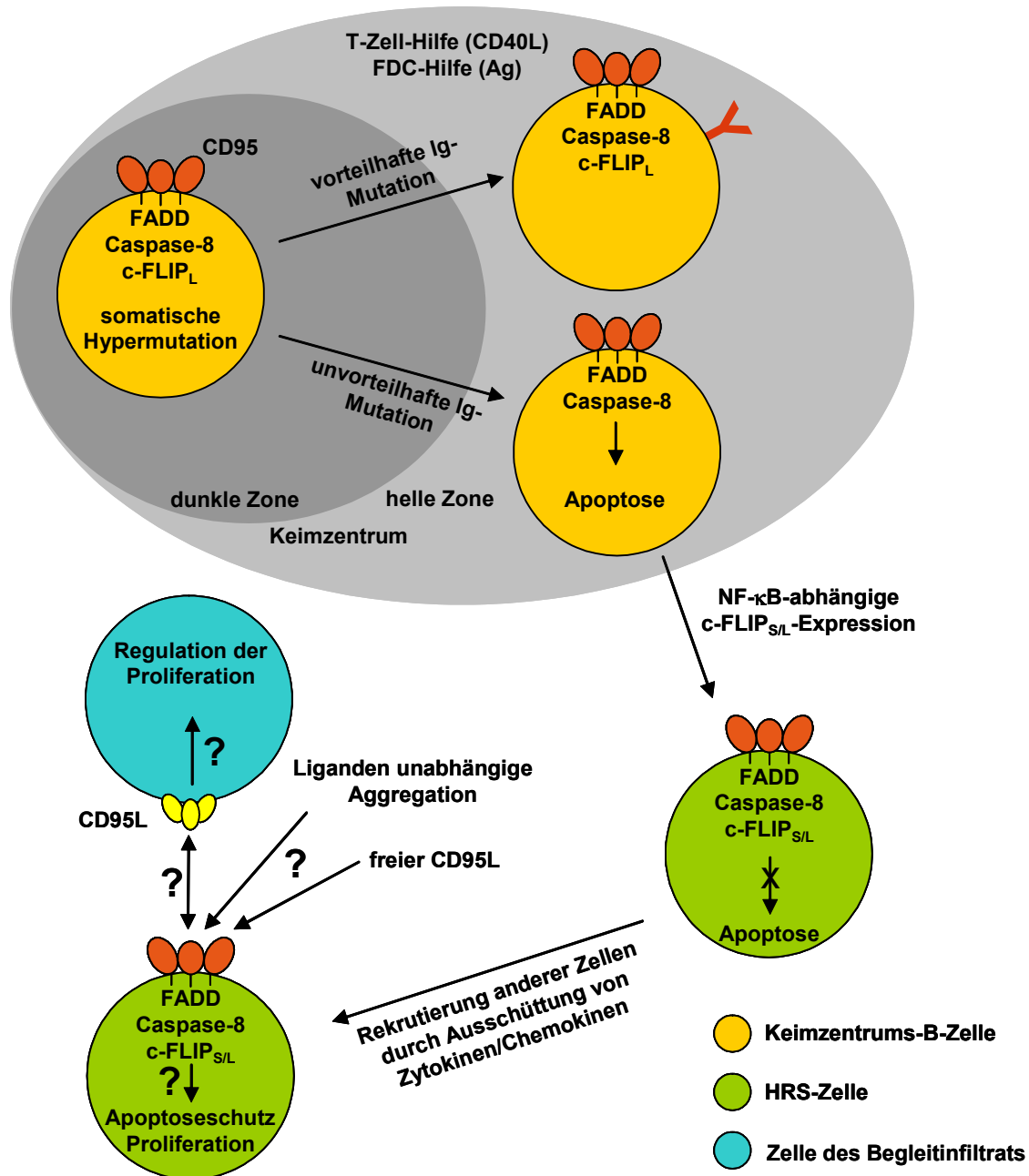


Abbildung 20
Die potentielle Rolle von c-FLIP und CD95 für das kHL.

Während der Keimzentrumsreaktion findet die somatische Hypermutation statt. Ziel ist die Generierung höher affiner Antikörper. B-Zellen, in denen das gelingt, erhalten in der hellen Zone des Keimzentrums Überlebenssignale von T_H-Zellen und FDCs. Dabei wird die Expression von c-FLIP_L induziert. B-Zellen ohne intakte Antikörper, wie es HRS-Zellen sind, sterben normalerweise durch Apoptose unter Beteiligung des CD95-Systems. In HRS-Zellen wird c-FLIP_{S/L} exprimiert, das von der konstitutiven NF-κB-Aktivität in diesen Zellen abhängt. HRS-Zellen sind so vor der Apoptoseinduktion durch TNF-Rezeptoren geschützt. HRS-Zellen rekrutieren eine Reihe von Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen/Chemokinen, die teilweise den CD95L tragen. Neben der Liganden-unabhängigen oder durch freien CD95L hervorgerufenen CD95-Aggregation ist das eine Möglichkeit für die nachgewiesene DISC-Bildung in den HRS-Zellen. Durch die inhibierte Apoptose ergeben sich alternative Signalwege durch CD95, die zu NF-κB-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung führen können. Die Bindung von CD95 an Zellen mit CD95L kann auch deren Proliferation beeinflussen.

6.1.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen am Beispiel von CD95 und dem TRAIL-Rezeptor, dass die Apoptoseinduktion über diese Rezeptoren funktionell und nicht strukturell inhibiert ist. An dieser Inhibition ist die Überexpression von c-FLIP_{S/L} beteiligt. Durch Herunterregulation von c-FLIP konnte die Sensitivität gegenüber diesen apoptotischen Stimuli teilweise wiederhergestellt werden. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus auch auf andere Apoptose-induzierende TNF-Rezeptoren in den HRS-Zellen zutrifft. Deshalb könnte die Manipulation der Signalwege dieser Rezeptoren neue Therapieansätze für die Behandlung des Hodgkin Lymphoms bieten. Eine Möglichkeit wäre die Inhibition der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen, von der die c-FLIP-Expression abhängt (**Abb. 7**). Ansatzpunkte sind hier die Inhibition des konstitutiv aktiven IKK-Komplexes, der zu einem ständigen proteasomalen Abbau der I κ B-Proteine führt. Eine andere Möglichkeit bieten Proteasominhibitoren, die den Abbau der I κ B-Proteine verhindern^{103, 186}.

Durch den Einsatz von siRNAs kann die Expression von Proteinen gezielt ausgeschaltet werden, was sie interessant für den therapeutischen Einsatz macht. Prinzipiell wurde an Mäusen gezeigt, dass die Injektion von siRNAs zu einer Herunterregulation von Zielgenen führt^{187, 188}. Für einen therapeutischen Einsatz von siRNAs müssen aber noch eine Reihe von Problemen gelöst werden. Dies betrifft die Form der Verabreichung, die Stabilität der siRNAs im Organismus, die Aufnahme durch die Zellen und die Wirksamkeit in verschiedenen Organen. Dabei wurden Fortschritte durch das Verpacken der siRNAs in Liposomen erzielt, wie sie auch für die Transfektion von Zellkulturzellen verwendet werden. Ein anderer Ansatz ist das Koppeln der siRNAs an Cholesterin, was zu einer verlängerten Halbwertszeit der siRNAs im Organismus und zu einer verbesserten Aufnahme durch die Zellen führt^{189, 190}.

In Zukunft bleibt zu klären, welche Bedeutung die starke Expression von TNF-Rezeptoren wie CD95, CD40 und CD30 für die HRS-Zellen oder für die Entstehung des Hodgkin Lymphoms besitzt. Eine Möglichkeit ist, dass sie zu der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen beitragen. Untersuchen ließe sich das z.B. durch den Einsatz von siRNAs, die eine Herunterregulation dieser Rezeptoren bewirken oder durch die Überexpression von dominant negativen Rezeptorvarianten, welche den Signalweg unterbrechen. Es bleibt auch zu klären, ob c-FLIP in den HRS-Zellen über

die anti-apoptotische Wirkung hinaus auch noch andere Effekte, wie z.B. die Aktivierung von NF- κ B-/AP-1 oder eine Wachstumsförderung, vermittelt.

6.2 Arsen-induzierte NF- κ B-Inhibition und Apoptoseinduktion in HRS-Zellen

Die Bedeutung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität für die HRS-Zellen wurde unter anderem durch Experimente mit dem NF- κ B-Superrepressor I κ B α Δ N gezeigt. Die mit diesem Repressor erreichte Reduktion der NF- κ B-Aktivität führt zu einem massiven Anstieg der Apoptoserate und einem Wachstumsarrest in den HRS-Zellen. Der Grund dafür ist die Herunterregulation NF- κ B-abhängiger anti-apoptotischer und Zellzyklustreibender Gene^{81, 103}. Im ersten Teil der Arbeit konnte dies am Beispiel von c-FLIP für ein Protein gezeigt werden, dessen Expression in den HRS-Zellen stark von der NF- κ B-Aktivität abhängt (**Abb. 7**). Eine Inhibition der NF- κ B-Aktivität könnte daher ein Ansatz zur Behandlung des Hodgkin Lymphoms sein. Allerdings wäre für eine Inhibition durch I κ B α Δ N ein Gentransfer nötig, der heute noch nicht ohne weiteres möglich ist. Für die klinische Anwendung wären Substanzen wünschenswert, welche die Ursachen für die konstitutive NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen angreifen, so z.B. Inhibitoren des IKK-Komplexes oder Proteasominhibitoren. Eine Vielzahl aus der Literatur bekannter NF- κ B-inhibierenden Substanzen, wie z.B. Azetylsalizylsäure, Dexamethason oder IL-11^{191, 192}, führten in den HRS-Zellen jedoch zu keiner Reduktion der NF- κ B-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

6.2.1 NaAsO₂-induzierte NF- κ B-Inhibition und Apoptose

Die NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zellen wird unter anderem auf einen konstitutiv aktiven IKK-Komplex zurückgeführt, der zu einem ständigen Abbau der I κ B-Proteine führt. Von NaAsO₂ ist bekannt, dass es die TNF α -induzierte Aktivierung des IKK-Komplexes, die damit verbundene Degradation der I κ B-Proteine und die resultierende NF- κ B-Aktivierung verhindern kann. Dieser Effekt beruht auf der Interaktion des, bei der Dissoziation von NaAsO₂ entstehenden, Arsenitanions mit einem Cystein in der Aktivierungsdomäne von IKK β und wahrscheinlich auch IKK α ¹⁵⁴. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die konstitutive IKK/NF- κ B-Aktivität in den HRS-Zelllinien durch Inkubation mit NaAsO₂ inhibiert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der HRS-Zellen mit NaAsO₂ zu einer Reduktion der IKK/NF- κ B-Aktivität führt. Dies geschah sowohl dosis- als auch zeitabhängig. Bei

hohen Dosierungen von 20-50 μM NaAsO_2 ergab sich eine deutliche Aktivitätsminderung der NF- κ B-Aktivität nach 8 h. Für die niedrigeren Dosierungen von 1-5 μM waren Inkubationszeiten von 24-48 h erforderlich, um eine Verminderung der NF- κ B-Aktivität feststellen zu können (**Abb. 12**). Durchgeführte Kinaseassays zeigten eine von der NaAsO_2 -Dosis abhängige Inhibition des IKK-Komplexes (**Abb. 13A**). Dies ging mit einer Abnahme der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA einher. Dabei blieb der Gehalt an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein konstant oder nahm zu (**Abb. 13B**). $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ist selbst ein Zielgen von NF- κ B. Die Abnahme der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA lässt sich deshalb mit der reduzierten NF- κ B-Aktivität im Verlauf der NaAsO_2 -Inkubation erklären. Das dabei unveränderte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteinniveau lässt sich als Folge einer posttranslationalen Stabilisierung durch die Inhibition des IKK-Komplexes erklären. Für diese Annahme spricht, dass das $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein in Gegenwart eines aktiven IKK-Komplexes nur eine geringe Halbwertszeit besitzt. Wird in Zellen durch Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ der IKK-Komplex aktiviert, führt dies innerhalb von ca. 15 min zu einem Abbau des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins¹⁹³. Im Falle der NaAsO_2 -Inkubation wies das $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein eine sehr viel größere Halbwertszeit auf, da nach 8 h zumindest ein konstanter $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteingehalt bei gleichzeitig stark reduzierter $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -mRNA festgestellt werden konnte. Bestätigt wird dieser Mechanismus der NF- κ B-Inhibition dadurch, dass in den Zelllinien L428 und KM-H2 mit defekten $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen eine Inkubation mit NaAsO_2 zu keiner Reduktion der NF- κ B-Aktivität führt (**Abb. 14**). Dieser Zusammenhang wurde auch in einer anderen Arbeit für HRS-Zellen gezeigt. Hier erfolgte die Inhibition des IKK-Komplexes durch Inhibition von Hsp90 (*heat shock protein*). Dabei wurde nachgewiesen, dass Hsp90 in den HRS-Zellen sowohl für die Aktivität des IKK-Komplexes als auch für die Synthese von dessen Untereinheiten notwendig ist. Die Inhibition von Hsp90 führte zur Abnahme der Aktivität des IKK-Komplexes. Eine gleichzeitige Abnahme der NF- κ B-Aktivität erfolgte aber auch hier nur in HRS-Zelllinien mit intakten $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen¹⁹⁴. Das ist ein Hinweis darauf, dass die NF- κ B-Inhibition von funktionellen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen abhängt, die durch den inhibierten IKK-Komplex stabilisiert werden (**Abb. 21**).

