

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
des Campus Berlin-Buch
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

**Die Bedeutung von
Apoptoseresistenzmechanismen für die
Pathogenese und Therapie maligner
Lymphome**

Zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Ralf Bargou
aus Sigmaringen

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. M. Debatin, Ulm

2. Prof. Dr. med. Ch. Huber, Mainz

Datum der Habilitation: 12.06.2001

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassende Darstellung des Habilitationsthemas	4
1.1	Einleitung.....	4
1.1.1	Maligne Lymphome.....	4
1.1.2	Apoptose.....	5
1.1.3	Molekulare Regulatoren der Apoptose.....	6
1.1.4	Apoptoseresistenz und maligne Lymphome.....	12
1.2	Apoptose und Zellzyklus bei malignen Zellen	13
1.3	Die Rolle von Apoptoseresistenzmechanismen bei der Pathogenese maligner Lymphome.....	16
1.3.1	Apoptoseresistenzmechanismen und Non-Hodgkin-Lymphome	16
1.3.2	Apoptoseresistenzmechanismen und Morbus Hodgkin.....	17
1.4	Apoptose und Therapieresistenz bei malignen Lymphomen.....	23
1.4.1	P-Glykoprotein und Zytostatikaresistenz.....	23
1.4.2	Apoptose und Zytostatikaresistenz	24
1.4.3	Antikörper vermittelter Zelltod und immunologische Therapieresistenzmechanismen	25
1.5	Literatur	32
1.6	Kurze Zusammenfassung.....	41
2	Originalarbeiten zum Habilitationsthema.....	42
2.1	Apoptose und Zellzyklus bei malignen Zellen	42
2.2	Die Rolle von Apoptoseresistenzmechanismen bei der Pathogenese maligner Lymphome.....	42
2.3	Apoptose und Therapieresistenz bei malignen Lymphomen.....	42
3	Danksagung	44
4	Erklärung	45

1 Zusammenfassende Darstellung des Habilitationsthemas

1.1 Einleitung

1.1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind maligne klonale Erkrankungen des lymphatischen Systems, die in zwei Gruppen eingeteilt werden: Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome. Non-Hodgkin-Lymphome können nach ihrem klinischen Verlauf ihrerseits wieder in zwei Gruppen eingeteilt werden: niedrigmaligne Lymphome mit mehr indolentem Verlauf und hochmaligne Lymphome mit aggressivem Verlauf. Hochmaligne Lymphome sind durch Behandlung mit Polychemotherapie und Strahlentherapie heilbar; ob hier die Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Knochenmark- bzw. peripherer Blutstammzelltransplantation eine Verbesserung darstellt, ist noch unklar. Trotz der verbesserten Behandlungsmöglichkeiten sterben nach wie vor etwa 50% bis 60% der Patienten mit hochmalignem Non-Hodgkin-Lymphomen an ihrer Erkrankung (1). Niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome sind zwar grundsätzlich in lokalisierten Stadien noch heilbar, doch die Mehrzahl der Patienten sind bei Diagnosestellung bereits in fortgeschrittenen Stadien. Somit ist die überwiegende Mehrzahl der Patienten mit niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen nicht heilbar, die Behandlung mit konventioneller Chemotherapie ist hier rein palliativ (2).

Im Gegensatz zu Non-Hodgkin-Lymphomen ist die Mehrzahl der Patienten mit Hodgkin-Lymphomen mittels Polychemotherapie heilbar (3, 4). Dennoch sind etwa 15% der Patienten als therapierefraktär anzusehen. Bei einem relativ hohen Anteil der Patienten, die in anhaltender Remission sind, stellt die Entstehung therapiebedingter Zweitmalignome ein klinisch relevantes Problem dar.

Trotz der kurativen Chance für einen Teil der Patienten ist insgesamt der klinische Verlauf und die Prognose für einen grossen Teil der Patienten mit malignen Lymphomen nach wie vor ungünstig. Die Entwicklung neuer verbesserter Therapieansätze ist daher notwendig. Die Verbesserung unseres Verständnisses der Biologie dieser Erkrankungen könnte in Zukunft zur Entwicklung solcher Therapieansätze beitragen.

Hodgkin-Lymphome sind durch das Vorhandensein charakteristischer mono- und multinukleärer Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen gekennzeichnet. Während bis vor kurzem die zelluläre Herkunft dieser Zellen umstritten war, geht man heute davon aus, dass die Mehrzahl der Fälle B-zellulären Ursprungs sind (5). Die Mehrzahl der Non-Hodgkin-Lymphome sind ebenfalls Zellen der B-Zellreihe (6). Die Deregulation von Genen, die die Apoptoseprozesse in diesen Zellen steuern, ist sowohl für die Pathogenese als auch die Entstehung von Therapieresistenz bei malignen Lymphomen von wahrscheinlich zentraler Bedeutung.

