

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink

**Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B
in Zellen des Hodgkin-Lymphoms und
des großzelligen anaplastischen Lymphoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Ulrike Embaye
aus Frankfurt am Main

Würzburg, August 2004

Referent:

Prof. Dr. med. Henrik Griesser

Koreferent:

Prof. Dr. med. Heide Rückle-Lanz

Dekan:

Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 2005

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne Lymphome: das Hodgkin-Lymphom und das großzellige anaplastische Lymphom	1
1.2	CD30-positive Zellen	2
1.3	Der CD30-Rezeptor	3
1.4	Die unterschiedlichen Rollen des CD30-Rezeptors	4
1.5	Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie.....	5
1.6	Die CD30-vermittelte NF- κ B-Aktivierung	8
1.7	NF- κ B und die Kontrolle der Apoptose	9
1.8	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Lösungen und Puffer	12
2.1.2	Chemikalien und Reaktionssysteme	14
2.1.3	Antikörper.....	15
2.1.4	Oligonucleotid	16
2.1.5	Kulturmedien	16
2.1.6	Zellkulturen	16
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Kultivieren, Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	17
2.2.2	Stimulation der Zellen	18
2.2.3	Verarbeitung der Zellen.....	18
2.2.4	Präparation von Kern- und Zytoplasmaproteinen	19
2.2.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
2.2.6	Proteinanalyse mittels Westernblot	19
2.2.7	Quantitative DNA/Protein-Bindungsstudie mittels Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	22
2.2.8	Qualitative DNA/Protein-Bindungsstudie mittels Supershift-EMSA	23

3	Ergebnisse.....	24
3.1	Expression der NF- κ B-Faktoren in unstimulierten und stimulierten HD- und LCAL-Zellen.....	24
3.1.1	Stimulation der HD- und LCAL-Zellen mit PMA-Ionomycin.....	24
3.1.2	Stimulation der HD- und LCAL-Zellen mit Anti-CD30-Antikörper.....	29
3.2	<i>In-vitro</i> -Analyse der spezifischen DNA-Bindung von NF- κ B-Faktoren in HD- und LCAL-Zellen.....	31
3.2.1	Die nukleäre Bindungsaktivität der NF- κ B-Faktoren in HD- und LCAL-Zellen.....	31
3.2.2	Die Zusammensetzung der NF- κ B-Bindungs-Komplexe in HD- und LCAL-Zellen.....	32
4	Diskussion.....	36
4.1	Unterschiede in der Art der konstitutiven NF- κ B-Zusammensetzung zwischen HD- und LCAL-Zellen.....	36
4.2	Unterschiede in der Art der NF- κ B-Aktivierung zwischen HD- und LCAL-Zellen.....	37
4.3	Unterschiede bezüglich der Ursprungszellen und zellulären Entwicklungsstufen zwischen HD- und LCAL-Zellen.....	38
4.4	Unterschiede in der Art der NF- κ B-Zusammensetzung und -Aktivierung als Hinweis auf Proliferation bzw. Apoptose in HD- und LCAL-Zellen.....	39
4.5	Ausblick.....	41
5	Zusammenfassung.....	42

1 Einleitung

1.1 Maligne Lymphome: das Hodgkin-Lymphom und das großzellige anaplastische Lymphom

Maligne Lymphome sind lymphozytäre Neoplasien, die entweder innerhalb oder außerhalb des lymphatischen Gewebes auftreten können. Nach morphologischen Kriterien werden sie in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome eingeteilt.

Das klassische Hodgkin-Lymphom (HD-Lymphom) zeichnet sich aus durch große atypische einkernige Blasten (Hodgkin-Zellen), mehrkernige Riesenzellen (Reed-Sternberg-Zellen) und ein entzündliches Begleitinfiltrat aus Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Fibroblasten, Histiozyten und Plasmazellen. Primär sind vor allem Lymphknoten, seltener extranodale Gewebsstrukturen betroffen. Es werden morphologisch hauptsächlich vier Subtypen der HD-Lymphome unterschieden: nodulär-lymphozytenreiche, nodulär-sklerosierende, gemischtzellige und lymphozytenarme HD-Lymphome. Nach der WHO-Klassifikation gehören die drei letztgenannten Lymphomarten zum sogenannten klassischen Hodgkin-Lymphom (Jaffe, 2001). Um den zellulären Ursprung der Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen (HD-Zellen) zu bestimmen, wurden ihre Antigen-Rezeptor-Gene analysiert (Küppers, 1998). HD-Zellen können sowohl T-Zell-Marker (z. B. CD2 und CD4), B-Zell-Marker (z. B. CD19 und CD20) als auch myeloische Marker (z. B. CD15 und c-fms) exprimieren. 1982 entdeckten Schwab und Stein auf Hodgkin-Zellen und Reed-Sternberg-Zellen ein neues Molekül, das Ki-1-Antigen, das später CD30 benannt wurde.

Non-Hodgkin-Lymphome sind maligne Neoplasien, die sich von unterschiedlich hoch differenzierten überwiegend der B- und T-Zellreihe angehörigen Lymphozyten herleiten. Sie kommen als nodale und extranodale Lymphome oder als Leukämien vor. Die Benennung erfolgt in der Regel nach dem vorherrschenden Zelltyp. Neben zytologischen Kriterien und der zellulären Herkunft spielt die Aggressivität der Non-Hodgkin-Lymphome – hoch- und niedrigmaligne – in der Kiel-Klassifikation bei der Einteilung eine Rolle. Man nimmt an, dass sich diese Neoplasien aus lymphozytären Entwicklungsstufen der normalen Hämatopoese entwickeln.

Stein et. al. beschrieben 1985 eine neue Lymphomkategorie mit der Bezeichnung großzelliges anaplastisches Lymphom („large cell anaplastic lymphoma“, LCAL). Großzellige anaplastische Lymphome sind durch ihre anaplastische Morphologie, das kohäsive Wachstumsmuster der Blasten, die Infiltration der Lymphknotensinus und die starke, perinukleär betonte, positive Immunreaktion mit dem CD30-Antigen auf allen neoplastischen Zellen charakterisiert. Der Phenotyp kann der von T-, B- oder Null-Zellen sein (Morris, 2001). Neben den Gemeinsamkeiten sind die unterschiedlichen LCALs heterogen, was Zytologie, Antigenprofil und klinisches Erscheinungsbild bei Patienten betrifft. Dies führte zur Einteilung in verschiedene morphologische, immunphänotypische und klinische Unterformen des LCALs. Unterschieden werden das primär systemische, das primär kutane und das sekundäre LCAL (Stein, 2000). Ferner wurden morphologische und immunphänotypische Überlappungen mit dem klassischen Hodgkin-Lymphom beschrieben (Stein, 2000).

1.2 CD30-positive Zellen

Das Molekül CD30 (Ki-1) wird auf Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen als Oberflächenrezeptor exprimiert (Schwab und Stein, 1982). Stein identifizierte 1985 mit dem CD30-Antikörper eine neue Kategorie von Non-Hodgkin-Lymphomen, definierte es morphologisch und nannte es CD30-positives, großzellig anaplastisches Lymphom.

CD30 wird nicht nur auf HD- oder LCAL-Zellen gefunden, sondern auch auf ruhenden und insbesondere aktivierten B- und T-Lymphozyten sowie auf einigen neoplastischen Zellen anderer hämatologischer und nicht hämatogener Tumoren.

CD30 ist nur selten auf Zellen des peripheren Blutes anzutreffen. Ein variabler Anteil (3 - 31 %) von Lymphozyten im peripheren Blut trägt den CD30-Oberflächenrezeptor. Viele dieser Zellen zählen zu den CD8-positiven T-Zellen (Agrawal, 1996). Shanebeck wies 1995 auch auf ruhenden B-Lymphozyten den Oberflächenrezeptor CD30 nach.

In normalem lymphatischem Gewebe gibt es eine kleine Population CD30-positiver Zellen, meist große mononukleäre Zellen interfollikulär in der Nähe von B-Zell-Follikeln oder am Rande von Keimzentren (Stein, 1985). Außerdem identifizierte Romagnani 1998 CD30-positive Zellen in der Milz und im Thymusmark, häufig den Hassal'schen Körperchen benachbart.

CD30 wird auf T-Zellen des T-Helferzell-2-Typs (Th2-Zelltyp) exprimiert. Auf Th0- und Th1-Zellen ist CD30 kurzzeitig nach *in-vitro*-Stimulation nachweisbar (Bengtsson, 1995; DelPrete, 1995; Romagnani, 1997). Ferner wird CD30 *in vitro* in virusinfizierten T- und B-Lymphozyten exprimiert, zum Beispiel durch Epstein-Barr-Virus, HIV, HTLV-I oder -II (Stein, 1985). CD30-Rezeptoren finden sich außerdem auf NK-Zellen (Cambiaggi, 1993), Makrophagen in einem späten Differenzierungsstadium (Andresen, 1989), Endothelzellen (Rudolph, 1993) und Dezidualzellen (Ito, 1994). Einige solide Tumore exprimieren CD30: embryonale Karzinome (Pallesen, 1988; Ferreiro, 1994; Latza, 1995), gelegentlich Melanome (Schwartz, 1989) und einige Seminome (Hittmair, 1996). Damit ist der Aktivierungsmarker CD30 zwar nicht spezifisch für Lymphome oder bestimmte Lymphomtypen, aber der Nachweis einer starken oberflächlichen und zytoplasmatischen positiven Reaktion ist charakteristisch für HD- und großzellig anaplastische Lymphome.

1.3 Der CD30-Rezeptor

Der Oberflächenrezeptor CD30 wird der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren) zugeordnet, zu der mehr als zehn unterschiedliche Rezeptoren gezählt werden (Durkop 1992, Smith, 1994). Den TNF-Rezeptoren Fas, CD30, TNFR1 und TNFR2 wird eine duale Rolle zugeschrieben. So kann die Aktivierung dieser Rezeptoren je nach Zelltyp, Differenzierungsstadium und Transformationszustand der Zelle und der Anwesenheit anderer Stimuli zur Proliferation, aber auch zur Apoptose führen.

TNF-Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine, gekennzeichnet durch eine Serie von drei bis vier cysteinreichen Regionen in der extrazellulären Domäne (Barclay, 1993; Smith, 1994), die an der Bindung von Liganden beteiligt sind (Welcher, 1991; Baldwin, 1992; Marsters, 1992). Der Aktivierung durch Ligandenbindung folgt eine Trimerisierung bzw. Multimerisierung der Rezeptorproteine (Banner, 1993). Außer membrangebundenen Rezeptorkomplexen gibt es auch lösliche Formen (Baker, 1996).

Der CD30-Rezeptor ist ein 120 kD großes phosphoryliertes Transmembran-Glykoprotein (Froese, 1987; Nawrocki, 1988). Das menschliche CD30-Gen ist wie andere Mitglieder der TNF-Rezeptoren-Familie (TNFR2, OX40) auf Chromosom 1p36 lokalisiert (Fonatsch, 1992). Der menschliche CD30-Rezeptor besteht aus

595 Aminosäuren (AS). Die Proteinanalyse ergab, dass der CD30-Rezeptor ein Führungspeptid („leader peptid“) aus 18 AS besitzt. Der extrazelluläre Anteil des CD30-Rezeptors besteht aus 365 AS, der transmembrane aus 24 AS und die cytoplasmatische Domäne aus 188 AS (Durkop, 1992). Die Vorläuferform von ca. 84 kD wird im Golgi-Apparat in seine endgültige Form umgewandelt (Froese, 1987; Nawrocki, 1988). CD30 bildet nach Ligandenbindung einen trimeren Komplex (Gedrich, 1996).

Die lösliche Form von CD30 hat ein geringeres molekulares Gewicht als der membrangebundene Rezeptor von nur 84 kD und entsteht wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen CD30-Moleküls (Josimovic-Alasevic, 1989).

Wie andere TNF-Rezeptoren weist CD30 extrazellulär sechs cysteinreiche Regionen auf (Durkop, 1992). Die intrazelluläre Domäne ist spezifisch für CD30 (Gruss, 1995), was darauf hindeutet, dass Differenzen im Signalmechanismus zwischen den unterschiedlichen Mitgliedern der TNF-Rezeptoren-Familie bestehen (Smith, 1994). So besitzt der CD30-Rezeptor keine „Todesdomäne“ (Feinstein, 1995), wie sie für den TNF1- und Fas-Rezeptor charakteristisch ist. Vier funktionell unabhängige Subdomänen der C-terminalen Region im intrazellulären Teil von CD30 interagieren mit verschiedenen TRAF-Faktoren (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor), die für die Signalweiterleitung in der Zelle entscheidend sind und unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren (Horie, 1998).

1.4 Die unterschiedlichen Rollen des CD30-Rezeptors

Die CD30-Aktivierung führt zu unterschiedlichen Effekten bei menschlichen CD30-positiven Zellen. Wie *In-vitro*-Analysen zeigten, kann CD30 sowohl Differenzierung, Aktivierung, Proliferation, als auch Zelltod induzieren, jeweils in Abhängigkeit von dem Zelltyp, dem Differenzierungs- und Transformationsstadium der Zelle und von der Anwesenheit anderer Stimuli (Gruss, 1994; Lee, 1996).

Nach der CD30-Aktivierung in T-Lymphozyten nimmt die Proliferation von T-Lymphozyten nach T-Zell-Rezeptor-Stimulierung zu (Smith, 1994). CD30 hat demnach die Funktion eines co-stimulierenden Rezeptors bei der sekundären Proliferationsantwort von T-Lymphozyten (Gilfillan, 1998). CD30-defiziente Mäuse

zeigen einen Defekt der negativen Selektion von Thymozyten. Dies legt nahe, dass CD30 in Thymozyten eine proapoptotische Funktion besitzt (Amakawa, 1996). In transgenen Mäusen, die CD30 in T-Lymphozyten überexprimieren, wird nach CD30-Aktivierung ebenfalls Apoptose ausgelöst. Bei B-Lymphozyten von Mäusen führt die CD30-Aktivierung *in vitro* zum Wachstum und zur Differenzierung (Shanebeck, 1995). Dieses Verhalten ist jedoch in menschlichen B-Lymphozyten nicht reproduzierbar. Der Aktivierung von CD30 folgen signifikant unterschiedliche Antworten in CD30-positiven Lymphom-Zelllinien. Smith et al. (1993) zeigten, dass CD30 die Proliferation in T-Zell-ähnlichen HDLM-2-Zellen stimulierte, aber keine Auswirkung auf die Proliferation von B-Zell-ähnlichen KMH-2- und L428-Zellen hatte. Jedoch wurde in der CD30-positiven LCAL-Zelle nach CD30-Stimulierung Apoptose induziert. Gruss et al. (1994) konnten nachweisen, dass nach CD30-Aktivierung die T-Zell-ähnlichen HD-Zellen HDLM-2 und L540 proliferierten, KMH-2- und L428-Zellen keine Veränderung zeigten, wohingegen in sieben von acht CD30-positiven LCAL-Zelllinien die Apoptose eingeleitet wurde. Hsu et al. (2000) fanden dagegen, dass CD30 die Proliferation in KMH-2- und L428-Zellen stimulierte und nur in einem Teil der von ihnen untersuchten LCAL-Zellen die Proliferation gehemmt wurde. Hübinger et al. (2001) und Levi et al. (2001) wiesen keine Apoptose nach CD30-Aktivierung in LCAL-Zelllinien nach, sondern einen Zellzyklusarretierung. Sie konnten zeigen, dass nach CD30-Aktivierung die Expression der Gene abnahm, die für die Zellzyklus-regulierende Proteine kodieren.

