

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Rolle des B-Zellrezeptors für die negative Selektion autoreaktiver B-Zellen

Eine der fundamental wichtigen Eigenschaften des Immunsystems ist die Fähigkeit, fremde Antigene zu erkennen und darauf adäquat zu reagieren, dabei aber gleichzeitig jede Reaktion auf Selbstantigene strikt zu vermeiden. Dies wird über Selektionsprozesse erreicht, wodurch autoreaktive T- und B-Zellen funktionell (Anergie) [1] oder physikalisch (Programmierter Zelltod/Apoptose) aus dem jeweiligen Repertoire entfernt werden [2]. Diese Selektionsprozesse laufen ab, bevor die T oder B-Zellen ein reifes, immunkompetentes Stadium erreicht haben [3]. Antigene, die von selektierten und damit reifen Zellen erkannt werden, gelten dann für den Organismus als fremd.

B-Zellen haben im Laufe ihrer Entwicklung zum ersten mal auf der Ebene der sog. „unreifen“ B-Zelle die Möglichkeit Antigene zu erkennen, da dieses Entwicklungsstadium durch die erstmalige Oberflächenexpression eines funktionellen B-Zellrezeptors (BZR) gekennzeichnet ist [4]. Dabei scheinen die Zellen ohne die Möglichkeit funktionelle BZR herzustellen auch gar nicht in der Lage zu sein, dieses Stadium überhaupt zu erreichen [5]. Was darüber hinaus dafür spricht, dass ein sehr schwaches Signal, ausgelöst allein durch das Vorhandensein des BZR, für das Überleben der unreifen B-Zellen nötig ist.

Ein etwas stärkeres aber immer noch vergleichsweise schwaches Signal, ausgelöst durch geringe Antigenmengen wie bei der Erkennung von löslichem Antigen ohne T-Zellhilfe führt dagegen zur Anergie der Zellen und zieht nach 2-3 Tagen den Tod der B-Zellen nach sich [6, 7].

Oberflächenständige Antigene dagegen, die von B-Zellen in diesem Entwicklungsstadium erkannt werden, sind mit großer Wahrscheinlichkeit Selbstantigene und bewirken ein nun vergleichsweise starkes BZR-Signal, das in diesem Falle direkt den Programmierten Zelltod (Apoptose, s.u.) zur Folge hat und zur Eliminierung der autoreaktiven Zelle führt [2]. Damit hat nicht nur das Auftreten eines BZR Signals alleine, sondern auch die Signalstärke eine wichtige Bedeutung für die Entscheidung über Leben und Tod unreifer B-Lymphozyten.

## **1.2 CD40 als Antagonist des BZR**

CD40 ist ein 45 bis 50 kDa großes membranständiges Glycoprotein aus der TNF-R Überfamilie (Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor Überfamilie) [8], das von B Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird [9].

Es ist in der Lage - nach Vernetzung durch den entsprechenden Reaktionspartner (s.u.) - in den Zellen ein Signal auszulösen, das den BZR-induzierten Tod verhindert und die Fähigkeit zur Proliferation wieder herstellt [10, 11].

Der für die Stimulation benötigte Reaktionspartner von CD40 wird als CD40-Ligand (CD40L, CD154) bezeichnet. Er findet sich bevorzugt auf der Oberfläche von aktivierten CD4+ T-Zellen [10].

## **1.3 Das WEHI 231 Modell**

WEHI 231 Zellen sind B-Lymphomzellen aus der Maus, die an ihrer Oberfläche funktionelles IgM exprimieren und auf eine Behandlung mit anti-IgM Antikörpern mit Wachstumsstopp und Apoptose reagieren, was dem Phänotyp unreifer B-Zellen sehr nahe kommt [12]. Die Auswirkungen des BZR-Signals können in diesen Zellen durch Kostimulation über CD40 aufgehoben werden [13], weshalb sich die WEHI 231 Zelllinie nicht nur generell als Modell einer unreifen B-Zelle, sondern insbesondere auch zum Studium der BZR-Signaltransduktion und der damit verbundenen Entscheidung über Leben und Tod der Lymphozyten, sehr gut eignet [14, 15].