Zur Kontrolle der Kinaseassays wurde die Expressionsstärke des $\text{IKK}\alpha$ -Proteins in den Lysaten untersucht, die für die Immunpräzipitation des IKK-Komplexes eingesetzt wurden. Hier zeigte sich, dass das $\text{IKK}\alpha$ -Proteinniveau durch die NaAsO_2 -Inkubation abnahm (**Abb. 13A**). Die Inhibition des IKK-Komplexes muss daher teilweise auf die

Abnahme des IKK α -Proteinniveaus zurückgeführt werden. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Inkubation mit NaAsO₂ zur Ubiquitinylierung von Proteinen und damit auch zu ihrem proteasomalen Abbau führt^{195, 196}. Das könnte eine Erklärung für die Abnahme des IKK α -Proteinniveaus im Verlauf der NaAsO₂-Inkubation sein. Die Stabilisierung des I κ B α -Proteins zeigt aber, dass NaAsO₂ nicht zu einem generellen proteasomalen Proteinabbau führt.

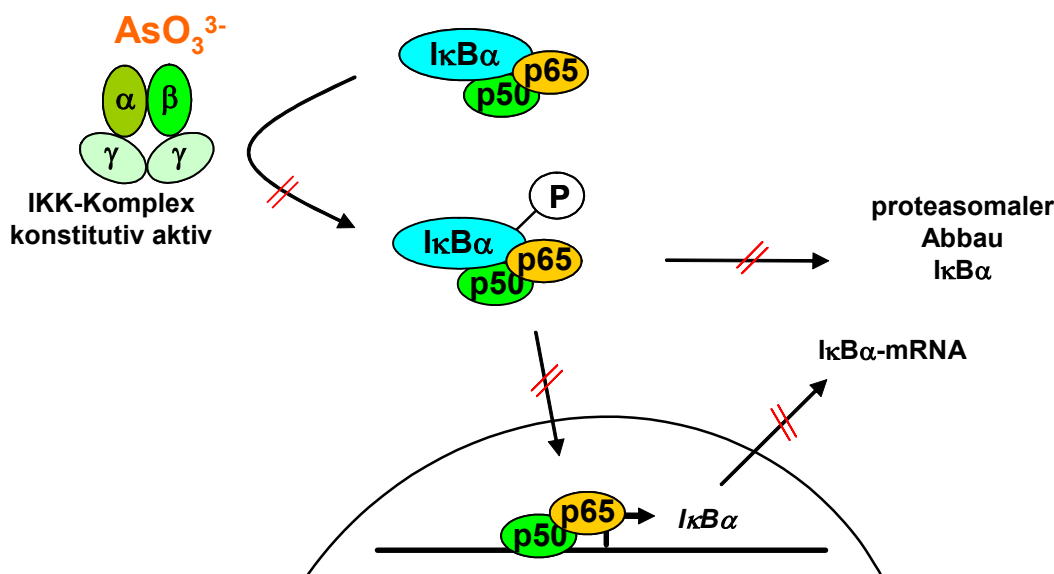


Abbildung 21
Mechanismus der NF- κ B-Inhibition durch Arsenit.

Das Arsenitanion bindet an ein Cystein in der Aktivierungsdomäne von IKK β und wahrscheinlich auch von IKK α , wodurch die Kinaseaktivität inhibiert wird. Die Folge ist eine ausbleibende Phosphorylierung von I κ B α , so dass das Signal für dessen proteasomalen Abbau fehlt. Dadurch wird das Freiwerden von NF- κ B und dessen Translokation in den Kern verhindert. Die NF- κ B-Inhibition führt zu einer Herunterregulation der I κ B α -mRNA, da I κ B α selbst ein Zielgen von NF- κ B ist.

Die Inkubation mit NaAsO₂ löste in HRS-Zellen Apoptose aus. Dies geschah sowohl bei hohen als auch bei niedrigen NaAsO₂-Konzentrationen (**Abb. 16A, 16B**). Eine Apoptoseinduktion war aber nur in Zelllinien möglich, in denen die NaAsO₂-Inkubation zu einer NF- κ B-Inhibition führte (**Abb. 14, 17**). Die NF- κ B-Inhibition war wiederum von funktionellen I κ B-Proteinen abhängig (**Abb. 14**). Darüber hinaus konnte die Sensitivität von L540Cy-Zellen gegenüber NaAsO₂-induzierter Apoptose stark reduziert werden, wenn in ihnen durch Transfektion mit p65-GFP eine zusätzliche NF- κ B-Aktivität erzeugt wurde (**Abb. 18**). Dies lässt den Schluss zu, dass die NF- κ B-Inhibition durch NaAsO₂ zur Apoptoseinduktion beiträgt. Dieser Zusammen-

hang konnte gezeigt werden, obwohl NaAsO_2 bis zu 200 Enzyme inhibieren kann. Darunter sind Enzyme, welche am Energiestoffwechsel, der DNA-Replikation- oder der DNA-Reparatur beteiligt sind ¹⁶⁴.

Xenotransplantierte Tumoren aus L540Cy-Zellen, eines Subklons der *in vitro* NaAsO_2 -empfindlichen L540-Zellen, bildeten sich durch Behandlung mit As_2O_3 zurück (**Abb. 19B, 19C**). Nach Behandlung mit As_2O_3 konnte in explantierten Tumorzellen eine Reduktion der NF- κ B-Aktivität nachgewiesen werden (**Abb. 19D**). Im Gegensatz dazu konnten Tumore der NaAsO_2 -unempfindlichen HD-My-Zellen (**Abb. 17**) durch Behandlung mit As_2O_3 nicht beeinflusst werden (**Abb. 19C**). In diesen Zellen blieb die ohnehin geringe NF- κ B-Aktivität bei Behandlung der Mäuse mit As_2O_3 unverändert (**Abb. 19D**). Die Mausmodelle bestätigen damit den Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und IKK/NF- κ B-Inhibition durch Arsen.

Alternativ zur Apoptose kann dreiwertiges Arsen (As_2O_3) auch Nekrose auslösen ¹⁹⁷. Dabei handelt es sich um einen Zelltod, der durch physikalische oder chemische Beschädigungen von Zellen ausgelöst werden kann. Nekrose läuft weniger kontrolliert als Apoptose ab, es entstehen Zellfragmente, und der Zellinhalt wird unkontrolliert an die Umgebung abgegeben ^{198, 199}. Für die Induktion von Apoptose durch NaAsO_2 in HRS-Zellen spricht die starke Aktivierung der Caspase-3 (**Abb. 16C**) und die AnnexinV-FITC-Positivität der Zellen bei gleichzeitiger Propidiumiodid (PI)-Negativität während der Inkubation mit NaAsO_2 (**Abb. 16A**). Beides sind Zeichen für einen Zelltod durch Apoptose. AnnexinV bindet spezifisch an Phosphatidylserin (PS) ²⁰⁰, das in apoptotischen Zellen von der inneren auf die äußere Membranseite geklappt wird ¹⁹⁸. Die Membran bleibt dabei intakt, weshalb PI nicht in diese Zellen eindringen kann, um in die DNA zu interkalieren. Dass in dieser Arbeit nach NaAsO_2 -Inkubation von HRS-Zellen Apoptose und nicht, wie in anderen Arbeiten, Nekrose beobachtet wurde, kann mit den unterschiedlichen Zelltypen erklärt werden, die für die Untersuchungen verwendet wurden ¹⁹⁷.

6.2.2 Ursachen der NaAsO_2 -induzierten Apoptose

Durch die Experimente mit dem Superrepressor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha\Delta\text{N}$ wurden in HRS-Zellen eine Reihe von NF- κ B-Zielgenen identifiziert ^{81, 103}. Gleichzeitig führte eine so induzierte NF- κ B-Inhibition in HRS-Zellen zu Apoptose und zu einer Wachstumsinhibition der

Zellen^{81, 103}. Die Inhibition der NF- κ B-Aktivität durch NaAsO₂ führte in den HRS-Zellen zu einer Herunterregulation von NF- κ B-Zielgenen, u.a. TRAF1, c-IAP2, IL-13 und CCR7. TRAF1 und c-IAP2 wirken anti-apoptotisch. c-IAP2 ist ein Inhibitor der Aktivität der Caspasen-3, -7 und -9. Es wurde gezeigt, dass die alleinige Herunterregulation von c-IAP2 in HRS-Zellen Apoptose auslösen kann¹⁷⁰. TRAF1 kann zusammen mit IAP-Proteinen die Aktivierung von Caspase-8 verhindern¹⁸⁶. IL-13 ist ein Zytokin, das HRS-Zellen autokrin stimuliert. Eine Unterbrechung dieser autokrinen Schleife führt in HRS-Zellen zu einer verringerten Proliferation und zur Induktion von Apoptose²⁰¹. CCR7 ist ein Chemokinrezeptor von dem angenommen wird, dass dessen Stimulation zur Dissemination der HRS-Zellen beiträgt²⁰². Durch die Herunterregulation solcher anti-apoptotisch und proliferativ wirkender Gene lassen sich sowohl die Apoptose-induzierende Wirkung des NaAsO₂ *in vitro*, als auch dessen Tumorreduzierende Wirkung *in vivo* erklären.

6.2.3 Die potentielle klinische Bedeutung der Ergebnisse

As₂O₃ wird in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, z.B. der akuten myeloischen Leukämie oder dem multiplen Myelom, getestet. Dabei werden, in Abhängigkeit von der Studie, 0,15-0,25 mg/kg As₂O₃ täglich oder in größeren Abständen verabreicht. Bei einer täglichen Dosierung von 0,15 mg/kg/d werden Serumkonzentrationen von 0,5-0,7 μ M erreicht¹⁵⁷. Dabei entstehen aber nach der Gabe auch Spitzenkonzentrationen von ca. 7 μ M¹⁶³. In diesem Bereich wird das As₂O₃ von den Patienten ohne schwere Nebenwirkungen toleriert¹⁵⁷. Für diesen Konzentrationsbereich konnte in den *in vitro*-Versuchen dieser Arbeit eine NF- κ B-Inhibition und eine Apoptoseinduktion gezeigt werden. In den Mausexperimenten war eine Wirkung auf das Tumorwachstum aber erst bei einer täglichen Dosierung von 5-7 mg/kg zu beobachten. Da für den Menschen letale Dosen von 100-300 mg bzw. 0,6 mg/kg/d angegeben werden, wären die in den Mausexperimenten nötigen Dosierungen tödlich¹⁶⁴. Allerdings sind die Dosierungen zwischen Maus und Mensch nicht direkt vergleichbar. Für eine Behandlung des Hodgkin Lymphoms bietet sich As₂O₃ in Kombination mit anderen Medikamenten oder zur Unterstützung etablierter Chemotherapien an. Auch in den beschriebenen klinischen Studien wird As₂O₃ häufig in Kombination mit anderen Substanzen eingesetzt^{156, 157, 203}.

In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass $\text{NaAsO}_2/\text{As}_2\text{O}_3$ auf Zelllinien mit mutierten $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen bzw. schwacher $\text{IKK}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität keine Apoptose-induzierende Wirkung hat (**Abb. 17, 19C**). In primären HRS-Zellen wurden ebenfalls Mutationen des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Gens in ca. einem Drittel der Fälle nachgewiesen^{129, 130}. Allerdings treten diese Mutationen meist nur in einem Allel auf, und die Zellen verfügen auf Grund der Mehrkernigkeit über mindestens ein Wildtypallel¹³⁰. In diesen Fällen besteht die Möglichkeit der Expression eines mutierten und eines nicht mutierten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins. Es ist unklar, ob As_2O_3 in diesen Zellen durch $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Inhibition Apoptose induzieren kann, da diese Wirkung von funktionellen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen abhängt.

