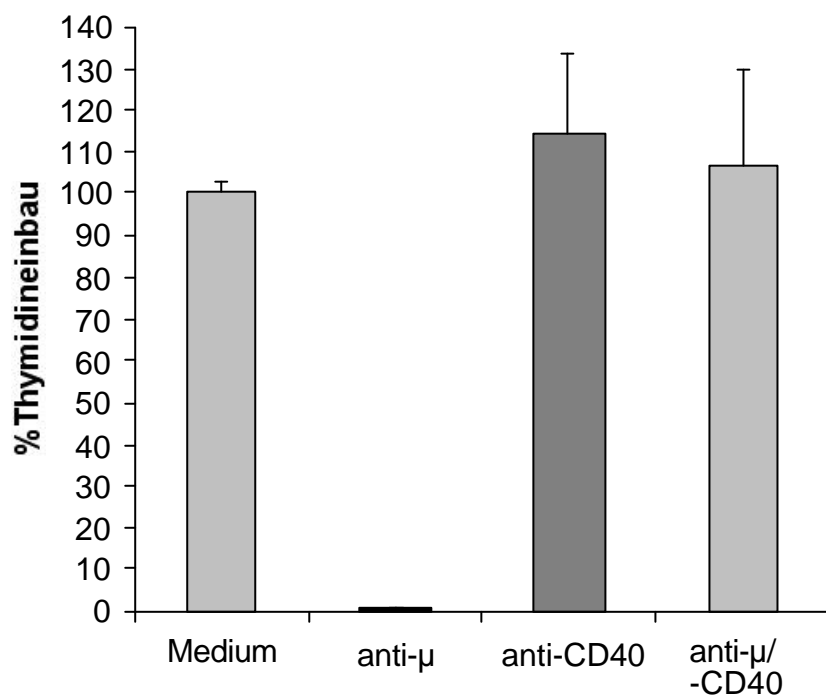


## 4. Ergebnisse

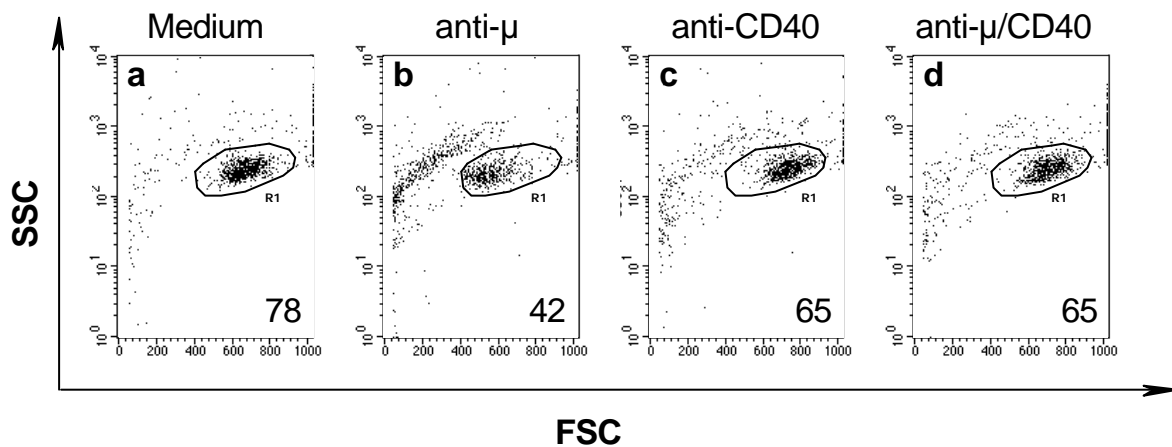
### 4.1 Das CD40 Signal schützt WEHI 231 Zellen vor BZR-induzierter Apoptose

WEHI 231 Zellen spiegeln den Status unreifer B-Zellen wieder, da sie wie diese nach Stimulation über den BZR die Proliferation einstellen, während Kostimulation über CD40 dies auszugleichen vermag und in der Lage ist, die Proliferationsfähigkeit der Zellen wiederherzustellen. Diese bereits mehrfach beschriebene Beobachtung [13, 103, 105] konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: In Abb.1 ist der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau als Maß für die Proliferation der Zellen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Vernetzung des Antigenrezeptors einen hier über neunzigprozentigen Einbruch im Thymidineinbau zur Folge hatte, der durch ein gleichzeitiges CD40 Signal vollständig verhindert wurde.



**Abb.1** CD40 Signale erhalten die Proliferationsfähigkeit anti-IgM stimulierter WEHI 231 Zellen nach Kreuzvernetzung des Antigenrezeptors. WEHI 231 Wildtypzellen wurden für 72 h mit anti-μ [1,5μg/ml] oder anti-CD40[1μg/ml], sowie einer Kombination aus beiden stimuliert. Anschließend wurde der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau als Maß für die Proliferation bestimmt. Dargestellt ist der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau bezogen auf den Mediumwert. Die Fehlerbalken stehen für den Standardfehler des Mittelwerts (n=3).

Auch bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der WEHI Zellen hinsichtlich ihres Überlebenszustandes nach Stimulation des BZR bzw. Kostimulation über CD40 zeigt sich ein deutlicher Schutzeffekt des CD40 Signals: Zwei Tage nach Beginn der Stimulation mit anti- $\mu$  befanden sich nur noch 42% der Zellen innerhalb des „Lebendfensters“, was im Vergleich zur Mediumkontrolle einer Überlebensrate von nur 54% entspricht, während Zellen, die über diesen Zeitraum hinweg ein kostimulatorisches CD40 Signal erhalten hatten, eine Überlebensrate von 83% aufwiesen. Das Lebendfenster war zunächst über Größe und Granularität der Zellen definiert und durch den Ausschluss von PI gefärbten Zellen verifiziert worden (siehe Abb.13B, S. 63).



**Abb.2** Kostimulation über CD40 begünstigt das Überleben von anti-IgM stimulierten WEHI 231 Zellen. WEHI 231 Wildtypzellen wurden zwei Tage lang mit anti-IgM, anti-CD40 sowie einer Kombination aus beiden (je 1 $\mu$ g/ml) stimuliert. Im Vergleich dazu wurden unstimulierte Zellen (Medium) betrachtet. Alle Populationen wurden im Anschluss an die Stimulation durchflusszytometrisch untersucht. Die angezeigten Zahlenwerte beziehen sich auf den prozentualen Anteil an lebenden Zellen (Fenster: R1) in der jeweiligen Population. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis. Aufgetragen ist Granularität ("Side Scatter", SSC) gegen Zellgröße ("Forward Scatter", FSC).

## 4.2 CD 40 induziert die Expression von A1 mRNA in B-Lymphozyten

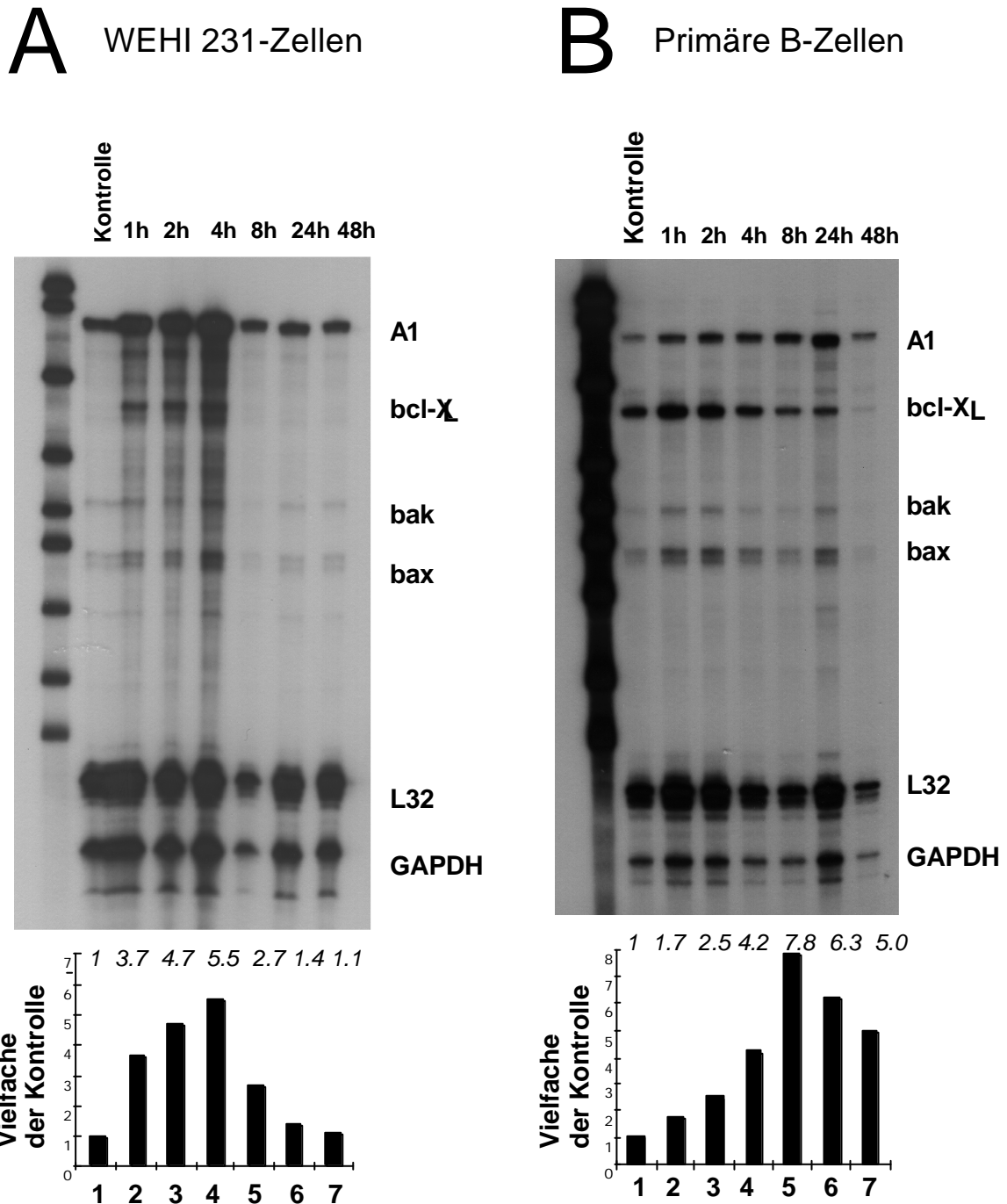
Im Einklang mit von Tsubata et al. veröffentlichten Ergebnissen zeigen die zuvor beschriebenen Befunde, dass CD40 Stimulation WEHI 231 Zellen vor anti-IgM induziertem Wachstumsstopp und Apoptose schützt [13]. Weiterhin ist bekannt, dass CD40 die Expression von Bcl-X<sub>L</sub> kontrolliert, dessen Überexpression das Überleben der Zellen nach Vernetzung des Antigenrezeptors deutlich begünstigt [103-106]. Bcl-X<sub>L</sub> ist ein antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie.

Um nun einen möglichen Einfluss von CD40 auf weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie zu untersuchen, wurde RNA von CD40 induzierten WEHI 231 Zellen einem Ribonuclease-Protektionsassay unterworfen (Abb.3). Hierbei war bereits in unbehandelten Zellen eine deutliche Expression von A1, einem weiteren antiapoptotischen Bcl-2 Verwandten, nachweisbar.

CD40 bewirkte innerhalb von vier Stunden einen Anstieg dieser bereits im unstimulierten Zustand relativ großen Menge an vorhandener A1 mRNA auf das Fünf- bis Sechsfache. Die A1 mRNA-Menge sank nach 24h wieder zurück auf das Ausgangsniveau (Abb.3 A, Spur 1-7).

Im Gesamtvergleich der untersuchten Bcl-2 Familienmitglieder war A1 mRNA die mit Abstand am stärksten repräsentierte Spezies. Bemerkenswert ist, dass Bcl-X<sub>L</sub> mRNA im unstimulierten Zustand nicht detektiert werden konnte und erst nach CD40 Stimulation schwache Signale zu beobachten waren. Im zeitlichen Verlauf war dieser Effekt ebenfalls transient, allerdings sank hier die mRNA Menge bereits nach 8h wieder unter die Nachweisgrenze (Abb.3 A, Spur 1-7). Die proapoptotischen Mitglieder Bak und Bax scheinen auch in ihrer Expression – wenn auch wesentlich schwächer – durch CD40 Signale beeinflusst zu werden.

Da in Kontrollversuchen mit IgG Antikörpern aus der Ratte keine solchen Veränderungen in Expressionsmuster und -intensität der mRNA von Bcl-2 Verwandten zu beobachten waren (Abb.4 B), belegen diese Ergebnisse, dass CD40 bevorzugt die Expression von antiapoptotischen Bcl-2 Verwandten anregt, wobei die Antwort von A1 dominiert wird.