1.5 Die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie

Die Transkriptionsfaktoren der Rel/NF- κ B-Familie spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Akuten-Phase-Reaktion und der Entzündungsreaktionen, bei der Lymphozyten-Aktivierung, beim Zellwachstum, bei der Differenzierung, der Apoptoseregulation und der Entstehung verschiedener Tumoren, besonders solchen hämatologischen Ursprungs (Baeuerle 1994; Pahl, 1999). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in fast allen Säugerzellen vorkommt. Er wurde zuerst 1986 als ein nukleärer Faktor beschrieben, der in B-Zellen an der Transkription der Ig κ -Kette beteiligt ist (Sen, 1986). Bisher wurden in Säugetieren fünf verschiedene Untereinheiten der NF- κ B-Faktoren gefunden: p50/p105, p52/p100, p65 (RelA), c-Rel und RelB. Allen NF- κ B-Faktoren gemeinsam ist eine homologe DNA-Bindungs/Dimerisations-Domäne,

die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD) von ca. 300 AS Länge. Diese Domäne vermittelt die Dimerbildung mit anderen NF- κ B-Proteinen, die Bindung an I κ B (NF- κ B-Inhibitoren), den Transport in den Zellkern sowie die DNA-Bindung.

Die NF- κ B-Faktoren werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Proteine p50 und p52 in der ersten Gruppe werden aus Vorläufermolekülen (p105 und p100) synthetisiert und durch Abspaltung des C-terminalen Molekülteils aktiviert. Dieser C-Terminus besitzt Ankyrin-, „Repeats“, die charakteristisch für NF- κ B-Inhibitoren, den I κ Bs, sind. Dementsprechend können p105 und p100 als I κ Bs fungieren.

Zur zweiten Gruppe der NF- κ B-Faktoren gehören c-Rel, p65 und RelB, die über ihre transaktivierende Domänen an der Expression von κ B-regulierten Genen beteiligt sind. Mit Ausnahme von RelB können alle NF- κ B-Untereinheiten Homo- und Heterodimere bilden. RelB bildet keine Homodimere, sondern nur Heterodimere mit p50, p52 und p65. Der p65/RelB-Komplex ist jedoch transkriptionell inaktiv (Marienfeld, 2003). Abhängig vom Zelltyp und dem Aktivierungsstadium der Zelle findet man unterschiedliche Homo- bzw. Heterodimere im Zytoplasma und Kern.

In den meisten unstimulierten Zellen sind die NF- κ B-Faktoren gebunden an I κ Bs im Zytoplasma (Baeuerle und Baltimore, 1988). Es existieren unterschiedliche I κ B-Proteine (I κ B α , β , ϵ , Faktor Bcl3 und die carboxyterminalen Anteile von p105 und p100), welche unterschiedliche Affinität für bestimmte NF- κ B-Komplexe besitzen, jeweils leicht unterschiedlich reguliert und gewebspezifisch exprimiert werden (Karin, 1999). Ungefähr 150 unterschiedliche Stimuli (z.B. IL-1, TNF- α , Ionophor, Phorbolster) können die Degradation von I κ B-Proteinen induzieren. Der Abbau von I κ B-Molekülen setzt NF- κ B frei, die dann in den Zellkern translozieren können. Die Degradation von I κ B-Proteinen ist komplex und läuft über mehrere Stufen ab: Phosphorylierung der I κ B-Proteine an spezifischen Aminosäuren durch den I κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex) gefolgt von der Polyubiquitinierung und schließlich die eigentliche Degradation im 26S-Proteasom (Mellits, 1993; Palombella, 1994; Orian, 1995). Der IKK-Komplex besteht aus den beiden katalytisch aktiven Untereinheiten IKK- α und IKK- β sowie der regulierenden Untereinheit IKK- γ und nimmt eine Schlüsselfunktion in der NF- κ B-Aktivierung ein (Karin, 1999). Ein weiterer NF- κ B-Signalweg wurde von Xiao et al. (2001) und Senftleben et al. (2001) aufgezeigt. Die

Abspaltung des I κ B-ähnlichen C-Terminus von p100 wird über die NF- κ B-aktivierende Kinase (NIK-Kinase) in Abhängigkeit von der IKK- α -Kinase induziert.

Im Zellkern regulieren die NF- κ B-Dimere die Expression verschiedener Gene (Pahl, 1999).

Im Folgenden werden einige beispielhaft genannt:

Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6 und IL-13,

Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF,

Akute-Phase-Proteine wie CRP und Angiotensinogen,

Immunrezeptoren wie CD48, MHC Klasse I und die TCR β -Kette,

Transkriptionsfaktoren wie *c-myc*, p53, *junB*, c-Rel und RelB,

Zelladhäsionsmoleküle wie ELAM-1 und ICAM-1,

virale Proteine und Regulatoren der Apoptose wie Bfl1/A1, Bcl-xL und der Fas-Ligand.

Außerdem wird die Transkription des NF- κ B-Inhibitors I κ B α induziert (Sun, 1993).

In bestimmten Zelltypen, wie z. B. B-Zellen, einigen Neuronen (Kaltschmidt, 1994), menschlichen Thymozyten (Korner, 1991), Sertoli-Zellen (Delfino und Walker, 1998) und in vielen Tumorzellen (Rayet, 1999), ist NF- κ B konstitutiv aktiviert. Eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung konnte in LCAL-Zellen nicht nachgewiesen werden (Bargou, 1996), ist jedoch ein molekulares Charakteristikum von HD-Zellen. Die konstitutive NF- κ B-Aktivität entsteht durch die konstitutive Aktivierung von Signalkinasen oder durch Mutationen der I κ B-kodierenden Gene, die beide zur Inaktivierung der I κ B-Untereinheiten führen (Rayet, 1999). Bei manchen HD-Zellen scheinen Mutationen des I κ B α -Gens zu konstitutiver NF- κ B-Aktivität zu führen (Wood, 1998; Cabannes, 1999; Emmerich, 1999; Krappmann, 1999; Jungnickel, 2000). Die Mutationen produzieren nicht funktionsfähige oder instabile I κ B α -Proteine. Jedoch finden sich in den meisten HD-Zellen keine derartigen Mutationen, obwohl diese Zellen eine konstitutive NF- κ B-Aktivität zeigen. In allen untersuchten Fällen waren IKKs konstitutiv aktiviert, was zu einer schnellen Degradation der I κ B α -Proteine führte (Krappmann, 1999). Außerdem scheint die Überexpression des CD30-Rezeptors mit der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in HD-Zellen zusammenzuhängen. Liganden-unabhängige Signale durch den überexprimierten CD30-Rezeptor induzieren die

konstitutive NF- κ B-Aktivität in diesen Zellen (Horie, 2002). In HD-Zellen nimmt die konstitutive NF- κ B-Aktivität eine Schlüsselfunktion beim Schutz vor dem Zelltod ein und scheint beim deregulierten Wachstum eine Rolle zu spielen (Bargou, 1997; Hinz, 2001). Die konstitutive nukleäre Aktivität von NF- κ B in HD-Zellen kann nicht durch einen einzigen Defekt, der allen HD-Zellen gemeinsam wäre, erklärt werden. Sie ist eher Folge einer Deregulation auf verschiedenen Ebenen des NF- κ B-Signalweges.

1.6 Die CD30-vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Die Bindung des CD30-Liganden (CD30L) oder eines agonistischen CD30-spezifischen Antikörpers an CD30 führt zu einer schnellen und anhaltenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dies wiesen Biswas et al. (1995) und McDonald et al. (1995) für T-Zellen nach. Das durch CD30 aktivierte NF- κ B besteht hauptsächlich aus p50 und p65. Die CD30-vermittelte NF- κ B-Aktivierung induziert verschiedene Gene, die eine NF- κ B-Bindungsstelle in ihren Promotoren haben (Pahl, 1999; Hinz 2002).

CD30 bildet nach Ligandenbindung eine trimerische Form. Jedes Rezeptorprotein enthält mehrere TRAF-Bindungsstellen, die dafür verantwortlich sind, dass sich eine Vielzahl an zell- oder stimulusspezifischer CD30-Signalkomplexe ausbilden können.

Nach CD30-Aktivierung interagiert die zytologische Domäne mit unterschiedlichen Signalmolekülen. Vier verschiedene TRAF-Moleküle – TRAF1, 2, 3 und 5 – können unabhängig voneinander und als Komplexe binden. TRAF-Proteine dienen als Adaptormoleküle, die mit weiteren Signalproteinen interagieren, was letztlich zur NF- κ B-Aktivierung führt.

Die zytoplasmatische Domäne von CD30 besteht aus mindestens vier funktionell unabhängigen Einheiten, die zum Teil TRAF-Proteine binden und jeweils eine vergleichbare NF- κ B-Aktivierungsfähigkeit besitzen. Zwei kurze Aminosäuresequenzen (Bindemotive) im C-terminalen Bereich von CD30 (PHYPEQET (AS 558-565) und MLSVEEEGKE (AS 576-585)) binden sowohl TRAF1 als auch TRAF2. TRAF3 geht lediglich eine Verbindung mit dem ersten Motiv ein (Gedrich, 1996; Duckett, 1997). Aizawa et al. (1997) fanden eine weitere Aminosäuresequenz EPPLGSC (AS 566-572), die TRAF5 bindet. Duckett et al. (1997) beschrieben ein nahe der zytoplasmatischen Membran gelegenes Teilstück (AS 410-531), welches NF- κ B TRAF-unabhängig

induzieren kann. Das gleiche gilt für eine weitere Rezeptordomäne (AS 519-538) (Horie, 1997).

TRAF3 hemmt NF- κ B, während alle anderen TRAFs NF- κ B aktivieren (Ansieau, 1996; Aizawa, 1997; Duckett, 1997). TRAF2 aktiviert NF- κ B durch Interaktion mit der NF- κ B-aktivierenden Kinase (NIK) (Malinin, 1997). TRAF2 kann auch eine weitere MAP3-Kinase, nämlich MEKK1, aktivieren, welche selektiv IKK- β aktiviert, was wiederum zur NF- κ B-Aktivierung führt (Nakano, 1998).

CD30 vermittelt eine schnelle und anhaltende NF- κ B-Aktivierung. In der T-Zell-ähnlichen HD-Linie L540 wird NF- κ B nach CD30-Stimulation induziert. Dieser Vorgang scheint mit einer Proteinkinase-C-Aktivierung (PKC- Aktivierung) verbunden zu sein (McDonald, 1995). Nach CD30-Aktivierung kommt es auch in einer zweiten HD-Zelllinie, HDLM-2, zur nukleären Translokation von NF- κ B. Der NF- κ B-Komplex besteht aus p50-, p65- und c-Rel (Gruss, 1996).

1.7 NF- κ B und die Kontrolle der Apoptose

NF- κ B-Faktoren sind an der Kontrolle der Apoptose in normalen Zellen und in Tumorzellen beteiligt. Dabei kann NF- κ B sowohl Apoptose-hemmend als auch Apoptose-fördernd wirken.

In einer Vielzahl von Zellen zeigt NF- κ B eine antiapoptotische Wirkung. Von unterschiedlichen Forschergruppen wurde 1996 berichtet, dass NF- κ B in HeLa- und Jurkat-Zellen die apoptotische Antwort auf verschiedene Stimuli, wie TNF- α , Daunomycin und ionisierende Strahlung, hemmt (Beg, 1996; Liu, 1996; Van Antwerp, 1996; Wang, 1996). Spätere Untersuchungen zeigten, dass NF- κ B primäre nicht transformierte Zellen und Tumorzellen vor Apoptose schützen kann (Barkett, 1999; Beg, 1995; Wang, 1999).

Außerdem kommt in einigen Zelltypen NF- κ B konstitutiv im Zellkern vor, wie in B-Lymphozyten und einigen lymphatischen Tumorzellen (Rayet, 1999). Die Hemmung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in HD-Zellen durch stabiltransfiziertes adenovirales I κ BAN, induziert Apoptose. I κ BAN ist eine dominant-negative I κ B α -Mutante, der bestimmte N-terminale Aminosäuren fehlen, die für die signalabhängige I κ B-Degradation notwendig sind (Bargou, 1997; Hinz, 2001). Eine konstitutive NF- κ B-

Aktivität schützt die WEHI-231-Zelle, eine unreife B-Lymphomzelle, vor der Apoptose. NF- κ B aktiviert ein antiapoptotisches Genprogramm. So werden z. B. TRAF1 und TRAF2, cIAPs und antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie, wie A1/Bfl1 und Bcl-xL, aktiviert (Pahl, 1999). Bcl-xL scheint eine herausragende Rolle in HD-Zellen zu haben. Bcl-xL hemmt die mitochondriale Cytochrom-c-Freisetzung, die für die Apoptose von entscheidender Bedeutung ist (Vander Heiden, 1997).

NF- κ B kann in seltenen Fällen auch proapoptotisch wirken. Nach Induktion des T-Zellrezeptors in reifen T-Zellen aktiviert NF- κ B die Expression des Fas-Liganden (FasL). Der Promoter des Fas-Liganden hat κ B-Bindungsstellen. FasL aktiviert Fas, einen Rezeptor der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorfamilie von Todesrezeptoren, der den Zelltod induziert (Matsui, 1998; Kasibhatla, 1999). In Jurkat-Zellen wird nach Behandlung mit Ionomycin und Phorbol ester der Fas-Rezeptor NF- κ B-abhängig verstärkt gebildet (Chan, 1999). NF- κ B spielt auch eine apoptotisch-fördernde Rolle in der anti-CD3-vermittelten Apoptose in CD4⁺CD8⁺-Thymozyten, was mit der Abnahme von Bcl-xL zusammenzuhängen scheint (Hettmann, 1999). Andererseits konnten Wang et al. (1999) zeigen, dass nach Glucocorticoidstimulation von unreifen Thymozyten die NF- κ B-Bindungsaktivität und damit die *c-myc*-Expression abnimmt. Der NF- κ B/*c-myc*-Signalweg wird also für das Überleben dieser Zellen gebraucht. In diesen Thymozyten hat NF- κ B offensichtlich sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen. In embryonalen Fibroblasten von Vögeln führt die Überexpression von c-Rel zur Apoptose dieser Zellen (Abbadie, 1993). Dies steht im Gegensatz zu den beobachteten antiapoptotischen Verhalten von c-Rel in WEHI 231-Zellen (Wu, 1996). Über die proapoptotischen NF- κ B-Zielgene ist wenig bekannt.