In präklinischen und klinischen Studien werden derzeit eine Reihe von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -inhibierenden Substanzen getestet. Darunter sind weitere Inhibitoren des IKK -Komplexes und des Proteasoms^{191, 204}. Proteasominhibitoren können den durch einen konstitutiv aktiven IKK -Komplex ausgelösten ständigen proteasomalen Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen verhindern und so $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inhibieren²⁰⁴. Der Proteasominhibitor PS-341 (Bortezomib, Velcade) hat die Zulassung der FDA (*Food and Drug Administration*) für die Behandlung des Multiplen Myeloms erhalten²⁰⁴. In HRS-Zelllinien löst PS-341 *in vitro* Apoptose aus²⁰⁵. Dies geschieht allerdings auch in Zelllinien mit mutierten $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen (L428, KM-H2) oder niedriger $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität (HD-My-Z). Für die Linie L428 wurde außerdem eine $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Inhibition durch PS-341 gezeigt. Der Grund für die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Inhibition ist unbekannt. Es wird vermutet, dass $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ oder ein unbekannter Inhibitor die Funktion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ übernimmt, welches in dieser Zelllinie mutiert ist. Die Apoptoseinduktion wird auf eine verstärkte Expression des proapoptotischen Proteins Bax und eine abgeschwächte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 zurückgeführt²⁰⁵.

Diese Daten zeigen, dass ein Eingriff in das $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -System der HRS-Zellen ein viel versprechender Therapieansatz für die Behandlung des Hodgkin Lymphoms ist. Substanzen wie PS-341, die unabhängig vom Status der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine das $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -System inhibieren können, haben dabei möglicherweise gegenüber As_2O_3 einen Vorteil.

6.3 Die Notwendigkeit neuer Therapieansätze für die Behandlung des Hodgkin Lymphoms

Das Hodgkin Lymphom ist in den frühen Stadien durch den Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie eine gut zu behandelnde Krankheit geworden. Abhängig vom Stadium der Krankheit wird in über 80 % der Fälle eine Heilung erzielt²⁰⁶. Aus mehreren Gründen besteht trotzdem Bedarf für alternative Therapien. Ein Grund sind Patienten, die nicht auf die konventionelle Therapie ansprechen. Der zweite Grund ist, dass die Chemo- und Strahlentherapie nach erfolgreicher Behandlung über einen langen Zeitraum Krankheiten hervorrufen können. Dazu gehören solide Tumoren, Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome und Unfruchtbarkeit^{206, 207}. Neue Therapiestrategien könnten helfen, diese Nebenwirkungen zu reduzieren, in dem die HRS-Zellen für die etablierten Behandlungsmethoden sensitiviert werden. Dadurch wäre es möglich, verringerte Dosierungen sowohl der Chemo- als auch der Strahlentherapie für eine Behandlung des Hodgkin Lymphoms einzusetzen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da das Hodgkin Lymphom in relativ jungem Alter auftritt. Ein erster Gipfel in der Häufigkeit der Erkrankung liegt in der dritten Lebensdekade, ein zweiter in der fünften^{207, 208}. Es wurde gezeigt, dass das Risiko nach erfolgreicher Behandlung an einem soliden Tumor zu erkranken mindestens 25 Jahre stetig ansteigt²⁰⁷. Besonders für junge Patienten spielt ein solcher Zeitraum eine große Rolle. Dies zeigt die Wichtigkeit, diese Langzeiteffekte durch die Chemo- und Strahlentherapie zu minimieren.

7 Material

7.1 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp
L428	Hodgkin Lymphom
L1236	Hodgkin Lymphom
KM-H2	Hodgkin Lymphom
HDLM-2	Hodgkin Lymphom
L540	Hodgkin Lymphom
L540Cy	Hodgkin Lymphom
L591	Hodgkin Lymphom
HD-My-Z	Hodgkin Lymphom
H9	humanes T-Zelllymphom
K299	humanes anaplastisch großzelliges Lymphom
SU-DHL-1	humanes anaplastisch großzelliges Lymphom
Reh	humane pro-B lymphoblastische Leukämie
Namalwa	humanes Burkittlymphom
Daudi	humanes Burkittlymphom
U266	humanes Myelom
Jurkat	humane T-Zelleukämie
Ina-6	humanes Myelom

7.2 Bakterienstämme

E. coli XL1blue	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
-----------------	------------------------------------

7.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Acridinorange	Sigma, St. Louis, MO, USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	BMA, Rockland, ME, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, St. Louis, MO, USA

Substanz	Hersteller
Aprotinin	Sigma, St. Louis, MO, USA
As ₂ O ₃	Sigma, St. Louis, MO, USA
ATP	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bacto-agar	Difco/BD, Sparks, MD, USA
Bacto-trypton	Difco/BD, Sparks, MD, USA
Bacto-yeast extract	Difco/BD, Sparks, MD, USA
Bovines Serum Albumin, Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Whitehouse Station, NJ, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
DAPI	Invitrogen., Karlsruhe, Deutschland
DTT	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dulbecco 's MEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Express-Hyb Solution	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Ficoll	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glutamax	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Sigma, St. Louis, MO, USA
LMW	Sigma, St. Louis, MO, USA
NaAsO ₂	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe Deutschland
Natriumyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
NP-40	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
PBS	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Pefabloc	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicillin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
poly[d(I-C)]	Roche, Mannheim, Deutschland
Ponceau-Rot	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protein-A-Sepharose	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden

Substanz	Hersteller
Protein-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
RPMI-1640	PAA, Cölbe, Deutschland
Smart Ladder	Eurogentic, München, Deutschland
Sodiumorthovanadat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trockenmilchpulver	TSI, Zeven, Deutschland
Venimmun	Centeon, Marburg, Deutschland
β -Glyzerophosphat	Sigma, St. Louis, MO, USA

7.4 Radioaktive Verbindungen

Verbindung	Hersteller
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	NEN, Boston, MA, USA
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	NEN, Boston, MA, USA

7.5 Antikörper

Wenn nicht anders angegeben, waren die Antikörper gegen humane Proteine gerichtet.

Spezifität (Bezeichnung)	Isotyp	Hersteller
Bcl-x _L	Kaninchen (polyklonal)	Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
Caspase-10 (MO059-3)	Maus (IgG1)	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Caspase-3	Kaninchen (polyklonal)	Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Caspase-8 (C15)	Maus (IgG2b)	P. Krammer, DKFZ, Heidelberg, Deutsch- land
CD30 (Ber-H2)	Maus (IgG1)	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
CD95 (APO-1)	Maus (IgG3)	P. Krammer, Heidelberg, Deutschland

Spezifität (Bezeichnung)	Isotyp	Hersteller
CD95 (C-20)	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
CD95 (CH-11)	Maus (IgM)	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD95L (G247-4)	Maus (IgG1)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD95-Phycoerythrin (PE) (33455x)	Maus (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
c-FLIP _{S/L} (Dave-2)	Ratte (IgG2a)	Axxora, Grünberg, Deutschland
c-FLIP _{S/L} (G-11)	Maus (IgG1)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
c-IAP2	Kaninchen (polyklonal)	Trevigen, Gaithersburg, MD
FADD (Clone-1)	Maus (IgG1)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FADD (Clone-A66-2)	Maus (IgG1)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
IKK α	Maus (IgG2b)	Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	Maus (IgG1)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Isotypkontrolle	Maus (IgM)	Axxora, Grünberg, Deutschland
Isotypkontrolle	Maus (IgG1)	Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
I κ B α (C21)	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Kaninchen Ig-HRP	Ziege (IgG)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Maus IgG1-HRP	Ziege	Southern Technology, Birmingham, USA
Maus IgG2b-HRP	Ziege	Southern Technology, Birmingham, USA
Maus IgG-Cy3	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Maus Ig-HRP		Promega, Madison, WI, USA
p65 (A)	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Tubulin (MCA78A)		Serotec, Düsseldorf, Deutschland

7.6 Enzyme und Peptide

Enzym / Peptid	Hersteller
Taq-Polymerase	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
GST-I κ B α	AG Scheiderei, MDC, Berlin, Deutschland
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

7.7 Kits

Kit	Hersteller
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche, Indianapolis, IN, USA
AnnexinV-FITC/PI Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich
ECL	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
HexaLabel Kit	MBI, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Nucleobond Maxi Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGEM [®] Teasy cloning Kit	Promega, Madison, WI, USA
QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TRAIL, soluble (human) (recombinant) (FLAG [®]) Set	Axxora, Grünberg, Deutschland

7.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Nylonmembran Zeta-Probe [®] Blotting Membran	Bio-Rad, München, Deutschland
Quick Spin Column	Roche, Basel, Schweiz
Nitrozellulosemembran Protran [®]	Schleicher&Schuell Bio Science, Dassel, Deutschland
Elektroporationsküvetten (0,4 cm)	Invitrogen., Karlsruhe, Deutschland

Whatmannpapier	Schleicher&Schuell Bio Science, Dassel, Deutschland
----------------	--

7.9 Plasmide

Plasmid / Adenovirus	Hersteller
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pEGFP-N3	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGEMT Easy	Promega, Madison, WI, USA
p65-EGFP	J. Schmid, Wien, Österreich
c-FLIP _S PL296	J. Tschopp, Universität v. Lausanne, Schweiz

7.10 Oligonukleotide

7.10.1 PCR

	c-FLIP (5' → 3')
Sense	TGC TGA AGT CAT CCA TCA GG
Antisense	TGC TGC TTG GAG AAC ATT CC
	c-FLIP_S-Mut (5' → 3')
Sense	CCC GGG AAT CAA AAC ATG GAT TAC AAA G
Antisense	AGG TCC CTG ACA TTA GGT GGA ACC ACA TC A AT G GC C AC G TC G CG A CAC A G A AAG AGC AGC
	IL-13 Rezeptor (5' → 3')
Sense	GTT GAC CAC GGT CAT TGC TCT CAC T
Antisense	TTC AGT TGA ACC GTC CCT CGC GAA
	GAPDH (5' → 3')
Sense	ATG CTG GCG CTG AGT AC
Antisense	TGA GTC CTT CCA CGA TAC

7.10.2 EMSA

	NF-κB-Shiftoligo (5' → 3')
Sense	AGC TCA GGG CTG GGG ATT CCC CAT CTC CAC AGG
Antisense	AGC TCC TGT GGA GAT GGG GAA TCC CCA GCC CTG

7.10.3 siRNA

Die siFLIP ist spezifisch für die Nukleotide 452–472 der c-FLIP_L-mRNA. Die Sequenzdaten sind in der Datenbank GenBank/EMBL/DDBJ unter der Nummer U97074 verfügbar. Sie wurde von H.-P. Vornlocher von der Ribopharma AG aus Kulmbach zur Verfügung gestellt.

7.11 Medien und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x MOPS	0,2 M MOPS, 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH 7,0
10x Shift-Hybridisierungspuffer	0,5 M Tris-HCl pH 8; 0,7 M NaCl
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat
4x Laemmlipuffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8; 40 % Glycerol; 16 % SDS; 20 % β-Mercaptoethanol; 0,22 % Bromphenolblau
Antikörperverdünnungslösung (AKV)	1 % Venimmun; 0,01 % NaN ₃ in PBS
As ₂ O ₃ -Lösung	10 mM in PBS
DAPI-Kernfärbelösung	0,1 mg / ml H ₂ O
DISC-Lysepuffer	30 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % Triton-X100; 10 % (vol/vol) Glycerol; 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail / 5ml
Immunoblot-Transferpuffer	35 mM Tris; 40 mM Glyzin; 0,04 % SDS; 20 % Methanol
Immunoblot-Waschpuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 % Triton X-100; 1 % Trockenmilchpulver

Puffer	Zusammensetzung
Kinase-Lysepuffer	50 mM Hepes pH7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1 % Triton-X100; 10 % Glycerol; je 1 µg/ml Pefabloc, Aprotinin, Leupeptin; 10 mM NaF; 8 mM β-Glycerophosphat; 100 µM Natriumorthovanadat; 1 mM DTT
Kinasepuffer	20 mM Hepes pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 20 µM ATP; 20 mM β-Glycerophosphat; 50 µM Natriumorthovanadat; 1 mM DTT
LB-Medium	10 g Bacto-trypton, 5 g Yeast-extract, 5 g NaCl ad 1l H ₂ O
NaAsO ₂ -Lösung	10 mM in PBS
NP40-Hochsalzlysepuffer	20 mM Hepes pH 7,9; 350 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,2 mM EGTA pH 8,0; 1 % NP40; 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail / 5ml
PBS	0.8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0.2 mM NaH ₂ PO ₄ ; 14 mM NaCl
Protein-A-Sepharose-Suspension	50 % (vol/vol) Protein-A-Sepharose in H ₂ O
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris; 500 mM Glyzin; 0,1 % SDS
TBE	0,1 M Tris; 0,1 M Borsäure; 2,5 mM EDTA

7.12 Geräte

Gerät	Hersteller
FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSVantage™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
LSM (<i>Laser Scanning Microscope</i>) 510	Carl Zeiss Microimaging, Jena, Deutschland
Gene Pulser™	Bio-Rad, München, Deutschland

7.13 Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
LSM Image Examiner	Carl Zeiss Microimaging, Jena, Deutschland

8 Methoden

8.1 Zellkultur

8.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in RPMI-1640 unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamax und 1 mM Natriumpyruvat bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

8.1.2 Apoptose

8.1.2.1 Induktion von Apoptose durch NaAsO₂/As₂O₃

Zellen der HRS-Zelllinien HDLM-2, L540, L540Cy, HD-My-Z, KM-H2 und L428 wurden mit den angegebenen Konzentrationen und für die aufgeführten Zeiträume mit NaAsO₂ oder As₂O₃ inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und einer Messung der Apoptoserate zugeführt oder die Pellets für weitere Analysen bei -80°C gelagert.

