

5. Diskussion

5.1 CD40 reguliert die Expression von A1

Unreife B Lymphozyten erleiden nach Stimulation über den Antigenrezeptor in Abwesenheit begleitender kostimulatorischer Signale einen Wachstumsstopp, gefolgt vom programmierten Zelltod. Bei gleichzeitiger Signalgebung über CD40 lässt sich dies jedoch verhindern. Die Zellen sterben in diesem Fall nicht ab und sind außerdem in der Lage, weiterhin zu proliferieren und zu differenzieren [13, 124].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD40 die Genexpression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 Verwandten A1 [92] sowohl in WEHI 231 Zellen als auch in primären B Lymphozyten der Maus kontrolliert (Abb.3, S.49). Dies findet seine Bestätigung auch in anderen Arbeiten, die unabhängig voneinander zu ähnlichen Ergebnissen kommen [115, 125].

Die Beobachtung, dass die CD40-induzierte erhöhte A1-Expression im WEHI-System auch bei gleichzeitiger Stimulation über den Antigenrezeptor erhalten bleibt (Abb.4A, S.51), führte zu der Hypothese, dass über A1 Resistenz gegen die BZR-induzierte Apoptose vermittelt wird.

Die antiapoptotische Wirkung von A1 im Kontext des BZR-induzierten Zelltodes ließ sich in WEHI 231 Zellen, die durch rekombinante Retroviren mit A1-a transduziert worden waren, direkt demonstrieren. A1-a ist eines von drei A1-Genprodukten (A1-a, -b und -d), die untereinander eine Homologie von über 96 % aufweisen. Die entsprechenden kodierenden Gene sind ebenfalls zu mehr als 97% homolog [117]. Es wird daher davon ausgegangen, dass sich die Proteine in ihrer Wirkungsweise nicht unterscheiden.

Die gezeigten Ergebnisse legen somit den Schluß nahe, dass die CD40 induzierte Verstärkung der A1 Expression tatsächlich zum Schutz der Zellen vor anti-IgM-induzierter Apoptose beiträgt.

Diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, dass immortalisierte B-Zelllinien von cRel defizienten Mäusen, die einen Defekt in der Expression von A1 aufweisen, nach Rekonstitution von A1 weniger empfindlich für die BZR-induzierte Apoptose sind [114]. Dazu kommt, dass eine CD40 abhängige Expression von A1 nicht nur in unreifen B Zellen zu beobachten ist, sondern auch bei Keimzentrums-B-Zellen gefunden wurde [125], wo CD40 ebenfalls eine Schutzfunktion ausübt [126].

Ferner wurde inzwischen berichtet, dass ein - im Vergleich zum kurzlebigen, unreifen Stadium - bis zu zehn mal höherer A1-Spiegel ein wichtiges Charakteristikum langlebiger, reifer B-Lymphozyten ist [113, 125]. Auch hier korreliert also die Fähigkeit, besser zu Überleben mit erhöhter Expression von A1. Für die Entwicklung reifer, peripherer B Zellen scheint A1 damit also eine bedeutende Rolle zu spielen.

Es ist interessant, dass A1 auch unter ganz anderen Bedingungen B-Lymphozyten vor Apoptose schützt: Blimp-1 (**B** **L**ymphocyte **i**nduced **m**aturation **p**rotein 1) ein Transkriptionsfaktor, der die terminale Differenzierung von B-Zellen zur immunglobulinsezernierenden Plasmazelle treibt [127], induziert in WEHI 231 Zellen neben den charakteristischen Merkmalen Immunglobulinsezernierender Zellen (Expression der J Kette, Syndecan Expression und Verschiebung des μ_s/μ_m Verhältnisses nach μ_s), auch Apoptose [128, 129], die durch ektopische Expression von A1 verringert werden kann [128]. Auf der Basis dieses Befundes könnte man spekulieren, dass A1 auch für das Überleben Ig-sezernierender Zellen wichtig ist.

All diese Beobachtungen machen eine wichtige Rolle von A1 für das Überleben von B Zellen der meisten, wenn nicht gar aller Entwicklungsstadien sehr wahrscheinlich.

5.2 Die CD40 abhängige A1-Expression: Hinweise auf eine direkte Beteiligung von NF κ B/Rel.

Die A1-Expression wie auch die Bcl-xL-Expression hängen direkt von der Transkriptionsaktivität der NF κ B/Rel Verwandten ab [115, 130].

