

6. Zusammenfassung

Stimulation von unreifen B-Lymphozyten der Maus über den Antigenrezeptor führt zu Wachstumsstopp und Apoptose. Eine gleichzeitige Stimulation über CD40 bewirkt die Aufrechterhaltung der Proliferation und schützt die Zellen vor programmiertem Zelltod.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Stimulation über CD40 die Genexpression von A1 – einem antiapoptotischen Mitglied der Bcl2-Proteinfamilie – in primären B-Lymphozyten aus Mäusen anregt. Die CD40 Abhängigkeit der A1 Expression wurde in WEHI 231 Lymphomzellen, einem Modellsystem für unreife B-Lymphozyten, bestätigt.

Um das Potential von A1 in den BZR-abhängigen Prozessen Wachstumsstopp und Apoptose zu untersuchen, wurden WEHI 231 Zellen mit A1 transduziert. Die cDNA von A1 wurde mittels rekombinanten, replikationsdefekten Retroviren eingeschleust. Positive Populationen wurden über chimäre Marker aus Gelbfluoreszenzprotein und Zeocin Resistenzprotein, deren Expression über eine „internal ribosomal entry site“ (IRES) an die Expression des Testgens gekoppelt war, selektioniert.

Nach Stimulation der A1 transduzierten Zellen über den BZR wiesen diese eine größere Überlebensrate auf als Zellen der entsprechenden Kontrollpopulation. Dabei hatte die konstitutive Expression von A1 jedoch keinerlei Einfluß auf den durch BZR Stimulation hervorgerufenen Zellzyklusarrest. Dieses Ergebnis erklärt sich durch die Tatsache, dass A1 alleine nicht in der Lage war, die durch den BZR negativ regulierte Expression von c-myc RNA zu verhindern. Auch der BZR-abhängige Aktivitätsverlust eines NFκB-abhängigen Luciferasereporters wurde durch A1 alleine nicht verhindert.

Die Überexpression von induzierbarem cMyc-ER in A1 transduzierten Zellen, um damit durch parallele Induktion des ektopischen cMyc-ER den BZR-induzierten Verlust von cMyc auszugleichen, führte nicht zur Wiederherstellung der Proliferationsfähigkeit dieser Populationen. Ektopisches cMyc-ER hatte im Gegenteil selbst eine proliferationshemmende und apoptotische Wirkung, die von A1 unbeeinflusst blieb.

Untersuchungen zur Funktionsweise von A1 zeigten, dass es den Abbau des Caspasesubstrates Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), die Aktivierung der Caspase 7, aber auch die Freisetzung radikalischer Sauerstoffverbindungen aus den Mitochondrien unterdrückte.

Das CD40-Signal scheint sich also oberhalb von A1 in zwei Hauptkomponenten aufzuteilen, wovon eine die Proliferationsfähigkeit aufrecht erhält, während die andere das Überleben der Zellen sichert. A1 ist allem Anschein nach für letztere von zentraler Bedeutung.

7. Summary

Engagement of the antigen receptor on murine immature B lymphocytes leads to growth arrest followed by apoptosis. Concomitant signalling through CD40 rescues the cells from apoptosis and sustains proliferation. It is shown here, that in primary murine B cells crosslinking of CD40 stimulates the expression of A1, an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family. CD40 dependent stimulation of A1 was confirmed in WEHI 231 cells, an immature B cell lymphoma line.

WEHI 231 cells were transduced with A1 and a chimeric selection marker comprising the enhanced yellow fluorescent protein and the zeocin resistance protein via recombinant replicationdefective retroviruses. Expression of A1 and marker proteins was coupled through an internal ribosomal entry site.

A1 transduced WEHI 231 cells showed a significantly enhanced survival rate after engagement of the antigen receptor whereas constitutive expression of A1 did not abrogate c-myc downregulation and activity-loss of a NF κ B-dependent luciferase reporter, both of which were induced by BCR-crosslinking.

Expression of inducible cMyc-ER in A1 transduced cells did not restore proliferation in these populations. In contrast, upon induction cMyc-ER itself caused growth arrest and apoptosis of these cells despite the presence of A1.

Studies of functional properties of A1 revealed that it was able to suppress BCR-induced degradation of the caspase substrate PARP as well as activation of Caspase 7. The generation of reactive oxygen species, a further consequence of BCR signalling, was also significantly reduced by A1.

Taken together these result suggest that upstream of A1 the CD40 signal is divided into two major components, one of which is responsible for the upkeep of proliferation whereas the other secures cell survival. It seems that for the latter A1 is of major importance.