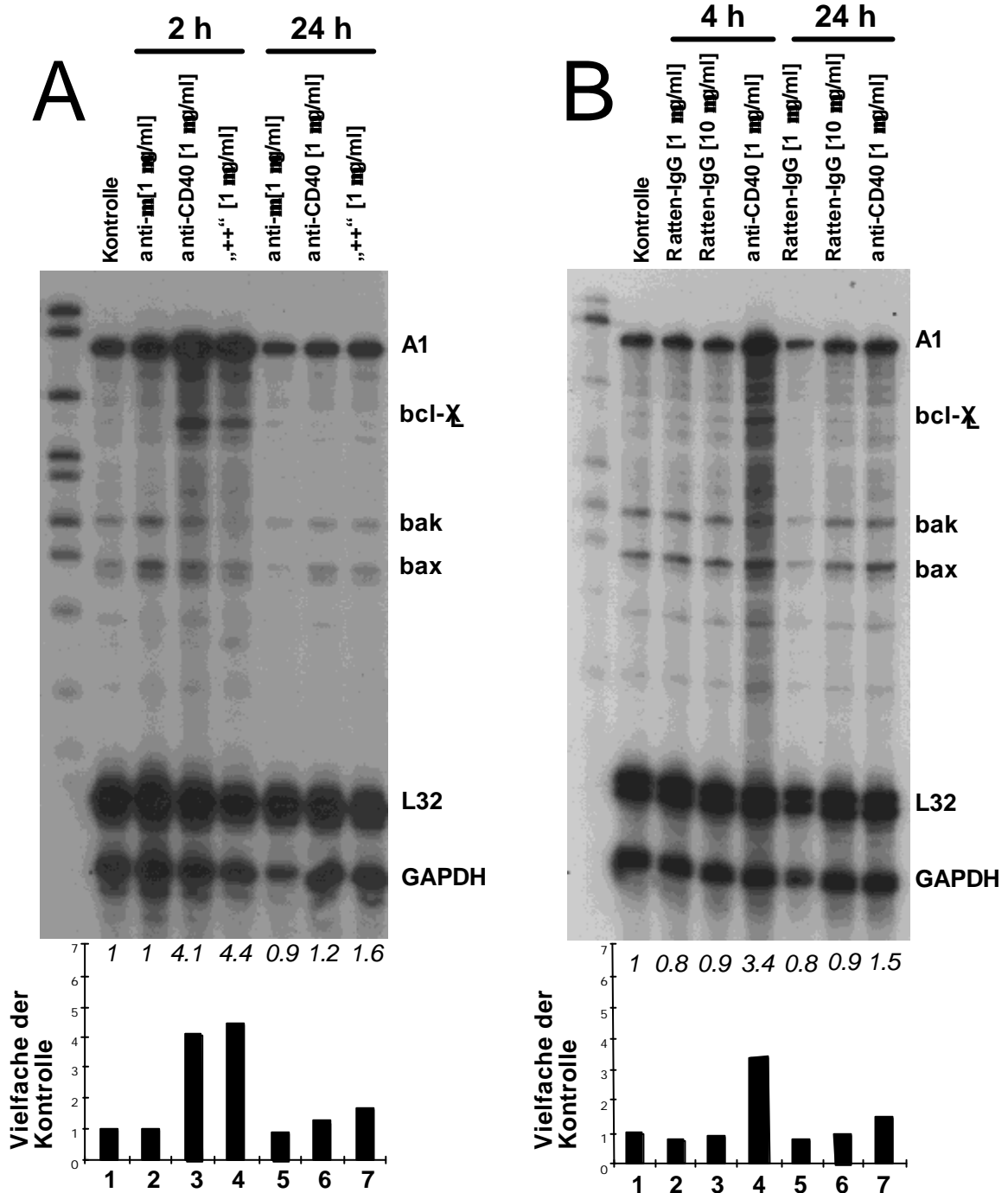
**Abb.3** CD40 Stimulation erhöht die Expression von A1 mRNA in WEHI 231 Zellen und primären B-Lymphozyten der Maus. (A) WEHI 231 Zellen wurden wie angegeben mit anti-mCD40 (1µg/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Gesamt RNA aus den Zellen wurde dann einem Ribonuclease-Protektionsassay, spezifisch für Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, unterworfen. Die geschützten Sondenmoleküle waren mit  $^{32}\text{P}$  markiert und konnten nach einer Gelelektrophorese als spezifische Banden in einem Autoradiogramm sichtbar gemacht und identifiziert werden. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Phosphor Imaging. In den Säulendiagrammen sind die A1 mRNA-Mengen als Vielfache der Kontrolle angegeben. (B) Primäre B-Lymphozyten wurden aus Milzen von Balb/c Mäusen isoliert und anschließend wie in (A) beschrieben in vitro mit anti-CD40 behandelt. Die Gesamt RNA wurde isoliert und mittels Ribonuclease-Protektionsassay untersucht (s.o.).

Um diese Beobachtungen vom Lymphom auf nicht entartete Zellen zurückzuführen, wurde unter den gleichen Bedingungen das Expressionsverhalten von primären B-Zellen aus der Maus auf mRNA Ebene in Bezug auf Bcl-2 Verwandte untersucht. Wie in den Lymphomzellen war A1 mRNA schon im unstimulierten Zustand nachweisbar und zeigte nach Stimulation über CD40 einen deutlichen Anstieg. Hier wurde das Maximum nach 8h fortgesetzter Stimulation erreicht. Im Gegensatz zum transienten Verlauf der A1-Induktion in WEHI 231 Zellen, bei der die Expression nach 24h wieder auf das Basisniveau sank, zeigte sich bei primären B-Zellen ein geändertes Verhalten: Es wurde auch noch nach 48h fünf mal mehr A1 exprimiert als im Ruhezustand (Abb.3 B, vgl. Spur 1 und 7). Darüber hinaus war in primären Zellen die Bcl-X<sub>L</sub> spezifische mRNA schon im unstimulierten Zustand detektierbar und im Vergleich zu den Lymphomzellen stark exprimiert. Ein ebenfalls durch CD40 induzierter Anstieg war jedoch mit maximaler Expression nach 1h (Abb.3 B, Spur 1-7) transient. Schon nach wenigen Stunden war hier das Ausgangsniveau wieder erreicht.

Dies zeigt, dass in B-Zellen aus der Mäusemilz die Stimulation über CD40 ebenfalls eine Steigerung der Expression nicht nur von Bcl-X<sub>L</sub> spezifischer, sondern vor allem auch von A1 spezifischer mRNA bewirkt. Hierbei ist die Reaktion von A1 im Vergleich zu Bcl-X<sub>L</sub> länger anhaltend.

### **4.3 CD40 abhängige A1 Expression wird durch Stimulation des Antigenrezeptors nicht beeinflusst**

Da A1 antiapoptotisches Potential besitzt [109, 110] und CD40 die Expression von A1 steigert, stellt sich die Frage, ob CD40 auch in anti-IgM stimulierten Zellen in der Lage ist, die Expression von A1 anzuregen. Dies würde dann auf einen möglichen Kausalzusammenhang zwischen A1 und dem durch CD40 vermittelten Schutz vor Apoptose hindeuten.



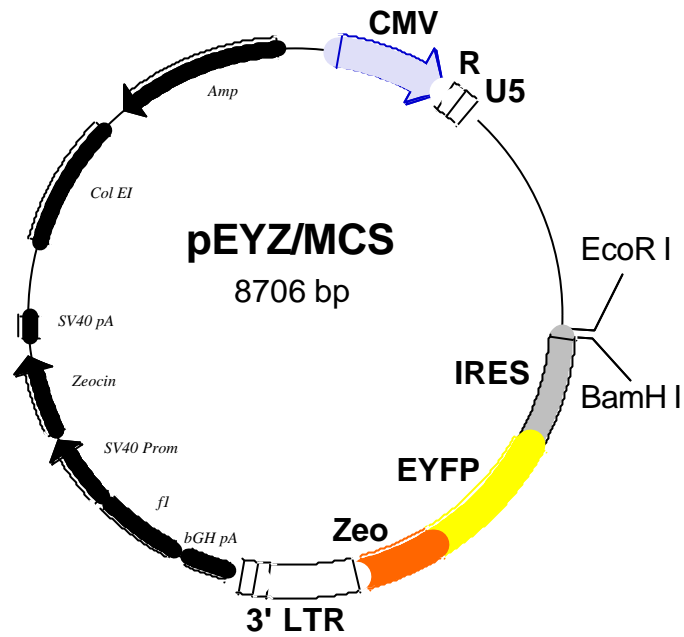
**Abb.4** CD40 abhängige A1 Expression wird durch Stimulation über den BZR nicht beeinflusst. (A) WEHI 231 Zellen wurden mit anti- $\mu$  (1 $\mu$ g/ml), anti-CD40 (1 $\mu$ g/ml) und einer Kombination aus beiden (je 1 $\mu$ g/ml) unterschiedlich lange (wie angegeben) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle. Die Gesamt RNA wurde präpariert und mittels Ribonuclease-Protektionsassay, spezifisch für Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, untersucht. In den Schaubildern sind die A1 mRNA-Mengen als Vielfache der Kontrolle dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm. (B) Verschieden lange Stimulation von WEHI 231 Zellen mit anti-CD40 (1  $\mu$ g/ml) und Ratten-IgG (1  $\mu$ g/ml bzw. 10  $\mu$ g/ml). Zur Kontrolle wurden unstimulierte Zellen herangezogen. Die Gesamt RNA wurde extrahiert und einem Ribonuclease-Protektionsassay, spezifisch für Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, unterworfen (so).

Um diese Frage zu beantworten, wurden WEHI 231 Zellen mit anti-IgM, anti-CD40 oder einer Kombination aus beiden Antikörpern für zwei bzw. 24 Stunden stimuliert. Die Gesamt RNA aus diesen Zellen wurde anschließend wieder einem Ribonuclease-Protektionsassay (s.o.) unterworfen (Abb.4 A). Wie zuvor induzierte CD40 eine transiente Verstärkung der A1 mRNA Expression (Abb.4 A, Spuren 1, 3 u. 6). Bei gleichzeitiger Stimulation des B-Zellrezeptors war interessanterweise zu keinem Zeitpunkt ein negativer Einfluss auf die über CD40 induzierte Expression zu beobachten (Abb.4A, Spuren 3 u. 4, bzw. 6 u. 7). Es ist somit denkbar, dass ein Anstieg der A1 Menge innerhalb der Zellen das Überleben von WEHI 231 Zellen nach Induktion über den B-Zellrezeptor begünstigt.

#### **4.4 Überexpression von A1 in WEHI 231 Zellen**

Um der Frage nachzugehen, inwieweit A1 selbst in der Lage ist, WEHI 231 Zellen vor dem negativen BZR-Signal zu schützen, wurden Überexpressionsuntersuchungen angestellt. Hierfür wurde mittels retroviraler Transduktion die cDNA für die Synthese eines Flag-tragenden murinen A1 Konstruktes (FmA1) stabil in das Genom der WEHI 231 Zellen integriert. Der verwendete retrovirale Expressionsvektor ist in Abb.5 schematisch dargestellt. Parallel zu FmA1 transduzierten Zellen wurde eine Kontrollpopulation erzeugt, die nur das chimäre Markergen exprimiert (Vektorkontrolle).

Die Selektion bezüglich stabil exprimierender Zellen wurde durch die gekoppelte Expression eines chimären Markergens ermöglicht: Erfolgreich infizierte Zellen tragen neben einer Zeocin-Resistenz (Zeo) auch ein Fluoreszenzprotein (Enhanced Yellow Fluorescence Protein, EYFP) mit einem Emissionsmaximum bei 527 nm, also im gelbgrünen Spektralbereich. Dies ermöglichte die fluoreszenzmikroskopische Identifizierung infizierter Zellen (Abb.6) und erlaubte ihre durchflusszytometrische Selektion bzw. Sortierung.