Um die spezifische Rolle jedes einzelnen NF- κ B-Faktors *in vivo* zu verstehen, wurden bei Mäusen gezielt diese Gene ausgeschaltet. Für jeden der bekannten NF- κ B-Faktoren gibt es defiziente Mäuse. Eine kritische Rolle nimmt p65 in der Entwicklung der Maus ein. Bei p65-defizienten Mäusen kommt es zur massiven Apoptose von Leberzellen, so dass die Mäuse im Embryonalstadium sterben. Dementsprechend wird p65 benötigt, um die Apoptose in normalen Leberzellen zu hemmen (Beg, 1995; Doi, 1997). Die Expression von c-Rel ist vor allem auf hämatopoetische Zellen beschränkt (Carrasco, 1994). Aber die Inaktivierung dieses Gens hat wenig Auswirkung auf die Entwicklung der hämatopoetischen Zellen (Kontgen, 1995). Bei c-Rel-defizienten Mäusen ist die

Proliferation und die Antwort auf mitogene Stimuli in B- und T-Zellen eingeschränkt. Die Expression von IL-2 ist stark reduziert. Auch p50-defiziente Mäuse entwickeln sich regelhaft und bilden normale B-Zellen. Allerdings finden sich bei ihnen Defekte in der Zellantwort, z. B. nach Stimulation mit dem Mitogen LPS (Sha, 1995). Die Expression von RelB ist weitgehend auf das lymphatische Gewebe beschränkt. Bei Mäusen, die kein RelB bilden können, läuft die Entwicklung bis zum zehnten Tag normal ab. Danach entstehen multiple Defekte: Atrophie des Thymus, Splenomegalie, Hyperplasie des Knochenmarks und Fehler in der Immunantwort (Weih, 1995). Außerdem scheint die Entwicklung der dendritischen Zellen gestört zu sein (Burkly, 1995). Untersuchungen an p50- und c-Rel-defizienten Mäusen zeigen, dass p50, nicht aber c-Rel, für das Überleben ruhender B-Zellen notwendig ist, während mitogen-transformierte B-Zellen dafür beide Faktoren benötigen (Grumont, 1998).

Ob NF- κ B Apoptose-hemmend oder -fördernd auf die Zelle wirkt, scheint davon abzuhängen, um welchen Zelltyp es sich handelt, welche Stimuli auf die Zelle einwirken und welche NF- κ B-Faktoren aktiviert werden.

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der Oberflächenrezeptor CD30 ist charakteristisch für HD- und LCAL-Zellen und kann in Lymphomzellen prinzipiell zwei unterschiedliche Signalwege aktivieren, die entweder zur Apoptose oder zur Proliferation führen. Die Aktivierung von NF- κ B ist eine wesentliche Funktion der CD30-Signalübertragung. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in HD-Zellen NF- κ B konstitutiv aktiv ist. Zum Verständnis der CD30-Funktion in malignen Lymphomen soll in dieser Arbeit die differentielle NF- κ B-Aktivierung in HD-Zellen im Vergleich zur differentiellen NF- κ B-Aktivierung in LCAL-Zellen nach CD30-Stimulation untersucht werden. Als Modell wurden die HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 sowie die LCAL-Zelllinien Karpas und Del für diese Untersuchung eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Puffer

3 × Bindungspuffer für EMSA-Experimente

HEPES pH 7,9	60 mM
DTT	3 mM
EDTA	3 mM
KCl	150 mM
Ficoll	12 %

Blue Juice (DNA-Proben-Ladepuffer)

Glycerin	80 %
EDTA	100 mM
Bromphenolblau	0,025 %
Xylenyanol F	0,025 %

0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,6)

Na ₂ CO ₃	30 mM
NaHCO ₃	48 mM

Kernextrakt-Puffer A

HEPES pH 7,9	10,0 mM
KCl	10,0 mM
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	1,0 mM
PMSF	0,5 mM

Kernextrakt Puffer C

HEPES pH 7,9	20,0 mM
KCl	0,4 M
EDTA	1,0 mM
EGTA	1,0 mM

DTT	1,0 mM
PMSF	1,0 mM

Laemli-Ladepuffer für SDS-PAA-Gele

Tris pH 6,8	100 mM
SDS	4,0 %
Bromphenolblau	0,2 %
Glycerin	20,0 %
DTT	0,5 %

10 × Laemli-Laufpuffer für SDS-PAA-Gele

Tris	30,3 g/l
Glycin	144,2 g/l
SDS	10,0 g/l

Laufpuffer für EMSA-Experimente

5 × TBE	80 ml
Aqua dest.	920 ml

PAA-Gel für EMSA-Experimente

30 % Bis-/Acrylamid	20 ml
5 × TBE-Puffer	8 ml
Aqua dest.	72 ml
10 % APS	500 µl
TEMED	50 µl

PBS (pH 7,2)

NaCl	137,0 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10,0 mM
KH ₂ PO ₄	1,75 mM

Sammelgel 5 % für SDS-PAA-Gele

Aqua dest.	6,80 ml
30 % Bis-/Acrylamid	1,70 ml
1,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS	0,10 ml
10 % APS	0,10 ml
TEMED	0,01 ml

„Stripping“-Puffer für Westernblot-Analyse

β-Mercaptoethanol	100,0 mM
SDS	2 %
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM

1 × TBE

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

20 × TBS (pH 7,6)

Tris	48,4 g
NaCl	160,0 g

1 × TBS-Tween für Westernblot-Analyse

Tween20 in 1 × TBS	0,05 %
--------------------	--------

Transferpuffer für Westernblot-Analyse

Tris	0,48 M
Glycin	0,39 M
Methanol	20 %

Trenngel 8 % für SDS-PAA-Gele

Aqua dest.	11,60 ml
30 % Bis-/Acrylamid	6,70 ml
1,5 M Tris pH 8,8	6,25 ml
10 % SDS	0,25 ml
10 % APS	0,25 ml
TEMED	0,02 ml

2.1.2 Chemikalien und Reaktionssysteme

Material (alphabetisch)	Herstellerfirma
Ampicillin (Endkonzentration 40 µg/ml)	Hoechst
BioMax MR-1 Film	Kodak
Bis-/Acrylamid 19:1	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Bradford Reagens 5x	BioRad
Bromphenolblau	Merck
BSA Fraktion V Rinderserumalbumin	Boehringer

Material (alphabetisch)	Herstellerfirma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
ECL, Western blotting analysis system	Amersham
Ethanol	Roth
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco
Ionomycin (5 mM)	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Nitrocellulose Membranen	Schleicher & Schül
Penicillin G	Gibco
Poly (dI/dC)	Boehringer
Ponceau S (Färbemittel)	Sigma
Rainbow (Proteingrößenmarker)	Amersham
Röntgenfilm (BioMax MR-1 Film)	Kodak
RPMI 1640	Gibco
TEMED	Roth
TPA (100 µg/ml in Ethanol)	Sigma
Trypanblau 0,1 %	Gibco
Tween 20	Roth

2.1.3 Antikörper

Für Westernblots und Supershifts	
Anti-CD30	Anti-CD30 M44 (Gruss, 1994) Monoklonaler Antikörper, Maus IgG
Anti-p65	SC-109X (Santa Cruz) Polyklonales Kaninchen-IgG, 200 µg/0,1 ml
Anti-c-Rel	SC-70X (Santa Cruz) Polyklonales Kaninchen-IgG, 200 µg/0,1 ml
Anti-RelB	SC-226X (Santa Cruz) Polyklonales Kaninchen-IgG, 200 µg/0,1 ml
Anti-p50	Ab 1141 (Dr. N. Rice, NCI, Frederick, MD)
Anti-p52	06-413 (Upstate Biotechnology Incorporated) Polyklonales Kaninchen-IgG
Für Westernblot	
Anti-p50	Ab 1141 (Dr. N. Rice, NCI, Frederick, MD)
Für Supershift-EMSA	
Anti-p50	SC-114X (Santa Cruz) Polyklonales Kaninchen IgG, 200 µg/0,1 ml

2.1.4 Oligonucleotid

TCEd_{A>C}

5` - GACCAAGAGGGGATTCACCCCTAAATC - 3`

Die verwendete Oligonukleotidprobe enthält eine sogenannte „consense“ NF-κB-Bindungsstelle, abgeleitet vom κB-Enhancer-Element des IL-2-Promotors.

2.1.5 Kulturmedien

Nährmedium

RPMI 1640	500 ml
Penicillin	5 ml
Glutamin	5 ml
FCS	50 ml

Einfriermedium

10 % FCS-RPMI 1640	50 ml
DMSO	20 ml
FCS	30 ml

2.1.6 Zellkulturen

2.1.6.1 Morbus-Hodgkin-Zellen

HDLM-2

Drexler et al. (1986) gewannen die menschliche Morbus-Hodgkin-Zelllinie aus der Pleuraflüssigkeit eines 74-jährigen Mannes mit Morbus Hodgkin (nodulär-sklerosierend, Stadium IV).

Immunologische Charakterisierung:

CD2 +, CD3 -, CD4 (+), CD5 -, CD6 -, CD7 -, CD8 -, CD13 -, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD21 -, CD25 +, CD30 +, HLA-DR +, TCRα/β -, TCRγ/δ -

KMH-2

Kamesaki et al. (1986) gewannen die menschliche Morbus-Hodgkin-Zelllinie aus der Pleuraflüssigkeit eines 34-jährigen Mannes mit Morbus Hodgkin (gemischtzelliger Typ, Stadium IV).

Immunologische Charakterisierung:

CD3 -, CD13 (+), CD14 (+), CD15 +, CD19 -, CD21 +, CD25 -, CD30 +, HLA-DR +

2.1.6.2 LCAL-Zellen

Del

Barbey et al. (1990) gewannen die menschliche maligne Lymphom-Zelllinie aus der Pleuraflüssigkeit eines 12-jährigen Patienten mit großzelligem anaplastischen Lymphom.

Immunologische Charakterisierung:

CD3 -, CD5 -, CD7 -, CD10 -, CD11b -, CD13 +, CD14 -, CD15 +, CD19 -, CD20 -, CD25 +, CD30 +, CD33 +, CD34 -, CD68 -, CD71 +, HLA-DR +, smIgG -, smIgM -

Karpas

Fisher et al. (1988) gewannen die Zelle aus dem peripheren Blut eines 25-jährigen Patienten mit CD30-positivem großzellig-anaplastischen Lymphom. Die Zelle trägt – als Folge der Translokation t(2;5) – das NPM-ALK-Fusionsgen.

Immunologische Charakterisierung:

CD2 -, CD3 -, CD4 +, CD5 +, CD6 -, CD7 (+), CD8 -, CD10 -, CD13 +, CD14 -, CD15 -, CD19 -, CD20 +, CD25 +, CD30 +, CD33 -, CD34 -, CD71 +, HLA-DR

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivieren, Einfrieren und Auftauen der Zellen

2.2.1.1 Kultivieren der Zellen

Die Zellen wachsen in Suspensionskultur in 90 % RPMI 1640 mit 10 % fötalem Kälberserum bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.1.2 Einfrieren der Zellen

Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase eingefroren. Von 10×10^6 bis 25×10^6 Zellen werden für jede angesetzte Zellkultur abzentrifugiert. Diese werden in 2 ml Mediengemisch bestehend aus 50 % RPMI und 50 % Einfriermedium aufgenommen und in Tiefkühlröhrchen abgefüllt. Die Zellen werden bei -80 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.3 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen werden schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, der Röhrcheninhalt wird in 8 ml Nährmedium überführt. Danach werden die Zellen abzentrifugiert, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen, in 5 ml RPMI (mit 10 % FCS) aufgenommen und bei 37 °C mit 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.2 Stimulation der Zellen

2.2.2.1 Anti-CD30-Stimulation

Die Zellen werden in Sechs-Loch-Kulturplatten mit immobilisierten Antikörpern stimuliert. Dazu werden die Platten, die mit 1 ml Antikörperlösung in Carbonatpuffer (Endkonzentration 51 ng/ml bei Anti-CD30) gefüllt sind, über Nacht im Kühlraum bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag werden 5 ml Zellsuspension dazugegeben und bei 37 °C über eine und vier Stunden inkubiert.

2.2.2.2 PMA und Ionomycin-Stimulation

Die Zellen werden in der 50 ml Zellsuspension durch Zugabe von 500 ng TPA und $0,5\text{ }\mu\text{mol}$ Ionomycin stimuliert und nach einer und vier Stunden Inkubation bei 37 °C verarbeitet.

2.2.3 Verarbeitung der Zellen

Die Zellen werden in Zentrifugationsgefäße überführt und anschließend fünf Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellsediment mit 10 ml PBS gewaschen.

2.2.4 Präparation von Kern- und Zytoplasmaproteinen

Alle Schritte erfolgen mit vorgekühlten Lösungen auf Eis im Kühlraum bei 4 °C. Das Zellsediment wird in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und 20 Sekunden bei 15.000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wird mit 100 µl Puffer A gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation bei 15.000 rpm wird das Zellsediment in 200 bis 600 µl Puffer A (Volumen abhängig von der Zellzahl) für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Zur Zellyse wird die Suspension circa zehnmal mittels einer Spritze durch eine Kanüle gezogen (1-ml-Spritze mit 26G 3/8 0,45 × 10 Kanüle). Anschließend wird eine Minute lang bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Zytoplasmafraktion, das Sediment die Kerne. Der Überstand wird 30 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, um einen möglichst reinen Zytoplasmaextrakt zu gewinnen. Der Überstand entspricht den reinen zytoplasmatischen Proteinen. Das Kernsediment wird dreimal mit 200 µl Puffer A gewaschen, wobei es jeweils resuspendiert und für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert wird. Nach Zugabe von 30 bis 60 µl Puffer C wird die Suspension mindestens eine Stunde unter kräftigem Schütteln inkubiert. Schließlich wird sie fünf Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält den Kernextrakt, der entweder schockgefroren oder sofort weiterverarbeitet wird.

2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Eichgerade werden mit Rinder-Serumalbumin (1mg/ml) von 1 bis 10 µg erstellt. Je Reaktionsgefäß werden 800 µl H₂O, 200 µl Bradford-Reagenz und 1 µg Proteinextrakt angesetzt, die gut durchmischt werden. Von den Proben werden immer Zweifachbestimmungen durchgeführt. In einem Spektralphotometer wird die Extinktion bei 595 nm gegen Puffer als Leerwert gemessen.

2.2.6 Proteinanalyse mittels Westernblot

Proteinextrakte werden hierbei aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt und danach elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen transferiert.

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAA-Gele) bestehen aus einem 5 % Sammelgel und einem 8 % bis 10 % Trenngel. Zuerst wird das Trenngel gegossen und mit 500 µl H₂O-gesättigtem Isobutanol überschichtet. Die PAA-Konzentration ist abhängig vom Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine. Mit 8 % bis 10 % PAA-Konzentrationen lassen sich Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 bis 150 kDA gut auftrennen. Die Proteinextrakte werden mit mindestens einem Volumen 2 × Laemli-Probenpuffer gemischt und auf das Sammelgel gegeben. Bei 70 V bis 100 V werden die Proteine für circa zwei bis vier Stunden elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.6.2 Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Die aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch über Nacht (12 bis 18 Stunden) im Kühlraum (4 °C) bei 50 V auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wird eine Transferkassette benötigt. Auf zwei Lagen Whatman-Papier (3 mm), das mit Transferpuffer getränkt ist, wird das Trenngel aufgebracht. Die ebenfalls mit Transferpuffer durchfeuchtete Nitrozellulose-Membran wird möglichst luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Dann folgen zwei weitere Lagen Whatman-Papier. Das sogenannte „Sandwich“ wird mit einer 10-ml-Pipette glattgestrichen. Die Kassette wird dann in eine Transferkammer gestellt, wobei die Membran auf der Anodenseite zu liegen kommen muss.

2.2.6.3 Detektion der Proteine mit Antikörpern („Immundetektion“)

Ponceau-S-Färbung

Zunächst wird die Membran mit Ponceau S gefärbt, um die Gleichmäßigkeit der Ladung zu kontrollieren. Ponceau S wird durch zweimaliges Waschen zehn Minuten lang mit 1 × TBS-Tween entfernt.