## **1.4 BZR und CD40 als Antagonisten auf Transkriptionsebene**

Eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Überleben und Wachstum in unreifen B Lymphozyten kommt Transkriptionsfaktoren aus der NFκB/Rel -Familie zu [16]. Dabei handelt es sich um Homo- und Heterodimere, deren Monomere sich aus einer Gruppe von fünf verschiedenen Polypeptiden (p50, p52, p65, cRel und RelB) [17] rekrutieren.

NF $\kappa$ B/Rel-Mitglieder sind im Zytoplasma der meisten tierischen Zellen vorhanden und werden dort in ihrer inaktiven Form durch den Inhibitor I $\kappa$ B zurückgehalten [18]. Ihre Freisetzung und der anschließende Eintritt der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern erfolgt nach Degradation von I $\kappa$ B [19]. In B Lymphozyten weist das NF $\kappa$ B-System, im Gegensatz zu den meisten anderen Zelltypen, bereits eine basale Aktivität auf, welche z.B. durch den Proteaseinhibitor N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon, der einen Abbau von I $\kappa$ B verhindert, unterbunden wird. Dies hat einen Wachstumsstopp und den programmierten Zelltod zur Folge [20]. Aber auch für Oberflächenrezeptoren wie eben IgM oder auch TGF  $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1) konnte gezeigt werden, dass ihre Stimulation den Eintritt von transkriptionell aktiven NF $\kappa$ B-Komplexen in den Nucleus verhindert, gefolgt von den gleichen Symptomen: Wachstumsstopp und Apoptose [16, 21]. Für eine Stimulation über CD40 wurde auf der anderen Seite nachgewiesen, dass sie in der Lage ist, eine Vermehrung aktiver NF $\kappa$ B-Komplexe herbeizuführen und sogar in Anwesenheit eines BZR-Signals den Übertritt von cRel Komplexen in den Zellkern aufrecht zu erhalten. Dabei steht letzteres in einem direkten Zusammenhang mit ebenfalls fortgesetzter Proliferation, wobei c-myc (s.u.) als Zielgen des NF $\kappa$ B Systems eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen scheint [22, 23]. All dies steht im Einklang mit den Befunden, dass eine Überexpression von cRel alleine in der Lage ist die BZR-induzierte Apoptose zu verhindern [24] und eine ektopische Expression von c-myc ebenfalls einen solchen Effekt hat [25].

CD40 wirkt also einem über IgM vermittelten Verlust an NF $\kappa$ B/Rel Aktivität entgegen und sichert so das Überleben der Zellen.

## 1.5 Die Myc Familie

Das Protoonkogen c-myc kodiert für einen Transkriptionsfaktor der basischen Helix-Schleife-Helix-Leucin-Zipper (bHLHZip)-Familie. Es wurde aufgrund der zelltransformierenden Eigenschaften seines onkogenen Pendant v-myc aus Retroviren isoliert und identifiziert [26]. Neben cMyc gehören noch N- und L-Myc zur Myc-Proteinfamilie [27]. Max, ebenfalls ein bHLHZip-Transkriptionsfaktor, wurde als Partner für Myc-Familienmitglieder zur Bildung von Heterodimeren identifiziert, kann aber - im

Gegensatz zu Myc - zumindest in vitro auch Homodimere bilden [28], deren funktionelle Existenz in vivo allerdings in Frage gestellt ist [29]. cMyc/Max Heterodimere wie auch Max/Max Homodimere binden an CACGTG-Motive oder E-box verwandte Sequenzen [30-32]. Es bewirken jedoch nur cMyc/Max Heterodimere eine transkriptionelle Aktivierung, da Max im Gegensatz zu cMyc keine Transaktivierungsdomäne besitzt [33, 34].

cMyc/Max Komplexe sind an der positiven Regulation der Zellproliferation beteiligt und daher in proliferierenden Zellen vorhanden [35]. Darin liegen unter anderem ihre transformierenden Eigenschaften und damit ihr onkogenes Potential begründet. Während Max auch in nicht proliferierenden Zellen vorhanden ist, wird cMyc nur im Übergang zwischen G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase und während des Zellzyklus exprimiert. Es ist daher die verantwortliche Komponente für die proliferationsinduzierende Wirkung der cMyc/Max Heterodimere [36, 37]. An WEHI 231 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von c-myc wiederum vom NF $\kappa$ B System abhängig ist [16]. Während der normalen B-Zell-Entwicklung wird c-myc in Übereinstimmung mit den vorgenannten Befunden in proliferierenden pro- und prä-B-Zellen exprimiert. Auch in reifen B-Zellen wurde nach Stimulation ein transients Anstieg der Expression von c-myc beschrieben [38].