8.1.2.2 Induktion von Apoptose durch CD95- oder TRAIL-R-Stimulation

Zur Stimulation des CD95 wurden KM H2-, L428-, L1236- und L540Cy-Zellen mit 500 ng/ml des agonistischen CD95-Antikörpers CH-11 oder zur Kontrolle mit einer IgM-Isotypkontrolle in der gleichen Konzentration inkubiert. Für die Stimulation des TRAIL-Rezeptors wurden L428- und L540Cy-Zellen mit 500 ng/ml rekombinantem humanem (rh) TRAIL und 2 µg/ml Enhancer, der dem Quervernetzen des rhTRAIL dient, inkubiert (TRAIL, soluble (human) (recombinant) (FLAG®) Set). Als Kontrolle diente die Inkubation ausschließlich mit dem Enhancer in der gleichen Konzentration. Die Dauer der Inkubation ist jeweils angegeben. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, der Messung der Apoptoserate zugeführt oder Zellpellets zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

8.1.2.3 Messung der Apoptoserate durch AnnexinV-FITC/PI-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie

Um die Rate der apoptotischen Zellen zu ermitteln, wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem AnnexinV und Propidiumiodid (PI) nach Angaben des Herstellers angefärbt und anschließend der Anteil der einfach (AnnexinV-FITC) und doppelt (AnnexinV-FITC/PI) gefärbten Zellen durchflusszytometrisch ermittelt (AnnexinV-FITC/PI Kit).

AnnexinV bindet spezifisch an Phosphatidylserin (PS). PS ist auf der intrazellulären Membranseite von Zellen verankert, wird aber bei aktivierter Apoptose nach außen geklappt. In diesem Zustand kann AnnexinV an PS binden²⁰⁰. Der Nachweis für diese Bindung erfolgt durch die Fluoreszenz des an AnnexinV gekoppelten FITC (Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat) (Fluoreszenzkanal, FL-1). Im weiteren Verlauf der Apoptose kommt es zur Porenbildung in der Membran, durch die das PI in die Zellen eindringen und in die DNA interkalieren kann. Auch dieser Vorgang lässt sich durch Fluoreszenz nachweisen, allerdings bei einer anderen Wellenlänge als das FITC (FL-3).

8.1.2.4 Messung der Apoptoserate durch Acridinorangefärbung

Zellen wurden mit 5 µg/ml Acridinorange gefärbt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde der Anteil von Zellen mit kondensierten und fragmentierten Kernen gegenüber Zellen mit normalen Kernen ermittelt.

8.1.2.5 Messung des Anteils toter Zellen durch PI-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie

GFP-transfizierte Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, in PBS mit 1 µg/ml PI aufgenommen und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Dadurch war es möglich, die PI-Färbung in Abhängigkeit von der GFP-Färbung zu messen.

8.1.3 Inhibition der Translation

CHX	50 mg/ml in 96% Ethanol
-----	-------------------------

Zur Inhibition der Translation wurde Cycloheximid (CHX) eingesetzt. Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 25 µg/ml CHX bzw., zur Kontrolle, mit der ent-

sprechenden Menge Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Zellen weiteren Experimenten zugeführt oder Zellpellets zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

8.1.4 Transiente Transfektion von Zellen

Nach der Abzentrifugation der benötigten Zellen wurden diese in einer Dichte von $2\text{-}5 \times 10^6$ pro $500\text{ }\mu\text{l}$ in Medium ohne Zusätze aufgenommen. Für die Transfektion mit siRNAs wurden die Zellen hierfür vorher zweimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen. Zu den Ansätzen wurden dann die benötigten Plasmide/siRNAs in der benötigten Menge pipettiert und in die Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit 180 V und $960\text{ }\mu\text{F}$ (Gene PulserTM). Nach einer Inkubation im Brutschrank für 10 min wurden die Zellen in normales Kulturmedium ausgesät. Transfizierte Plasmid- und siRNA-Mengen werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Plasmid/siRNA	Menge [μg] pro Küvette	Fragestellung
c-FLIP _S -Mut	15	Zeigen der Spezifität des durch die siFLIP vermittelten Effektes
pEGFP-N3	10	Transfektionsmarker zur FACS-Anreicherung
p65-pEGFP-N3	40	Aufhebung der NaAsO ₂ -Wirkung
pEGFP-N3	4	Mocktransfektion für p65-GFP-N3
pcDNA3.1(+)	verschieden	Ausgleich unterschiedlicher DNA-Mengen
siFLIP	600 nM	Ausschalten der c-FLIP-Expression
siK3	600 nM	Kontrolltransfektion für die siFLIP-Ansätze

8.2 DNA

Alle Standardmethoden wie Plasmidpräparation, Klonierungsmethoden, Agarosegelelektrophoresen in TBE u.s.w. wurden nach Sambrook et al. ²⁰⁹ oder nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

8.2.1 Generierung c-FLIP_S-Mut

Zur Kontrolle der Spezifität des von der c-FLIP-siRNA vermittelten Effekts wurde ein Plasmid generiert, das die cDNA eines mutierten FLIP_S enthält, welches im Bindungsbereich der siRNA sieben still mutierte Tripletts enthält. Als Vorlage diente das FLIP_S-Plasmid PL296 (v. J. Tschopp). Auf dieses Plasmid wurde eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt:

Sense	CCC GGG AAT CAA AAC ATG GAT TAC AAA G
Antisense	AGG TCC CTG ACA TTA GGT GGA ACC ACA TCA <u>ATG</u> <u>GCC</u> <u>CAC</u> <u>TCG</u> CG <u>CAC</u> <u>AGA</u> AAG AGC AGC

Der Senseprimer enthielt eine Erkennungsstelle für Endonuklease SmaI am 5'-Ende. Der Antisenseprimer enthielt eine Erkennungsstelle für die Endonuklease Eco0109I sowie die mutierten Tripletts (kursiv und unterstrichen). Das PCR-Fragment wurde in den *pGem®-T Easy Vector* kloniert und sequenziert. Anschließend wurde aus dem Wildtyp-c-FLIP_S-Plasmid das korrespondierende SmaI/Eco0109I Fragment herausgeschnitten und durch Ligation des mutierten Fragments aus dem *pGem®-T Easy Vector* ersetzt.

8.3 RNA

8.3.1 RNA-Präparation

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* nach Angaben des Herstellers präpariert und danach bei -80 °C gelagert.

8.3.2 cDNA-Synthese

cDNA wurde mit Hilfe des *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* synthetisiert. Dafür wurde 1 µg einer zuvor präparierten Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Synthese wurde ein Oligo-p(dT)15 Primer verwendet.

8.3.3 Northernblot

8.3.3.1 Generierung von Northernblotsonden

Northernblotsonden wurden durch Amplifikation mit spezifischen Primern von cDNAs gewonnen (c-FLIP, IL-13, GAPDH). Dafür wurden PCRs nach folgendem Schema durchgeführt

PCR-Ansatz		PCR-Programm	Zeit [min]	
cDNA	0,5 µl	94 °C	5:00	
Primer sense/ antisense [10 µM]	0,5 µl, je	94 °C	0:40	35 mal
10x Polymerasepuffer	5 µl	60 °C	0:40	
Taq-Polymerase	1 µl	72 °C	0:40	
dNTPs (10 mM)	0,5 µl			
H ₂ O	42,5 µl			

Anschließend wurde der PCR-Ansatz über ein Agarosegel aufgereinigt, das amplifizierte DNA-Fragment aus dem Gel geschnitten, mit Hilfe des *QIAEXII Agarose Gel Extraction Kit* aus dem Gel eluiert und durch Vergleich mit einem Marker (*Smart Ladder*) quantifiziert. Die Sequenz des amplifizierten DNA-Fragmentes wurde nach Klonierung in den *pGem®-T Easy Vector* durch Sequenzierung überprüft.

Für die CCR7-Northernsonde wurde ein Fragment aus einem CCR7-Expressionsplasmid mit den Enzymen DraI und SacI herausgeschnitten und ebenfalls wie beschrieben über ein Agarosegel aufgereinigt, aus dem Gel eluiert und quantifiziert.

8.3.3.2 Radiaktive Markierung der Northernblotsonden

Für Northernblotsonden wurden PCR-amplifizierte DNA-Oligomere radioaktiv markiert. Dafür wurden 60 ng mit Hilfe des *HexaLabel Kit* nach den Vorgaben des Herstellers mit [α -³²P]dCTP markiert. Nicht eingebautes [α -³²P]dCTP wurde durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von *Quick Spin*-Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt.

8.3.3.3 RNA Agarosegelelektrophorese

RNA-Gel	1,2 % Agarose; 1,1 % Formaldehyd; 1x MOPS
Prämix	1,3x MOPS; 3 M Formaldehyd; 4 % Formamid
Ladepuffer	1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % Bromphenolblau(gesättigt); 0,25 % Xylencyanol; 50 % Glyzerol
10x MOPS	0,2 M MOPS, 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH 7,0

RNA wurde auf einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA in 12 µl H₂O mit 39 µl Prämix, 10 µl Ladepuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1µg/µl) aufgefüllt, für 15 min bei 55°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Laufpuffer war 1 x MOPS. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V. Nach dem vollständigen Einlaufen der Proben in das Gel wurde der Laufpuffer ständig zwischen den beiden Elektrodenräumen umgewälzt. Die Auftrennung der RNA wurde durch Detektion der 28S (4,7kb)-, 18S (1,87kb)- und der 5S (0,16kb)-ribosomalen RNA-Banden mit Hilfe eines UV-Tisches überprüft und im Foto dokumentiert.

8.3.3.4 RNA-Transfer auf eine Nylonmembran

20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat
---------	----------------------------------

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die RNA über Nacht durch Kapillarkräfte vom Gel auf eine Hybond-N-Membran übertragen. Als Transferpuffer kam 20 x SSC zum Einsatz. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) auf der Membran fixiert.

8.3.3.5 Hybridisierung der Northernblotmembran

Zur spezifischen Detektion von RNA auf der Membran kamen radioaktiv markierte DNA-Sonden zum Einsatz. Die Hybond-N-Membran mit der fixierten RNA wurde für 30 min bei 68°C in 15 ml ExpressHyb-Lösung inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die radioaktive Sonde, nach einer 5 minütigen Inkubation bei 95 °C, in einer Endkonzentration von $1-3 \times 10^6$ cpm/15ml dazu gegeben und über Nacht bei 68°C unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurden mit der Membran folgende Waschschriffe vorgenommen:

1. 2xSSC, 0,05 % SDS 20 min bei RT

2. wie 1
3. 0,1xSSC, 0,1 % SDS 20 min bei RT

Die Membran wurde in Folie eingeschweißt. Mit der Membran wurden X-omat Filme bei -80°C belichtet und diese durch anschließende Entwicklung ausgewertet.

8.4 Protein

8.4.1 Lyse

NP40-Hochsalzlysepuffer	20 mM Hepes pH 7,9; 350 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,2 mM EGTA pH 8,0; 1 % NP40; 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail / 5ml
-------------------------	---

Wenn nicht anders angegeben, wurden Zellen mit dem NP40-Hochsalzlysepuffer lysiert. Proteine liegen danach in einer nativen Form vor. Die Zellen wurden dazu einmal mit PBS gewaschen, in dem Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert, Membranrückstände für 10 min bei 12000 U/min abzentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradfordmethode mit dem Protein-Assay (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers.