1.1.2 Apoptose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein genetisch regulierter aktiver biochemischer Prozess, der für Wachstum, Differenzierung und Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben und Organismen von zentraler Bedeutung ist (7). Apoptose unterscheidet sich von der Nekrose durch morphologische und biochemische Kriterien wie Zellschrumpfung, "membrane blebbing", Chromatinkondensation, Kernfragmentation, DNA-Fragmentation und Degradation des Zytoskeletts (8). Störungen in diesem fein regulierten Prozess kann zur Entstehungen von Krankheiten führen bzw. zu deren Entstehung beitragen. So scheint eine Deregulation im Sinne verstärkter Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen und HIV eine Rolle zu spielen; Deregulation im Sinne erhöhter Apoptosersistenz hingegen spielt bei der Pathogenese und Biologie maligner Erkrankungen eine entscheidende Rolle (9-11). So führt beispielsweise die Überexpression des Anti-Apoptosegens bcl-2 zur Entstehung von Lymphomen (12). Apoptoseresistenz ist nicht nur für das maligne Wachstum von grundlegender Bedeutung, sondern stellt auch einen wichtigen Mechanismus bei der Entstehung von Resistenz gegenüber Zytostatika, aber auch gegenüber immuntherapeutischen Ansätzen dar (13, 14). Apoptosemechanismen während der normalen Gewebe- und Zellentwicklung und somit die physiologische Bedeutung der Apoptose ist bislang wohl am besten im hämatopoetischen System und hier insbesondere im lymphatischen Immunsystem untersucht worden (15). Entsprechend sind auch Apoptoseresistenzmechanismen, die zu malignem Wachstum führen können, bei den malignen Gegenständen des lymphatischen Systems, den malignen Lymphomen, am besten

untersucht (siehe unten: Die Rolle von Apoptoseresistenzmechanismen bei der Pathogenese maligner Lymphome).

Apoptose ist essentiell für die Generierung der Diversität des B-Zell- und des T-Zell-Repertoires. So tritt an mindestens drei Stellen der B-Zellentwicklung Apoptose auf: 1) während der frühen B-Zell-Ontogenese sterben diejenigen B-Zellen ab, die keine funktionellen Immunglobulinrezeptoren synthetisieren (15-17); 2) auf der Ebene der unreifen B-Zellen werden autoreaktive Zellen durch Bindung von (Auto-)Antigenen an das Oberflächen-IgM und nachfolgende Aktivierung via Apoptose klonal deletiert (Negativselektion) (18); 3) in den Zentrozyten der Keimzentren von Lymphfollikeln tritt Apoptose in denjenigen Zellen auf, die keine Bindung zwischen Immunglobulinrezeptor und einem passenden Antigen ausbilden (Positivselektion) (19). Nach Bindung des Antigens kommt es bei der Positivselektion in den Keimzentren zur Hochregulation des Antiapoptosegens *bcl-2*, das die B-Zellen so vermutlich vor dem programmierten Zelltod schützt (20). Die entsprechenden B-Zellen können sich so zu Plasmablasten und Gedächtniszellen entwickeln.

Ähnliche Apoptosemechanismen wie bei der B-Zellentwicklung bestehen bei der T-Zellentwicklung. Unreife Thymozyten, die über den CD3/T-Zell-Rezeptorkomplex stimuliert werden, sterben durch Apoptose (negative Selektion). Ebenso werden Thymozyten, die Rezeptoren besitzen, die keine „Eigen“-MHC-Moleküle erkennen, eliminiert (positive Selektion). Ein wichtiger Regulator während der T-Zellapoptose ist das Apo-I/FAS-System (siehe unten: Molekulare Regulatoren der Apoptose) (21). Apoptose kann somit über verschiedene extrazelluläre Stimuli ausgelöst werden, wobei die intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen noch in weiten Teilen ungeklärt sind.

1.1.3 Molekulare Regulatoren der Apoptose

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Molekülen identifiziert, die an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Dabei handelt es sich vor allem um pro- und anti-apoptotisch wirksame Proteine der *bcl-2* Familie und die immer grösser werdende Familie der

Caspasen (Apoptose-spezifische Proteasen), sowie mit diesen Proteinen assoziierte und interagierende Moleküle.

Bcl-2 wurde als erstes Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie beim Menschen identifiziert und beim folliculären B-Zell-Lymphom zuerst als Onkogen beschrieben (siehe auch unten: Apotoseresistenzmechanismen in der Pathogenese maligner Lymphome) (22). Weitere Mitglieder der bcl-2 Familie bzw. verwandte Proteine wurden durch Sequenzhomologien oder aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem bcl-2 Protein identifiziert (23). Dabei können die Mitglieder der bcl-2 Familie funktionell in zwei Gruppen eingeteilt werden: in Antagonisten der Apoptose (bcl-2, bcl-x_L, mcl-1, A1) und in Agonisten der Apoptose (bax, bak, bcl-x_S, bad, bok). Die Proteine der bcl-2 Familie sind durch die konservierten Regionen BH1-4 (**bcl-2 homology region**) charakterisiert, die für die biologische Aktivität sowie die Dimerisierung und Heterodimerisierung wichtig sind (24, 25). Am besten charakterisiert sind die Proteine bcl-x und bax. Bcl-x kann in zwei Splicevarianten nachgewiesen werden, wobei die lange Splicevariante bcl-x_L Zellen vor wachstumsfaktorentzug-induzierter Apoptose schützt. Die kurze Splicevariante bcl-x_S kann hingegen die bcl-2 Wirkung antagonisieren und somit proapoptotisch wirken. Bcl-x_S wird vor allem in Geweben mit hohem Zell-Umsatz exprimiert, bcl-x_L dagegen hauptsächlich in langlebigen, postmitotischen Zellen (26).