Myc-Familienmitglieder sind jedoch nicht die einzigen Interaktionspartner von Max. Auch die sog. Mad-Proteine - ebenfalls bHLHZip-Transkriptionsfaktoren - können mit Max Heterodimere bilden und folglich mit Myc um Max konkurrieren [39]. Inzwischen sind vier Mad-Familienmitglieder bekannt (mad1, mx1, mad3 und mad4), die zelltyp- und gewebespezifisch exprimiert werden [27]. Mad/Max Komplexe binden hierbei an die gleichen regulatorischen DNA-Elemente wie Myc/Max Komplexe, unterdrücken aber die Transkription, statt sie zu aktivieren. Sie wirken daher antagonistisch zur transkriptionellen Aktivierung durch Myc [40]. Mad/Max Komplexe rekrutieren über Adapterproteine (sin3) transkriptionelle Korepressoren (z.B. N-CoR) und Proteine mit Histondeacetylase-Aktivität. Die Histon-Deacetylierung und damit Chromatinverdichtung wird derzeit als Hauptmechanismus der Transkriptionshemmung durch Mad/Max angesehen [34, 41, 42]. Am Beispiel von mad1 konnte in diesem Zusammenhang in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von Mad Proteinen mit Differenzierungsprozessen auf Kosten des Zellwachstums einhergeht [43, 44].

Hieraus leitet sich eine verbreitete Modellvorstellung ab, derzufolge die Zelldifferenzierung auf einer Verschiebung des Verhältnisses von Myc/Max- hin zu Mad/Max-Heterodimeren und damit zumindest teilweise auf einer Hemmung der Transkription von Myc-abhängigen, proliferationsfördernden Genen beruht. Für B-Lymphozyten wird ein solcher Mechanismus bereits diskutiert [45].

## 1.6 Der programmierte Zelltod

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein weitgehend stereotypes Schlüsselement bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Stabilität vielzelliger Organismen. Zusammen mit Proliferation und Differenzierung reguliert diese Form des organisierten Zellsuizids das Gleichgewicht zwischen Verlust und Zugewinn an Zellen, welches für den Aufbau und Erhalt der verschiedenen Gewebe unerlässlich ist [46]. Entsprechend ist er auch für die Aufrechterhaltung eines funktionierenden Immunsystems von großer Bedeutung.

Die Apoptose kann durch die unterschiedlichsten Faktoren ausgelöst werden. Der Todesstimulus kann dabei, wie im Falle des BZR bei unreifen B-Zellen, von Oberflächenrezeptoren wie Fas oder Mitgliedern der TNF Rezeptorfamilie ausgehen. Aber auch Stress im weitesten Sinne, ausgelöst durch Toxine, Hitzebelastung, radioaktive Strahlung oder auch ein Mangel an überlebensnotwendigen Substanzen kann zum Zelltod durch Apoptose führen [47].

Obwohl diese Faktoren bezüglich der Initiierungsphase des Zelltodprogramms sehr heterogen sind, führen alle letztendlich zur Aktivierung von proteolytischen Enzymen, den sogenannten Caspasen (s.u.). Ob es sich hierbei dann um eine reine Caspase Reaktionskaskade handelt, oder zunächst mitochondriale Auflösungsprozesse dominieren, hängt vom Gesamtzustand der Zelle ab: Am Beispiel der Fas vermittelten Apoptose konnten zwei Zelltypen unterschieden werden, die entweder ein caspasedominiertes Zelltodprogramm aufweisen (Typ I) oder bei denen nur eine schwache Aktivierung der Initiatorcaspase 8 auftritt und erst mitochondriale Auflösungsprozesse schließlich den Zelltod herbeiführen (Typ II) [48]. B Lymphozyten, werden aufgrund von Beobachtungen an Keimzentrums B-Zellen unter diesen Gesichtspunkten dem Typ II zugeordnet (Übersicht:[49]).