8.4.2 Immunoblot

4xLaemmlipuffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8; 40 % Glycerol; 16 % SDS; 20 % β-Mercaptoethanol; 0,22 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	50 mM Tris; 500 mM Glyzin; 0,1 % SDS
Immunoblot-Transferpuffer	35 mM Tris; 40 mM Glyzin; 0,04 % SDS; 20 % Methanol
Immunoblot-Waschpuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 % Triton X-100; 1 % Trockenmilchpulver

20 µg Protein wurden für 5 min in 1x Laemmli-Puffer bei 95°C inkubiert, durch eine SDS-PAGE zusammen mit einem Größenmarker (LMW) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran mit

Ponceau-Rot gefärbt und die Markerbanden markiert. Danach wurde die Membran 1,5 h in Immunoblot-Waschpuffer geblockt und für 1,5 h mit dem Erstantikörper (1:1000 in Immunoblot-Waschpuffer) inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 5 min mit dem Immunoblot-Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 30 min (1:5000 in Immunoblot-Waschpuffer). Danach wurde die Membran 3x 10 min gewaschen, mit dem ECL-Kit nach den Angaben des Herstellers entwickelt, um dann anschließend mit der Membran X-omat LS Filme zu belichten.

8.4.3 EMSA

8.4.3.1 Hybridisierung des Shift-Oligomers

10x Shift-Hybridisierungspuffer	0,5 M Tris-HCl pH 8; 0,7 M NaCl
---------------------------------	---------------------------------

Für die Hybridisierung der einzelsträngigen DNA-Oligomere wurden jeweils 5 µg des sense- und des antisense-Oligomers in 1x Shift-Hybridisierungspuffer aufgenommen (insg. 50 µl) und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde das Shift-Oligomer über Nacht auf Raumtemperatur langsam abgekühlt.

8.4.3.2 Radioaktive Markierung des Shift-Oligomers

Das hybridisierte Shift-Oligomer verfügte an jedem 5'-Ende über einen AGCT-Überhang, das mit Hilfe des Klenowenzym durch dNTPs aufgefüllt wurde, wobei das dCTP durch [α -³²P]dCTP ersetzt wurde. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Shift-Oligomer	1,25 µl
10x Klenowpuffer	2,5 µl
[α - ³² P]dCTP	4 µl
dNTPs (ohne dCTP)	1 mM
Klenow-Enzym	1 µl
H ₂ O	Ad 25 µl

Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebautes [α -³²P]dCTP wurde durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe von *Quick Spin*-Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt.

8.4.3.3 EMSA

20x TBE	1 M Tris; 1 M Borsäure; 20 mM EDTA-Na ₂ x2H ₂ O
2x Shiftpuffer	40 mM Hepes pH 7,9; 120 mM KCl; 8 % Ficoll; 10 mM DTT; 1mg/ml BSA; 0,2 µg/ml poly[d(I-C)]
Gel	1x TBE; 5 % Acrylamid-Bisacrylamid; 0,4 ml 10 % APS; 40 µl TEMED; ad 60ml H ₂ O

5 µg Gesamtprotein wurden zusammen mit 10 µl 2x Shiftpuffer und 20000 cpm des radioaktiv markierten Shift-Oligos auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Gelelektrophorese bei 180-240 V getrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE eingesetzt. Nach der Auftrennung wurde das Gel auf Whatmannpapier übertragen und für 30 min bei Unterdruck und 80 °C getrocknet. Mit dem getrockneten Gel auf dem Filterpapier wurden X-omat LS Filme bei -80 °C belichtet.

8.4.4 IKK-Komplex-Kinaseassay

Kinase-Lysepuffer	50 mM Hepes pH7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1% Triton-X100; 10% Glycerol; je 1 µg/ml Pefabloc, Aprotinin, Leupeptin; 10 mM NaF; 8 mM β-Glycerophosphat; 100 µM Natriu- morthovanadat; 1 mM DTT
Protein-A-Sepharose-Suspension	50 % (vol/vol) Protein-A-Sepharose in H ₂ O
Kinasepuffer	20 mM Hepes pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 20 µM ATP; 20 mM β- Glycerophosphat; 50 µM Natriumorthovanadat; 1 mM DTT

Die benötigten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, in Kinase-Lysepuffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert, mit 12000 U/min in einer Mikrofuge abzentrifugiert und der Überstand dann weiter verwendet. 250 µg des Proteins wurden mit Kinase-Lysepuffer auf 250 µl aufgefüllt und zusammen mit 20 µl Protein-A-Sepharose für 30 min bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert, um Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die Protein-A-Sepharose binden. Dieses Gemisch wurde für 1 min

bei 1200 U/min in einer Mikrofuge abzentrifugiert und der Überstand mit 30 µl Protein-A-Sepharose und 1 µg anti-IKK α -Antikörper für 2h auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Agarose 4x mit 1 ml Kinase-Lysepuffer und einmal mit 0,5 ml Kinasepuffer gewaschen. Das gewaschene und abzentrifugierte Pellet wurde in 20 µl Kinasepuffer zusammen mit 1 µg rekombinantem GST-I κ B α (AS 1-55) und 3 µCi (0,111Mbg) [γ ³²P]ATP aufgenommen und die Kinasereaktion für 20 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2x Laemmli und Inkubation bei 95°C für 5 min gestoppt. Nach Abzentrifugation der Agarose (1min, 12000 U/min) wurde der Überstand durch SDS-PAGE getrennt, das Gel auf ein Whatmannpapier überführt, bei 50 °C und Unterdruck getrocknet und damit dann X-omat LS Filme bei -80°C belichtet, um radioaktiv markiertes I κ B α nachzuweisen.

8.4.5 DISC-Immunpräzipitation

DISC-Lysepuffer	30 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton-X100; 10% (vol/vol) Glycerol; 1 Tablette Proteaseinhibitorcocktail Complete Mini / 5ml
-----------------	--

Zellen wurden mit 2 µg/ml des agonistischen anti-CD95-Antikörper Apo-1 (Maus IgG3) für 10 min im Brutschrank inkubiert, um die Bildung eines DISCs zu induzieren. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht induziert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, in DISC-Lysepuffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 12000 U/min in einer Mikrofuge zentrifugiert. Von dem Überstand wurden dann 700 µg Protein für die Immunpräzipitation eingesetzt. Bei den induzierten Zellen wurde der noch von der Induktion in dem Lysat vorhandene anti-CD95-Antikörper präzipitiert. Das Lysat der nicht induzierten Zellen wurde jetzt mit dem anti-CD95-Antikörper in gleicher Menge versetzt. Alle Ansätze wurden zusammen mit 25µl Protein-A-Sepharose für 1,5 h auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert, 5x mit 1 ml DISC-Lysepuffer gewaschen, das Pellet dann in 2x Laemmli aufgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Der Überstand wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Auf der Membran erfolgte die Detektion der DISC-Proteine in einer Schlitzblotkammer, wie im Abschnitt Immunoblot beschrieben, mit folgenden monoklonalen Antikörpern: anti-C-8 (C-15, IgG2b), anti-C-10 (IgG1), anti-FADD (IgG1) und anti-c-

FLIP_{S/L} (IgG1). Die Detektion wurde mit Meerrettichperoxidase gekoppelten isotypspezifischen Zweitantikörpern durchgeführt.

8.4.6 Durchflusszytometrie

Antikörperverdünnungslösung (AKV)	1 % Venimmun; 0,01 % NaN ₃ in PBS
-----------------------------------	--

1x 10⁵ Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und 20 min in 50 µl AKV inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 3 µl anti-CD95-PE Antikörper und eine anschließende 20-minütige Inkubation bei 4 °C. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen (FACSCalibur™)

8.5 Immunhistologie

8.5.1 Expression der DISC-Proteine

Für die Analyse der Expression der DISC-Proteine CD95, FADD, Caspase-8, c-FLIP sowie von CD95L wurden aus paraffinierten Lymphknoten von 59 repräsentativen Hodgkinfällen Gebiete mit HRS-Zellen herausgestanzt und auf einem Paraffinblock gesammelt. Die Antikörperreaktionen wurden dann auf diesem *multi-tissue array* durchgeführt. Die *multi-tissue arrays* wurden von S. Joos vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg angefertigt. Die Färbungen wurden am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF) der Freien Universität (FU) Berlin durchgeführt.

8.5.2 Analyse der Präformation eines DISCs in primären HRS-Zellen

DAPI-Kernfärbelösung	0,1 mg / ml H ₂ O
----------------------	------------------------------

Für diese Analyse wurden paraffinierte Schnitte von Fällen des klassischen Hodgkin Lymphoms wieder deparaffiniert. Dieser Schritt geschah am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Benjamin Franklin (UKBF) der Freien Universität (FU) Berlin. Anschließend wurden die Schnitte mit den Erstantikörpern für 1 h in einer feuchten

Kammer bei 37 °C inkubiert. Es kamen folgende Antikörper in der angegebenen Verdünnung zum Einsatz:

Spezifität (Bezeichnung)	Spezies (Isotyp)	Verdünnung in PBS
CD30 (Ber-H2)	Maus (IgG1)	1:100
c-FLIP _{S/L} (G-11)	Maus (IgG1)	1:75
Isotypkontrolle	Maus (IgG1)	1:30

Anschließend wurden die Schnitte 2x mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem Zweitantikörper (anti-Maus IgG konjugiert mit Cy3, 1:100 in PBS) bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 2x mit PBS gewaschen und mit DAPI (1:1000 Verdünnung der Stammlösung) die Kerne gefärbt. Anschließend wurde 2x mit PBS und einmal mit H₂O gewaschen und die Schnitte eingedeckelt. Die Vermessung der gefärbten Schnitte am konfokalen Lasermikroskop (LSM510, Carl Zeiss Microimaging) wurde von B. Wiesner vom Institut für molekulare Pharmakologie vorgenommen mit dessen Hilfe auch die quantitative Auswertung der Aufnahmen mit der LSM Image Examiner Software erfolgte.

8.6 Mausexperimente

Mausexperimente zur Wirkung des As₂O₃ auf xenotransplantierte Tumoren von HRS-Zellen wurden von I. Fichtner und C. Nowak von der Firma Experimentelle Pharmakologie & Onkologie (EPO) GmbH durchgeführt.

9 Literaturverzeichnis

1. **Jacobson MD, Weil M, Raff MC:** "Programmed cell death in animal development." **Cell** 1997, (88):347-354.
2. **Marsden VS, Strasser A:** "Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more." **Annu Rev Immunol** 2003, (21):71-105.
3. **Martin SJ, Green DR, Cotter TG:** "Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery." **Trends Biochem Sci** 1994, (19):26-30.
4. **White E:** "Life, death, and the pursuit of apoptosis." **Genes Dev** 1996, (10):1-15.
5. **Krammer PH:** "CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die." **Adv Immunol** 1999, (71):163-210.
6. **Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X:** "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." **Annu Rev Cell Dev Biol** 1999, (15):269-290.
7. **Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH:** "Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways." **Int J Biochem Cell Biol** 2000, (32):1123-1136.
8. **Thornberry NA, Lazebnik Y:** "Caspases: enemies within." **Science** 1998, (281):1312-1316.
9. **Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S:** "Apoptosis: cell death defined by caspase activation." **Cell Death Differ** 1999, (6):495-496.
10. **Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH:** "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." **Annu Rev Biochem** 1999, (68):383-424.
11. **Cohen GM:** "Caspases: the executioners of apoptosis." **Biochem J** 1997, (326 (Pt 1)):1-16.
12. **Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X:** "DFP, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis." **Cell** 1997, (89):175-184.
13. **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S:** "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." **Nature** 1998, (391):43-50.
14. **Sakahira H, Enari M, Nagata S:** "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." **Nature** 1998, (391):96-99.
15. **Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H:** "Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8." **Embo J** 2002, (21):4520-4530.
16. **Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME:** "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." **Embo J** 1997, (16):2794-2804.
17. **Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM:** "An induced proximity model for caspase-8 activation." **J Biol Chem** 1998, (273):2926-2930.
18. **Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J:** "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." **Nat Cell Biol** 2000, (2):241-243.
19. **Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H:** "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." **Immunity** 2000, (12):599-609.
20. **Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A:** "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." **Immunity** 2000, (12):611-620.
21. **Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME:** "The CD95 type I/type II model." **Semin Immunol** 2003, (15):185-193.
22. **Kroemer G, Reed JC:** "Mitochondrial control of cell death." **Nat Med** 2000, (6):513-519.
23. **Green DR, Reed JC:** "Mitochondria and apoptosis." **Science** 1998, (281):1309-1312.
24. **Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ:** "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." **Genes Dev** 1999, (13):1899-1911.
25. **Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ:** "Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death." **Embo J** 1999, (18):2330-2341.
26. **Lassus P, Opitz-Araya X, Lazebnik Y:** "Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization." **Science** 2002, (297):1352-1354.