Für das CD40-Signal ist andererseits gezeigt, dass es eine gesteigerte NF κ B-Aktivität hervorruft und in Anwesenheit eines gleichzeitigen BZR-Signals in der Lage ist, den hierdurch normalerweise ausgelösten Verlust an NF κ B-Aktivität zu verhindern [23]. Damit liegt der Schluß nahe, dass ein Überleben der Zellen direkt mit der NF κ B-Aktivität korreliert. Ein Zusammenhang, der auch von Wu et al. durch selektive Unterdrückung der NF κ B-Aktivität in WEHI 231 Zellen nachgewiesen werden konnte: Eine entsprechende Behandlung der Zellen führte zu Wachstumsstopp und Apoptose [24]. Nachdem hier nun gezeigt werden konnte, dass das Überlebenssignal von CD40 die Expression von A1 induziert, womit nun gleichzeitig ein Zusammenhang zwischen CD40-Signal, NF κ B/Rel-

Aktivität und A1 hergestellt wird, liegt es nahe anzunehmen, dass hier die A1-Expression ebenfalls vom NFκB/Rel-System abhängt.

Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass der Anstieg des A1 mRNA-Spiegels der den Übertritt kurzlebiger, unreifer B Lymphozyten in das langlebigere Reifestadium begleitet, mit einer Vermehrung von cRel einhergeht [113, 131-133] und entsprechend auch eine Überexpression von cRel in WEHI 231 Zellen in der Lage ist, diese Zellen vor der IgM-induzierten Apoptose zu schützen [24]. Vor allem aber ist die Expression von A1 in Lymphozyten, sowohl basal als auch induziert, von c-Rel abhängig: Primäre B und T Zellen aus c-rel defizienten Mäusen zeigen einen erheblich reduzierten A1 mRNA-Spiegel im Vergleich zu Wildtypzellen und nfκb1^{-/-} Lymphozyten, was auf ein κB-Element im A1 Promotor zurückgeführt werden kann [114].

Ganz im Einklang damit steht außerdem die starke Expression von cRel in WEHI 231 Zellen [133, 134] und parallel dazu die Dominanz der A1 Expression im Vergleich zu den anderen antiapoptischen Bcl-2 Verwandten (Abb.3, S.49).

Zusammengenommen führen diese Beobachtungen zu der Schlußfolgerung, dass CD40 über Transkriptionsfaktoren aus der NFκB/Rel Familie die Expression von A1 anregt und damit das Überleben der Zellen sichert.

Andererseits könnten aber auch noch weitere Transkriptionsfaktoren an der Regulierung des A1-Pegels beteiligt sein. Hierfür spricht zum Beispiel, dass CD40 über den Jak3/Stat3-Signalweg [135] oder Kinasen aus der p38- bzw. SAP-Kinase Unterfamilie (SAP- für engl.: stress activated protein-) der MAP-Kinasen (MAP- für engl.: mitogen activated protein-) auch andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst [136-138]. Dabei würde über p38 hauptsächlich ATF-2 angesprochen während durch SAP-Kinasen die Transkriptionsfaktoren Elk1 und/oder cJun aktiviert werden können [137, 139].

Es darf außerdem nicht übersehen werden, dass die Basisexpression des A1 Gens auf Veränderungen der NFκB/Rel-Aktivität wesentlich weniger empfindlich reagiert als z.B. die c-Myc-Expression. So hatte eine IgM-Vernetzung über einen Zeitraum von 24 Stunden und der dadurch ausgelöste Verlust an NFκB/Rel im Zellkern keine signifikante Auswirkung auf die mRNA-Menge von A1 im Gegensatz zur cMyc mRNA (Abb.4A, S.51, Spur 1 und 5, sowie Abb.10, S.58, Spur 1 und 4). Hinzu kommt der Befund von Grumont et al., dass in transient transfizierten Jurkat Zellen ein A1-Promotor mit mutiertem κB-Element zwar nicht mehr in der Lage ist, einen Rel-abhängigen Anstieg von

entsprechenden Reporterkonstrukten zu vermitteln, eine unverminderte Basisexpression jedoch weiterhin ermöglicht [114].