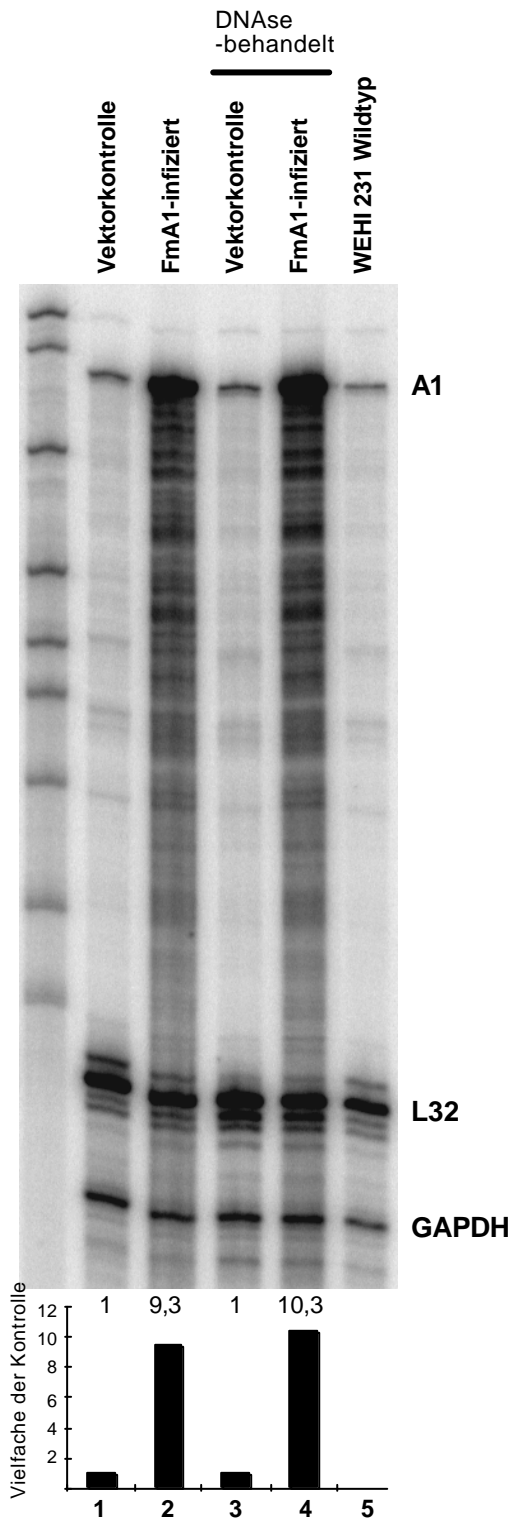


**Abb. 5** Vektor für die Überexpression von FmA1 und EYFP in WEHI 231 Zellen

Zur Anzeige wird der QuickTime™  
Dekompressor "Foto - JPEG"  
benötigt.

**Abb.6** Mit FmA1 infizierte WEHI 231 Zellen exprimieren das Fluoreszenz-Markerprotein EYFP. Gezeigt ist eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von FmA1-transduzierten WEHI 231 Zellen.





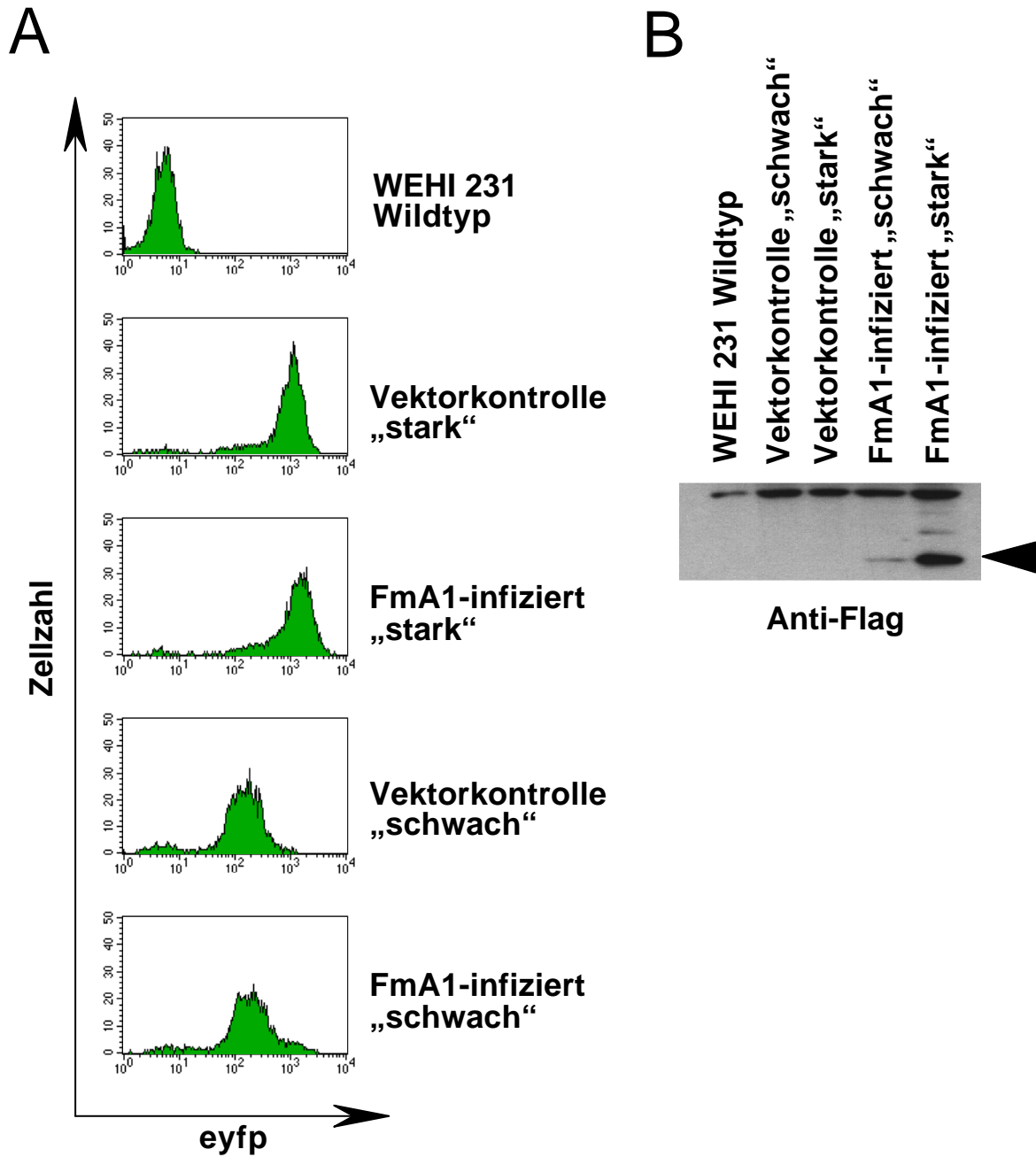
**Abb.7 Nachweis von ektoischem A1 in transduzierten WEHI 231 Zellen auf RNA-Ebene** WEHI 231 Zellen wurden wie beschrieben mit Kontrollplasmid bzw. FmA1 tragendem Vektor transduziert und basierend auf Gelbfluoreszenz bzw. Zeocinresistenz selektioniert. Gesamt RNA aus den Zellen wurde dann einem Ribonuclease-Protektionsassay, spezifisch für Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie, unterworfen (Spur 1 und 2). RNA aus wildtypischen Zellen dienten als zusätzliche Kontrolle (Spur5). Um eine mögliche Verfälschung des Ergebnisses infolge von Verunreinigungen durch den jeweiligen Vektor auszuschließen, war ein Teil der Gesamt-RNA (2,5 µg) vor ihrer Verwendung im Ribonuclease-Protektionsassay für 30 min bei 37°C mit RNase freier DNase (1U) behandelt worden (Abb.4 Spur 3 und 4). Die geschützten Sondenmoleküle waren mit <sup>32</sup>P markiert und konnten nach einer Gelelektrophorese als spezifische Banden in einem Posphor Image sichtbar gemacht, identifiziert und quantifiziert werden. Im Schaubild sind die A1 mRNA-Mengen als Vielfache der jeweiligen Vektorkontrolle angegeben.

Um den Erfolg der Infektion auf RNA-Ebene zu überprüfen, wurden Gesamt-RNA Präparate im Ribonuclease-Protektionsassay, spezifisch für Bcl-2 Verwandte, auf ihren Gehalt an A1-mRNA hin untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb.7 dargestellt und ergab, dass die FmA1 transduzierten Zellen einen im Vergleich zur Kontrollpopulation und Wildtyppopulation etwa zehnfachen Gehalt an A1-mRNA aufwiesen (Abb.7 Spur 1 und 2). Um eine mögliche Verfälschung des Ergebnisses infolge von Verunreinigungen durch den jeweiligen Vektor auszuschließen war ein Teil der Gesamt-RNA vor ihrer Verwendung im Ribonuclease-Protektionsassay mit DNase behandelt worden (Abb.7 Spur 3 und 4).

Aus der gemischten Population niedrig und hoch exprimierender FmA1 transduzierter Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Sortierung und Zeocin-Selektion Populationen mit hoher bzw. niedriger Expressionsintensität von A1 isoliert (Abb.8).

Diese wurden herangezogen, um mithilfe eines Antikörpers gegen das gekoppelt exprimierte Flag-Protein das ektopische A1 in infizierten Zellen auch auf Proteinebene nachzuweisen und zu überprüfen, inwieweit eine Beziehung zwischen FmA1 Expression und Intensität der Gelbfluoreszenz besteht. Hierbei zeigte sich, dass im Gesamtproteinextrakt aus der Population der stärker fluoreszierenden Zellen auch eine größere Menge Protein detektierbar war als in der Vergleichspopulation mit geringerer Gelbfluoreszenz (Abb.8 B) und damit eine gute Korrelation zwischen der Expression der Selektionsmarker und des transduzierten A1 besteht.

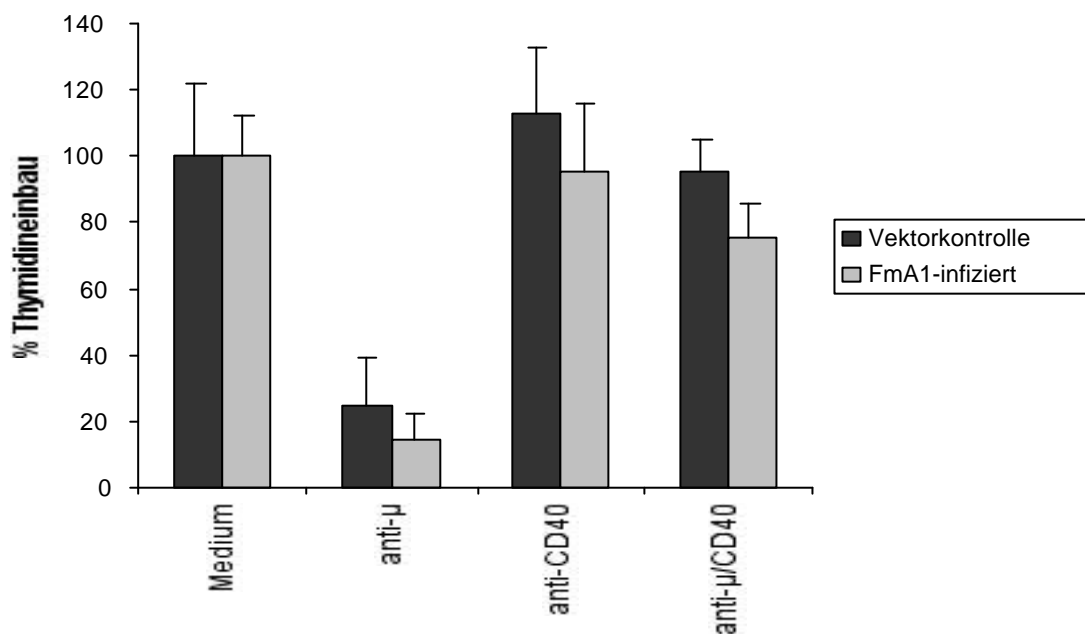
Bezogen auf die Wirksamkeit des transduzierten FmA1 bestand jedoch zwischen den hoch bzw. niedrig exprimierenden Populationen kein signifikanter Unterschied (siehe auch Abb.14A, S.64). Für die nachfolgend dargestellten Experimente wurden - wenn nicht anders angegeben - Populationen mit mittlerer bis hoher FmA1-Expression mit einem, der Abschätzung auf RNA-Ebene zufolge (siehe Abb.7, S.54) mindestens zehnfachen Gehalt an A1 mRNA herangezogen.



**Abb.8** Überexpression von *FmA1* und *EYFP* in WEHI 231 Zellen auf Proteinebene. (A) WEHI 231 Zellen wurden mit einem rekombinanten Retrovirus transduziert („FmA1-infiziert“). Das Konstrukt enthielt neben der Information für EYFP und Zeocin-Resistenz als Selektionsmarker die cDNA Sequenz für murines A1 mit anhängender Flag Aminosäuresequenz. Die Kontrollpopulation wurde mit leerem Vektor (Schematische Darstellung: siehe Abb.5, S.53) transduziert („Vektorkontrolle“). Dieses Konstrukt enthielt zwar die Selektionsmarkergene, nicht jedoch die Information für das Flag-tragende A1. Die transduzierten Populationen wurden mit Zeocin selektioniert und auf der Basis der erworbenen Gelbfluoreszenz durchflusszytometrisch sortiert. Dadurch wurden Populationen mit unterschiedlicher Expressionsintensität („schwach“ bzw. „stark“) isoliert. (B) Anti-Flag (Pfeil) Western Blot mit Gesamt-Proteinextrakten aus den in A gezeigten Populationen.