## 1.7 Die Caspase Kaskade

Die Caspasen (Cysteiny Aspartate-specific Proteinases [50]) bilden eine Familie aus asparaginsäurespezifischen proteolytischen Enzymen, deren Aktivierung auf ein proapoptotisches Signal hin erfolgt und zur Zerlegung einer Vielzahl zellulärer Proteine führt, was letztlich im Zelltod endet (Übersicht: [46, 51]).

Caspasen liegen in einer inaktiven Form – auch Procaspasen genannt [50] - konstitutiv im Zytoplasma vor und können auf verschiedenen Wegen proteolytisch in ihre aktive Form überführt werden. Hierbei spielen oft auch autokatalytische Vorgänge eine Rolle. Besonders wichtig ist die Fähigkeit aktiver Caspasen, andere Caspasen zu aktivieren. Man unterscheidet hier sog. Initiatorcaspasen (z.B. Caspase 8/“FLICE“ und 9 [51]), die am Anfang der Signalkette stehen, von sog. Effektorcaspasen (z.B. Caspase 3, 6 und 7 [51]) die von den Initiatorcaspasen aktiviert werden und dann ihrerseits andere Substrate abbauen [52] (Diagramm 1).

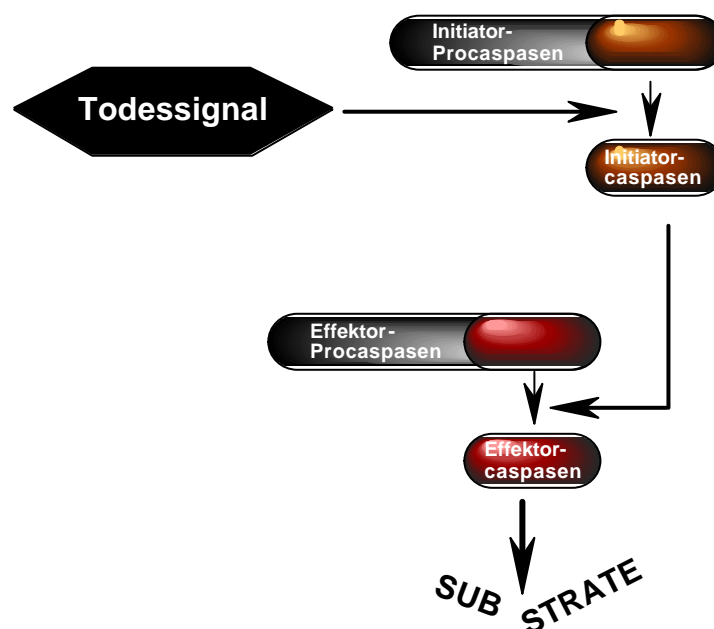
Eines dieser Substrate ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) [53], ein in Eukaryonten hochkonserviertes Zellkernenzym, das  $Zn^{2+}$ -abhängig an DNA-Stränge binden kann und dort in der Lage ist, Brüche zu erkennen und zu beheben [54, 55].

Neben der Zerstörung von solchen Proteinen, die für den Erhalt der Funktionsfähigkeit von Zellen erforderlich sind, können aber auch zusätzliche Apoptoseeffektoren durch Caspasen aktiviert werden. Dies geschieht z.B. bei der Spaltung von  $I^{CAD}/DFF45$ . Durch den Abbau dieses Inhibitors wird aus einem für die Zelle zunächst unschädlichen Komplex die ihrerseits für die Fragmentierung chromosomaler DNA verantwortliche Nuclease CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease) freigesetzt [56]. Ebenso wird das apoptosefördernde Bcl-2-Verwandte Bid (siehe S.11) durch Caspaseaktivität in eine aktive Form überführt [57]. Daneben sind Strukturproteine wie das nucleäre Matrixprotein Lamin A mögliches Ziel der Aktivität von Caspasen [58].