27. **Huang DC, Strasser A:** "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* 2000, (103):839-842.
28. **Puthalakath H, Strasser A:** "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." *Cell Death Differ* 2002, (9):505-512.
29. **Wang X:** "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 2001, (15):2922-2933.
30. **Jiang X, Wang X:** "Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1." *J Biol Chem* 2000, (275):31199-31203.
31. **Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW:** "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* 2002, (9):423-432.
32. **Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X:** "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* 1997, (91):479-489.
33. **Rodriguez J, Lazebnik Y:** "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." *Genes Dev* 1999, (13):3179-3184.
34. **Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S:** "Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis." *J Biol Chem* 2002, (277):29803-29809.
35. **Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SL, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang J, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW:** "Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex." *Cell Death Differ* 1998, (5):271-288.
36. **Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME:** "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 1999, (274):1541-1548.
37. **Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J:** "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* 1997, (388):190-195.
38. **Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S:** "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 2001, (276):20633-20640.
39. **Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J:** "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." *Nature* 1997, (386):517-521.
40. **Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC:** "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." *Embo J* 1997, (16):6914-6925.
41. **Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC:** "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases." *J Biol Chem* 1998, (273):7787-7790.
42. **Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J, Rasper D, Roy S, Slack RS, Nicholson DW, MacKenzie AE:** "The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7." *J Neurosci* 2002, (22):2035-2043.
43. **Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, Shi Y:** "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP." *Cell* 2001, (104):769-780.
44. **Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H:** "Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain." *Cell* 2001, (104):781-790.
45. **Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS:** "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." *Cell* 2001, (104):791-800.
46. **Sun C, Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC, Fesik SW:** "NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP." *Nature* 1999, (401):818-822.
47. **Sun C, Cai M, Meadows RP, Xu N, Gunasekera AH, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW:** "NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP." *J Biol Chem* 2000, (275):33777-33781.

48. **Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, Alnemri ES, Fairman R, Shi Y:** "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." *Mol Cell* 2003, (11):519-527.
49. **Zou H, Yang R, Hao J, Wang J, Sun C, Fesik SW, Wu JC, Tomaselli KJ, Armstrong RC:** "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." *J Biol Chem* 2003, (278):8091-8098.
50. **Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W:** "Two tumour necrosis factor receptors: structure and function." *Trends Cell Biol* 1995, (5):392-399.
51. **Baud V, Karin M:** "Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives." *Trends Cell Biol* 2001, (11):372-377.
52. **Lee R, Collins T:** "Nuclear factor-kappaB and cell survival: IAPs call for support." *Circ Res* 2001, (88):262-264.
53. **Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV:** "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." *Cell* 1996, (84):299-308.
54. **Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV:** "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 1994, (78):681-692.
55. **Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV:** "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." *Science* 1995, (269):1424-1427.
56. **Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B:** "RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death." *Cell* 1995, (81):513-523.
57. **Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM:** "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* 1995, (81):505-512.
58. **Rath PC, Aggarwal BB:** "TNF-induced signaling in apoptosis." *J Clin Immunol* 1999, (19):350-364.
59. **Shu HB, Takeuchi M, Goeddel DV:** "The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, (93):13973-13978.
60. **Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV:** "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." *Cell* 1995, (83):1243-1252.
61. **Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whitemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW:** "Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, (90):7951-7955.
62. **Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW:** "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation." *Cell* 1999, (97):395-406.
63. **Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al.:** "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy." *Cell* 1995, (80):167-178.
64. **Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH:** "Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120." *Nature* 1995, (375):497-500.
65. **Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY, Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnav AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ:** "The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis." *Blood* 2001, (98):194-200.
66. **Friesen C, Fulda S, Debatin KM:** "Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells." *Leukemia* 1997, (11):1833-1841.
67. **Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM:** "Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system." *Int J Cancer* 1998, (76):105-114.
68. **Debatin KM, Stahnke K, Fulda S:** "Apoptosis in hematological disorders." *Semin Cancer Biol* 2003, (13):149-158.

69. **Maeda T, Yamada Y, Moriuchi R, Sugahara K, Tsuruda K, Joh T, Atogami S, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kamihira S:** "Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia." *J Exp Med* 1999, (189):1063-1071.
70. **Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS:** "Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma." *Blood* 1997, (90):4266-4270.
71. **Wohlfart S, Sebinger D, Gruber P, Buch J, Polgar D, Krupitza G, Rosner M, Hengstschlager M, Raderer M, Chott A, Mullauer L:** "FAS (CD95) mutations are rare in gastric MALT lymphoma but occur more frequently in primary gastric diffuse large B-cell lymphoma." *Am J Pathol* 2004, (164):1081-1089.
72. **Shen L, Liang AC, Lu L, Au WY, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G:** "Frequent deletion of Fas gene sequences encoding death and transmembrane domains in nasal natural killer/T-cell lymphoma." *Am J Pathol* 2002, (161):2123-2131.
73. **Schroter M, Peli J, Hahne M, Tschopp J, Reichmann E:** "Fas-dependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance." *Oncogene* 2000, (19):1794-1800.
74. **French LE, Tschopp J:** "Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape." *Semin Cancer Biol* 2002, (12):51-55.
75. **French LE, Tschopp J:** "Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors." *J Exp Med* 1999, (190):891-894.
76. **Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Offringa R:** "Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein." *J Exp Med* 1999, (190):1033-1038.
77. **Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A:** "The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors." *J Exp Med* 1999, (190):1025-1032.
78. **Cory S, Adams JM:** "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* 2002, (2):647-656.
79. **Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A:** "Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease." *Mutat Res* 2001, (488):211-231.
80. **Solary E, Dubrez L, Eymen B:** "The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases." *Eur Respir J* 1996, (9):1293-1305.
81. **Hinz M, Loser P, Mathas S, Krappmann D, Dorken B, Scheidereit C:** "Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." *Blood* 2001, (97):2798-2807.
82. **Hodgkin T:** "On some morbid appearance of the absorbent glands and spleen." *Medical Chirurgical Transaction* 1832, (17):69-97.
83. **Wilks S:** "Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease), with remarks." *Guy's Hospital Report* 1865, (11):56-67.
84. **Reed DM:** "On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis." *Johns Hopkins Hospital Reports* 1902, (10):133-196.
85. **Sternberg C:** "Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie Verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates." *Ztschz. Heilk.* 1898, (19):21-90.
86. **Bonadonna G:** "Historical review of Hodgkin's disease." *Br J Haematol* 2000, (110):504-511.
87. **Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML:** "Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, (91):10962-10966.
88. **Thomas RK, Re D, Wolf J, Diehl V:** "Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells." *Lancet Oncol* 2004, (5):11-18.
89. **Re D, Kuppers R, Diehl V:** "Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma." *J Clin Oncol* 2005, (23):6379-6386.
90. **Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, Pileri A, Jr., Giunti M, Falini B, Bolis GB, Stein H:** "Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint." *J Clin Pathol* 2002, (55):162-176.
91. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M:** In: "Immunologie", 5 ed. pp. 131-143: Spektrum Akademischer Verlag; 2002: 131-143.
92. **Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML:** "Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, (94):9337-9342.

93. **Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, Foss HD, Falini B, Delsol G, Isaacson PG, Pileri S, Stein H:** "Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells." *N Engl J Med* 1997, (337):453-458.
94. **Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K:** "Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells." *J Exp Med* 1996, (184):1495-1505.
95. **Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Jr., Miljkovic V, Cattoretti G, Califano A, Dalla-Favera R:** "Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, (100):2639-2644.
96. **van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C:** "Death-receptor contribution to the germinal-center reaction." *Trends Immunol* 2001, (22):677-682.
97. **Takahashi Y, Ohta H, Takemori T:** "Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire." *Immunity* 2001, (14):181-192.
98. **Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T:** "FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis." *J Exp Med* 2001, (193):447-458.
99. **van Eijk M, Medema JP, de Groot C:** "Cutting edge: cellular Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein protects germinal center B cells from apoptosis during germinal center reactions." *J Immunol* 2001, (166):6473-6476.
100. **Maggio EM, Van Den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S:** "Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma." *Am J Pathol* 2003, (162):29-35.
101. **Muschen M, Re D, Brauninger A, Wolf J, Hansmann ML, Diehl V, Kuppers R, Rajewsky K:** "Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells." *Cancer Res* 2000, (60):5640-5643.
102. **Re D, Hofmann A, Wolf J, Diehl V, Staratschek-Jox A:** "Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95." *Exp Hematol* 2000, (28):31-35.
103. **Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C:** "Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity." *J Exp Med* 2002, (196):605-617.
104. **Xerri L, Palmerini F, Devillard E, Defrance T, Bouabdallah R, Hassoun J, Birg F:** "Frequent nuclear localization of ICAD and cytoplasmic co-expression of caspase-8 and caspase-3 in human lymphomas." *J Pathol* 2000, (192):194-202.
105. **Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS:** "Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease." *Lancet* 1991, (337):320-322.
106. **Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, Niedobitek G, Pileri S, Muller-Lantzsch N, Stein H:** "Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, (88):4766-4770.
107. **Niedobitek G, Kremmer E, Herbst H, Whitehead L, Dawson CW, Niedobitek E, von Ostau C, Rooney N, Grasser FA, Young LS:** "Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis." *Blood* 1997, (90):1664-1672.
108. **Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W:** "Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule." *Embo J* 1997, (16):6131-6140.
109. **Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R:** "Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals." *Immunity* 1998, (9):405-411.
110. **Bechtel D, Kurth J, Unkel C, Kuppers R:** "Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas." *Blood* 2005, (106):4345-4350.
111. **Bonizzi G, Karin M:** "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." *Trends Immunol* 2004, (25):280-288.
112. **Greten FR, Karin M:** "The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer." *Cancer Lett* 2004, (206):193-199.
113. **Ghosh S, May MJ, Kopp EB:** "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 1998, (16):225-260.

114. **Medzhitov R:** "Toll-like receptors and innate immunity." **Nat Rev Immunol** 2001, (1):135-145.
115. **Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA:** "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." **Nature** 2001, (413):732-738.
116. **Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D:** "Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses." **Cell** 1995, (80):321-330.
117. **Weih DS, Yilmaz ZB, Weih F:** "Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines." **J Immunol** 2001, (167):1909-1919.
118. **Yamada T, Mitani T, Yorita K, Uchida D, Matsushima A, Iwamasa K, Fujita S, Matsumoto M:** "Abnormal immune function of hemopoietic cells from alymphoplasia (aly) mice, a natural strain with mutant NF-kappa B-inducing kinase." **J Immunol** 2000, (165):804-812.
119. **Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM, Bravo R:** "Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses." **J Exp Med** 1998, (187):185-196.
120. **Matsushima A, Kaisho T, Rennert PD, Nakano H, Kurosawa K, Uchida D, Takeda K, Akira S, Matsumoto M:** "Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I." **J Exp Med** 2001, (193):631-636.
121. **Tumang JR, Owyang A, Andjelic S, Jin Z, Hardy RR, Liou ML, Liou HC:** "c-Rel is essential for B lymphocyte survival and cell cycle progression." **Eur J Immunol** 1998, (28):4299-4312.
122. **Shinkura R, Kitada K, Matsuda F, Tashiro K, Ikuta K, Suzuki M, Kogishi K, Serikawa T, Honjo T:** "Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding NF-kappa B-inducing kinase." **Nat Genet** 1999, (22):74-77.
123. **Mercurio F, DiDonato JA, Rosette C, Karin M:** "p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction." **Genes Dev** 1993, (7):705-718.
124. **Ghosh S, Karin M:** "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." **Cell** 2002, (109 Suppl):S81-96.
125. **Chiao PJ, Miyamoto S, Verma IM:** "Autoregulation of I kappa B alpha activity." **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994, (91):28-32.
126. **Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer HD, Scheidereit C, Dorken B:** "High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells." **Blood** 1996, (87):4340-4347.
127. **Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B:** "Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells." **J Clin Invest** 1997, (100):2961-2969.
128. **Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss HD, Jundt F, Mathas S, Krappmann D, Scheidereit C, Stein H, Dorken B:** "Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells." **Blood** 1999, (94):3129-3134.
129. **Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT:** "Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha." **Oncogene** 1999, (18):3063-3070.
130. **Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Brauninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K, Kuppers R:** "Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma." **J Exp Med** 2000, (191):395-402.
131. **Emmerich F, Theurich S, Hummel M, Haeffker A, Vry MS, Dohner K, Bommert K, Stein H, Dorken B:** "Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells," 2003.
132. **Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dorken B, Scheidereit C:** "Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." **Oncogene** 1999, (18):943-953.
133. **Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, Kadin ME:** "Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells." **Oncogene** 2002, (21):2493-2503.
134. **Annunziata CM, Safiran YJ, Irving SG, Kasid UN, Cossman J:** "Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor." **Blood** 2000, (96):2841-2848.
135. **Joos S, Kupper M, Ohl S, von Bonin F, Mechttersheimer G, Bentz M, Marynen P, Moller P, Pfreundschuh M, Trumper L, Lichter P:** "Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells." **Cancer Res** 2000, (60):549-552.