Erklären ließen sich diese Beobachtungen mit unterschiedlicher Stabilität der verschiedenen mRNA-Spezies oder aber einer hohen Affinität von cRel Komplexen für das κ B-Element im A1 Promotor.

5.3 A1 hat keinen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit BZR-stimulierter WEHI 231 Zellen.

Den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen zufolge kann A1 das Leben von WEHI Zellen in Anwesenheit eines apoptotischen BZR-Signals verlängern (Abb.13, S.63 und Abb.14, S.64).

Im Gegensatz dazu ist A1 jedoch nicht in der Lage, auch eine fortgesetzte Proliferation zu ermöglichen und den über anti- μ ausgelösten G1-Arrest aufzuheben (Abb.11, S.60).

Offensichtlich ist also der Effekt des CD40 Signals, das ja beides zu leisten vermag, nicht auf die gesteigerte Expression von A1 alleine zurückzuführen. Der CD40 Signalweg scheint sich also schon oberhalb von A1 in zwei Richtungen, nämlich Aufrechterhaltung der Proliferation auf der einen Seite und Überleben auf der anderen Seite, zu verzweigen.

In diesem Zusammenhang gewinnt der in Abb.10 (S.58) gezeigte Befund, dass ektopisches A1 den durch anti- μ verursachten Verlust von cMyc-RNA nicht verhindern kann, klärende Bedeutung. Verlust der c-myc mRNA, gekoppelt mit einem Anstieg an mad4 mRNA würde in einer Verschiebung des Verhältnisses von Myc/Max- hin zu Mad/Max-Heterodimeren resultieren. Entsprechend dem einleitend vorgestellten Modell (siehe S.5) käme es dadurch zu einer Hemmung der Transkription von Myc-abhängigen, proiliferationsfördernden Genen [45] wie z.B. der Zykline D1 und D2 [140], was dann den Zellzyklusarrest nach sich ziehen würde.

Nachdem die Expression von cMyc auch vom NF κ B/Rel System abhängig ist [16], scheinen Proliferation auf der einen Seite und Überleben auf der anderen Seite durch zwei verschiedene Gengruppen reguliert zu werden, die ihrerseits jedoch beide vom NF κ B/Rel System abhängen. Dazu passt die Beobachtung, dass nach 16 stündiger Stimulation mit

anti- μ auch in den A1 transduzierten Zellen ein Verlust des kotransduzierten NF κ B-abhängigen Luciferasereporters zu sehen ist (Abb.12A, S.62).

Die Vorstellung, dass verschiedene NF κ B-abhängige Gengruppen für die unterschiedlichen Aspekte des CD40-Signals verantwortlich sind, findet Bestätigung in der Beobachtung, dass die Expression eines Bcl-2 Transgens in cRel $^{-/-}$ oder NF κ B $^{-/-}$ B Zellen zwar einen mitogeninduzierten Tod verhindern kann, nicht jedoch den begleitenden Zellzyklusarrest in der G1-Phase aufhebt[141].

5.4 Ektopischer Ausgleich des cMyc mRNA-Verlustes infolge eines BZR-Signals ist nicht dazu geeignet, die Proliferationsfähigkeit von WEHI 231 Zellen aufrecht zu erhalten

Die Einführung von induzierbarem cMyc-ER in bereits A1 überexprimierende Zellen um neben dem Überleben auch die Proliferationsfähigkeit nach einem BZR-Signal wiederherzustellen, führte zu keinem positiven Ergebnis (Abb.15, S.66). Stattdessen war sowohl bezüglich des Überlebenszustandes als auch bezüglich der Proliferationsfähigkeit der Zellen sogar eine Verstärkung des anti- μ Effekts zu beobachten (Abb.15, S.66 und Abb. 16, S.67). Dies steht zunächst im Widerspruch zu Beobachtungen von Wu et. al., die in stabil transfizierten Einzelklonen mithilfe von ektopischem cMyc anti-IgM induzierte Apoptose in WEHI 231 Zellen unterdrücken konnten [85]. Die Autoren arbeiteten jedoch mit selektionierten Einzelklonen, die möglicherweise schon aufgrund des Selektionsprozesses weitere, sekundäre Veränderungen erworben hatten und damit veränderte Grundvoraussetzungen für eine entsprechende Wirkung des ektopischen cMyc boten. Ebenso könnten dort durch die Selektion auch Zellen mit einer ganz bestimmten, gut verträglichen Expressionsintensität des in diesem Falle konstitutiv aktiven cMyc isoliert worden sein, während in den hier vorgestellten Versuchen cMyc erst durch Tamoxifen induziert wurde. Damit überstieg die eingebrachte Menge an ektopischem cMyc zum Zeitpunkt der Induktion möglicherweise den durch IgM-Engagement hervorgerufenen Verlust an endogenem Genprodukt zu weit und verursachte damit eine Überkompensation. Der Versuch, die Aktivität von induzierbarem Myc-ER durch Titration des Induktors (Hydroxitamoxifen) zu regulieren blieb erfolglos (Daten nicht gezeigt). In