Darüber hinaus sind Caspasen in der Lage, solche Apoptoseregulatoren, die normalerweise die Zelle vor dem Zelltod schützen, anzugreifen: So kann z.B. das antiapoptotisch wirksame Bcl-xL (siehe S.11) durch Caspasen unwirksam gemacht [59] und das ebenfalls als antiapoptotisch bekannte Bcl-2 (siehe S.11) durch Caspaseaktivität gar in einen Zelltodeffektor umgewandelt werden [60]. Auch das BZR-Signal im WEHI 231 Modell für unreife B-Zellen (s.o.) führt zu einer Aktivierung von Caspasen und einem Abbau des

Caspasesubstrates PARP [61]. Hier geht man bisher davon aus, dass selektiv die Effektorcaspase 7 aktiviert wird, die ihrerseits in der Lage ist, PARP direkt abzubauen [61, 62]. In diesem System scheint allerdings keine Initiatorcaspase, sondern Calpain für die Aktivierung der Caspase 7 und des darauffolgenden Autokatalysevorgangs verantwortlich zu sein [63]. Calpain ist ebenfalls eine Cysteinprotease, die jedoch - anders als die Caspasen – keine Asparaginsäurespezifität aufweist [64]. Der Mechanismus der Calpainaktivierung in diesem System ist bislang unbekannt.

Für die Regulation der Aktivität von Caspasen sind unter anderem aktivierende und hemmende Faktoren von Bedeutung (Übersicht: z.B. [52]): Für die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 ist beispielsweise die Bildung eines Komplexes mit Apaf-1 (Apopototic Protease-Activating Factor 1) über dessen CARD (Caspase Recruitment Domain) notwendig, [65] während auf der anderen Seite die Aktivierung der Caspase 8 durch kompetitive Hemmung mit sogenannten FLIPs (FLICE Inhibitory Proteins) unterbunden werden kann [66, 67]. Weitere Caspaseinhibitoren sind Mitglieder der IAP (Inhibitors of Apoptosis) Proteinfamilie (Übersicht:[68]). Ein Beispiel ist XIAP, für das gezeigt werden konnte, dass es sowohl Caspase 9 als auch Caspase 3 und 7 hemmen kann [69].



**Diagramm 1** Schematische Darstellung der Caspase Kaskade. Verschiedene Todessignale führen über die Aktivierung unterschiedlicher Initiatorcaspasen zur Aktivierung von Effektorcaspasen und gleichartigen apoptotischen Prozessen (siehe auch [52]).

## 1.8 Die Mitochondrien als Apoptosemediatoren

Die Beteiligung der Mitochondrien am Programmierten Zelltod hat zwei Hauptaspekte: Auf der einen Seite sind die Organellen Ziel apoptotischer Prozesse und verlieren ihre Funktionalität. Auf der anderen Seite wird in letzter Zeit immer deutlicher, dass Ihnen auch ein effektorischer Charakter zukommt, der innerhalb der Programmierten Zelltodvorgänge eine bedeutende Rolle zu spielen scheint [47, 70, 71].

Das Zelltodsignal schlägt zunächst einen spezifischen Weg ein, der vom Stimulus abhängt. Dieser mündet dann jedoch in einen in der Evolution konservierteren Signalweg. Die mitochondrialen Veränderungen, deren Hauptmerkmal unter anderem eine Änderung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran ist (sie wird durchlässig für Proteine mit einer Größe von bis zu 1500 Da), werden den allgemeinen Signalwegen zugeordnet.