#### 4.5 A1 hat keinen Einfluss auf den über IgM vermittelten Proliferationsnachteil in WEHI 231 Zellen

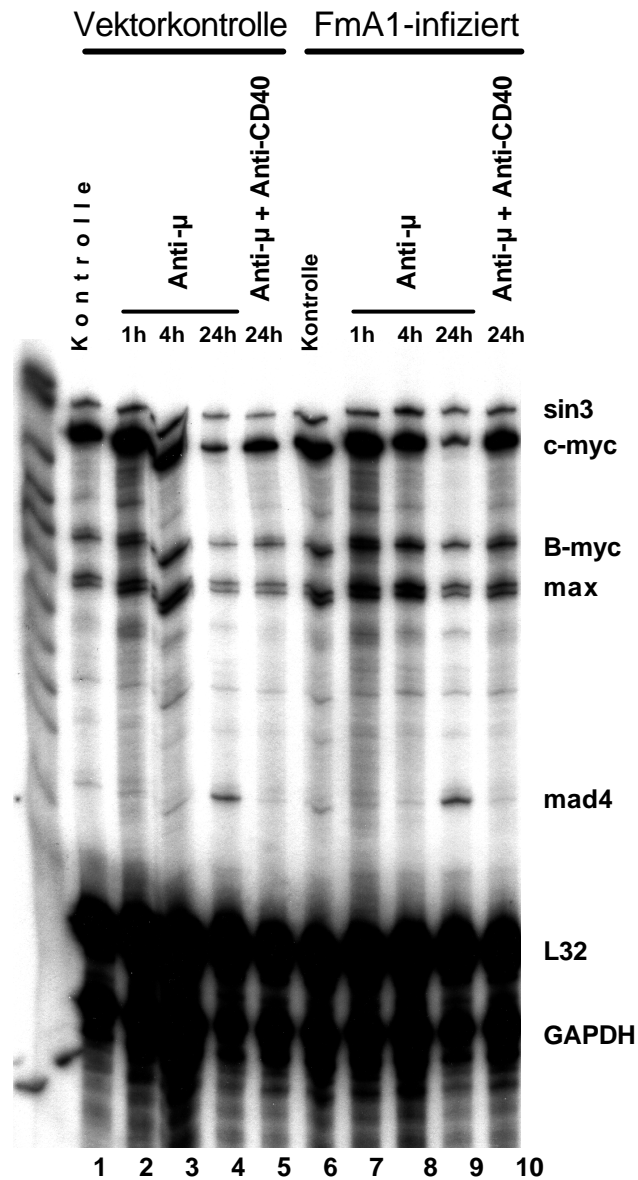
In einem nächsten Schritt wurde das Proliferationsverhalten von FmA1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen anhand des Thymidineinbaus untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Verhalten der FmA1 transduzierten Zellen, insbesondere im Hinblick auf eine Stimulation der Zellen über den BZR, nicht von dem der Kontrollpopulation abwich: Beide erlitten einen Einbruch von 80 % (Abb.6).



**Abb.9** A1 hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von WEHI 231 Zellen. Transduzierte WEHI Populationen (FmA1 und Vektorkontrolle) wurden für 72 h mit anti-μ, anti-CD40, sowie einer Kombination aus beiden Stimulanzen in einer Konzentration von jeweils 1 μg/ml Medium stimuliert. Anschließend wurde der <sup>3</sup>H-Thymidineinbau als Maß für die Proliferation bestimmt. Dargestellt ist der <sup>3</sup>H-Thymidineinbau bezogen auf den Mediumwert, die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung (n=3).

Auf dem Hintergrund dieser Information wurde das mRNA Expressionsmuster cMyc verwandter Gene in den transduzierten Zellen untersucht (Abb.10), da bekannt ist, dass ein Verlust von cMyc bei WEHI 231 grundlegend an Wachstumsstopp und Apoptose beteiligt

ist [25, 85] und cMyc auch in anderen Zellen eine maßgebliche Rolle bei der Regulation von Proliferationsprozessen spielt [36]. In Einklang mit den Proliferationsdaten führt A1 zu keiner Veränderung des BZR-induzierten myc Expressionsmusters. In beiden Fällen folgte einem kurzzeitigen Anstieg ein starker Abfall der c-myc mRNA Menge nach 24 Stunden (Abb.10 Spur 1-4).



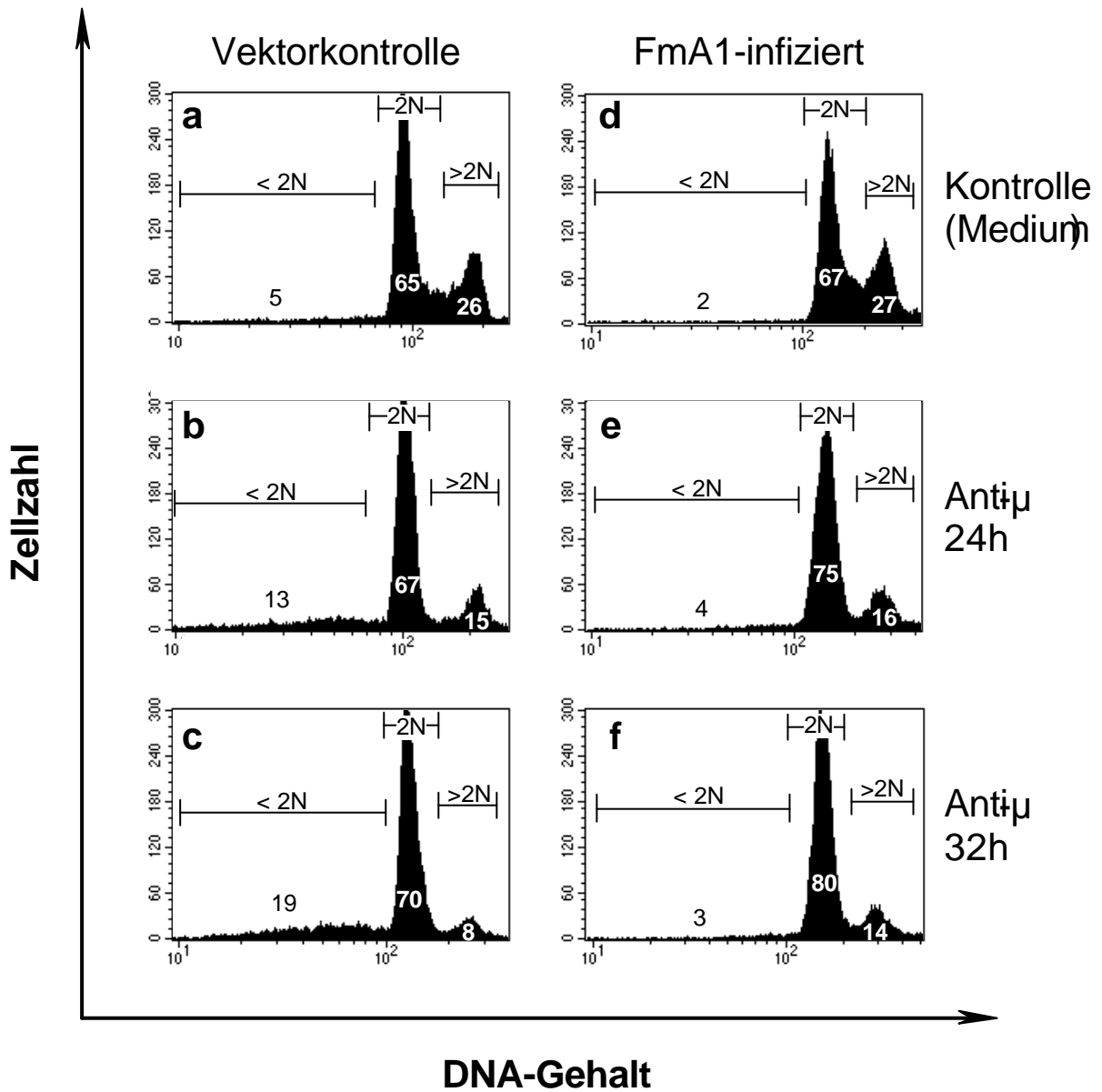
**Abb.10** A1 hat auf RNA-Ebene keinen erkennbaren Einfluss auf das Expressionsmuster c-myc-vewandter Gene. Transduzierte WEHI 231 Zellen wurden mit anti-IgM (1 $\mu$ g/ml) bzw. einer Kombination aus anti-IgM und anti-CD40 (je 1  $\mu$ g/ml) unterschiedlich lange wie angegeben stimuliert. Als Kontrolle wurden jeweils unstimulierte Zellen verwendet. Die Gesamt RNA aus den verschiedenen Populationen wurde isoliert und einem Ribonuclease-Protektionsassay, spezifisch für myc-verwandte Gene, unterworfen. Das gezeigte Autoradiogramm ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

Darüber hinaus hatte die Gegenwart von ektopisch exprimiertem A1 ebenfalls keinen Einfluss auf die über den Antigenrezeptor regulierte Expression von B-myc und max mRNA (Abb.10 alle Spuren). Schließlich konnte in beiden Populationen nach 24 Stunden eine Induktion von mad4 beobachtet werden (Abb.7 Spur 4 bzw. 9). Mad4 trägt zur Hemmung der Proliferation bei und fördert die Differenzierung in bestimmten Zelltypen [121]. A1 hatte also keinen erkennbaren Einfluss auf das RNA-Expressionsmuster c-myc-verwandter Gene in WEHI 231 Zellen, die ein Signal über den Antigenrezeptor erhalten haben.

In einem weiteren Schritt wurden die beiden infizierten Populationen bezüglich ihrer Verteilung auf die Zellzyklusphasen nach anti-IgM Stimulation untersucht. Eine Signalgabe über den Antigenrezeptor arretierte die Zellen in der G1 Phase. Dies galt sowohl für die Kontrollpopulation (Abb.11 a-c) als auch für die A1 überexprimierenden Zellen (Abb.11 d-f).

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Populationen wird jedoch bei der Betrachtung des Anteils an Zellen mit subdiploidem DNA Gehalt deutlich: Bei den Kontrollzellen war hier innerhalb von 32 Stunden ein Anstieg von fünf auf 19% zu beobachten (Abb.11 a-c), was einer ungefähren Vervierfachung entspricht. Bei der Population mit erhöhter A1 Expression war hingegen keine Zunahme apoptotischer Zellen zu erkennen. Dort blieb der Anteil an Zellen mit subdiploidem DNA Gehalt im gleichen Zeitraum mit 2 bzw. 3% konstant niedrig (Abb.11 d-f).

Es scheint also, dass A1 keinen Einfluss auf den Zellzyklus ausübt, jedoch in der Lage ist, die antigenrezeptorinduzierte Apoptose zu unterdrücken.



**Abb.11** A1 verhindert das Absterben von anti-IgM stimulierten WEHI 231 Zellen, nimmt jedoch keinen Einfluss auf den Zellzyklus. FmA1-transduzierte WEHI 231 Zellen und die relevante Kontrollpopulation wurden jeweils für 24 und 32 Stunden mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-IgM stimuliert. Im Vergleich dazu wurden jeweils unbehandelte Zellen betrachtet ("Medium"). Die gezeigten Histogramme stellen das durchflusszytometrische DNA-Fluoreszenz-Profil der Zellpopulationen nach erfolgter PI-Färbung dar. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil an Zellen in den jeweiligen Fenstern für subdiploide (<2N) und diploide (2N) Zellen, sowie für Zellen in der S/G2/M-Phase (>2N) an. Es handelt sich hier um die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

## **4.6 A1 hat keine Wirkung auf die NFκB-Aktivität in WEHI 231 Zellen**

Da die Expression von cMyc vom NFκB System abhängt [16], erschien es interessant, die A1 überexprimierenden WEHI Zellen bezüglich NFκB getriebener Transkription im Rahmen der BZR-Stimulation zu untersuchen. Hierfür wurde die Aktivität von NFκB in FmA1 infizierten Zellen mithilfe eines zuvor transduzierten, von diesem Transkriptionsfaktor abhängigen Luciferasegens bestimmt. Als Maß für die NFκB-Aktivität diente dabei die Luciferaseaktivität in Extrakten aus diesen Zellen.