Populationen, die Myc-ER auf niedrigem Niveau exprimierten, konnte ebenfalls kein positiver Effekt auf die Proliferationsfähigkeit nachgewiesen werden. Dies steht jedoch im Einklang mit Ergebnissen von Hagiyama et al., die über Myc-ER in WEHI 231 Zellen sogar die Apoptose einleiten konnten [142].

Auch in anderen Zellen ist cMyc in der Lage, den programmierten Zelltod nach Wachstumsfaktor- oder Nährstoffentzug auszulösen bzw. zu fördern [79-81]. Über die apoptotische Wirkungsweise von cMyc weiß man, dass es die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien bewirken kann [84]. Cytochrom-c ist dann seinerseits in der Lage mit APAF-1 und Caspase 9 einen funktionellen Komplex zu bilden, gefolgt von einer Aktivierung von Effektorcaspasen [143].

Möglicherweise wird auch in den hier vorgestellten Experimenten von den cMyc-ER exprimierenden Zellen nach Induktion von cMyc-ER ein anderer Apoptoseweg als bei der Stimulation über IgM eingeschlagen. Ein Hinweis darauf liegt darin, dass auch das CD40-Signal nicht mehr zur vollständigen Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit nach gleichzeitiger cMyc-Induktion und Stimulation über den BZR ausreicht (Abb.15, S.66) bzw. darin, dass durch induziertes cMyc-ER alleine schon ein Proliferationsnachteil entsteht, der durch CD40 nicht ausgeglichen werden kann.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die cMyc-Expression während der B-Zellentwicklung normalerweise vor dem Übergang in das durch IgM-Expression gekennzeichnete und vom WEHI Modell repräsentierte unreife Stadium abnimmt [45] was darauf hindeuten könnte, dass eine Verstärkung von cMyc auf dieser Entwicklungsstufe von vornherein nachteilig für die Zellen ist.

5.5 A1 Überexpression schützt WEHI 231 Zellen vor PARP- und Caspase 7-Spaltung nach IgM-Stimulation

Bei dem Versuch, A1 innerhalb des anti- μ /-CD40-Signalwegs einzuordnen, war bei Betrachtung des Caspasesubstrates PARP nach 24stündiger IgM Induktion wieder eine Übereinstimmung zwischen der Schutzwirkung von A1 und CD40 zu sehen (Abb.17, S.68), was ein A1-vermitteltes Eingreifen von CD40 Signalen in die Caspase-Kaskade nahelegt. Da laut Brás et al. die Caspase 7 in WEHI Zellen über den BZR selektiv aktiviert

wird [61], diese aber endogen nur sehr schwer zu detektieren war, wurde sie hier überexprimiert. Bei anschließend paralleler Betrachtung von PARP und Caspase 7 in Western Blot Analysen ergab sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Brás et al. [61] eine BZR-induzierte Spaltung der Caspase, wobei zu frühen Zeiten (16h) ein paralleler Schutzeffekt von A1 und CD40 auftritt (Abb.18, S.70).

Dass A1 in den WEHI Zellen zwar die anti- μ bedingte Caspase 7- und PARP-Spaltung auch nach langer Stimulation weitgehend zu unterdrücken vermochte (Abb.18A und B Spuren 5), nicht jedoch den Effekt, den CD40 auf beide hatte (Abb.18.A und B, Spuren 6 und 7) legt nahe, dass hier das Ergebnis eines weiteren, CD40-abhängigen Signalwegs vorliegt. Es scheint also, dass unterschiedliche Signalkaskaden in der Aktivierung dieser Caspase münden, von denen der BZR-Weg durch A1 blockiert werden kann, während der CD40-abhängige von A1 nicht kontrolliert wird.