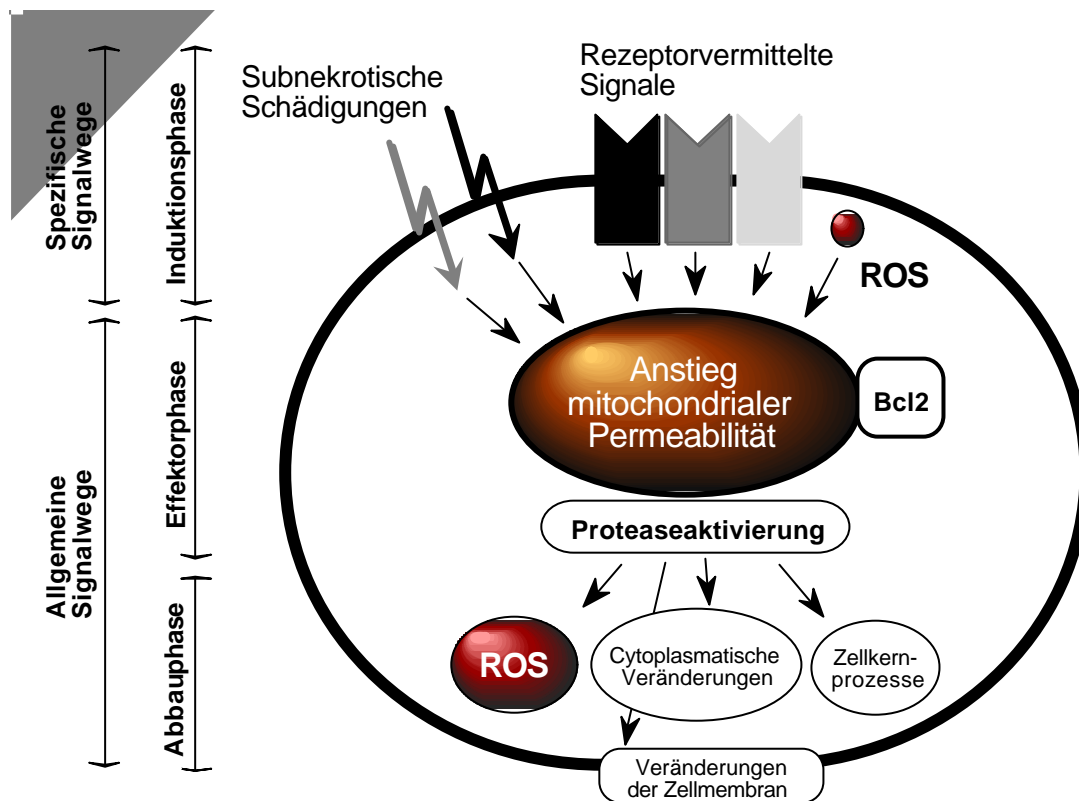
Hierbei sind verschiedene Mechanismen bekannt, deren Effekte außerdem miteinander verknüpft sein können: Zum einen der Abbruch des Protonentransports, der oxidativen Phosphorylierung und der ATP Produktion, zum anderen die Freisetzung von Proteinen, wie dem Elektronentransportenzym Cytochrom-c aus der Atmungskette [72, 73], Caspasen [74], Caspaseaktivatoren, aber auch caspaseunabhängigen Apoptoseeffektoren wie z.B. AIF (Für engl. Apoptosis-inducing Factor) [75]. Beides ist gefolgt oder begleitet von einem Verlust des inneren Membranpotentials  $\Delta\Psi_m$  und resultiert in der Regel in einer Proteaseaktivierung. Beispielhaft hierfür ist die durch Cytochrom-c ausgelöste Aktivierung der Initiatorcaspase 9 über Apaf-1 (siehe auch .S.7) [76]. Ferner kann man Veränderungen im zellulären Reduktions-/Oxidationspotential beobachten, welche unter anderem durch die Freisetzung von radikalischen Sauerstoffverbindungen [77] gekennzeichnet sind, die ihrerseits auch selbst Auslöser für die Apoptose sein können.

Eine wichtige Rolle bei der Steuerung der mitochondrialen Vorgänge übernehmen Proteine der Bcl-2 Familie (s.u.), deren antiapoptotische Mitglieder zum großen Teil in der äusseren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, während proapoptotische Mitglieder nach Induktion der Apoptose dorthin wandern [57, 78].

Aber auch cMyc ist zusätzlich zur Steuerung der Zellproliferation an der Regulation der Apoptose beteiligt. In verschiedenen Systemen ist cMyc in der Lage, den Programmierten Zelltod nach Wachstumsfaktor- oder Nährstoffentzug auszulösen bzw. zu fördern [79-81]. Die Apoptose ist dann zum Teil abhängig von p53 und kann durch Bcl-2 verhindert



werden [82, 83]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass cMyc die Freisetzung von Cytochrom-c aus den Mitochondrien fördert und die Zellen dadurch empfindlich für die Apoptose macht [84]. Allerdings existieren auch Arbeiten, die im Gegensatz dazu eine Verminderung der Expression von c-myc als Auslöser der Apoptose in manchen Zellen, z.B. im B-Zell-Lymphom WEHI 231, anführen. Die Aufrechterhaltung der c-myc Expression besitzt in diesen Zellen eine Schutzfunktion und fördert deren Überleben [85].



**Diagramm 2** (nach [47] )*Spekulatives Modell der mitochondrialen Beteiligung am Programmierten Zelltod.* Schematisch und vereinfacht dargestellt sind allgemeine und spezifische Signalwege aus Induktions- Effektor- und Abbauphase des Programmierten Zelltodes (siehe auch [47] [71]).