Zellen mit stabiler Expression einer NFκB-abhängigen Luciferase wurden über Nacht in An- bzw. Abwesenheit von anti-μ, anti-CD40 oder beiden zusammen kultiviert und die Luciferaseaktivität in den Proben bestimmt (Abb.12A).

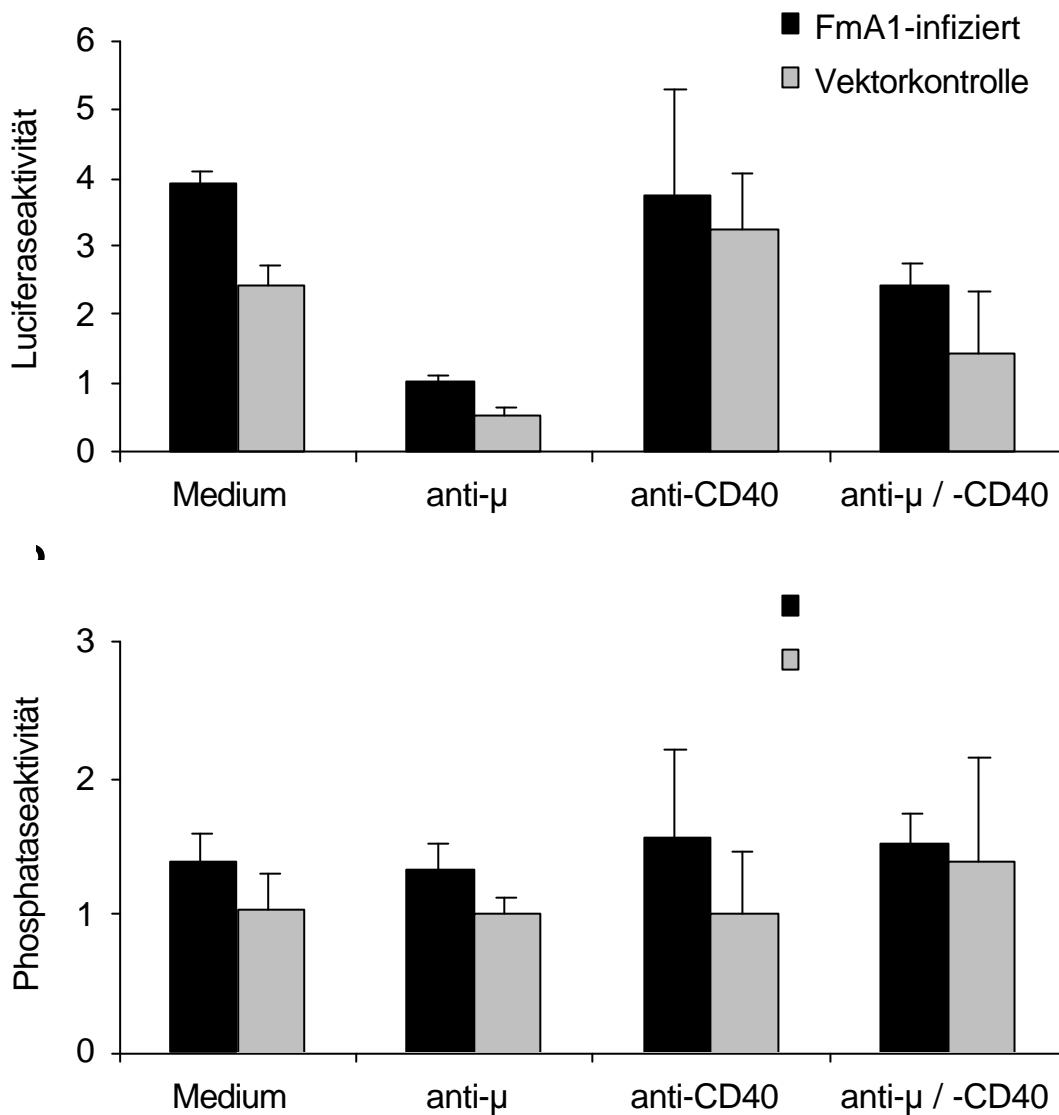
Um sicherzustellen, dass ein Rückgang der NFκB-Aktivität nicht auf eine transduktionsbedingte Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Zellen zurückzuführen war, wurden die Luciferase exprimierenden Zellen zusätzlich stabil mit SEAP (Secreted form of human placental alkaline phosphatase), der sezernierbaren Form einer alkalinen Phosphatase kotransduziert. Die Expression von SEAP stand unter der Kontrolle des NFκB unabhängigen MuLV LTR.

Für SEAP ist gezeigt, dass Konzentrationsänderungen im Mediumüberstand direkt proportional zu Änderungen der intrazellulären Gen- und Proteinexpression in den transduzierten Zellen sind [119, 120].

Die Zellen wurden über Nacht mit anti-μ, anti-CD40 und einer Kombination aus beiden Antikörpern stimuliert und anschließend die Luciferaseaktivität ermittelt. Parallel dazu wurde die Phosphataseaktivität im Mediumüberstand bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass das ektopische A1 den Zellen keinen ausreichenden Schutz vor dem BZR-vermittelten Verlust an NFκB-Aktivität bietet (Abb.12A). Dass sich diese Beobachtung tatsächlich auf einen BZR-Effekt bezieht, ist daraus ersichtlich, dass die Phosphataseaktivität im Mediumüberstand als Maß für die Gen- und Proteinexpression in den Zellen durch Induktion über den BZR unbeeinflusst blieb (Abb.12B).

Die Kostimulation mit anti-CD40 hingegen vermochte die Aktivität von NFκB nach BZR-Stimulation weitgehend aufrechtzuerhalten (Abb.12A).



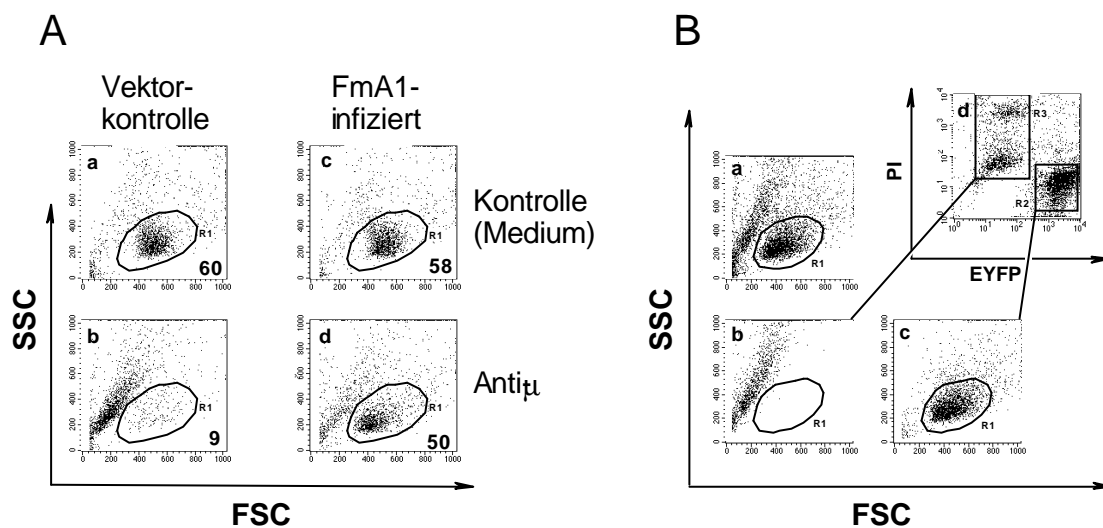


**Abb12.** *A1 hat keinen direkten Einfluss auf NF $\kappa$ B getriebene Transkription.* Doppelt kotransduzierte WEHI Populationen\* (FmA1 und Vektorkontrolle jeweils mit NF B-abhängiger Luciferase und SEAP) wurden über Nacht mit anti- $\mu$  (7,5 $\mu$ g/ml) anti-CD40 (1 $\mu$ g/ml), sowie einer Kombination aus beiden Stimulanzen stimuliert. Anschließend wurden die Luciferaseaktivität in den Zellen (A) und die Phosphataseaktivität im Überstand (B) bestimmt. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung (n=4). \* Es handelte sich hier um Populationen mit niedriger FmA1 Expression, siehe Abb.8.

Die Schutzfunktion des CD40-Signals in BZR-induzierten WEHI 231 Zellen scheint bezüglich des NF $\kappa$ B-Systems also nicht über A1 alleine vermittelt zu werden.

## 4.7 A1 begünstigt das Überleben von anti-IgM stimulierten WEHI 231 Zellen

In einem weiteren Schritt wurde mittels Durchflusszytometrie der Einfluss von A1 auf das Überleben von WEHI 231 Zellen nach Stimulation mit anti-IgM untersucht. Dies geschah, um in unabhängigen Versuchen zu überprüfen, ob A1 vor dem Antigenrezeptor-induzierten Zelltod schützt. Abb.13 zeigt das Ergebnis: Drei Tage nach Beginn der Stimulation befanden sich immer noch 50% der A1 überexprimierenden Zellen in einem über Größe und Granularität stringent definierten "Lebendfenster". Im Vergleich zu 58% lebenden Zellen in der relevanten Mediumkontrolle entspricht das einer Überlebensrate von 85% (Abb.13A c u. d). Im Gegensatz dazu lebten bezogen auf die Mediumkontrolle nur noch 15% der Kontrollzellen (Abb.13A a u. b).

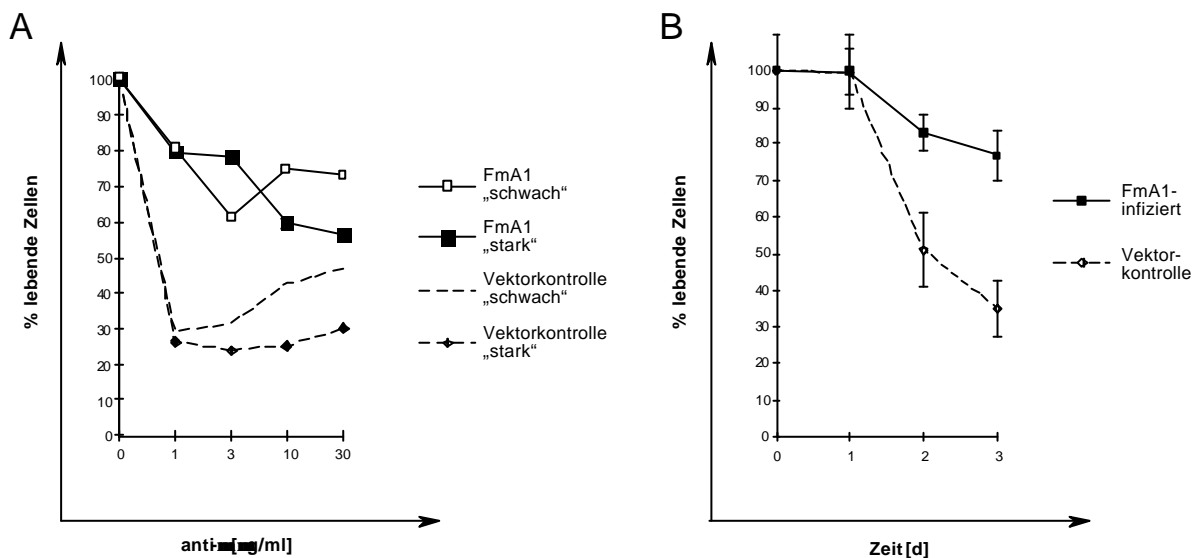


**Abb.13** Überexpression von A1 begünstigt das Überleben von anti-IgM stimulierten WEHI 231 Zellen. (A) WEHI 231 Zellen, transduziert mit FmA1, sowie die relevante Kontrollpopulation wurden drei Tage lang mit anti-IgM (1µg/ml) stimuliert. Im Vergleich dazu wurden jeweils unstimulierte Zellen (Medium) betrachtet. Alle Populationen wurden im Anschluss an die Stimulation durchflusszytometrisch untersucht. Die angezeigten Zahlenwerte beziehen sich auf den prozentualen Anteil an lebenden Zellen (Fenster: R1) in der jeweiligen Population. Diese Ergebnisse sind beispielhaft für mindestens vier unabhängige Experimente. (B) Ergebnisse durchflusszytometrischer Analyse von FmA1-transduzierten WEHI 231 Zellen nach Behandlung mit Propidiumiodid (PI). In a ist die Gesamtpopulation dargestellt. Aufgetragen ist Granularität ("Side Scatter", SSC) gegen Zellgröße ("Forward Scatter", FSC). Das Fenster für lebende Zellen (R1) wurde so gewählt, dass PI-positive Zellen (d, R3) ausgeschlossen waren (b), jedoch die lebenden, gelb fluoreszierenden Zellen (d, R2) erfasst wurden (c).