Dass ein CD40 Signal Caspaseaktivität hervorrufen kann, wird z.B. von Eliopoulos et al. berichtet: Die Autoren konnten zeigen, dass in HELA Zellen CD40 die Aktivierung der Caspasen 8 und 3 auslösen kann und die dort zu beobachtende CD40-induzierte Apoptose durch Caspaseinhibitoren unterdrückt wird [144]. Sie finden, dass CD40 Fas-Ligand, Fas und TRAIL (für engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) induziert, was seinerseits dann Caspaseaktivierung und Zelltod auslöst. Da sowohl Caspase 8 und 9 als auch Caspase 3 in der Lage sind, Caspase 7 zu aktivieren [145, 146], ist nicht ausgeschlossen, dass auch in WEHI 231 Zellen einen solcher Signalweg vorliegt. Hierbei handelt es sich jedoch um einen Apoptoseweg vom Typ I (siehe S.5) der vor allem über Caspasen vermittelt wird. Wenn man davon ausgeht, dass A1 wie viele Bcl-2 Familienmitglieder nur in die hauptsächlich mitochondrialen Vorgänge der Apoptose vom Typ II (siehe S.5) eingreift, ließe sich damit erklären, warum A1 dieses Signal nicht blockiert. Dass die Mitochondrien hier tatsächlich eine Rolle spielen, wird durch das Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen, als deren Hauptquelle sie gelten, gestützt (s.u.). Ebenso weist die Tatsache, dass A1 als Bcl-2 verwandtes Protein die BZR-vermittelte Apoptose unterdrückt, in diese Richtung. Das späte Auftreten des CD40-Effekts auf Caspase 7 könnte dafür sprechen, dass es sich wirklich um einen sekundäres, TRAIL-induziertes Phänomen handelt.

Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle der Caspase 7 als Ziel der CD40-vermittelten Signalkaskaden zukommen könnte.

Ein Anhaltspunkt liegt z.B. in der Beobachtung von Deveraux et al., dass Caspase 7 den Apoptoseinhibitor XIAP in zwei Fragmente spalten kann. Hierdurch wird in der Zelle einerseits zwar das Potential, die Aktivierung von Caspase 3 und 7 direkt zu unterdrücken verringert, auf der anderen Seite entsteht jedoch ein stabiles Fragment, welches selektiv die Aktivierung der Caspase 9 inhibiert [69]. In WEHI 231 Zellen könnte also ein CD40 Signal mithilfe aktiver Caspase 7 den über Caspase 9 vermittelten mitochondrialen Anteil am BZR-Zelltodprogramm blockieren und dies umso effektiver, da die Expression von XIAP unter der Kontrolle von NF κ B steht [147] und diese Transkriptionsfaktoren wiederum unter dem positiven Einfluss von CD40 [134].

Weiterhin fällt auf, dass auch ektopische Expression von Caspase 7, wodurch das Angebot an aktiver Caspase 7 nach BZR-Stimulation stark, erhöht wird, nicht zu verstärkter PARP-Spaltung führt (Abb.18, S.70). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die überexprimierte Caspase nicht funktionsfähig ist. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die DNA-Sequenz keinerlei Mutation im Bereich des aktiven Zentrums aufweist und auf Proteinebene das funktionelle Fragment (20kD) detektiert werden kann. Somit scheinen andere Caspasen oder Proteasen in WEHI 231 Zellen für die Proteolyse von PARP verantwortlich bzw. limitierend zu sein.

Daneben gibt es bei der BZR-induzierten Spaltung von Caspase 7 in WEHI 231 Zellen eine Diskrepanz zwischen den hier gezeigten Ergebnissen und Beobachtungen von Ruiz-Vela et al.. Diese beobachteten in Zellextrakten nur eine eingeschränkte Proteolyse der Caspase 7 in ein 32 kD-Fragment [63], während hier ein Fragment mit 20 kD auftritt.

Für die Aktivierung der Caspase 7 ist gezeigt, dass Prozessierung durch Caspase 9 einen vollständigen Abbau der Caspase 7 in ein 20 kD und ein 12 kD Fragment bewirkt [146]. Dieser Abbau erfolgt über ein Zwischenprodukt mit 32 kD. Nur das Heterodimer aus den 12 und 20 kD Fragmenten besitzt Enzymaktivität. Caspase 3 hingegen, die bezüglich ihrer Aktivität der Caspase 7 ähnlich ist, erzeugt *in-vitro*-Untersuchungen zufolge nur das 32 kD Fragment der Caspase 7 [145].