Blockierung unspezifischer Bindungen

Die Filter werden eine Stunde in 5%igem Magermilchpulver in 1 × TBS-Tween bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen. Die Membran wird anschließend insgesamt 30 Minuten (zweimal fünf und zweimal zehn Minuten) mit 1 × TBS-Tween gewaschen.

Antikörper-Inkubation

Die Membran wird ein bis zwei Stunden in 5 ml der ersten Antikörperlösung inkubiert.

Antikörperverdünnungen

Die Konzentration des Antikörpers in der Antikörperlösung ist abhängig von der Bindungseigenschaft des Antikörpers. Die Antikörper werden nach Vorschrift verdünnt. Üblicherweise wird eine Verdünnung von 1:1000 (1 µg/ml in Magermilchlösung) verwendet. Ausnahmen gelten für Anti-c-Rel und Anti-p52.

Anti-p65	1:1000
Anti-RelB	1:1000
Anti-p50	1:1000
Anti-c-Rel	1:750
Anti-p52	1:200

Nach dem Waschen des Filters in 1 × TBS-Tween wird er mit dem zweiten Antikörper maximal 45 Minuten inkubiert. Dieser zweite indirekte Antikörper Anti-Kaninchen (1:2000 verdünnt) ist ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper. Anschließend wird die Membran wieder gewaschen.

ECL-System und Autoradiographie

Das ECL-System ist eine lichtemittierende, nicht radioaktive Methode zur Detektion immobilisierter Antigene, die an Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-gekoppelte Antikörper gebunden sind. Die Lumineszenz kann durch Exposition eines Röntgenfilmes detektiert werden.

Mit dem ECL-System wird die Membran für genau eine Minute inkubiert. Nach Abtropfen der überflüssigen Substratlösung wird die Membran in Haushaltsfolie blasenfrei eingeschlagen und in einer Röntgenkassette mit dem Röntgenfilm BioMax MR-1 exponiert. Die Expositionslänge richtet sich nach der Stärke des Signals. Die Membran lässt sich danach bei 4 °C in der Folie aufbewahren.

Ablösung der Antikörper von der Nitrozellulose-Membran („Stripping“)

Damit die Membran für eine weitere Immundetektion genutzt werden kann, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Dabei wird die Membran 30 Minuten mit dem

„Stripping“-Puffer in einem Schüttelwasserbad bei 55 °C inkubiert. Danach wird der Filter zweimal zehn Minuten in 1 × TBS-Tween gewaschen.

2.2.7 Quantitative DNA/Protein-Bindungsstudie mittels Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die *In-vitro*-Analyse mittels EMSA dient dem quantitativen Nachweis spezifischer DNA-Bindungen von Transkriptionsfaktoren.

Für EMSA werden 6%ige nicht-denaturierende Polyacrylamidgelle verwendet. Diese Lösung wird sofort nach Zugabe der Radikalbildner und somit Polymerisationsstarter TEMED und APS luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten mit 1-mm-Abstandhalter gegossen. Zunächst wird ein Vorlauf mit 0,4 × TBE als Laufpuffer durchgeführt, bis circa 11 mA Stromstärke erreicht wird. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 bis 300 Volt (konstante Voltage) circa drei Stunden lang.

2 bis 5 µg Kernprotein werden beim EMSA eingesetzt. Das Volumen der einzelnen Ansätze sollte 10 bis 15 µl betragen. Die Volumina werden mit Puffer C ausgeglichen. Das Reaktionsgemisch enthält 1 µg Poly (dI/dC) pro 4 µg Kernproteine, um unspezifische Protein-DNA-Bindungen zu reduzieren.

Die Inkubationsgemische setzen sich wie folgt zusammen:

Proteinextrakt	x µl
4-fach-Bindepuffer	2,5 µl
Poly (dI/dC)	1,0 µl
4.000 bis 10.000 Cpm der markierten Probe	
H ₂ O	ad 10 µl

Die folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt.

2 bis 5 µg Proteinextrakt einer ³²P-markierten Oligonukleotidprobe wird mit 4.000 bis 10.000 cpm fünf Minuten inkubiert und auf einem nativem 6%igem PAA-Gel bei 200 V/15 cm aufgetrennt. Zur Kontrolle des Gellaufs wird eine substratfreie „Blue-Juice“-Probe in einer separaten Spur aufgetragen. Die Gele werden getrocknet und eine Autoradiographie wird durchgeführt.

2.2.8 Qualitative DNA/Protein-Bindungsstudie mittels Supershift-EMSA

Die *In-vitro*-Analyse mittels Supershift-EMSA dient dem qualitativen Nachweis spezifischer DNA-Bindungen von Transkriptionsfaktoren. Sie gibt Auskunft über die Zusammensetzung der NF- κ B-Komplexe, die in verschiedenen Zelltypen an spezifische DNA-Sequenzen binden.

Zur Durchführung von Supershift-EMSA werden zum obigen Ansatz je 1 μ l der NF- κ B-spezifischen Antikörper (1 μ g/ μ l) zugegeben und die Inkubationszeit auf 20 bis 30 Minuten verlängert. Wenn der spezifische Antikörper an ein Protein bindet, wird die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Komplexe weiter reduziert, d.h. ein so genannter „supershift“ findet statt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der NF- κ B-Faktoren in unstimulierten und stimulierten HD- und LCAL-Zellen

Zum Verständnis der CD30-Funktion in malignen Lymphomen sollte in dieser Arbeit die NF- κ B-Verteilung und NF- κ B-Induktion in HD- und LCAL-Zellen untersucht werden.

3.1.1 Stimulation der HD- und LCAL-Zellen mit PMA-Ionomycin

Als Modell für HD-Zellen wurden sowohl HDLM-2-Zellen (T-Lymphozyten-ähnlich), als auch KMH-2-Zellen (B-Lymphozyten-ähnlich) verwendet. Stellvertretend für die LCAL-Zellen wurden die Zelllinien Del und Karpas eingesetzt.

Die Zellen wurden zunächst mit PMA-Ionomycin für eine Stunde und vier Stunden stimuliert. Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor. Phorbolester, wie PMA, ahmen die Wirkung von Diacylglycerol nach, indem sie an die Proteinkinase C (PKC) binden und sie aktivieren. Beide Stimuli sollen die T-Zellrezeptor-Stimulation lymphoider Zellen simulieren und führen zu einer starken NF- κ B-Aktivierung (Baltimore, 1986; Novak, 1990).

Nach Stimulation der Zellen wurden Zytoplasma- und Zellkern-Proteinextrakte hergestellt und zur Analyse der Rel-Proteine mittels Westernblot-Analysen eingesetzt. Die Detektion der NF- κ B-Faktoren erfolgte mit Rel-Protein-spezifischen Anti-NF- κ B-Antikörpern. Es ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der NF- κ B-Translokation und damit hinsichtlich der Aktivierung nach PMA-Ionomycin-Stimulation zwischen den HD- und LCAL-Zelllinien.

Die LCAL-Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich der subzellulären Verteilung von p65. In unstimulierten Karpas-Zellen war p65 kaum im Zellkern detektierbar. Im Gegensatz dazu war in unstimulierten Del-Zellen p65 konstitutiv im Zellkern nachweisbar (Abb. 1a, Spur 1-6). In unstimulierten Zellen war in beiden Zelllinien p65 im Zytoplasma lokalisiert. Mit zunehmender Stimulationszeit wurde die Expression von

p65 in Karpas-Zellen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma stärker. Durch die PMA-Ionomycin-Stimulation wurde die Expression von p65 induziert, und es kam zu einer Translokation dieses Faktors in den Zellkern. Bei Del-Zellen nahm die Expression erst nach vier Stunden und nur im Zytoplasma deutlich zu (Abb. 1a, Spur 1-6). Dagegen wurde in den HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 p65 sowohl im Zytoplasma als auch im Kern stark exprimiert. In HD-Zellen war p65 also konstitutiv aktiv. In HDLM-2 stieg die Konzentration von p65 nach einer Stunde im Zytoplasma an. Im Kern blieb sie jedoch konstant (Abb. 1a, Spur 7-12).

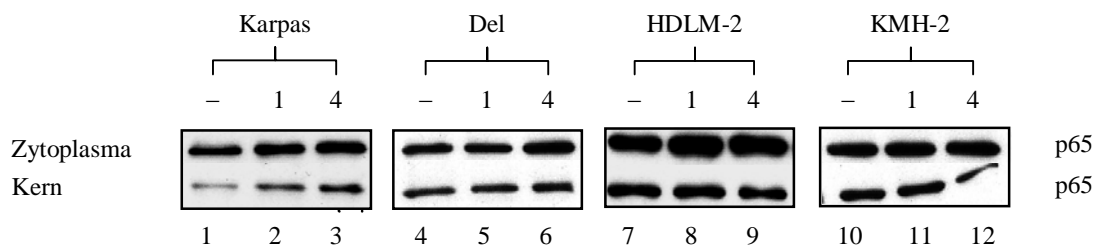


Abb. 1a: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen p65.

Abb. 1a-1d: Die Zellen waren entweder unstimuliert (Spur 1, 4, 7 und 10) oder mit PMA-Ionomycin für eine Stunde (Spur 2, 5, 8 und 11) und vier Stunden (Spur 3, 6, 9, und 12) stimuliert. Pro Spur wurden vom Proteinextrakt 6 µg bei Karpas, 10 µg bei HDLM-2, je 11 µg bei Del und bei KMH-2 eingesetzt.

In den LCAL-Zellen Karpas und Del wurde der NF-κB-Faktor p50 konstitutiv im Zellkern nachgewiesen. Die Konzentration von p50 und der Vorläuferform p105 stieg in Karpas-Zellen nach einer Stunde, in Del-Zellen nach vier Stunden im Zytoplasma an. Bei Del-Zellen fiel im Nukleus die p50-Konzentration nach einer Stunde ab, um nach vier Stunden wieder ihren Ausgangswert zu erreichen (Abb. 1b, Spur 1-6). In HD-Zellen war p50 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert und wurde auch nicht im Zytoplasma induziert. Dies wird beispielhaft für HD-Zellen an HDLM-2 gezeigt (Abb. 1b, Spur 7-9).

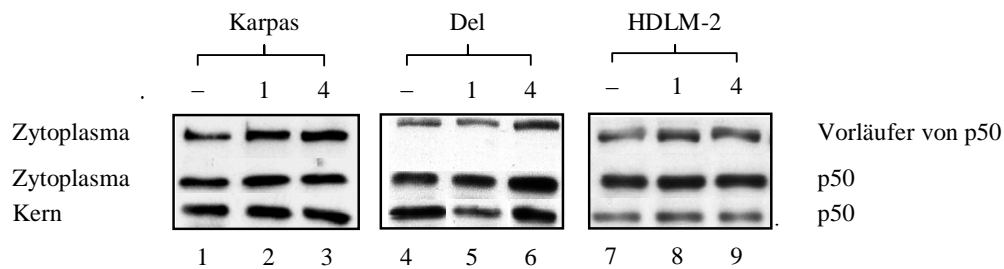


Abb. 1b: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen p50

Ausgeprägt unterscheiden sich die HD-Zellen von den LCAL-Zellen in Bezug auf RelB. In Del- und Karpas-Zellen wurde RelB sowohl konstitutiv im Kern als auch im Zytoplasma stark exprimiert. RelB war in unstimulierten und in stimulierten Karpas-Zellen etwa gleichstark im Zytoplasma und im Zellkern detektierbar. Bei Del nahm die RelB-Konzentration im Zytoplasma nach einer Stunde ab, nach vier Stunden stieg sie wieder deutlich an. Im Zellkern der Del-Zellen nahm die RelB-Konzentration nach einer Stunde zu, um nach vier Stunden wieder etwas abzufallen. RelB-haltige Komplexe wurden also nach einer Stunde Stimulation aktiviert (Abb. 1c, Spur 1-6). Dagegen konnte in den HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 in beiden Zellfraktionen keine RelB-Expression nachgewiesen werden. Dies wird beispielhaft an KMH-2-Zellen gezeigt (Abb. 1c, Spur 7-9).

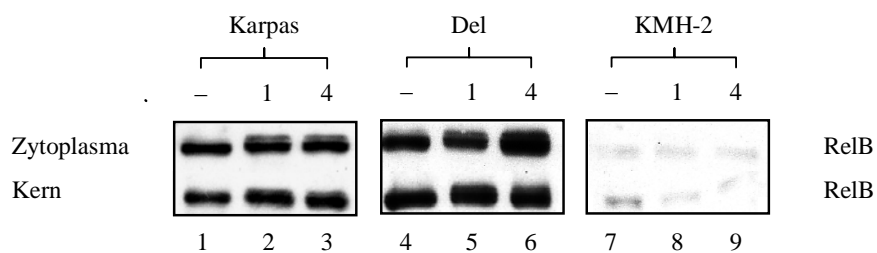


Abb. 1c: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen RelB

Die Expression von c-Rel wurde in den LCAL-Zelllinien Karpas und Del induziert. Bei beiden Zelltypen konnte ein Anstieg von c-Rel im Zytoplasma nachgewiesen werden. Bei Karpas-Zellen stieg dabei die c-Rel-Konzentration nach einer Stunde und nach vier Stunden an. Bei Del-Zellen nahm die c-Rel-Konzentration erst nach vier Stunden

Stimulation zu. Es kam dabei auch zu einer allerdings schwachen nukleären Translokation (Abb. 1d, Spur 1-6). In den unstimulierten HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 war c-Rel konstitutiv im Zellkern lokalisiert, wobei die c-Rel-Konzentration in den HDLM-2-Zellen deutlich schwächer war. Bei HDLM-2-Zellen war c-Rel vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert und stieg hier nach einer Stunde leicht an. KMH-2-Zellen zeigten dagegen deutliche Signale nach einer und nach vier Stunden in beiden Fraktionen. Auch hier stieg die zytoplasmatische Konzentration nach einer Stunde an (Abb. 1d, Spur 7-12).

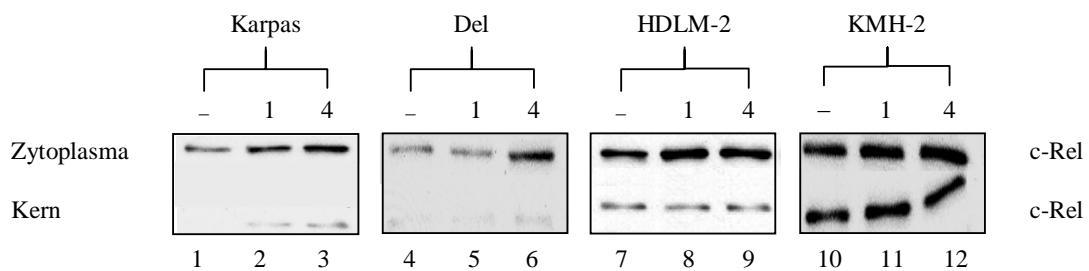


Abb. 1d: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen c-Rel

In Del-Zellen wurde p52 in konstanter Stärke im Zytoplasma exprimiert, während die Konzentration des „Vorläufers“ p100 nach einstündiger und vierstündiger Stimulation zunahm. Im Zellkern waren bei der Immundetektion nur schwache Signale nachweisbar (Abb. 1e, Spur 1-3). In HDLM-2-Zellen war p52 nur schwach im Zytoplasma exprimiert, während im Zellkern kein p52 nachweisbar war. In KMH-2-Zellen war ebenfalls keine p52-Expression nachweisbar (Abb. 1e, Spur 4-9).