Abb.13 B demonstriert die Verifikation des bei der Auswertung zugrundegelegten „Lebendfensters“ durch den Ausschluss von PI-gefärbten Zellen.

In der Folge wurde diese offensichtliche Schutzfunktion von A1 auf eine mögliche Abhängigkeit von der anti-IgM Dosis hin überprüft. Der leicht verminderte Effekt von anti- $\mu$  bei extrem hoher Dosierung war nicht generell signifikant und wurde nicht weiter analysiert.

Die A1 exprimierenden Zellen sind sogar bei anti- $\mu$  Konzentrationen von bis zu 30  $\mu\text{g/ml}$  wesentlich widerstandsfähiger gegenüber anti-IgM vermittelter Apoptose als die Kontrollpopulation: Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  anti- $\mu$  standen 80 % Überlebende in der A1 Population 25 % Überlebenden in der Kontrollpopulation gegenüber. Bei 30  $\mu\text{g/ml}$  anti- $\mu$  konnten immer noch 70 % der A1 Zellen im Vergleich zu nur 40 % der Kontrollzellen überleben. (Abb.14A; gemessen am 3. Tag nach Stimulationsbeginn). Die Expressionsintensität von A1 hatte hierbei auf die Überlebensrate keinen signifikanten Einfluss (Abb.14A "schwach" bzw. "stark").



**Abb.14 Überlebensfähigkeit von FmA1-exprimierenden Zellen nach Stimulation über den Antigenrezeptor.** (A) Mit FmA1 und Vektor transduzierte WEHI 231 Zellen mit jeweils hoher bzw. niedriger Expressionsintensität wurden über drei Tage mit unterschiedlichen Dosen anti-IgM stimuliert. Der Prozentsatz an lebenden Zellen in diesen Kulturen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. (B) Transduzierte WEHI 231 Zellen (FmA1 und Vektorkontrolle) wurden wie angegeben über unterschiedliche Zeiträume hinweg mit 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-IgM behandelt. Die Populationen wurden anschließend durchflusszytometrisch auf den Prozentsatz lebender Zellen hin untersucht. Der Graph zeigt den durchschnittlichen Prozentsatz ( $\pm$  Standardabweichung) an lebenden Zellen in den Kulturen aus vier unabhängigen Experimenten.

Auch im zeitlichen Verlauf trat die Schutzfunktion von A1 deutlich zu Tage: Am zweiten und dritten Tag nach Stimulationsbeginn war von der A1 transduzierten Population ein signifikant höherer Prozentsatz an Zellen am Leben als in der Kontrollpopulation: 85 % im Vergleich zu 50 % bzw. 80 % im Vergleich zu 35 % (Abb.14 B). Diese Befunde zusammengenommen deuten darauf hin, dass ektopisch exprimiertes A1 das Überleben von WEHI 231 Zellen nach Stimulation über den B-Zellrezeptor fördert bzw. die Apoptose verhindert.

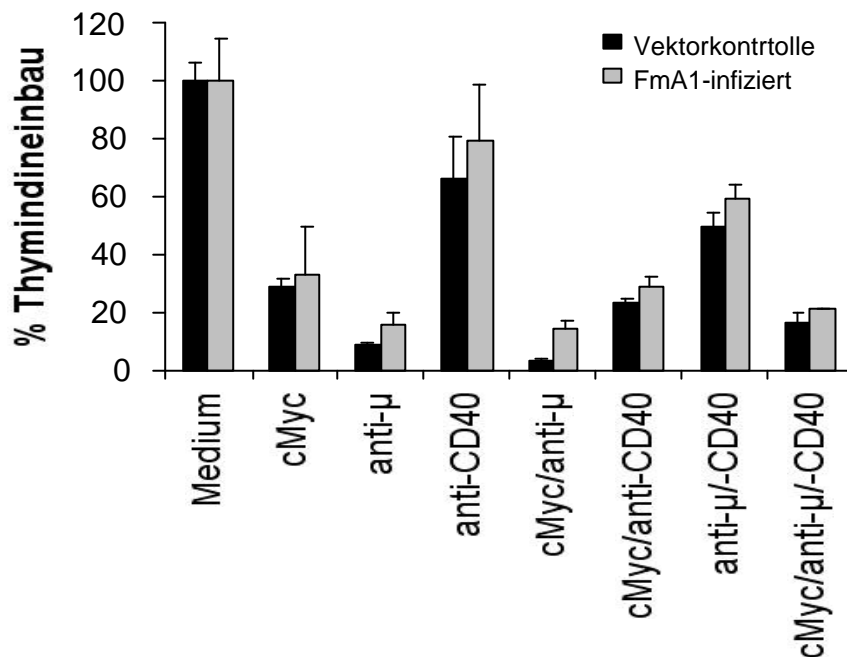
A1 alleine reicht also nicht aus, um die Proliferation von BZR-induzierten WEHI 231 Zellen wiederherzustellen, erhält diese aber am Leben.

#### **4.8 Überexpression von cMyc in FmA1 transduzierten WEHI 231 Zellen verhindert nicht den BZR-induzierten Wachstumsstopp**

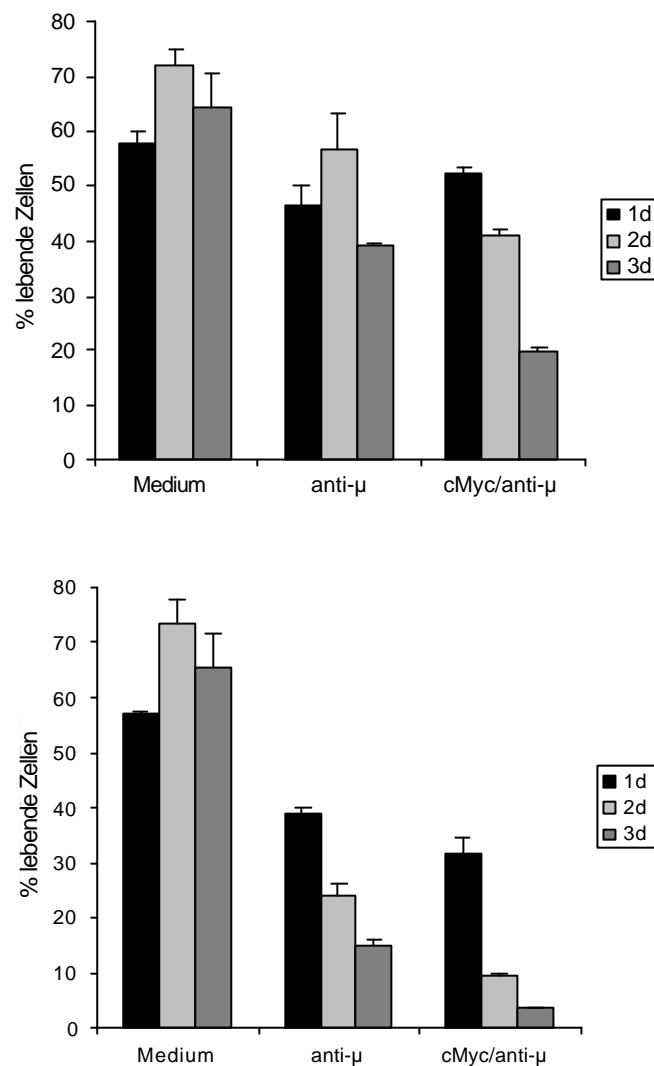
Da weder der Rückgang der Proliferation noch der Verlust von cMyc durch A1 verhindert werden konnte, ergab sich die Frage, ob eine alleinige oder zusätzliche ektopische Expression des Oncogens *c-myc* geeignet ist, um die Proliferationsfähigkeit der Zellen wiederherzustellen. Zu diesem Zweck wurden FmA1-infizierte Zellen und die entsprechende Kontrollpopulation zusätzlich mit rekombinanten Retroviren infiziert, die ein induzierbares cMyc-Konstrukt (Myc-ER) in die Zellen einbrachten. Die Aktivierung von cMyc-ER erfolgte über den gekoppelten Östrogenrezeptor (ER) durch Hydroxitamoxifen: cMyc-ER bildet über den Östrogenrezeptor in der Zelle einen inaktiven Komplex mit Hsp90 (für engl.: Heat Shock Protein 90), einem ubiquitären Chaperonin [122, 123], aus dem es dann mittels Tamoxifen freigesetzt werden kann.

Die Selektion bezüglich stabil exprimierender doppelt infizierter Zellen wurde wiederum durch die gekoppelte Expression eines chimären Markergens ermöglicht. In diesem Falle handelte es sich jedoch um eine Neomycin-Resistenz und ein Fluoreszenzprotein (Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP) mit einem Emissionsmaximum von 507 nm. Dies liegt im Vergleich zum Emissionsmaximum des an FmA1 gekoppelten EYFP weiter im grünen Spektralbereich und ermöglicht damit eine durchflusszytometrische Identifizierung doppelt infizierter Zellen.

Es war unter den gegebenen Bedingungen keine positive Wirkung des ektoptischen cMyc-ER auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu beobachten, d. h. beide Populationen (FmA1 infizierte und A1-Vektorkontrolle) erlitten nach BZR-Vernetzung wie zuvor schon beobachtet (siehe Abb.9) beim Thymidineinbau einen gleichermaßen erheblichen Einbruch von hier 84 % (FmA1 transduzierte Zellen) bzw. 91,5 % (A1-Vektorkontrolle) der auch durch zusätzliche Induktion des ektoptischen cMyc-ER nicht verhindert werden konnte (Abb.15, anti- $\mu$  im Vergleich mit cMyc/anti- $\mu$ ). Im Gegenteil fällt ins Auge, dass auch schon die Induktion des ektoptischen cMyc alleine sich in beiden Populationen negativ auswirkte. Interessanterweise konnte hier eine zusätzliche Stimulation über CD40 die Proliferationsfähigkeit nicht im gleichen Maße wiederherstellen, wie nach alleiniger Signalgabe durch IgM und hatte auf den kombinierten Effekt von anti- $\mu$  und cMyc-ER einen ebenfalls verringerten Einfluss. Die Induktion eines freien Östrogenrezeptors wirkte sich in damit transduzierten Zellen nicht negativ auf die Proliferationsfähigkeit aus.



**Abb.15** *Ektopisches cMyc reicht nicht aus, um den BZR-induzierten Wachstumsstopp in WEHI 231 Zellen rückgängig zu machen.* Mit einem durch Tamoxifen über einen gekoppelten Östrogenrezeptor induzierbaren cMyc-Konstrukt transduzierte WEHI Populationen\* (FmA1 und Vektorkontrolle) wurden für 48 h mit anti- $\mu$ , anti-CD40, Tamoxifen sowie verschiedenen Kombinationen aus den Stimulanzen (anti- $\mu$  und anti-CD40 mit je 1  $\mu$ g/ml, Tamoxifen 200 nM) stimuliert. Anschließend wurde der  $^3$ H-Thymidineinbau über einen Zeitraum von 5 Stunden als Maß für die Proliferation bestimmt. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung (n=3). \*Es handelte sich hier um Populationen mit niedriger FmA1 Expression, siehe Abb.8.



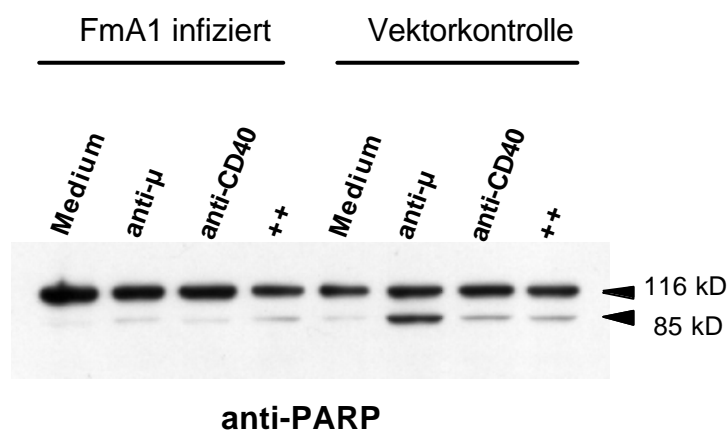
**Abb.16** Überlebensfähigkeit von *FmA1* und *cMyc* exprimierenden Zellen nach Stimulation über den Antigenrezeptor. (A) Mit *FmA1* und (B) *FmA1*-Kontrollvektor transduzierte WEHI 231 Zellen\*, die jeweils zusätzlich mit einem induzierbaren *cMyc*-Expressionsvektor infiziert waren, wurden über ein, zwei und drei Tage mit anti-IgM stimuliert, bzw. durch Zugabe von Tamoxifen (200 nm) die Ko-Expression von *cMyc* induziert. Anschließend wurde jeweils der Prozentsatz an lebenden Zellen in diesen Kulturen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Säulen stehen für den durchschnittlichen Prozentsatz ( $\pm$  Standardabweichung) an lebenden Zellen in den Kulturen aus zwei unabhängigen Experimenten. \*Es handelte sich hier um Populationen mit niedriger *FmA1* Expression, siehe Abb.8.