Da sie davon ausgehen, dass durch den BZR nur Caspase 7 aktiviert wird, führen Ruiz-Vela et al. ihre Beobachtungen auf eine autokatalytische Aktivität der Caspase 7 zurück. Für das Fehlen des über das 32 kD Fragment hinausgehenden Abbaus der Caspase 7 machen sie einen Mangel an Caspase 9-Aktivität verantwortlich [63]. Es ist aber zu beachten, dass die Autoren *in vitro* mit Zellextrakten gearbeitet haben, während in der

vorliegenden Arbeit ein *in-vivo*-Abbau von Caspase 7 dargestellt ist. Es könnte dort also eine *in vivo* vorhandene Caspase 9-Aktivität im Zuge der Extraktion verloren gegangen sein, die möglicherweise für den hier gezeigten, vollständigen Abbau verantwortlich ist.

5.6 CD40 Signale und A1-Überexpression hemmen das Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen nach Vernetzung des BZR in WEHI 231 Zellen

Viele Bcl-2 Familienmitglieder, wie z.B. das antiapoptotische Bcl-2 selbst, tragen Transmembrandomänen und sind damit in intrazellulären Membranen, unter anderem in der äußeren Mitochondrienmembran verankert [148]. Andere wie z.B. das proapoptotische Bax wandern bei Induktion der Apoptose vom Cytosol hin zu den Mitochondrien [149]. Inzwischen gibt es Hinweise, dass auch A1 an den Mitochondrien lokalisiert ist und dort für die Erhaltung mitochondrialer Funktionalität sorgen kann [112]. Dass es, wie hier gezeigt, das BZR-induzierte Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen verhindert, unterstützt diese Beobachtungen, da die Mitochondrien als Hauptquelle solcher Verbindungen gelten (siehe Einleitung).

Bemerkenswert ist wieder die Übereinstimmung der Schutzwirkung von ektopischem A1-Überangebot und CD40-Signal (Abb.20, S.73 und Abb.21, S.74). Sie deutet darauf hin, dass A1 auch hier ein Effektor des CD40 Signals ist.

5.7 A1 im Gesamtzusammenhang des CD40-Signals und der BZR-vermittelten Apoptose bei WEHI 231 Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse sind in Diagramm 3 als schematischer Überblick dargestellt. Zusammengenommen weisen sie darauf hin, dass A1 bei WEHI 231 Zellen im Zusammenhang des CD40-Signals eine physiologisch bedeutende Rolle spielt.