## **1.9 Radikalische Sauerstoffverbindungen im apoptotischen Zusammenhang**

Radikalische Sauerstoffverbindungen (ROS; Abk. f. engl. „Reactive Oxygen Species“) kommen in den Mitochondrien als Zwischenprodukte der Atmungskette vor und werden normalerweise durch verschiedene Enzyme wie z.B. die Superoxid Dismutase abgefangen und unschädlich gemacht [86, 87]. Dies macht die Mitochondrien zur intrazellulären Hauptquelle für ROS. Ein vermehrtes Auftreten solcher Verbindungen steht auf besondere, bisher noch nicht vollständig aufgeklärte Weise, im Zusammenhang mit dem Programmierten Zelltod und kann je nach Herkunft und Zeitpunkt die Apoptose auslösen oder als Effektor ein bereits eingeleitetes Zelltodprogramm vorantreiben [77]. Im letzteren Fall wird ROS oft ein eigener Signalweg, parallel zur Caspase Kaskade zugewiesen [77]. Daneben wird ein direktes Eingreifen von ROS in den Caspasesignalweg diskutiert [88], was bereits im Zusammenhang der Apoptose von aktivierten T-Zellen gezeigt werden konnte, wo durch Unterdrückung der ROS-Freisetzung ein caspaseabhängiger DNA Verlust verhindert werden konnte [89].

Darüber hinaus wird inzwischen davon ausgegangen, dass ROS als Second Messenger in der Lage sind, Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF $\kappa$ B zu aktivieren und damit Einfluss auf die Steuerung der zellulären Genexpression zu nehmen [86]. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass ROS bei der Kontrolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) eine Rolle spielen [86]. Hierbei handelt es sich um eine Proteinfamilie, deren Mitglieder entscheidend an der zellulären Antwort auf Proliferations- und Stresssignale beteiligt sind (Übersicht: [90]). Bestätigt wird dies unter anderem durch die Beobachtung, dass Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Zelltypen ERK2 aktiviert [91].

## 1.10 Die Bcl-2 Familie

Eine entscheidende Funktion für das Überleben von Zellen haben Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie. Sie übernehmen eine zentrale Kontrollfunktion im Rahmen des programmierten Zelltodes. Innerhalb apoptotischer Signalkaskaden werden sie oberhalb der Caspasen und mitochondrialer Apoptosevorgänge angesiedelt und beeinflussen deren Aktivität bzw. Funktionalität [92]. Die Bcl-2 Familie beinhaltet pro- und antiapoptotische Mitglieder. Alle diese besitzen mindestens eine von maximal 4 sog. Bcl-2 Homologiedomänen BH1-4 [93]. Proapoptotisch wirken u.a. Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid und Mtd, antiapoptotisch sind Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und A1 [94]. Über ihre Homologiedomänen bilden sie Homo- und Heterodimere. Die Dimerbildung bzw. die Verdrängung von antiapoptotischen Molekülen aus ihren Homodimeren und umgekehrt scheint auch ein Hauptwirkungsmechanismus der Bcl-2 Verwandten zu sein, so dass das Verhältnis zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Mitgliedern die Empfindlichkeit der Zelle für ein Todessignal bestimmt [92, 95].

Bcl-2 Proteine treten sowohl membrangebunden, insbesondere an den Mitochondrien, als auch im Cytosol auf [95]. Bax beispielsweise liegt sowohl im Cytosol, als auch lose mit Membranen assoziiert vor und verlagert sich infolge eines Todessignals in die Mitochondrienmembran [96, 97]. Dort ist es in der Lage, ebenso wie Bak einen Zusammenbruch von  $\Delta\Psi_m$ , und die Freisetzung von Cytochrom-c auszulösen [97].