Bei einer Analyse der Überlebensrate von A1-transduzierten WEHI 231 Zellen nach BZR-Engagement übte die Induktion von *cMyc*-ER einen negativen Einfluss aus und reduzierte den Anteil lebender Zellen um etwa 50 % (Abb.16A). Dennoch hatten auch hier die A1 überexprimierenden Zellen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollpopulation (Abb.16A und B: „*cMyc/anti-μ*“)!

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass cMyc-ER nicht ausreichend war, um FmA1 transduzierte WEHI 231 Zellen nach BZR-Ligation im Zellzyklus zu halten, sondern im Gegenteil, die Zellen in Proliferationsfähigkeit und Überleben zusätzlich beeinträchtigte. A1 war aber dennoch in der Lage auch hier einen Überlebensvorteil gegenüber der Kontrollpopulation zu vermitteln.

#### 4.9 A1 verhindert den BZR-induzierten Abbau der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)

Auf dem Hintergrund der bisher geschilderten Ergebnisse sollte nun geklärt werden, inwiefern A1 in den apoptotischen Signalweg eingreift. Wie einleitend schon erwähnt spielen die sog. Caspasen eine zentrale Rolle innerhalb der apoptotischen Verläufe (siehe z.B.[51]). Ein Indikator für das Auftreten von aktiven Caspasen ist die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP). PARP ist ein DNA-bindendes Enzym, das Brüche innerhalb von DNA-Strängen erkennen und beheben kann [54, 55]. Im Zuge apoptotischer Prozesse kommt es zu einem Abbau von PARP durch aktivierte Caspasen [53]. Die entstandenen Spaltprodukte können im Western Blot Verfahren detektiert und ihr Vorhandensein als Hinweis auf Caspaseaktivität betrachtet werden.



**Abb.17** Überexpression von A1 in WEHI 231 verhindert ebenso wie anti-CD40 die Spaltung von PARP nach anti-μ Stimulation. FmA1-überexprimierende WEHI 231 Zellen und die entsprechende Kontrollpopulation wurden für 24 Stunden mit anti-μ, anti-CD40 sowie einer Kombination aus beiden stimuliert. Die Konzentration der Stimulanzien war jeweils 1 μg/ml Kulturmedium. Die Abbildung zeigt einen danach hergestellten anti-PARP Western Blot mit Gesamtproteinextrakten aus den Populationen.

Es wurden A1 transduzierte Zellen und entsprechende Kontrollzellen über den BZR stimuliert und Protein-Gesamtextrakte von diesen Populationen hergestellt. Western Blots aus diesen Extrakten wurden dann mit einem Antikörper gegen PARP und seine Abbauprodukte behandelt. Abb.17 zeigt die Aufnahme eines repräsentativen Blots. Deutlich ist bei der Vektorkontrolle ein PARP-Spaltprodukt als Bande bei 85 kD zu erkennen. Bei der A1 transduzierten Population tritt diese Bande mit weit geringerer Intensität auf. Bemerkenswert ist, dass auch hier wieder eine deutliche Übereinstimmung in der Wirkung zwischen ektopischem A1 und CD40 sichtbar wurde: Kostimulation mit anti-CD40 verhinderte in der Kontrollpopulation ebenfalls das Auftreten von PARP-Abbauprodukten und impliziert damit ein möglicherweise über A1 vermitteltes Eingreifen von CD40 in die Caspase Kaskade.

#### **4.10 A1 kann die BZR-induzierte Spaltung ektopischer Caspase 7 unterdrücken**

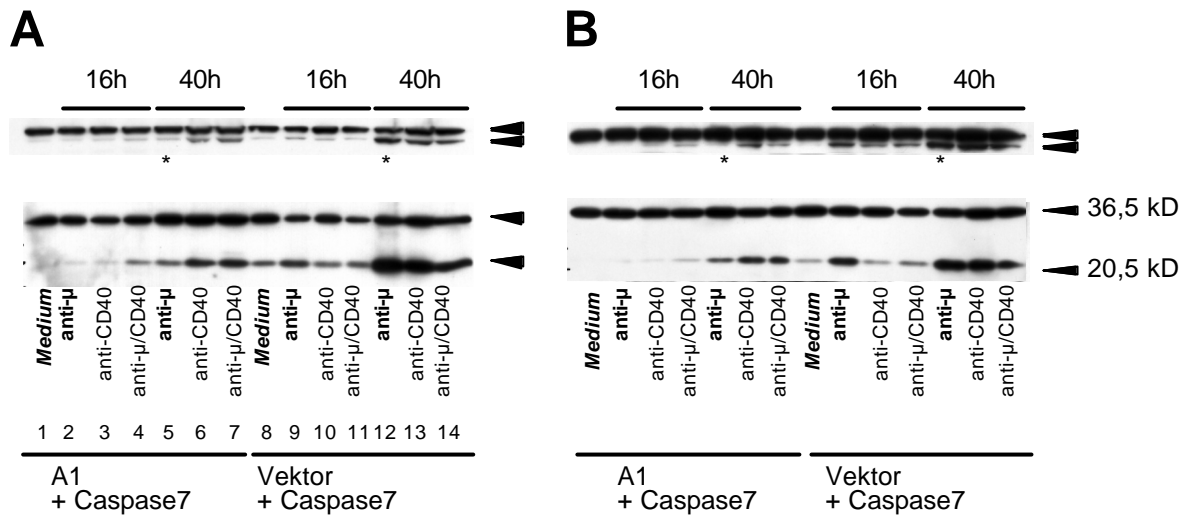
Nachdem bekannt ist, dass in WEHI 231 Zellen bei der BZR-induzierten Apoptose vor allem die Caspase 7 eine wichtige Rolle spielt [63], war es nun interessant zu untersuchen, ob A1 einen Einfluss auf diese Effektorcaspase hat.

Da endogene Caspase 7 mit kommerziell erhältlichen Antikörpern nur sehr schwer nachzuweisen war (siehe Abb.19), wurden zunächst FmA1-infizierte Zellen und die entsprechende Kontrollpopulation zusätzlich mit rekombinanten Retroviren infiziert, die cDNA für Caspase 7 in die Zellen einbrachten. Diese cDNA für Caspase 7 wurde mittels PCR aus einem reversen Transkriptionsprodukt von WEHI 231 RNA gewonnen, in ein Vektorplasmid inkloniert und sequenziert. Es wurde der gleiche Vektor wie bei der Kotransduktion von cMyc-ER (siehe S.65) verwendet. Die Selektion bezüglich stabil exprimierender doppelt infizierter Zellen wurde wie dort durch die gekoppelte Expression eines chimären Markergens ermöglicht.

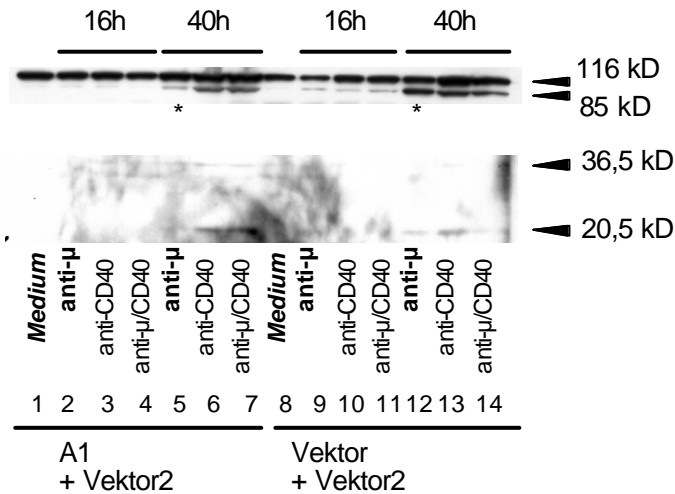
Die stabil doppelt transduzierten Zellen wurden dann über den BZR, CD40 und eine Kombination aus beiden stimuliert und Protein-Gesamtextrakte aus den Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellt. Western Blots aus diesen Extrakten wurden dann



mit Antikörpern gegen PARP und Caspase 7, sowie deren jeweilige Spaltprodukte behandelt.



**Abb.18** Überexpression von A1 in WEHI 231 verhindert die Spaltung von ektopischer Caspase 7 nach anti- $\mu$  Stimulation. WEHI 231 Zellen, die FmA1 bzw. die dazugehörige Vektorkontrolle stabil exprimierten und jeweils zusätzlich mit Procaspase 7 transduziert worden waren, wurden für 16 und 40 Stunden in Anwesenheit von anti- $\mu$  (7,5  $\mu$ g/ml), anti-CD40 (1  $\mu$ g/ml), sowie einer Kombination aus beiden stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen („Medium“). Die Abbildung zeigt das Ergebnis zweier unabhängiger Western Blot Experimente (A,B) mit Antikörpern gegen PARP (116 kD) und Caspase 7 (36,5 kD), sowie deren Spaltprodukte (85 bzw. 20,5 kD). Die entsprechenden Vektorkontrollen sind in Abb.19 dargestellt.



**Abb.19** CD40 induziert den Abbau endogener Caspase 7 WEHI 231 Zellen, die FmA1 bzw. die dazugehörige Vektorkontrolle stabil exprimierten und jeweils zusätzlich mit dem EGFP-tragenden Vektor 2 (Kontrollvektor für die Überexpression der Caspase 7) transduziert worden waren, wurden für 16 und 40 Stunden in Anwesenheit von anti- $\mu$  (7,5  $\mu$ g/ml), anti-CD40 (1  $\mu$ g/ml), sowie einer Kombination aus beiden stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen („Medium“). Detektiert wurden PARP (116 kD) und Caspase 7 (36,5 kD), sowie deren Spaltprodukte (85 bzw. 20,5 kD).

Dabei stellte sich heraus, dass anti- $\mu$  in der Tat eine Spaltung der Caspase 7 herbeiführte (Abb.18A und B, jeweils Spur 9 und 12) und dies von A1 (Abb.18A und B, jeweils Spur 2 und 5) wie auch durch Kostimulation über CD40 zu frühen Zeiten vollständig verhindert werden konnte (Abb.18A und B, jeweils Spur 11). Überraschend ist in diesem Zusammenhang, dass CD40-Signale zu späten Zeitpunkten (40h) im Vergleich zum BZR-Signal eine fast ebenso ausgeprägte Spaltung der Caspase 7 auslösten, die sich auch im PARP-Abbau widerspiegelte. Entsprechend war bei der Doppelstimulation durch anti-CD40 zusammen mit anti- $\mu$  in den Vektorkontrollen nach 40h kein gleichermaßen ausgeprägter Schutzeffekt von CD40 zu beobachten (Abb.18A und B, jeweils Spur 7) wie durch A1 alleine (Abb.18A und B, jeweils Spur 5). Ebenso hat auch das ektopische A1 auf die CD40-abhängige Aktivierung der Caspase 7 einen geringeren Einfluss, als auf deren anti- $\mu$  bedingten Abbau (Vergleiche Abb.18 A und B jeweils Spur 5 und 6). Beides scheint sich auch im Hinblick auf die endogene Caspase 7 zu bestätigen, da bei Western Blots mit den Vektorkontrollen nach entsprechender Stimulation mitunter ebenfalls eine Bande auf der Höhe des Caspasespaltproduktes auftrat (Abb.19 Spur 6,7 und 12 bis 14).

Außerdem ist zu bemerken, dass das Ausmaß des PARP-Abbaus durch die ektopische Caspase 7 unbeeinflusst blieb, was dadurch zum Ausdruck kommt, dass zwischen den überexprimierenden Populationen und den entsprechenden Kontrollen kein Unterschied zu sehen war (Abb.18 und 19). Daneben bestätigte sich jedoch die Beobachtung, dass A1 den BZR-abhängigen Abbau von PARP verhinderte (Abb.18A und B Spur 5\* und 12\*, sowie Abb.19 Spur 5\* und 12\*) und CD40 zumindest zu frühen Zeitpunkten (16h) einen ähnlichen Effekt hatte (insbesondere Abb.18A und B, jeweils Spur 9 und 11).