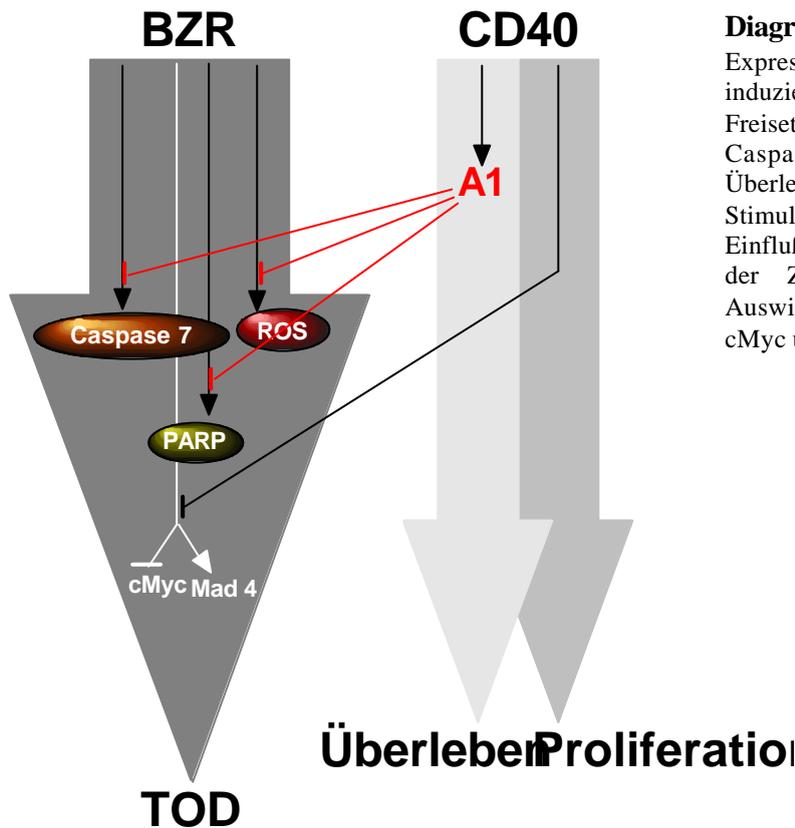


Diagramm 3 Überblick. A1-Expression wird durch CD40-Signale induziert. A1 verhindert ROS-Freisetzung, sowie PARP- und Caspase 7-Abbau und ermöglicht das Überleben der Zellen nach BZR-Stimulation. Es hat jedoch keinen Einfluß auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen, sowie bezüglich der Auswirkungen des BZR-Signals auf cMyc und Mad4.

Es scheint, dass sich das CD40 Signal in mindestens zwei Stränge aufspaltet, von denen der eine die Proliferationsfähigkeit der Zellen aufrechterhält und z.B. den BZR-induzierten Verlust von cMyc verhindert, während der andere das Überleben sichert. Ektopisches A1 erhält die Zellen am Leben, ohne jedoch den durch das BZR Signal hervorgerufenen Zellzyklusarrest aufzuheben. Folglich muss die Induktion von A1 dem Teil des CD40 Signals zugeordnet werden, der das Überleben sicher stellt.

BZR induzierte PARP-Spaltung und Caspase 7 Aktivierung, sowie das Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen sind hierbei wichtige Parameter, die von ektoischem A1 unterdrückt werden. Damit ist A1 innerhalb des Gesamtzusammenhangs der Signale von BZR und CD40 auf jeden Fall oberhalb der Caspase 7-Aktivierung und PARP-Spaltung anzusiedeln.

Die Ergebnisse von Ruiz-Vela et al., die mithilfe eines Pancaspaseinhibitors in WEHI 231 Zellen die BZR induzierte Freisetzung von ROS verhindern konnten [63] legen nahe, dass die Entstehung freier radikalischer Sauerstoffverbindungen eine Folge von Caspaseaktivität ist. In einem möglichen Modell könnte A1 auf einer sehr frühen Stufe die Aktivität von Caspasen (Caspase 7) und dadurch die Bildung von ROS verhindern (Diagramm 4A). Dies könnte bedeuten, dass es sich hierbei um einen Typ I ähnlichen Apoptoseweg handelt, der in der Hauptsache aus einer Caspase-Kaskade besteht und die Mitochondrien als Apoptosemediatoren umgeht. Dabei müsste man dann davon ausgehen, dass andere intrazelluläre Quellen für ROS als die Mitochondrien beteiligt sind. Aktivierte Caspase 7 könnte in diesem Modell diejenigen Enzyme angreifen, welche normalerweise radikalische Zwischenprodukte abfangen und unschädlich machen, wie z.B. die Superoxid Dismutase. Dadurch würde eine Akkumulation physiologisch auftretender Radikale ausgelöst. Da Bcl-2 Verwandte wie Bcl-2 und BclxL bei Typ I ähnlichen Apoptosewegen bisher keine nachgewiesene Schutzfunktion haben [48], bliebe zu klären, ob A1 direkt mit Caspase 7 interagieren kann und somit deren Aktivierung verhindert.

Setzt man voraus, dass es sich bei WEHI 231 Zellen bezüglich der BZR induzierten Apoptose um einen Typ II ähnlichen Prozess handelt, ergibt sich eine weitere Interpretationsmöglichkeit (Diagramm 4B): Beim programmierten Zelltod vom Typ II kommt es infolge des Todessignals hauptsächlich zu mitochondrialen Veränderungen wie der Freisetzung von Cytochrom-c, oder der Caspasen 9 und 2 [74] wodurch dann weitere Caspasen aktiviert werden. Auch wenn man berücksichtigt, dass Ruiz-Vela et al. in WEHI 231 Zellen nach BZR-Induktion weder Cytochrom-c noch starke Caspase 9-Aktivität finden, so könnte dennoch freigesetzte Caspase 2 für die Aktivierung von Calpain und Caspase 7, sowie den Abbau von PARP verantwortlich sein. In der Schlussfolgerung wären dann sowohl die Caspaseaktivität als auch die ROS Freisetzung eine Folge mitochondrialer Prozesse. A1 würde damit auf Mitochondrienebene eingreifen, wie es für Bcl-2 Familienmitglieder typisch ist. Man müsste dann jedoch fordern, dass erst eine