Abgesehen von der Fähigkeit zur Dimerisierung herrscht über die molekularen Mechanismen der pro- bzw. antiapoptotischen Wirkung der Bcl-2 Verwandten noch sehr wenig Klarheit. Es scheint jedoch, dass sie auf verschiedenen Ebenen apoptotischer Signalkaskaden eingreifen, und hierbei ganz unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit der Proteine Membrankanäle zu bilden. Sowohl bei antiapoptotischen Familienmitgliedern wie Bcl-xL [98] und Bcl-2 [99] als auch beim proapoptotischen Bax [100] konnte die Bildung von kationenselektiven Ionenkanälen in Lipid-Doppelschichten beobachtet werden. Bcl-2 ist aber auch in der Lage die Porenbildung durch Bax zu verhindern [100]. Ob dies auf eine Heterodimerisierung zurückzuführen ist und/oder auf Unterschieden in der pH-Abhängigkeit der Porenbildung zwischen den beiden Proteinen [100] beruht, ist jedoch unklar.

Während der normalen B-Zell-Entwicklung scheint Bcl-2 von besonderer Bedeutung für das Überleben unreifer Zellen im Knochenmark zu sein [101, 102]. So konnte z.B. für unreife B-Zellen am WEHI Modell nachgewiesen werden, dass die Überexpression von Bcl-xL ein Überleben in Anwesenheit von anti-IgM Antikörpern ermöglicht [103-106]. Da jedoch weder primäre, unreife B Lymphozyten noch WEHI 231 Zellen signifikante Mengen von Bcl-xL exprimieren, stellt sich die Frage, ob eventuell andere antiapoptotische Bcl-2-Verwandte am Schutz dieser Zellen vor BZR-vermittelter Apoptose beteiligt sind [103, 105, 107].

A1 ist ein relativ spät beschriebenes Mitglied der Bcl-2 Familie und wurde ursprünglich als „hematopoietic lineage specific early response gene“ vorgestellt [108]. Es spielt eine Rolle beim Schutz vor TNF $\alpha$  und p53 induzierter Apoptose und ist außerdem in der Lage, das Überleben einer Myeloidvorläufer-Zelllinie nach dem Entzug von Wachstumsfaktoren zu verlängern [109-111]. Es ist in der Mitochondrienmembran lokalisierbar und wirkt im Rahmen der TNF-induzierten Apoptose schützend vor Depolarisierung der Mitochondrien, Freisetzung von Cytochrom-c und anschließender Aktivierung von Caspase 9, sowie der Spaltung des Caspasesubstrates PARP [112].

Die Expression von A1 steigt an, wenn reife B-Zellen das Knochenmark verlassen und Bestandteil der zirkulierenden Lymphozytenpopulation werden [113]. Weiterhin wurde an c-Rel defizienten Mäusen gezeigt, dass A1 NF $\kappa$ B abhängig exprimiert wird und für das Überleben der B-Zelle nach BZR-Induktion notwendig ist [114]. Eine Beteiligung von NF $\kappa$ B an der Expression des A1 homologen Bfl-1 wurde auch in humanen B-Zelllinien demonstriert [115].

## 1.11 Ziel der Arbeit

Die negative Selektion autoreaktiver B-Lymphozyten im unreifen Stadium wird über den BZR-induziert. Eine gleichzeitige Vernetzung von CD40 ist in der Lage, die negativen Effekte des BZR-Signals aufzuheben, wobei sich die antagonistische Wirkung der Signale auf Transkriptionsebene insbesondere über das NF $\kappa$ B/Rel-System manifestiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern eine Stimulation durch CD40 die Genexpression von Mitgliedern der apoptoseregulatorischen Bcl-2 Proteinfamilie, mit Hauptaugenmerk auf das als antiapoptotisch beschriebene A1, in murinen B-Lymphozyten beeinflusst. Dies sollte im besonderen Hinblick auf die antagonistische Wirkung des CD40 Signals im Vergleich zum apoptoseinduzierenden BZR-Signal geschehen. Das WEHI 231 Lymphom sollte als Modellsystem für unreife B Lymphozyten herangezogen werden. Dort auf RNA-Ebene erzielte Ergebnisse sollten in einen direkten Vergleich mit Resultaten aus primären B-Zellen gestellt werden.

Weiterhin sollten Überexpressionsstudien am Lymphommodell Aufschluss darüber geben, inwieweit A1 für CD40-spezifische Auswirkungen auf das Überlebens-, Zellzyklus- und Proliferationsverhalten BZR-stimulierter unreifer B-Lymphozyten verantwortlich ist.

Daneben sollte der Versuch unternommen werden zu klären, auf welcher Ebene A1 in die relevanten apoptotischen Signalprozesse eingreift.