136. Joos S, Menz CK, Wrobel G, Siebert R, Gesk S, Ohl S, Mechtersheimer G, Trumper L, Moller P, Lichter P, Barth TF: "Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2." **Blood** 2002, (99):1381-1387.
137. Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Hansmann ML, Dyer MJ, Siebert R: "Recurrent involvement of the *REL* and *BCL11A* loci in classical Hodgkin lymphoma." **Blood** 2002, (99):1474-1477.
138. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M: "NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition." **Mol Cell Biol** 1999, (19):2690-2698.
139. Weinberg RA: "The retinoblastoma protein and cell cycle control." **Cell** 1995, (81):323-330.
140. Sherr CJ: "Cancer cell cycles." **Science** 1996, (274):1672-1677.
141. Strauss M, Lukas J, Bartek J: "Unrestricted cell cycling and cancer." **Nat Med** 1995, (1):1245-1246.
142. Poppema S, van den Berg A: "Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas." **Semin Cancer Biol** 2000, (10):345-350.
143. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Muller G, Foss HD, Royer HD, Stein H, Dorken B: "Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils." **Blood** 1999, (94):2065-2071.
144. Burgess AW, Metcalf D: "The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors." **Blood** 1980, (56):947-958.
145. Gilmore T, Gapuzan ME, Kalaitzidis D, Starczynowski D: "Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer." **Cancer Lett** 2002, (181):1-9.
146. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M: "IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer." **Cell** 2004, (118):285-296.
147. Bharti AC, Aggarwal BB: "Chemopreventive agents induce suppression of nuclear factor-kappaB leading to chemosensitization." **Ann N Y Acad Sci** 2002, (973):392-395.
148. Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, Chow WH, Dubrow R, Ahsan H, Mayne ST, Schoenberg JB, West AB, Rotterdam H, Fraumeni JF, Jr., Blot WJ: "Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer." **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1998, (7):97-102.
149. Zaridze D, Borisova E, Maximovitch D, Chkhikvadze V: "Aspirin protects against gastric cancer: results of a case-control study from Moscow, Russia." **Int J Cancer** 1999, (82):473-476.
150. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB: "The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta." **Nature** 1998, (396):77-80.
151. Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB: "Sulindac inhibits activation of the NF-kappaB pathway." **J Biol Chem** 1999, (274):27307-27314.
152. Adams J: "Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy." **Trends Mol Med** 2002, (8):S49-54.
153. Snow ET: "Metal carcinogenesis: mechanistic implications." **Pharmacol Ther** 1992, (53):31-65.
154. Kapahi P, Takahashi T, Natoli G, Adams SR, Chen Y, Tsien RY, Karin M: "Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of I kappa B kinase." **J Biol Chem** 2000, (275):36062-36066.
155. Waxman S, Anderson KC: "History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy." **Oncologist** 2001, (6 Suppl 2):3-10.
156. Douer D, Tallman MS: "Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies." **J Clin Oncol** 2005, (23):2396-2410.
157. Amadori S, Fenaux P, Ludwig H, O'Dwyer M, Sanz M: "Use of arsenic trioxide in hematological malignancies: insight into the clinical development of a novel agent." **Curr Med Res Opin** 2005, (21):403-411.
158. Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M: "Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus." **Glycobiology** 1999, (9):557-569.
159. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME: "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." **Embo J** 1995, (14):5579-5588.

160. **Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D:** "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." *Cell* 1996, (85):803-815.
161. **Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J:** "NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP." *Mol Cell Biol* 2001, (21):5299-5305.
162. **Meister G, Tuschl T:** "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." *Nature* 2004, (431):343-349.
163. **Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY:** "Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients." *Blood* 1997, (89):3354-3360.
164. **Ratnaik RN:** "Acute and chronic arsenic toxicity." *Postgrad Med J* 2003, (79):391-396.
165. **Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mehta-Grigoriou F, Stein H, Dorken B, Scheidereit C:** "Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B." *Embo J* 2002, (21):4104-4113.
166. **Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, Young LS, Murray PG:** "Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, (101):6611-6616.
167. **Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, Schultze JL, Draube A, Vockerodt M, Re D, Diehl V, Wolf J:** "Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells." *Am J Pathol* 2002, (160):1521-1528.
168. **Xiao CW, Asselin E, Tsang BK:** "Nuclear factor kappaB-mediated induction of Flice-like inhibitory protein prevents tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in rat granulosa cells." *Biol Reprod* 2002, (67):436-441.
169. **Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, Jurgensmeier JM:** "XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells." *J Exp Med* 2003, (198):341-347.
170. **Durkop H, Hirsch B, Hahn C, Stein H:** "cIAP2 is highly expressed in Hodgkin-Reed-Sternberg cells and inhibits apoptosis by interfering with constitutively active caspase-3." *J Mol Med* 2005:1-10.
171. **Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X:** "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." *Embo J* 2002, (21):3704-3714.
172. **Boatright KM, Deis C, Denault JB, Sutherlin DP, Salvesen GS:** "Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)." *Biochem J* 2004, (382):651-657.
173. **Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grutter MG:** "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 2002, (277):45162-45171.
174. **Legembre P, Barnhart BC, Zheng L, Vijayan S, Straus SE, Puck J, Dale JK, Lenardo M, Peter ME:** "Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signaling thresholds." *EMBO Rep* 2004, (5):1084-1089.
175. **Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P:** "Non-apoptotic Fas signaling." *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, (14):53-66.
176. **Lambert C, Landau AM, Desbarats J:** "Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system." *Apoptosis* 2003, (8):551-562.
177. **Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, Kindler V, Tschopp J, Ricciardi-Castagnoli P:** "Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses." *J Exp Med* 2000, (192):1661-1668.
178. **Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D:** "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally." *Immunity* 1998, (9):267-276.

179. Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A, Waisman A, Brenner O, Haffner R, Gustafsson E, Ramakrishnan P, Lapidot T, Wallach D: "Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles." *J Immunol* 2004, (173):2976-2984.
180. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A: "Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1." *Nature* 1998, (392):296-300.
181. Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW: "FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis." *Science* 1998, (279):1954-1958.
182. Chau H, Wong V, Chen NJ, Huang HL, Lin WJ, Mirtsos C, Elford AR, Bonnard M, Wakeham A, You-Ten AI, Lemmers B, Salmena L, Pellegrini M, Hakem R, Mak TW, Ohashi P, Yeh WC: "Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling." *J Exp Med* 2005, (202):405-413.
183. Yeh WC, Itie A, Elia AJ, Ng M, Shu HB, Wakeham A, Mirtsos C, Suzuki N, Bonnard M, Goeddel DV, Mak TW: "Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development." *Immunity* 2000, (12):633-642.
184. Kataoka T, Budd RC, Holler N, Thome M, Martinon F, Irmeler M, Burns K, Hahne M, Kennedy N, Kovacsovics M, Tschopp J: "The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways." *Curr Biol* 2000, (10):640-648.
185. Kataoka T, Tschopp J: "N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway." *Mol Cell Biol* 2004, (24):2627-2636.
186. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr.: "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." *Science* 1998, (281):1680-1683.
187. Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M: "Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice." *J Mol Biol* 2003, (327):761-766.
188. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J: "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis." *Nat Med* 2003, (9):347-351.
189. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Kotliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP: "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs." *Nature* 2004, (432):173-178.
190. de Fougerolles A, Manoharan M, Meyers R, Vornlocher HP: "RNA interference in vivo: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics." *Methods Enzymol* 2005, (392):278-296.
191. Nakanishi C, Toi M: "Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* 2005, (5):297-309.
192. Zimmerman MA, Selzman CH, Reznikov LL, Raeburn CD, Barsness K, McIntyre RC, Jr., Hamiel CR, Harken AH: "Interleukin-11 attenuates human vascular smooth muscle cell proliferation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, (283):H175-180.
193. Nasuhara Y, Adcock IM, Catley M, Barnes PJ, Newton R: "Differential IkappaB kinase activation and IkappaBalpha degradation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in human U937 monocytic cells. Evidence for additional regulatory steps in kappaB-dependent transcription." *J Biol Chem* 1999, (274):19965-19972.
194. Broemer M, Krappmann D, Scheidereit C: "Requirement of Hsp90 activity for IkappaB kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF-kappaB activation." *Oncogene* 2004, (23):5378-5386.
195. Chen F, Zhang Z, Bower J, Lu Y, Leonard SS, Ding M, Castranova V, Piwnica-Worms H, Shi X: "Arsenite-induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, (99):1990-1995.
196. Tsou TC, Tsai FY, Hsieh YW, Li LA, Yeh SC, Chang LW: "Arsenite induces endothelial cytotoxicity by down-regulation of vascular endothelial nitric oxide synthase." *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, (208):277-284.

197. **Scholz C, Wieder T, Starck L, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dorken B, Daniel PT:** "Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway." **Oncogene** 2005, (24):1904-1913.
198. **Jin Z, El-Deiry WS:** "Overview of cell death signaling pathways." **Cancer Biol Ther** 2005, (4):139-163.
199. **Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G:** "Cell death independent of caspases: a review." **Clin Cancer Res** 2005, (11):3155-3162.
200. **van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP:** "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." **Cytometry** 1998, (31):1-9.
201. **Trieu Y, Wen XY, Skinnider BF, Bray MR, Li Z, Claudio JO, Masih-Khan E, Zhu YX, Trudel S, McCart JA, Mak TW, Stewart AK:** "Soluble interleukin-13Ralpha2 decoy receptor inhibits Hodgkin's lymphoma growth in vitro and in vivo." **Cancer Res** 2004, (64):3271-3275.
202. **Hopken UE, Foss HD, Meyer D, Hinz M, Leder K, Stein H, Lipp M:** "Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs." **Blood** 2002, (99):1109-1116.
203. **Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, Gu BW, Li JM, Zhu YM, Shi JY, Zheng PZ, Yan H, Liu YF, Chen Y, Shen Y, Wu W, Tang W, Waxman S, De The H, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z:** "All-trans retinoic acid/As2O3 combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia." **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004, (101):5328-5335.
204. **Re D, Thomas RK, Behringer K, Diehl V:** "From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential." **Blood** 2005, (105):4553-4560.
205. **Zheng B, Georgakis GV, Li Y, Bharti A, McConkey D, Aggarwal BB, Younes A:** "Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors." **Clin Cancer Res** 2004, (10):3207-3215.
206. **Diehl V, Thomas RK, Re D:** "Part II: Hodgkin's lymphoma--diagnosis and treatment." **Lancet Oncol** 2004, (5):19-26.
207. **Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S:** "Hodgkin's lymphoma: evolving concepts with implications for practice." **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)** 2004:184-202.
208. **Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V:** "Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma." **Ann Oncol** 2002, (13 Suppl 4):147-152.
209. Sambrook J, Fritsch EF: *Molecular Cloning*, 2 edn: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.

10 Anhang

10.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag : 23.08.1973

Geburtsort : Rostock

Staatsangehörigkeit : deutsch

Ausbildung

1980-1981 45. Polytechnische Oberschule Wladimir Komarow in Rostock

1981-1987 43. Polytechnische Oberschule Valentina Tereschkowa in Rostock

1987-1990 14. Polytechnische Oberschule Willi Bredel in Berlin-Mitte

1990-1991 Erweiterte Oberschule in Berlin-Treptow

1991-1992 Max-Planck-Oberschule (Gymnasium) in Berlin-Mitte

Abschluss: Abitur

1994-1995 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin

1995-2002 Studium der Biochemie an der Universität Potsdam

Diplomprüfungen Biochemie, Immunologie, Analytische Chemie, Pflanzenphysiologie

2000-2002 Diplomarbeit bei Dr. Kurt Bommert in der Arbeitsgruppe Hämatologie, Onkologie und Tumormunologie von Prof. Dr. Bernd Dörken

Thema: Charakterisierung Hodgkin-spezifischer I κ B ϵ -Mutationen

2002-2006 Doktorarbeit bei Dr. Stephan Mathas in der Arbeitsgruppe Hämatologie, Onkologie und Tumormunologie von Prof. Dr. Bernd Dörken

Berufserfahrung

1992-1994 Zivildienst in der Rettungsstelle im städtischen Krankenhaus Berlin-Friedrichshain

1997-1999 Studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie der Pflanzen der Universität Potsdam bei Herrn Prof. Dr. Guido Baumann

10.2 Publikationen

Manuskripte

Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mehta-Grigoriou F, Stein H, Dörken B, Scheidereit C: *"Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B"*. **Embo J** 2002, 21:4104-4113.

Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheidereit C, Bommert K, Dörken B: *"Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis"*. **Blood** 2003, 102:1028-1034.

Mathas S*, Lietz A*, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Johrens-Leder K, Vornlocher Hp, Bommert K, Stein H, Dörken B: *"c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis"*. **J Exp Med** 2004, 199:1041-1052.

* Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Arbeit bei

Jundt F, Raetzl N, Muller C, Calkhoven Cf, Kley K, Mathas S, Lietz A, Leutz A, Dörken B: *"A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein {beta} and NF-{kappa}B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas"*. **Blood** 2005, 106:1801-1807.

Mathas S, Johrens K, Joos S, Lietz A, Hummel F, Janz M, Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Lichter P, Stein H, Scheidereit C, Dörken B: *"Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas"*. **Blood** 2005, 106:4287-4293.

Mathas S, Janz M, Hummel F, Hummel M, Wollert-Wulf B, Lusatis S, Anagnostopoulos I, Lietz A, Sigvardsson M, Jundt F, Johrens K, Bommert K, Stein H, Dörken B: *"Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma"*. **Nat Immunol** 2006, 7:207-215.

Vortrag

"c-FLIP Proteins Mediate Resistance of Hodgkin-/Reed-Sternberg Cells to Death Receptor Induced Apoptosis."

45. Jährliches Treffen der amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (American Society of Hematology, ASH), 6.-9. Dezember 2003, San Diego, USA

Poster

Lehnhardt, L, Lietz, A, Baumann, G: *"Mass spectrometry of ubiquitin-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit conjugates in callus cultures of sugar beet (Beta vulgaris L.)"*. **Biol. Chem.** **378, Special Supplement** p. S173, Fall Meeting Hamburg (1999).

10.3 Summary

Apoptosis, the programmed cell death, is important for the balance between proliferation and dying of cells. It is also involved in the removal of infected and damaged cells. Apoptosis can be induced by stimulation of receptors of the TNF (tumor necrosis factor)-receptor family, such as CD95 (also designated as Fas). After ligand-induced trimerisation of these receptors, FADD (Fas associated death domain containing protein) binds to the cytoplasmic part of the receptors and recruits Caspase-8 (also termed FLICE, FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme) and/or Caspase-10. The induced proximity of the caspases in this complex, called DISC (death inducing signaling complex), leads to their auto- and transcatalytic cleavage and subsequently to their activation. These initiator caspases activate effector caspases and thereby the apoptotic program which leads to the death of the cell. A number of anti-apoptotic proteins, which inhibit the activation or the activated forms of caspases, control this process. The deregulation of this system is involved in a variety of diseases. The disruption of the apoptotic program can contribute to the malignant transformation of cells and to the development of tumors. Classical Hodgkin Lymphoma is a malignant disease of the lymphatic system, characterized by mononucleated Hodgkin or multinucleated Reed/Sternberg (HRS) cells. These tumor cells are derived from germinal-center B-cells. However, HRS cells lack the expression of typical B cell markers, such as the B-cell receptor. Usually, B-cells without B-cell receptor expression are negatively selected during the germinal-center reaction and undergo apoptosis. CD95 is involved in this apoptosis induction. It has been shown previously that in many malignant diseases CD95 is down-regulated or mutated, indicating that CD95 is involved in the removal of tumor cells. In opposite to these findings, primary HRS cells and Hodgkin-derived cell lines usually express wild type CD95, but are resistant to CD95 induced apoptosis. In this work, it could be demonstrated that in contrast to other malignant diseases components of the CD95 system are up-regulated in HRS cells, including CD95 itself. By immunoprecipitation it was shown that, in addition to FADD and Caspase-8/-10, c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein) is a component of the DISC in CD95-stimulated cells. c-FLIP is a caspase homolog which, like caspases, binds to FADD, but lacks proteolytic activity. It inhibits the activation of caspases in the DISC and thus prevents apoptosis induction. A

strong c-FLIP expression was shown in all HRS cell lines and in HRS cells of nearly all investigated cases of Hodgkin Lymphoma (55/59). siRNA-mediated (small interfering RNA) down-regulation of c-FLIP sensitized HRS cell lines to CD95-induced apoptosis. This shows that the CD95 receptor-induced apoptosis in HRS cells is not structurally but functionally inhibited and that c-FLIP strongly contributes to this inhibition. In addition, it was shown that c-FLIP expression depends on the constitutive activity of the transcription factor NF- κ B (nuclear factor- κ B) which is characteristic for HRS cells. Usually, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm by a family of inhibitor proteins, the I κ Bs (inhibitors of NF- κ B). A variety of stimuli can activate the IKK (I κ B kinase)-complex which subsequently phosphorylates the I κ Bs, leading to their ubiquitinylation and degradation. The released NF- κ B translocates to the nucleus where it activates the transcription of target genes. It is supposed that a constitutively activated IKK complex and, in some cases, mutated I κ B proteins contribute to the constitutive NF- κ B activity in HRS cells. To the NF- κ B dependent genes in HRS cells belong those with anti-apoptotic and cell cycle promoting activities. Inhibition of the NF- κ B activity in HRS cells leads to apoptosis and decreased proliferation. Trivalent arsenic is known to inhibit the induction of the IKK complex and thus the activation of NF- κ B. In this work, it was shown that arsenic inhibits the constitutively active IKK complex in HRS cells. This led to an inhibition of NF- κ B and induction of apoptosis in HRS cell lines with non-mutated I κ B proteins. The NF- κ B inhibition was accompanied by the down-regulation of anti-apoptotic and cell cycle promoting genes. Ectopic overexpression of NF- κ B partially reverted the apoptotic effect of arsenic. Treatment of mice with arsenic reduced the growth of subcutaneously xenotransplanted HRS cells. In explanted tumor cells, a reduced NF- κ B activity could be demonstrated following treatment with arsenic. Thus, the inhibition of NF- κ B by arsenic contributes to the induction of apoptosis in HRS cells.

Taken together, the results indicate that modulation of the apoptosis resistance at the transcriptional or protein level may offer new therapeutic strategies for the treatment of Hodgkin Lymphoma. Of particular interest is the application of arsenic because it is already used in the treatment of other malignant disorders.

10.4 Allgemeinverständliche Zusammenfassung

Für mehrzellige Organismen ist es wichtig, das Gleichgewicht zwischen der Zellbildung und dem Zelltod aufrecht zu erhalten sowie geschädigte und infizierte Zellen zu beseitigen. In diesem Zusammenhang spielt die Apoptose, der programmierte Zelltod, eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich um ein in den Zellen vorliegendes Programm, das, wenn es gestartet wird, zum Tod der Zelle führt. Apoptose kann durch Zellen des Immunsystems, z.B. den T-Zellen, ausgelöst werden. Dazu binden sie mit dem CD95-Liganden auf ihrer Außenseite an den CD95-Rezeptor auf der Außenseite der zu tötenden Zelle. Dadurch bildet sich am zellinneren Teil des Rezeptors ein Signalkomplex, der das Apoptoseprogramm startet. Bei vielen Krebsarten wurden Mechanismen in den Tumorzellen entdeckt, die sie vor dem Auslösen von CD95-induzierter Apoptose schützen. Es wird angenommen, dass sie so einer Reaktion des Immunsystems entgehen. Dabei konnten in den Tumorzellen sowohl Mutationen von Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind, nachgewiesen werden als auch das Fehlen dieser Proteine. Auch die Tumorzellen des Lymphknotenkrebses Hodgkin Lymphom (Hodgkin/Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen) sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose. Es ist aber bekannt, dass die an der Apoptose beteiligten Proteine in diesen Zellen nicht mutiert sind, weshalb die Gründe der Apoptoseresistenz dieser Zellen unklar sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die starke Überproduktion des Proteins c-FLIP mitverantwortlich für die Apoptoseresistenz ist. c-FLIP bindet an den CD95-Signalkomplex und verhindert die Signalweitergabe, die im Normalfall die Apoptose auslöst. Das Ausschalten der c-FLIP-Produktion in den Zellen führte dazu, dass sie wieder sensitiv gegenüber CD95-gestarteter Apoptose wurden. Die Beeinflussung des CD95-Systems könnte deshalb einen therapeutischen Ansatz bieten. Die c-FLIP-Produktion in den HRS-Zellen hängt von der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B ab. Transkriptionsfaktoren sind für das Ablesen der Gene im Zellkern notwendig, an Hand deren Vorschrift die Proteine produziert werden. Eine Überaktivität von Transkriptionsfaktoren kann auch zu einer Überproduktion von Proteinen führen. NF- κ B wird normalerweise von Inhibitoren, den I κ Bs, außerhalb des Zellkerns festgehalten und kann so nicht mit seinen Zielgenen interagieren. Erhält die Zelle über Rezeptoren von außen ein Signal, wird im Zellinneren der IKK-Komplex aktiviert, der zum Abbau der I κ Bs führt und damit zum Freilassen von NF-

κ B. In den HRS-Zellen ist dieser Komplex aber ständig aktiv und führt somit zu einer ständigen Überaktivität von NF- κ B. Diese NF- κ B-Aktivität ist überlebenswichtig für die HRS-Zellen, da sie für die Produktion von Proteinen sorgt, die die HRS-Zellen vor Apoptose schützen (wie z.B. c-FLIP). Von Arsenverbindungen war bekannt, dass sie die Aktivierung dieses Komplexes verhindern kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Arsenverbindungen auch die ständige Aktivität des IKK-Komplexes in den HRS-Zellen ausschalten können und so eine Deaktivierung von NF- κ B auslösen. Diese NF- κ B-Deaktivierung führt zum Tod der HRS-Zellen durch Apoptose. Da Arsenverbindungen auch schon zur Behandlung von anderen Krebsarten eingesetzt werden, sind sie eventuell auch interessant für die Behandlung des Hodgkin Lymphoms.

10.5 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Dr. Stephan Mathas für seine hervorragende Betreuung, die vielen Ideen und seine immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Dörken für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Doktorarbeit zu diesem interessanten Thema anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. Burkhard Micheel bedanke ich mich für die Möglichkeit, an der Universität Potsdam zu promovieren und für seine unkomplizierte und uneigennützigte Hilfe.

Für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten, danke ich Frau Prof. Dr. Petra Knaus von der Freien Universität Berlin, Institut für Biochemie und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dubiel von der Chirurgischen Klinik der Charité, Abteilung für Molekularbiologie.

Herrn Dr. Kurt Bommert danke ich für die vielen Jahre, in denen er meine Arbeit hilfreich begleitet hat.

Dank auch an Herrn Dr. Martin Janz für viele wertvolle Hinweise.

Herrn Dr. Hans-Peter Vornlocher von der Ribopharma AG (jetzt Alnylam Europe AG) danke ich für das Bereitstellen der c-FLIP siRNA.

Herrn Dr. Stefan Joos vom DKFZ in Heidelberg danke ich für das Anfertigen der *multi-tissue arrays* der primären Hodgkinfälle. Für die Färbungen der *multi-tissue arrays* danke ich Herrn Prof. Dr. Ioannis Anagnostopoulos und Frau Dr. Korinna Jöhrens-Leder vom Institut für Pathologie am UKBF der FU Berlin.

Für die Durchführung der konfokalen Lasermikroskopie, die Hilfe bei der Färbung der Schnitte und die Gastfreundlichkeit danke ich Herrn Dr. Burkhard Wiesner und Frau Jenny Eichhorst vom Institut für molekulare Pharmakologie.

Franziska Hummel und Simone Lusatis aus unserer Arbeitsgruppe danke ich für ihre exzellente technische Unterstützung.

Überhaupt bedanke ich mich bei der ganzen Labormannschaft Arbeitsgruppe Dörken für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die vielen gefundenen Rechtschreibfehler bedanke ich mich bei meiner Mutter, Katharina Kley, Björn Lamprecht, der Zeit zum Korrekturlesen trotz Schreibens seiner Diplomarbeit gefunden hat und Barbara Schories.

Mein letzter Dank gilt meinen lieben Eltern ohne deren Unterstützung ich es nie so weit geschafft hätte und die mich ermutigt haben, von der Biotechnologie zur Biochemie zu wechseln.

10.6 Versicherung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst zu haben und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Andreas Lietz

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheiderei C, Bommert K, Dörken B: *"Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis"*. **Blood** 2003, 102:1028-1034.

Mathas S*, Lietz A*, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, Jundt F, Hirsch B, Johrens-Leder K, Vornlocher Hp, Bommert K, Stein H, Dörken B: *"c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis"*. **J Exp Med** 2004, 199:1041-1052.

* Autoren trugen zu gleichen Teilen zur Arbeit bei