Rückwirkung der mitochondriell ausgelösten Caspaseaktivität für die ROS-Freisetzung verantwortlich ist, um den Befund von Ruiz-Vela et al. zu erklären, dass durch Caspaseinhibition die BZR-induzierte Freisetzung von ROS verhindert werden kann.

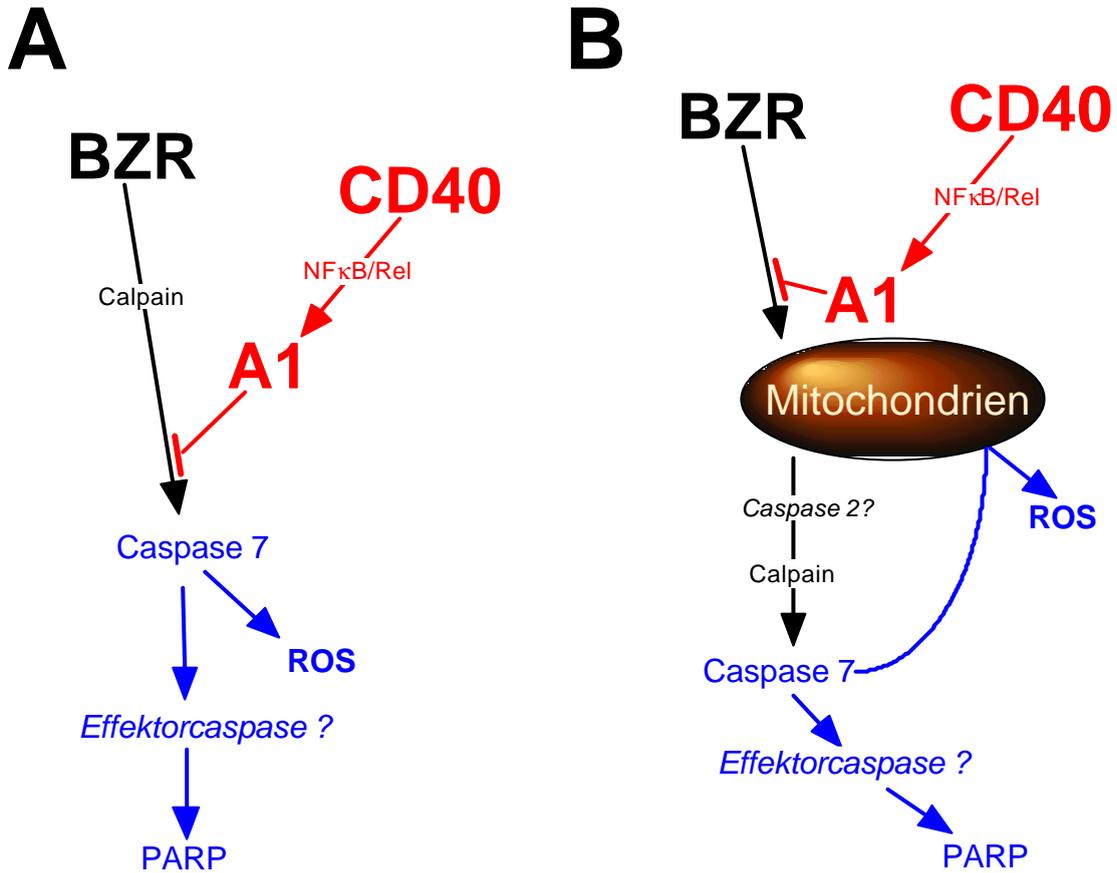


Diagramm 4 *A1 im Zusammenhang der BZR-vermittelten Apoptose.* A) A1 greift in eine Caspase-Kaskade ein, eine Beteiligung der Mitochondrien, ist in diesem Szenario fraglich. B) A1 greift oberhalb der mitochondrialen Anteile des Zelltodprogrammes ein. Spekulative Komponenten der Modelle sind kursiv beschriftet und mit Fragezeichen versehen.