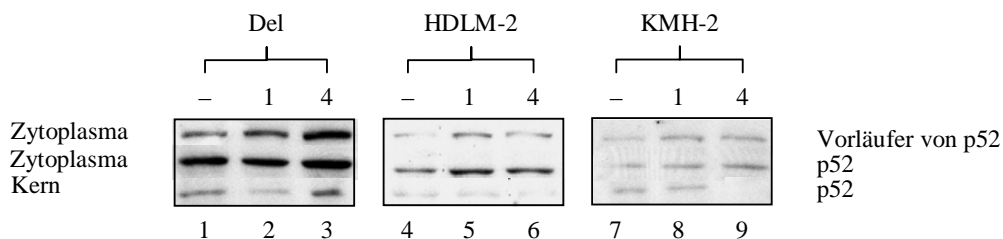


Abb. 1e: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen p52

Die zwei HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 zeigten eine konstitutive Aktivierung von p65, p50 und c-Rel. Nach PMA-Ionomycin-Stimulation konnte keine Zunahme der Proteinkonzentrationen in den Kernextrakten festgestellt werden. RelB war in den untersuchten HD-Zelllinien nicht nachweisbar. Im Zytoplasma von HDLM-2 fand sich p52 lediglich in schwacher Konzentration. In KMH-2 war überhaupt kein p52 nachzuweisen.

Die zwei LCAL-Zelllinien Karpas und Del zeigten eine konstitutive Aktivierung von p65, p50 und RelB. Außerdem wurde in Karpas-Zellen p65 aktiviert. Ferner konnte eine schwache Induktion der c-Rel-Expression in Karpas und Del-Zellen nachgewiesen werden.

NF- κ B	Zellfraktion	LCAL-Zellen		HD-Zellen	
		Karpas	Del	HDLM-2	KMH-2
p65	Kern	Induziert Translokation	konstitutiv	konstitutiv	konstitutiv
	Zytoplasma	Expression induziert	Expression Zunahme n. 4 h	starke Expression Zunahme n. 1 h	starke Expression
p50/p105	Kern	konstitutiv	konstitutiv	konstitutiv schwache Expression	konstitutiv schwache Expression
	Zytoplasma	Expression Zunahme n. 1 h	Expression Zunahme n. 4 h	Expression	Expression
RelB	Kern	konstitutiv	konstitutiv Translokation n. 1 h	keine Expression	keine Expression
	Zytoplasma	starke Expression	starke Expression Abnahme n. 1 h	keine Expression	keine Expression
c-Rel	Kern	schwache Translokation	schwache Translokation	konstitutiv schwache Expression	konstitutiv starke Expression
	Zytoplasma	induziert	induziert	Expression Zunahme n. 1 h	starke Expression Zunahme n. 1 h
p52/p100	Kern	keine Expression	schwache Expression	keine Expression	keine Expression
	Zytoplasma	keine Expression	Expression	schwache Expression	keine Expression

Tabelle 1 Stimulation der HD- und LCAL-Zellen mit PMA-Ionomycin (Übersicht der Immunoblot-Analysen)

3.1.2 Stimulation der HD- und LCAL-Zellen mit Anti-CD30-Antikörper

Die CD30-positiven HD- und LCAL-Zellen wurden mit dem spezifischen agonistischen Anti-CD30-Antikörper M44 für eine Stunde und vier Stunden stimuliert. Danach wurde aus den Zellen die Kern- und Zytoplasma-Proteinextrakte fraktioniert und auf ihren Gehalt an NF- κ B-Faktoren mittels Westernblot-Analysen analysiert.

Bei der LCAL-Zelllinie Karpas fanden sich deutliche p65-Akkumulationen in unstimulierten wie stimulierten Zellen in beiden Fraktionen, im Kern etwas schwächer als im Zytoplasma. Eine Induktion von p65 – wie nach PMA-Ionomycin-Stimulation – konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 2a, Spur 1-3). Bei der HD-Zelllinie HDLM-2 war p65 im Zytoplasma stark exprimiert, während im Nukleus keine p65-Expression nachweisbar war (Abb. 2a, Spur 4-6).

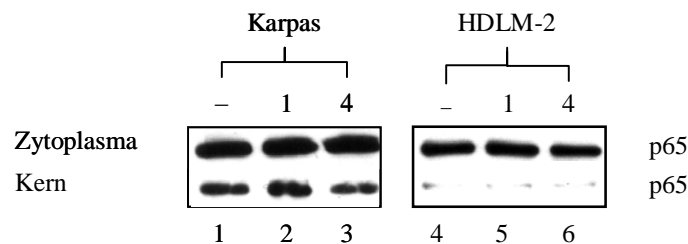


Abb. 2a: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen p65.

Abb. 2a-2c: Die Zellen waren entweder unstimuliert (Spur 1 und 4) oder mit Anti-CD30 eine (Spur 2 und 5) oder vier Stunden (Spur 3 und 6) stimuliert. Pro Spur wurden vom Proteinextrakt 6,5 μ g bei Karpas und 4,3 μ g bei HDLM-2 eingesetzt

In Karpas-Zellen wurde p50 etwa in gleicher Konzentration im Zytoplasma und im Kern gefunden, wobei im Kern eine Konzentrationsabnahme nach vier Stunden beobachtet wurde (Abb. 2b, Spur 1-3). In CD30-stimulierten HDLM-2-Zellen wurde p50 im Gegensatz zu den Befunden nach PMA-Ionomycin-Stimulation nur im Zytoplasma nachgewiesen (Abb. 2b, Spur 4-6).

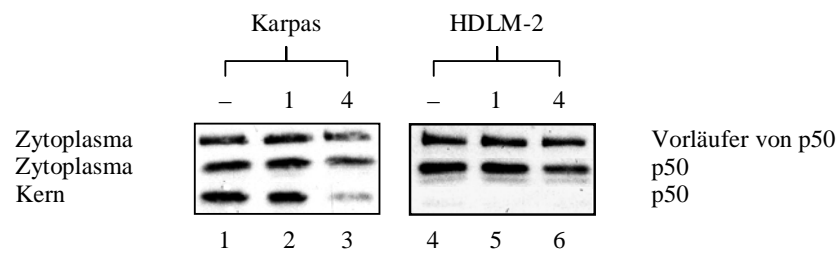


Abb. 2b: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen p50.

RelB änderte seine zytoplasmatische und nukleäre Konzentration nach CD30-Stimulation in Karpas-Zellen nicht (Abb. 2c, Spur 1-3).

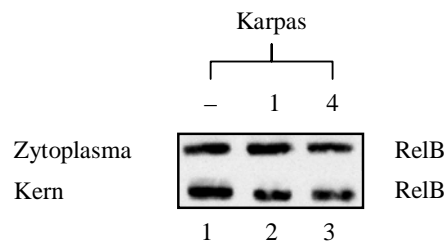


Abb. 2c: Immunoblot-Analysen von Zytoplasma- und Kern-Proteinextrakten mit einem spezifischen Antikörper gegen RelB.

NF- κ B	Zellfraktion	Karpas (LCAL-Zelle)	HDLM-2 (HD-Zelle)
p65	Kern	konstitutiv	keine Expression
	Zytoplasma	starke Expression	starke Expression
p50/p105	Kern	konstitutiv	keine Expression
	Zytoplasma	Expression	Expression
RelB	Kern	konstitutiv	nicht bestimmt
	Zytoplasma	Expression	nicht bestimmt

Tabelle 2 Stimulation der HD- und LCAL-Zellen mit Anti-CD30-Antikörper (Übersicht der Immunoblot-Analysen)

3.2 *In-vitro*-Analyse der spezifischen DNA-Bindung von NF- κ B-Faktoren in HD- und LCAL-Zellen

Westernblot-Analysen zeigten, dass sowohl in HD-Zelllinien als auch in LCAL-Zelllinien verschiedene NF- κ B-Faktoren konstitutiv im Zellkern vorliegen. Teilweise wurde nach PMA-Ionomycin-Stimulation die nukleäre Expression einzelner NF- κ B-Faktoren induziert (in Karpas-Zellen p65, in LCAL-Zellen c-Rel).

Die Bandshift-Experimente geben Auskunft über die funktionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren. In dieser Arbeit wurde die DNA-Bindung der NF- κ B-Faktoren in unstimulierten und mit PMA-Ionomycin stimulierten HD- und LCAL-Zellen untersucht. Mit Hilfe des Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) wurde die spezifische DNA-Bindung von NF- κ B-Faktoren quantitativ analysiert. In Supershift-Versuchen wurde dann qualitativ die Zusammensetzung der einzelnen NF- κ B-Bindungs-Komplexe untersucht. Als spezifische DNA-Probe wurde eine punktmutierte κ B-Erkennungssequenz aus dem Enhancermotiv des Interleukin-2-Promoters (TCED_{A>C}) verwendet.

3.2.1 Die nukleäre Bindungsaktivität der NF- κ B-Faktoren in HD- und LCAL-Zellen

Sowohl bei den HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 als auch bei den LCAL-Zellen Karpas und Del zeigte sich, dass NF- κ B bereits konstitutiv, d. h. in unstimulierten Zellen, an die DNA bindet. Die Komplexzusammensetzung unterschied sich jedoch zwischen den beiden unterschiedlichen Zellarten. In LCAL-Zellen waren ein langsam laufender Komplex (Komplex I) und ein Komplex mit höherer elektrophoretischer Mobilität (Komplex II) nachweisbar. In HD-Zellen fand sich dagegen nur Komplex I.

Im Vergleich der HD-Zellen HDLM-2 und KMH-2 war die konstitutive Bindungsaktivität von NF- κ B in HDLM-2-Zellen stärker als in KMH-2-Zellen. Ein deutlicher Anstieg des Komplexes I konnte nach Stimulation mit PMA-Ionomycin in den KMH-2-Zellen nachgewiesen werden. In HDLM-2-Zellen war die NF- κ B-spezifische DNA-Bindungsaktivität in unstimulierten Zellen größer als nach

einstündiger Stimulation mit PMA-Ionomycin, stieg aber nach vierstündiger Stimulation wieder deutlich an (Abb. 3, Spur 1-6).

Bei den LCAL-Zellen Del und Karpas war ebenfalls eine konstitutive DNA-Bindungsaktivität der NF- κ B-Faktoren nachweisbar. Hier waren zwei Komplexe (Komplex I und II) detektierbar. Nach Stimulation mit PMA-Ionomycin war ein signifikanter Anstieg der DNA-Bindung bei Del-Zellen nach vier Stunden und bei Karpas-Zellen bereits nach einer Stunde erkennbar (Abb. 3, Spur 7-12).

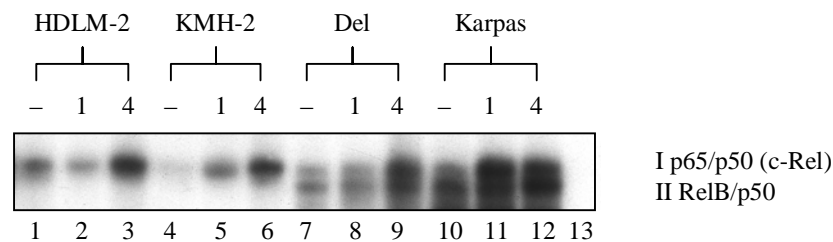


Abb. 3: EMSA mit Kern-Proteinextrakten aus PMA-Ionomycin-stimulierten HD- und LCAL-Zellen. Die Zellen waren entweder unstimuliert (Spur 1, 4, 7 und 10) oder mit PMA-Ionomycin eine Stunde (Spur 2, 5, 8 und 11) oder vier Stunden (Spur 3, 6, 9, 12) stimuliert. Pro Ansatz wurden 4,4 μ g Kernprotein-Extrakt eingesetzt. In Spur 13 wurde 100 ng des unmarkierten Oligonukleotides als spezifischer Kompetitor eingesetzt.

3.2.2 Die Zusammensetzung der NF- κ B-Bindungs-Komplexe in HD- und LCAL-Zellen

Bei den LCAL-Zelllinien Karpas und Del setzte sich der langsam laufende Komplex I aus p65/p50, der schneller laufende Komplex II aus RelB/p50 zusammen. c-Rel und p52 konnten nicht nachgewiesen werden.

Bei Karpas-Zellen zeigte sich eine schwache konstitutive p65/p50-DNA-Bindung (Komplex I), die aber nach einstündiger Stimulation mit PMA-Ionomycin anstieg. Nach vierstündiger Stimulation nahm dieser p65/p50-Komplex ab (Abb. 4a, Spur 2, 5, 8, 11, 14 und 17). In Karpas-Zellen ließen sich RelB/p50-Komplexe (Komplex II) sowohl konstitutiv als auch nach Stimulation mit PMA-Ionomycin nachweisen. Diese waren nicht induzierbar (Abb. 4a, Spur 4, 5, 10, 11, 16 und 17).

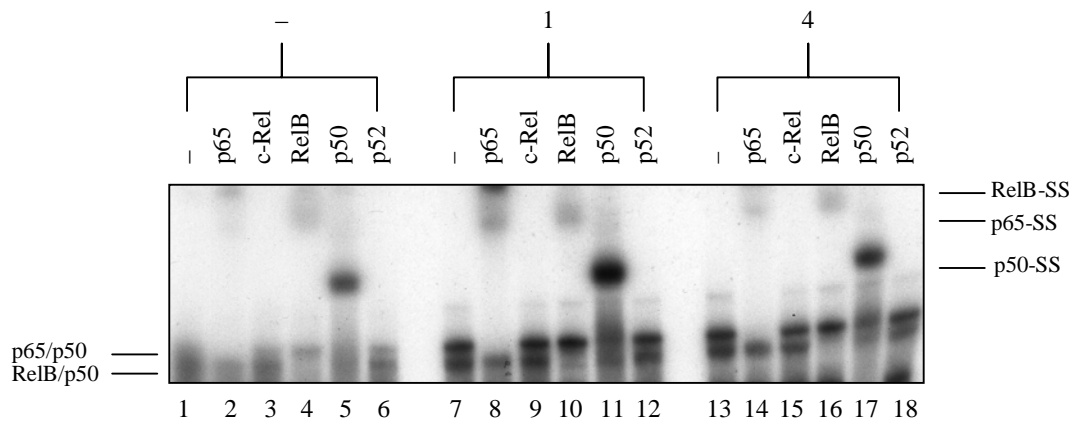


Abb. 4a: Supershift-Analysen mit Kern-Proteinextrakten aus Karpas-Zellen. Pro Ansatz wurde 3 μg Kernprotein-Extrakt eingesetzt.

Abb. 4a-d: Die Zellen waren entweder unstimuliert (Spur 1 bis 6) oder mit PMA-Ionomycin eine Stunde (Spur 7 bis 12) oder vier Stunden (Spur 13 bis 18) stimuliert. Jeweils 1 μl (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) der spezifischen Antikörperlösung wurde verwendet.