#### **4.11 Überexpression von A1 verhindert das gesteigerte Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen nach IgM-Stimulation in WEHI 231 Zellen**

Radikalische Sauerstoffverbindungen wie Peroxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Hydroperoxyradikale ( $HO_2^{\cdot}$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) entstehen normalerweise als Zwischenprodukte der Atmungskette [86]. Sie werden bei intakten Mitochondrien nur in geringem Maße freigesetzt (1-5%) [71] und in solchen Fällen durch Enzyme wie die Superoxid Dismutase,

Katalase und andere Peroxidasen unschädlich gemacht, d.h. z.B. zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt [86].

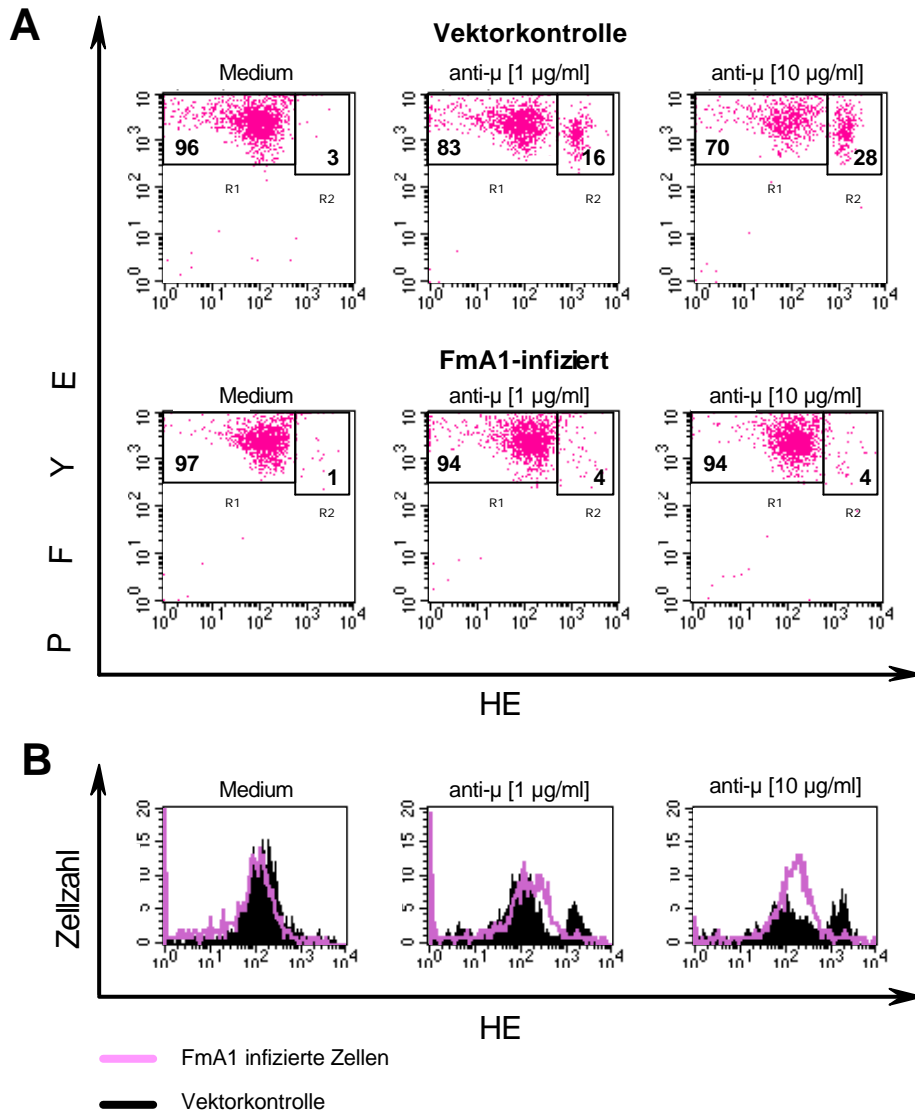
Das gesteigerte Auftreten solcher Oxidantien gilt inzwischen nicht mehr nur als wichtiges Merkmal für den Ablauf apoptotischer Prozesse, sondern es zeigt sich immer mehr, dass diese Verbindungen auch wichtige Funktionen als Regulatoren apoptotischer Abläufe in den sterbenden Zellen übernehmen [89].

Die also zum größten Teil mitochondriale Herkunft dieser Verbindungen und die maßgebliche Beteiligung von Bcl-2 Verwandten an der Regulation mitochondrialer Zelltodprozesse legen nahe, dass letztere auch Einfluss auf das Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen nehmen. So ist auch bereits für das antiapoptotische Bcl-2 selbst gezeigt [63], dass es in der Lage ist, die vermehrte Freisetzung radikalischer Verbindungen in WEHI-231 Zellen nach BZR-Stimulation zu verhindern. Dies ist jedoch das Ergebnis einer Überexpressionsstudie mit humanem also speziefremdem Bcl-2. Nachdem nun Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge Bcl-2 in WEHI 231 Zellen auf RNA Ebene keine Rolle zu spielen scheint und stattdessen A1 das dominant exprimierte antiapoptotische Bcl-2 Verwandte war (Abb.3, S.49), erschien es interessant zu untersuchen, ob nicht A1 in diesen Zellen eine solche Funktion übernimmt.

Zu diesem Zweck wurden transduzierte Zellen 24 Stunden nach Stimulationsbeginn (anti- $\mu$ ) mit Dihydroethidium (HE) versetzt. Das Reagens wird durch die radikalischen Verbindungen oxidiert, wodurch eine Rotfluoreszenz erzeugt wird. Diese kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

In Abb.20 ist folgender Befund dargestellt: Es wird deutlich, dass von den lebenden Zellen (siehe auch Abb.21 B) der Kontrollpopulation ein weitaus größerer Prozentsatz mit gesteigerter Rotfluoreszenzintensität - repräsentativ für einen hohen Gehalt an radikalischen Sauerstoffverbindungen - im Vergleich zur Medium-Kontrolle auftrat (Abb.20 A, "Vektorkontrolle") als bei den A1-infizierten Zellen (Abb.20 A, "FmA1-Infiziert"). Auch nach bis zu vier Tagen Stimulationsdauer waren diese Effekte qualitativ gleich (nicht gezeigt). Die Höhe der anti- $\mu$  Dosis hatte in einem Bereich von bis zu 10  $\mu\text{g/ml}$  Medium keinen nennenswerten Einfluss auf die Schutzfunktion von A1 und wirkte sich auch in der Kontrollpopulation nur schwach aus: Eine Verzehnfachung der anti- $\mu$  Dosis hatte nur eine Vergrößerung des Anteils stark fluoreszierender Zellen um den Faktor

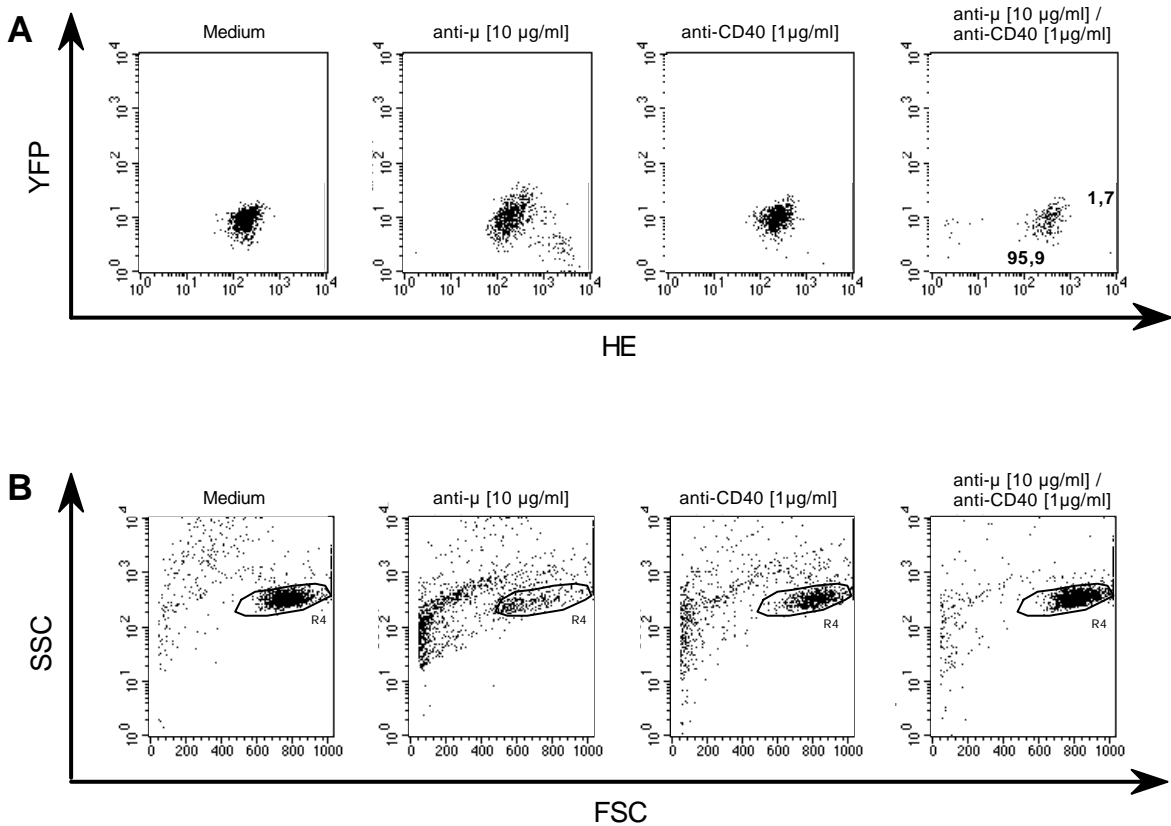
1,75 zur Folge. Besonders deutlich zeigt sich der Effekt im durchflusszytometrischen Profil der Populationen, das in Abb.20 B dargestellt ist.



**Abb.20** Das gesteigerte Auftreten freier Sauerstoffradikale infolge anti-IgM vermittelter Apoptose in WEHI 231 Zellen wird durch A1 vermindert. Mit FmA1 transduzierte WEHI 231 Zellen sowie die relevante Kontrollpopulation wurden mit anti-IgM (Konzentration wie angegeben) für 24 Stunden stimuliert. Das Auftreten radikalischer Sauerstoffverbindungen wurde anschließend durchflusszytometrisch unter Einsatz von Dihydroethidium (HE) als Färbemittel untersucht. (A) Die angezeigten Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil an lebenden Zellen der jeweiligen Population im entsprechenden Fenster (R1 bzw. R2) an. R2 enthält Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität, repräsentativ für einen grossen Gehalt an freien Sauerstoffradikalen. Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Darstellung die Gelbfluoreszenz auf der Y-Achse liegt und die Rotfluoreszenz auf der X-Achse! (B) Die gezeigten Histogramme stellen das durchflusszytometrische Profil der Populationen nach erfolgter HE-Färbung dar. Die Daten stammen von einem repräsentativen Experiment.

In einem weiteren Experiment sollte nun geklärt werden, ob auch die o.g. Schutzfunktion des überexprimierten A1 mit dem Effekt einer Kostimulation via CD40 übereinstimmt. Diese Untersuchung ergab, dass anti-CD40 in der Tat auch in diesem Zusammenhang wieder einen ganz ähnlichen Effekt hatte (Abb.21): Der Anteil an lebenden Zellen (Abb.21 B) mit starker Rotfluoreszenz nach BZR-Stimulation wurde durch Kostimulation mit anti-CD40 um den Faktor 5 reduziert (Abb.21 A).

Es scheint also, dass CD40 über A1 auch in der Lage ist, mitochondriale Symptome bzw. Signale im Zuge des Programmierten Zelltodes zu verhindern.



**Abb.21** Kostimulation über CD40 schützt WEHI 231 Zellen vor antigenrezeptorinduzierter Freisetzung radikalischer Sauerstoffverbindungen. (A) WEHI 231 Zellen wurden mit anti-IgM, anti-CD40 sowie einer Kombination aus beiden (Konzentrationen wie angegeben) für 24 Stunden stimuliert. Das Auftreten freier Sauerstoffradikale wurde anschließend durchflusszytometrisch unter Einsatz von Dihydroethidium (HE) als Färbemittel untersucht. Die angezeigten Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil an lebenden Zellen (B, R4) der jeweiligen Population im entsprechenden Fenster (R1 bzw. R2) an. R2 enthält Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität, repräsentativ für einen grossen Gehalt an radikalischen Sauerstoffverbindungen. Es ist zu beachten, dass hier die Gelbfluoreszenz auf der Y-Achse liegt und die Rotfluoreszenz auf der X-Achse! (B) zeigt das Fenster (R4), das jeweils die lebenden Zellen enthält, die der Auswertung in (A) zugrunde gelegt wurden. Dargestellt ist ein repräsentativer Befund.