Bei der LCAL-Zelllinie Del verhielt sich die DNA-Bindung des p65/p50-Komplexes ähnlich wie in Karpas-Zellen, denn nach vier Stunden nahm die Bindungsaktivität leicht ab (Abb. 4b, Spur 2, 7 und 12). Das p50-spezifische Supershift-Signal nahm nach einstündiger Stimulation mit PMA-Ionomycin ab, um nach vier Stunden wieder anzusteigen (Abb. 4b, Spur 5, 10 und 15). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der Westernblot-Analysen.

Nach Inkubation mit einem RelB-spezifischen Antikörper kam es zur schwachen Reduktion der spezifischen Bande, die etwas schneller lief (Komplex II). RelB ist somit Bestandteil des Komplexes II und interagiert dabei vermutlich mit p50 (Abb. 4b, Spur 4, 9 und 14).

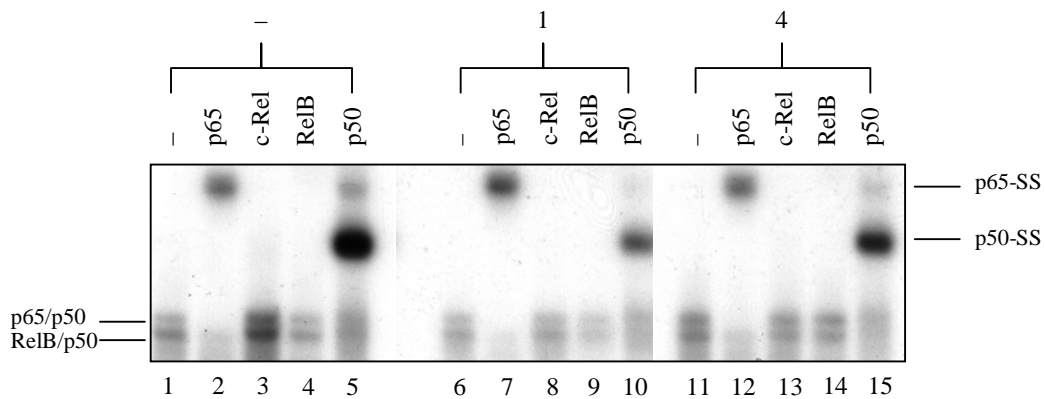


Abb. 4b: Supershift-Analysen mit Kernprotein-Extrakten aus Del-Zellen. Pro Ansatz wurden 4,4 µg Kernprotein-Extrakt eingesetzt.

In den HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 konnte das p65/p50-Heterodimer in Supershift-EMSA ebenfalls als Hauptkomponente des Komplexes I identifiziert werden. Zusätzlich trat ein weiterer Supershift mit dem c-Rel-spezifischen Antikörper auf, der auf einen weiteren Subkomplex – wahrscheinlich ein c-Rel/p50-Heterodimer – hinweist (Abb. 4c und Abb. 4d, Spur 3, 9 und 15). RelB/p50-Heterodimere konnten nicht nachgewiesen werden.

In HDLM-2-Zellen fiel die Bindungsaktivität des p65/p50-Komplexes nach einstündiger Stimulation ab, stieg aber nach vier Stunden wieder an (Abb. 4c, Spur 2, 5, 8, 11, 14 und 17).

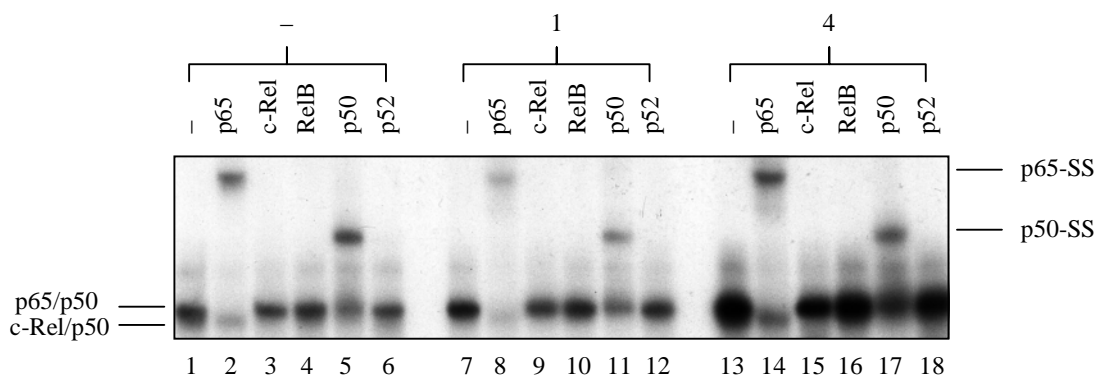


Abb. 4c: Supershift-Analysen mit Kern-Proteinextrakten aus HDLM-2-Zellen. Pro Spur wurden 4,4 µg Kernprotein-Extrakt eingesetzt.

Die KMH-2-Zellen zeigten eine mit HDLM-2-Zellen vergleichbare NF- κ B-spezifische DNA-Bindungsaktivität. Die Bindungsaktivität des p65/p50-Heterodimers stieg nach einer Stunde an und blieb dann vier Stunden konstant (Abb. 4d, Spur 2, 5, 8, 11, 14 und 17).

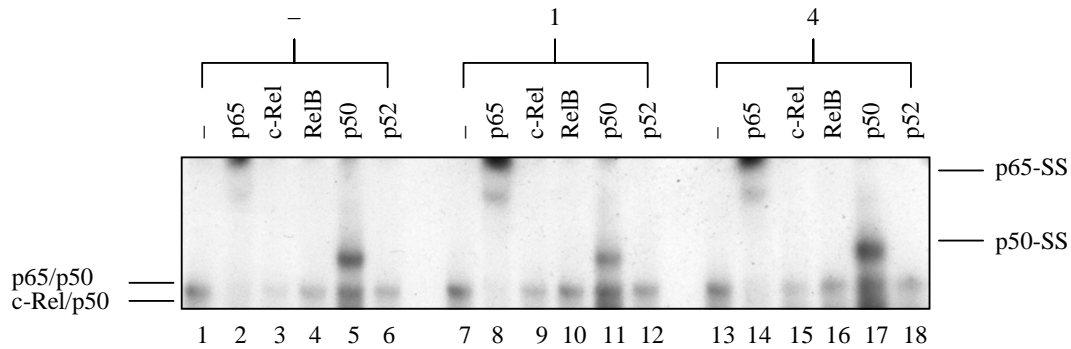


Abb. 4d: Supershift-Analyse mit Kern-Proteinextrakten aus KMH-2-Zellen. Pro Spur wurden 4 μ g Kernprotein-Extrakt eingesetzt.

Die NF- κ B-Bindungskomplexe in den untersuchten HD- und LCAL-Zelllinien unterscheiden sich grundlegend sowohl in ihrer Zusammensetzung und als auch in ihrer Induktionskinetik. Die Dimere in HDLM-2- und KMH-2-Zellen bestehen aus p65/p50 und c-Rel/p50. Bei Karpas- und Del-Zellen setzen sie sich aus p65/p50 und RelB/p50 zusammen. Dieser grundlegende Unterschied der NF- κ B-Aktivität könnte – zumindest zum Teil – das unterschiedliche Verhalten der Zelltypen nach CD30-Stimulation erklären.

	LCAL-Zellen		HD-Zellen	
	Karpas	Del	HDLM-2	KMH-2
NF-κB-Bindungs-komplexe	p65/p50 schwach konstitutiv Zunahme nach 1h, dann Abnahme (induziert)	p65/p50 konstitutiv Zunahme nach 1h, dann Abnahme (induziert)	p65/p50 Abnahme nach 1 h, dann Zunahme	p65/p50 Zunahme nach 1 h (induziert)
	RelB/p50 konstitutiv	RelB/p50	c-Rel/p50	c-Rel/p50

Tabelle 3 Die Zusammensetzung der NF- κ B-Bindungs-Komplexe in HD- und LCAL-Zellen (Supershift-Analysen)

4 Diskussion

Aus unseren Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass sich HD- und LCAL-Zellen deutlich hinsichtlich ihrer konstitutiven NF- κ B-Zusammensetzung, ihrer konstitutiven NF- κ B-Aktivität und ihrem NF- κ B-Aktivierungsmuster nach CD30-Stimulation unterscheiden.

4.1 Unterschiede in der Art der konstitutiven NF- κ B-Zusammensetzung zwischen HD- und LCAL-Zellen

Die Westernblot-Versuche ergaben, dass die HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 p50, p65 und c-Rel konstitutiv im Zellkern exprimieren. Dagegen wurden in den LCAL-Zelllinien Karpas und Del im Kern konstitutiv RelB aber auch p50 und p65 nachgewiesen. NF- κ B ist in HD- und LCAL-Zellen unterschiedlich konstitutiv transkriptionell aktiv. Wie aus Bandshift-Versuchen für HDLM-2 und KMH-2 hervorging, besteht ein konstitutiver NF- κ B-Komplex aus p65/p50-Heterodimeren. Des Weiteren fanden sich Hinweise auf einen weiteren Komplex bestehend aus c-Rel/p50-Heterodimeren. Im Vergleich der gewonnenen Daten mit den Angaben in der Literatur waren für LCAL-Zelllinien deutliche Unterschiede festzustellen. Bei Del und Karpas konnte eine konstitutive nukleäre NF- κ B-Aktivität bestehend aus zwei verschiedenen Heterodimeren nachgewiesen werden. Sowohl p65/p50- als auch RelB/p50-Dimere binden an die DNA.

Bargou et al. (1996 und 1997) wiesen sowohl in kultivierten als auch in primären HD-Zellen konstitutive NF- κ B-Aktivität nach, p65/p50-Heterodimere waren die vorherrschenden NF- κ B-Komplexe. Nur in wenigen Zelllinien, darunter HDLM-2 und KMH-2, wurde auch c-Rel konstitutiv im Kern gefunden werden. Wood et al. (1998) konnten jedoch keine konstitutive c-Rel-Aktivität in HDLM-2- und KMH-2-Zellen nachweisen. In LCAL-Zelllinien stellten Bargou et al. keine konstitutive nukleäre NF- κ B-Aktivität fest. Diese Ergebnisse wurden von anderen Forschergruppen bestätigt (Wood, 1998; Krappmann, 1999; Mir, 2000; Levi, 2001). Unsere Ergebnisse stimmen in Bezug auf HDLM-2 und KMH-2 mit den Ergebnissen von Bargou et al. überein,

unterscheiden sich aber deutlich hinsichtlich der Zellen Del und Karpas, bei denen wir sowohl konstitutiv aktive p65/p50- als auch RelB/p50-Dimere nachgewiesen haben.

4.2 Unterschiede in der Art der NF- κ B-Aktivierung zwischen HD- und LCAL-Zellen

Die Stimulation des Oberflächenrezeptors CD30 führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dies wurde in unterschiedlichen Zelltypen festgestellt (Biswas, 1995; McDonald, 1995), so auch in HD- und LCAL-Zellen. In den vorliegenden Westernblot-Analysen nach CD30-Stimulation mit dem Antikörper M44 wurde keine NF- κ B-Induktion in HD- oder LCAL-Zellen nachgewiesen.

Nach PMA-Ionomycin-Stimulation wird in Karpas-Zellen p65 induziert. Außerdem kommt es in Karpas- und Del-Zellen zu einer schwachen Induktion von c-Rel. In Del-Zellen fiel die p50-Konzentration im Kern nach einer Stunde ab und stieg nach vier Stunden wieder an. Im Zytoplasma stieg die p50-Konzentration nach vier Stunden an. In Del-Zellen scheint RelB nach einer Stunde in den Zellkern transloziert zu werden. Nach vier Stunden fiel im Kern die RelB-Konzentration wieder ab, stieg dafür aber im Zytoplasma stark an. Bei einigen NF- κ B-Faktoren kam es lediglich im Zytoplasma zu einer Konzentrationszunahme nach PMA-Ionomycin-Stimulation; die p65-Konzentration stieg in HDLM-2 und Del an, die p50-Konzentration nahm bei Karpas zu und die c-Rel-Konzentration stieg in HD-Zellen an.

Die funktionelle Aktivität der NF- κ B-Faktoren wurde in Bandshift-Analysen in unstimulierten sowie mit PMA-Ionomycin stimulierten Zellen untersucht. In allen untersuchten Zellen zeigte sich eine Zunahme der Bindungsaktivität der NF- κ B-Komplexe, jedoch mit unterschiedlicher Kinetik und Komplexzusammensetzung. Die Bindungsaktivität der p65/p50-Komplexe wird in allen Zellen durch PMA-Ionomycin-Stimulation beeinflusst. In den LCAL-Zellen kommt es nach vier Stunden Stimulation zur Aktivitätsabnahme der p65/p50-Komplexe. Dagegen nimmt in HDLM-2-Zellen die Bindungsaktivität nach vier Stunden, in KMH-2-Zellen nach einer Stunde zu. Die Komplexe mit der Komponente RelB in LCAL-Zellen bzw. c-Rel in HD-Zellen zeigen keine veränderte Bindungsaktivität nach PMA-Ionomycin-Stimulation.

Unsere Ergebnisse stimmen in einigen Punkten mit den Daten der unten angeführten Forschergruppen überein, teilweise widersprechen sie ihnen aber auch. Dies könnte an den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen wie z. B. Verwendung verschiedener Antikörper oder unterschiedlicher Dauer der Stimulation liegen. Bei Gruss et al. (1996) kam es in HDLM-2-Zellen nach Stimulation des CD30-Rezeptors mit dem spezifischen agonistischen monoklonalen Antikörper M44 innerhalb von zwei Stunden zu einer vermehrten Bindungsaktivität von p65, p50 und aber auch von c-Rel, danach fiel die Bindungsaktivität nach 24 Stunden wieder auf ihren Ausgangswert zurück. Mir et al. (2000) stimulierten zwölf Stunden die LCAL-Zelle Michel mit den agonistischen CD30-Antikörpern M44 und M67 und stellten keine Induktion von NF- κ B fest, wohingegen durch zwölfstündige PMA-Stimulation NF- κ B induziert wurde. Levi et al. (2001) verwendeten zur einstündigen CD30-Stimulation den monoklonalen Antikörper HeFi-1. Hierbei wurde in Karpas-Zellen NF- κ B schwach aktiviert, aber in KMH-2 blieb die NF- κ B-Expression unbeeinflusst. Krappmann et al. (1999) stimulierten HD-Zellen 45 Minuten mit dem Phorbol ester PMA. Dies führte zu keiner gesteigerten NF- κ B-spezifischen DNA-Bindung. Daraus zogen Krappmann et al. (1999) den Schluss, dass in unstimulierten HD-Zellen bereits eine maximale NF- κ B-Induktion vorliegt.

4.3 Unterschiede bezüglich der Ursprungszellen und zellulären Entwicklungsstufen zwischen HD- und LCAL-Zellen

Die Ursprungszellen, aus denen sich die Lymphomzellen ableiten, sind oft nicht exakt bestimmbar. In der überwiegenden Zahl der Fälle scheinen sich Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms aus B-Lymphozyten der Keimzentren zu entwickeln und nur in seltenen Fällen leiten sie sich von T-Lymphozyten ab (Kanzler, 1996; Staudt, 2000). NF- κ B ist im Verlauf der hämatopoetischen Differenzierung nur in spezifischen Stadien aktiv. Daher kann dieser Transkriptionsfaktor als Marker für verschiedene zelluläre Entwicklungsstufen dienen. Reife B-Lymphozyten besitzen in der Regel konstitutive nukleäre NF- κ B-Aktivität. Das vorherrschende konstitutiv-aktive Heterodimer ist dabei c-Rel/p50. Die induzierbare NF- κ B-Aktivität besteht hauptsächlich aus p65/p50-Heterodimeren (Liou, 1994; Miyamoto, 1994). In T-Lymphozyten sind p65 und c-Rel

hingegen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, während RelB-haltige NF- κ B-Komplexe auch im Kern vorhanden sind (Lernbecher, 1993).

Wie in unseren Westernblot-Analysen festgestellt werden konnte, befindet sich in den untersuchten HD-Zelllinien HDLM-2 und KMH-2 p50, c-Rel und p65 konstitutiv im Zellkern. Dies wäre ein Indiz dafür, dass die Stammzelle eine reife B-Zelle ist, da konstitutiv-aktive c-Rel und p50 für reife B-Zellen charakteristisch sind. Es weist aber auch mit dem konstitutiven p65 auf ein dereguliertes NF- κ B-System in diesen Zellen hin (Krappmann, 1999). Die HD-Zelle HDLM-2 wurde als T-Zell-ähnliche Zelle beschrieben (Diehl, 1990; Trümper, 1993). In den Untersuchungen unserer Arbeit war c-Rel in dieser Zelle überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, was ein Hinweis auf die T-Zell-Herkunft sein könnte. In der HD-Zelle KMH-2 befand sich c-Rel dagegen in hohem Maße konstitutiv im Zellkern, was, wie oben genannt, für B-Zellen typisch ist. In den hier untersuchten LCAL-Zelllinien Karpas und Del wurden im Kern konstitutiv RelB aber auch p50 und p65 nachgewiesen. In den unstimulierten Zellen fand sich c-Rel ausschließlich in Zytoplasma, was ihre T-Zell-Herkunft widerspiegeln dürfte.

4.4 Unterschiede in der Art der NF- κ B-Zusammensetzung und -Aktivierung als Hinweis auf Proliferation bzw. Apoptose in HD- und LCAL-Zellen

Dem CD30-Rezeptor werden verschiedene Rollen zugeschrieben. So reagierten Zellen nach seiner Aktivierung mit Apoptose, Proliferation oder zeigten keine Veränderung in ihrem Wachstum. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine Rolle bei der Kontrolle der Apoptose: Er kann Apoptose-hemmend als auch -fördernd wirken. Der CD30-Signalweg führt zu einer NF- κ B-Aktivierung. Andererseits wurde in HD- und LCAL-Zellen konstitutive NF- κ B-Aktivität nachgewiesen, die in HD-Zellen auf ein dereguliertes NF- κ B-System hinweist. Die Aktivierung von CD30 stimuliert in HDLM-2-Zellen die Proliferation, in KMH-2-Zellen hat sie keine Auswirkung und bei LCAL-Zellen führt sie zur Apoptose (Smith, 1993; Gruss, 1994). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kam es bei Hsu et al. (2000) zur Proliferation von KMH-2-Zellen nach CD30-Aktivierung. Hübinger et al. (2001) und Levi et al. (2001) wiesen eine Zellzyklusarretierung bei LCAL-Zellen nach.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Westernblot- und EMSA-Versuche zeigten, dass sich HD- und LCAL-Zellen in der Kinetik der p65/p50-Heterodimere und in der Expression der RelB- und c-Rel-Komplexe unterscheiden. RelB wird ausschließlich in LCAL-Zellen exprimiert und besitzt DNA-Bindungsaktivität. Dagegen kommt c-Rel nur in HD-Zellen konstitutiv nukleär vor.

Die Hemmung der konstitutiv aktiven NF- κ B-Faktoren in HD-Zellen induziert Apoptose (Bargou, 1997). Der antiapoptotische Effekt von p65 ist eindeutig belegt. In beiden HD-Zelllinien kommt es nach Stimulation zu einer Zunahme der p65/p50-Aktivität, was die Proliferation fördern dürfte. Außerdem könnte der konstitutive c-Rel/p50-Komplex in HD-Zellen entscheidend dafür sein, dass die Zellen vor der Apoptose geschützt werden. Zu c-Rel gibt es hinsichtlich Apoptose-fördernder oder -hemmender Eigenschaften unterschiedliche Aussagen in der Literatur. So ist bei ruhenden B-Zellen p50, nicht aber c-Rel fürs Überleben nötig. Bei mitogen-transformierten B-Zellen werden p50 und c-Rel für das Überleben gebraucht (Grumont, 1998). In der unreifen B-Lymphomzelle WEHI 231 wirkt konstitutives c-Rel/p50 Apoptose-hemmend (Wu, 1996). Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Abbadie et al. (1993), die in embryonalen Fibroblasten von Vögeln Apoptose durch Überexpression von c-Rel nachwiesen. In HD-Zellen könnte c-Rel einen Apoptose-hemmende Funktion haben. Dieser Befund kann zum Teil die initial langsame Vermehrung der Blasten im Morbus Hodgkin erklären, begründet überwiegend auf einer gesteigerten Überlebenswahrscheinlichkeit (Apoptosehemmung), wohingegen in den Non-Hodgkin-Lymphomen die Proliferation im Vordergrund steht, die das Ausmaß der Apoptose übersteigt. Eine Erklärung für das von Smith et al. (1993) und Gruss et al. (1994) gezeigte unterschiedliche Verhalten von HDLM-2- und KMH-2-Zellen nach CD30-Stimulation konnte nicht mit einer unterschiedlichen NF- κ B-Bindungsaktivität erklärt werden.

Die p65-Bindungsaktivität in den untersuchten LCAL-Zellen nimmt nach vier Stunden ab und könnte somit die Apoptose in diesen Zellen fördern. RelB beeinflusst die NF- κ B-abhängige Genexpression entweder positiv oder negativ. Die Heterodimere, die RelB mit p50 und p52 bildet, sind transkriptionell aktiv. Die transkriptionell inaktiven RelB/p65-Heterodimere hemmen die p65-Aktivität (Marienfeld, 2003). Trotz der Induktion von p65 in Karpas-Zellen und p65-Zunahme nach vier Stunden in Del-Zellen

kommt es nicht zur gesteigerten DNA-Bindungsaktivität. Die reduzierte DNA-Bindung der p65-Heterodimere könnte auf einer verstärkten Komplexbildung von p65 mit RelB beruhen. Die starke Konzentration von RelB im Zytoplasma und im Zellkern der LCAL-Zellen könnte ein Hinweis auf das inaktivierte p65 und damit eine weitere Erklärung für die Apoptose dieser Zellen sein.

4.5 Ausblick

NF- κ B kann durch die Expression verschiedener Zielgene die Apoptose hemmen oder fördern. Die NF- κ B-Faktoren RelB und c-Rel könnten in den untersuchten Zellen verschiedene κ B-regulierte Zielgene induzieren, die die Zellen eher Richtung Proliferation oder Apoptose führen. Hübinger et al. (2001) konnten eine CD30-vermittelte Hemmung des Zellzyklus in der LCAL-Zelle Karpas feststellen. Diese Hemmung des Wachstums korrelierte mit der starken Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21. Die Überexpression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p21 war ausreichend, einen Zellzyklusstopp in einer Vielzahl an Zellen herbeizuführen (Givol, 1998; Boulaire, 2000; Cariou, 2000).

Es wäre zu prüfen, ob der RelB/p50-Dimer die Expression des p21-Gens induziert. Des weiteren wäre zu untersuchen, ob noch andere anti-proliferative Faktoren durch RelB/p50-Aktivität in LCAL-Zellen überexprimiert werden. Die konstitutive NF- κ B-Aktivität reguliert die Expression der Gene, die typischerweise in HD-Zellen überexprimiert werden. Dazu zählen die antiapoptotisch wirkenden Proteine Bfl-1/A1, c-IAP2, TRAF1, Bcl-xL und das den Zellzyklus regulierende Protein Cyclin-D2, außerdem IL-13, IL-15R α und CD40 als die Proliferation fördernde Faktoren (Hinz, 2002). Hier wäre zu zeigen, ob auch der c-Rel/p50-Dimer maßgeblich an der Expression dieser Gene beteiligt ist. So könnte die unterschiedliche NF- κ B-Verteilung in den untersuchten Zellen mit den verschiedenen Folgen nach CD30-Stimulation in Zusammenhang stehen. Der Beweis, dass die konstitutiv-aktiven p65/p50-Heterodimere in LCAL-Zellen auch auf ein dereguliertes NF- κ B-System zurückzuführen sind, wäre in weiterführenden Untersuchungen noch anzutreten.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen Unterschiede in der NF- κ B-Zusammensetzung zwischen HD- und LCAL-Zelllinien und zum anderen anhand der NF- κ B-Verteilung das in der Literatur beschriebene Verhalten der jeweiligen Zellen bezüglich Proliferation und Apoptose zu analysieren.

In beiden untersuchten Zelllinien wurden die NF- κ B-Faktoren p50 und p65 konstitutiv nukleär exprimiert. In den HD-Zelllinien fand sich zusätzlich konstitutives c-Rel, in den LCAL-Zelllinien dagegen konstitutives RelB. Diese vier Faktoren zeigten auch in den jeweiligen Zellen konstitutive Bindungsaktivität. Die NF- κ B-Faktoren können als Marker für verschiedene Entwicklungsstufen hämatopoetischer Zellen dienen. Die konstitutiven nukleären NF- κ B-Faktoren p50 und c-Rel in HD-Zellen wiesen auf B-Zell-typische Eigenschaften hin. Allerdings spricht das in der HD-Zelle HDLM-2 überwiegend im Zytoplasma lokalisierte c-Rel für T-Zell-typische Eigenschaften. In LCAL-Zellen dagegen lassen die konstitutiven nukleären NF- κ B-Faktoren p50 und RelB einen T-Lymphozyten als Ursprungszelle erkennen.

Die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HD-Zelllinien konnte im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Arbeiten in der Literatur konnten bei den LCAL-Zellen konstitutiv aktive p65/p50-Heterodimere als auch RelB/p50-Heterodimere nachgewiesen werden. Obwohl p65 in den meisten menschlichen Zellen induziert wird, wurde p65 in beiden Zelllinien konstitutiv nukleär exprimiert. Dies könnte ein Indiz für ein dereguliertes NF- κ B-System in beiden Zelllinien sein und damit möglicherweise die entkoppelte Funktion bezüglich Apoptose und Proliferation erklären.

Nach Stimulation des Oberflächenrezeptors CD30 mit dem agonistischen monoklonalen Antikörper M44 konnte in der vorliegenden Arbeit keine NF- κ B-Induktion festgestellt werden. Nach PMA-Ionomycin-Stimulation fiel in LCAL-Zellen die Aktivität des p65/p50-Komplexes nach vier Stunden ab, in HDLM-2-Zellen nahm sie nach vier Stunden und in KMH-2-Zellen nach einer Stunde zu. Die Komplexe mit den Faktoren RelB in LCAL-Zellen und c-Rel in HD-Zellen hatten eine unveränderte Bindungsaktivität. Die CD30-Stimulation führte in HD-Zellen zur Proliferation. Für

KMH-2 sind die Aussagen in der Literatur allerdings widersprüchlich: teilweise zeigte sie keine Auswirkung, teilweise kam es zur Proliferation. Wird die konstitutive NF- κ B-Aktivität in HD-Zellen gehemmt, reagieren die Zellen mit Apoptose. Der p65-Faktor ist bekannt für seine Apoptose-hemmende Eigenschaft. Die zunehmende p65/p50-Aktivität in HD-Zellen könnte die Zellen zur Proliferation anregen. Außerdem kam es ausschließlich in HD-Zellen zur Expression von c-Rel. Dieser Faktor ist in einigen Zellen ebenfalls für das Überleben notwendig. In LCAL-Zellen folgt der CD30-Aktivierung die Apoptose. In diesen Zellen nimmt die p65-Bindungsaktivität ab, was darauf hinweist, dass sie der Apoptose ausgesetzt sind. RelB wird nur in LCAL-Zellen exprimiert. RelB besitzt eine Doppelrolle: als Komplex mit p50 oder p52 ist er ein positiver Transaktivator, als Komplex mit p65 beeinflusst er die κ B-abhängige Genexpression negativ. Die starke Konzentration von RelB im Zytoplasma und im Zellkern und die trotz steigender p65-Expression abnehmende p65-Aktivität könnte ein Hinweis auf das inaktivierte p65 und damit eine weitere Erklärung für die Apoptose der LCAL-Zellen sein.

Literaturverzeichnis

Abbadie C, Kubrun N, Bouali F, Smardova J, Stehelin D, Vandenbunder B, Enrietto PJ (1993). High levels of c-Rel expression are associated with programmed cell death in developing avian embryo and in bone marrow cells in vitro. *Cell*, 77; 899

Agrawal B, Reddish M, Longenecker BM (1996). CD30 expression on human CD8⁺ T cells isolated from peripheral blood lymphocytes of normal donors. *J Immunol*, 157; 3229

Aizawa S, Nakano H, Ishida T, Horie R, Nagai M, Ito K, Yagita H, Okumura K, Inoue J, Watanabe T (1997). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NF- κ B activation. *J Biol Chem*, 272; 2042

Amakawa R, Hakem A, Kundig TM, Matsuyama T, Simard JLL; Timms E, Wakeham A, Mittrucker H-W, Griesser H, Takimoto H, Schmitts R, Shahinian A, Ohashi PS, Penninger JM, Mak TW (1996). Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell*, 84; 551

Andreesen R, Brugger W, Löhner GW, Bross KJ (1989). Human macrophages can express the Hodgkin's cell-associated antigen Ki-1 (CD30). *Am J Pathol*, 134; 187

Ansieau S, Scheffrahn I, Mosialos G, Brand H, Duyster J, Kaye K, Harada J, Dougall B, Hübinger G, Kieff E, Herrmann F, Leutz A, Gruss H-J (1996). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, and TRAF-3 interact in vivo with the CD30 cytoplasmic domain; TRAF-2 mediates CD30-induced nuclear factor κ B activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93; 14053

Baeuerle PA, Baltimore D (1988). I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, 242; 540

Baeuerle PA, Henkel T (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12: 141

Baker SJ, Reddy EP (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene*, 12; 1

Baldwin AN, Bitler CM, Welcher AA, Shooter EM (1992). Studies on the structure and binding properties of the cysteine-rich domain of rat low affinity nerve growth factor receptor (p75NGFR). *J Biol Chem*, 267; 8352

Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W (1993). Crystal structure of the soluble human 55kd TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, 73; 431

Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH, Beyers AD, Davis SJ, Somoza C, Williams AF (1993). *The leukocyte antigen facts book*. London, UK, Academic, 166

Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer H-D, Scheidereit C, Dörken B (1996). High-level nuclear NF- κ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 87; 4340

Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dorken B (1997). Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 100; 2961

Barkett M, Gilmore TD (1999). Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18; 6910

Beg AA, Sha W, Bronson R, Ghosh S, Baltimore D (1995). Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*, 376; 167

Beg AA, Baltimore D (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science*, 274; 782

Bengtsson A, Johannsson C, Linder MT, Hallden G, van der Ploeg I, Scheynius A (1995). Not only Th2 cells but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation. *J Leukoc Biol*, 58; 683

Biswas P, Smith CA, Goletti D, Hardey EC, Jackson RW, Fauci AS (1995). Cross-linking of CD30 induces HIV expression in chronically infected T cells. *Immunity*, 2; 587

Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R (2000). The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)*, 48; 190

Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D (1995). Expression of RelB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, 373; 531

Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT (1999). Mutations in the I κ Ba gene in Hodgkin's disease suggest a tumor suppresser role for I κ Ba. *Oncogene*, 18; 3063

Cambiaggi A, Cantoni C, Marciano S, De Totero D, Pileri S, Tazzari PL, Stein H, Ferrini S (1993). Cultured human NK cells express the Ki-1/CD30 antigen. *Br J Haematol*, 85; 270

Cariou S, Donavan JC, Flanagan WM, Milic A, Bhattacharya N, Slingerland JM (2000). Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cellcycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97; 9042

Carrasco D, Weih F, Bravo R (1994). Developmental expression of the mouse c-Rel proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development*, 120; 2991

Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB (1999). Activation-dependent transcriptional regulation of the human Fas promoter requires NF- κ B p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol*, 19; 2098

Del Prete G, De Carli M, Dèlios MM, Daniel KC, Almerigogna F, Alderson M, Smith CA, Thomas E, Romagnani S (1995). CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med*, 182; 1655

Delfino F and Walker WH (1998). Stage-specific nuclear expression of NF- κ B in mammalian testis. *Mol Endocrin*, 12; 1696

Diehl V, Fonatsch C, Tesch H, Juecker M, Schaadt M (1990). The cell origin in Hodgkin's disease. *Semin Oncol*, 17; 660

Doi TS, Takahashi T, Taguchi O, Azuma T, Obata Y (1997). NF- κ B RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J Exp Med*, 185; 963

Duckett CS, Thompson CB (1997). CD30-dependent degradation of TRAF2: implication for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival. *Genes Dev*, 11; 2810

Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan MC, Thompson CB (1997). Induction of nuclear factor κ B by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. *Mol Cell Biol*, 17; 1535

Durkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B, Stein H (1992). Molecule cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell*, 68; 421

Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss H-D, Jundt F, Mathas S, Krappmann D, Scheidereit C, Stein H, Dörken B (1999). Overexpression of I κ B α inhibition of NF- κ B activity and mutations in the I κ B α gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*, 94; 3129

Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci*, 20; 342

Ferreiro J (1994). Ber-H2 expression in testicular germ cell tumors. *Hum Pathol*, 25; 522

Fonatsch C, Latza U, Dürkop H, Rieder H, Stein H (1992). Assignment of the human CD30 (Ki-1) gene to 1p36. *Genomics*, 14; 825

Froese P, Lemke H, Gerdes J, Havsteen B, Schwarting R, Hansen H, Stein H (1987). Biochemical characterization of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines. *J Immunol*, 139; 2081

Gedrich RW, Gilfillan MC, Duckett CS, van Dongen JL, Thompson CB (1996). CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *J Biol Chem*, 271; 12852

Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL, Thompson CB (1998). Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol*, 160; 2180

Givol I, Givol D, Hughes SH (1998). Overexpression of p21WAF1/cip1 arrests the growth of chicken embryo fibroblasts that overexpress E2F1. *Oncogene*, 16; 3115

Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, Gerondakis S (1998). B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor κ B1 (NF- κ B1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med*, 187; 1

Gruss H-J, Boiani N, Williams DE, Armitage RJ, Smith CA, Goodwin RG (1994). Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood*, 83; 2045

Gruss H-J, Dower SK (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*, 85; 3378

Gruss H-J, Ulrich D, Dower SK, Herrmann F, Brach M (1996). Activation of Hodgkin cells via the CD30 receptor induces autocrine secretion of interleukin-6 engaging the NF- κ B transcription factor. *Blood*, 87; 2443

Gruss H-J, Pinto A, Gloghini A, Wehners E, Wright B, Boiani N, Aldinucci D, Gattei V, Zagonel V, Smith CA, Kadin ME, von Schilling C, Goodwin RG, Herrmann F, Carbone A (1996). CD30 ligand expression in non-malignant and Hodgkin's. disease-involved lymphoid tissues. *Am J Pathol*, 149; 469

Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM (1999). An essential role for nuclear factor κ B in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med*, 189; 145

Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Scheidereit C (2001). Constitutive NF- κ B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 97; 2798

Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dörken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C (2002). Nuclear factor κ B-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*, 196; 605

Hittmair J, Rogatsch H, Hobisch A, Mikuz G, Feichtinger H (1996). CD30 expression in seminoma. *Hum Pathol*, 27; 1166

Horie R, Aizawa S, Nagai M, Ito K, Higashihara M, Ishida T, Inoue J, Watanabe T (1997). A novel domain in the CD30 cytoplasmic tail mediates NF- κ B activation. *Int Immunology*, 10; 203

Horie R, Watanabe T (1998). CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol*, 10; 457

Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, Kadin ME, Watanabe T (2002). Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF- κ B activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 21; 2493

Hsu PL, Hsu SM (2000). Autocrine growth regulation of CD30 ligand in CD30-expressing Reed-Sternberg cells: distinction between Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest*, 80; 1111

Hübinger G, Müller E, Scheffrahn I, Schneider C, Hildt E, Singer BB, Sigg I, Graf J, Bergmann L (2001). CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP/WAF1) in anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene*, 20; 590

Ito K, Watanabe T, Horie R, Shiota M, Kawamura S, Mori S (1994). High expression of the CD30 molecule in human decidual cells. *Am J Pathol*, 145; 276

Josimovic-Alasevic O, Dürkop H, Schwarting R, Backe B, Stein H, Diamantstein T (1989). Ki-1 (CD30) antigen is released by Ki-1 positive tumor-cells *in vitro* and *in vivo*. Partial characterization of soluble Ki-1 antigen and detection of the antigen in cell culture supernatants and in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Immunol*, 19; 157

Jaffe E S, Harris N L, Stein H, Vardiman J W (2001). World Health Classification of tumours: Pathology and genetics of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Arc Press, Lyon

Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Bräuninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K, Küppers R (2000). Clonal deleterious mutations in the I κ Ba gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*, 191; 395

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeurle PA (1994). Constitutive NF- κ B activity in neurons. *Mol Cell Biol*, 14; 3981

Kanzler H, Küppers R, Hansmann M, Rajewsky K (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of dominant tumor clone derived from (crippled) germinal centers B cells. *J Exp Med*, 184; 1495

Karin M (1999). How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18; 6867

Kasibhatla S, Genestier L, Green DR (1999). Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor κ B. *J Biol Chem*, 274; 987

Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S (1995). Mice lacking the c-Rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev*, 9; 1965

Korner M, Tarantino N, Debre P (1991). Constitutive activation of NF- κ B in human thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 181; 80

Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dörken B, Scheidereit C (1999). Molecular mechanisms of constitutive NF- κ B/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene*, 18; 943

Küppers R, Rajewsky K (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*, 16; 471

Latza U, Foss HD, Durkop H, Eitelbach F, Dieckmann KP; Loy V, Unger M, Pizzolo G, Stein H (1995). CD30 antigen in embryonal carcinoma and embryogenesis and release of soluble molecule. *Am J Pathol*, 146; 463

Lee SY, Lee SY, Kandala G, Liou M-L, Liou H-C, Choi Y (1996). CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF- κ B activation and binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93; 9699

Lee SY, Park CG, Choi Y (1996). T cell receptor-dependent cell death of cell hybridomas mediated by the CD30 cytoplasmic domain in association with tumor necrosis factor receptor-associated factors. *J Exp Med*, 183; 669

Lernbecher T, Muller U, Wirth T (1993). Distinct NF- κ B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature*, 365; 767

Levi E, Pfeifer WM, Kadin ME (2001). CD30-activation-mediated growth inhibition of anaplastic large-cell lymphoma cell lines: apoptosis or cell-cycle arrest? *Blood*, 98; 1630

Liou HC, Sha WC, Scott ML, Baltimore D (1994). Sequential induction of NF- κ B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Mol Cell Biol*, 14; 5349

Liu Z-G, Hsu H, Goeddel D V, Karin M (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*, 87, 565

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D, (1997). MAP3k-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*, 385; 540

Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S, Neumann M (2003). RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem*, 30; 278; 19852

Marsters S A, Frutkin A D, Simpson N J, Fendly B M, Ashkenazi A (1992). Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. *J Biol Chem*, 267; 5747

Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A, Ju ST (1998). Identification of two NF- κ B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol*, 161; 3469

McDonald PP, Cassatella MA, Bald A, Maggi E, Romagnani S, Gruss H-J, Pizzolo G (1995). CD30 ligation induces nuclear factor- κ B activation in human T cell lines. *Eur J Immunol*; 25; 2870

Mellits KH, Hay RT, Goodbourn S (1993) Proteolytic degradation of MAD3 (I κ B α) and enhanced processing of the NF- κ B precursor p105 are obligatory steps in the activation of NF- κ B. *Nucleic Acids Res*, 21; 5059

Mir SS, Richter BWM, Duckett CS (2000). Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood*, 96; 4307

Miyamoto S, Schmitt MJ, Verma IM (1994). Qualitative changes in the subunit composition of κ B-binding complexes during murine B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 5056

Morris SW, Xue L, Ma Z, Kinney MC (2001). ALK+ CD30+ Lymphomas: a distinct molecular genetic subtype of Non-Hodgkin's Lymphoma. *British J of Hematology*, 113; 275

Nakano H, Shindo M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K (1998). Differential regulation of I κ B kinase- α and - β by two upstream kinases, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95; 3537

Nawrocki JF, Kirsten ES, Fisher RI (1988). Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. *J Immunol*, 141; 672....

Orian A, Whiteside S, Israel A, Stancoviski I, Schwartz AL, Ciechanover A (1995). Ubiquitin-mediated processing of NF- κ B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem*, 270; 21707

Pahl HL (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, 18; 6853

Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ (1988). Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. *Am J Pathol*, 133; 446

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AI, Maniatis T (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*, 78; 319

Rayet B, Gelinas C (1999). Aberrant Rel/NF κ B genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18, 6938

Romagnani P, Annunziato F, Manetti R, Mavilia C, Lasagni L, Manuelli C, Vannelli GB, Vanini V, Maggi E, Pupilli C, Romagnani S (1998). High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassle's corpuscles in the medulla of human thymus. *Blood*, 91; 3323

Romagnani S, Parronchi P, Dèlios MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccini MP, Manetti R, Sampognaro S, Mavilia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF (1997). An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 113; 153

Rudolph P, Lappe T, Schmidt D (1993). Expression of CD30 and nerve growth factor-receptor in neoplastic and reactive vascular lesions: an immunohistochemical study. *Histopathology*, 23; 173

Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299; 65

Schwarting R, Gerdes J, Durkop H, Falini B, Pileri S, Stein H (1989). Ber-H2: a new anti Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formal resistant epitope. *Blood*, 74; 1678

Sen R, Baltimore D (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46, 705

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y; Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, 293; 1495

Sha WC, Liou H-C, Tuomanen EI, Baltimore D (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multiple defects in immune responses. *Cell*, 80; 321

Shanebeck KD, Maliszewski CR, Kennedy M, Picha KS, Smith CA, Goodwin RG, Grabstein KH (1995). Regulation of murine B cell growth and differentiation by CD30 ligand. *Eur J Immunol*, 25; 2147

Smith CA, Gruss H-J, Davis T, Anderson D, Farrah T, Baker E, Sutherland GR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Grabstein KH, Gliniak B, McAlister IB, Fanslow W, Alderson M, Falk B, Gimpel S, Gillis S, Din WS, Goodwin RG, Armitage RJ (1993). CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell*, 73; 1349

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, 76; 959

Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K (1985). The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue. *Blood*, 66; 848

Stein H, Foss H-D, Dürkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B (2000). CD30+ anaplastic large cell lymphoma: a review of histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*, 96; 3681

Staudt LM (2000). The molecular and cellular origins of Hodgkin's disease. *J Exp Med*, 191; 207

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259; 1912

Trümper LH, Brady G, Bagg A, Gray D, Loke SL, Griesser H, Wagmann R, Braziel R, Gascoyne RD, Vicini S, Iscove N, Cossmann J, Mak TW (1993). Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood*, 81; 3097

Vander Heiden MG, Chaandel NS, Williamson EK (1997). Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91; 627

Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996). Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science*, 274; 787

Wang C-Y, Mayo MW, Baldwin AS (1996). TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, 274; 784

Wang CY, Cusack JC, Jr, Liu R and Baldwin AS (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nat Med*, 5; 412

Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck R-P, Lira SA, Bravo R (1995). Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel Family. *Cell*, 80; 331

Welcher AA, Bitler CM, Radeke MJ, Shooter EM (1991). Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88; 159

Wood KM, Roff M, Hay RT (1998). Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B. *Oncogene*, 16; 2131

Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, Fitzgerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE (1996). Inhibition of NF- κ B/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.*, 15; 4682

Xiao G, Harhaj EW, Sun SC (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. *Mol Cell*, 7; 401

Danksagungen

Bei Herrn Prof. Henrik Griesser bedanke ich mich für das interessante Thema und die hilfreichen Diskussionen. Herrn Priv.-Doz. Manfred Neumann danke ich für die Unterstützung bei den Experimenten, die guten Ideen und die Korrektur der Doktorarbeit. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Judith Glöckner-Pagel für die Einführung im Labor und die stetige Motivation, ohne die die Arbeit nicht vollendet worden wäre. Ich danke sehr Herrn Dr. Ralf Marienfeld für seine große Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Meinen Geschwistern danke ich, vorallem meiner Schwester Dorothea Dentz für das mühevollle Korrekturlesen und die Beratung in Form- und Stilfragen. Meinen Eltern Christina und Hans Kern danke ich dafür, daß sie in guten und schlechten Zeiten an meiner Seite stehen. Meinem Mann Tekle danke ich für die Hilfe am Computer, seine unerschütterliche Geduld und seine Liebe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Ulrike Embaye, geb. Kern
Geburtsdatum 18. Oktober 1973
Geburtsort Berlin

Schulbildung

1979 bis 1983 Carl-Benz-Grundschule in Marxzell
1983 bis 1992 Eichendorff-Gymnasium in Ettlingen:
Allgemeine Hochschulreife im Mai 1992

Hochschulbildung

April 1993 bis Okt. 1996 Studium der Medizin an der Georg-August-Universität in Göttingen
Nov. 1996 bis Nov. 2000 Fortsetzung und Abschluss des Studiums an der Julius-Maximilian-Universität in Würzburg
Okt. 1999 bis Okt. 2000 Praktisches Jahr
Innere Medizin an der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg
Frauenheilkunde und Geburtshilfe/Chirurgie am Klinikum Aschaffenburg

Famulaturen und Auslandsaufenthalte

März 1996 Innere Medizin: Onkologie und Gastroenterologie am Waldkrankenhaus St. Marien, Lehrkrankenhaus der Universität Erlangen
März 1997 bis April 1997 Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Queen Elisabeth Hospital, Lehrkrankenhaus der Universität Cambridge, King's Lynn, Großbritannien
Sept. 1997 bis Okt. 1997 Chirurgie und Innere Medizin am Herna Hospital, Medan, Indonesien
März 1998 Pathologie an der Universität Würzburg

Berufserfahrung

März 2001 bis Aug. 2002 Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des Klinikums Fulda bei Prof. Dr. med. L. Spätling
seit Sept. 2002 Assistenzärztin in der Frauenklinik der Hochtaunus-Kliniken Bad Homburg bei Priv. Doz. Dr. med. A. Etzrodt

Frankfurt, den 10. August 2004