Bax kann ebenfalls in unterschiedlichen Splicevarianten vorkommen. Bax- α verstärkt die durch Wachstumsfaktor-Depletion induzierte Apoptose und kann die bcl-2 Wirkung wahrscheinlich über die Ausbildung von Heterodimeren (bcl-2/bax) antagonisieren (24, 27). Eine Heterodimerbildung wurde auch für bcl-x_L und bax beschrieben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass für den antiapoptotischen Effekt von bcl-x_L eine Dimerbildung mit bax nicht notwendig ist (28). Neuere Daten aus transgenen Tiermodellen zeigen, dass bax- α und bcl-2 unabhängig voneinander anti- bzw., proapoptotisch wirken können (29). So kann in bcl-2-“knock-out“-Mäusen eine Genkopie von bax- α Apoptose fördern. Umgekehrt kann in bax-“knock-out“-Mäusen die Überexpression von bcl-2 Apoptose blockieren (30). *In vivo* wird bax- α vor allem in Geweben exprimiert, in denen vermehrt Apoptose stattfinden kann, wie z.B. im

Keimzentrum von Lymphfollikeln. Anhand von Deletionsmutanten im "yeast-two-hybrid" System konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotische Domäne und die für die Interaktion mit anderen Molekülen der bcl-2 Familie wichtige Region in der BH3 Domäne des bax Proteins liegt (31). Entfernter verwandte Proteine besitzen nur die BH3 Domäne. Mutagenesestudien an Bld und Bad zeigen, dass diese BH3 Domäne für die Bindung an bcl-2 und bcl-x_L sowie die proapoptotische Funktion notwendig ist.

Die Regulation und Funktion der verschiedenen Proteine der bcl-2 Familie ist noch weitgehend ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. Aus der Strukturaufklärung des bcl-x_L Proteins und seiner Homologie zu anderen Proteinen ergaben sich allerdings Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen und Funktionen (32). Ein wichtiger Regulationsmechanismus scheint die bereits erwähnte Bildung von Homo- und Heterodimeren zu sein. In ersten Modellen ging man davon aus, dass bcl-2 und bax sowohl heterodimerisieren als auch homodimerisieren können und das Verhältnis von bcl-2 und bax Molekülen über das Schicksal der Zelle entscheidet (33). Mittlerweile zeichnet sich ein viel komplexeres Bild ab. Dimerisierung von bcl-2 mit sich selbst scheint für die antiapoptotische Funktion essentiell zu sein. Bcl-2 Mutanten, die nicht mehr dimerisieren können, verlieren ihre antiapoptotische Wirkung. Andere bcl-2 Familienmitglieder können nur beschränkt heterodimerisieren. Bak z.B. bindet an bcl-x_L, nicht aber an bcl-2, bcl-x_S oder bax. Bad hingegen kann nicht homodimerisieren (25, 34, 35). Andere bcl-2 verwandte Proteine werden gewebespezifisch exprimiert, wie z.B. das Protein bok, das nur im reproduktiven Gewebe nachgewiesen werden konnte (36). Die meisten Mitglieder der bcl-2 Familie werden jedoch ubiquitär exprimiert (37).

Mittlerweile sind mindestens elf weitere Proteine verschiedener Funktion identifiziert worden, die Proteine der bcl-2 Familie binden. Die Proteinkinase Raf1 bindet an die BH4 Domäne von bcl-2 und wird anschliessend an die Mitochondrienmembran transportiert (38). BAG-1 ist mit dem HGF-(Hepatocyte Growth Factor) Rezeptor assoziiert und ist somit vielleicht ein Adaptermolekül zwischen dem Tyrosinkinase-Rezeptor und der antiapoptotischen Maschinerie (39). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist wahrscheinlich die posttranslationelle Phosphorylierung der "loop"-

Region von bcl-x_L und bcl-2. Die Bedeutung dieser Modifikation wird kontrovers diskutiert und einige Publikationen deuten auf eine Inaktivierung von bcl-2 durch die Phosphorylierung dieser Region hin. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Deletionen der "loop"-Struktur die antiapoptotische Funktion von bcl-x_L und bcl-2 unterdrücken (40). Die "loop"-Region wird wiederum zumindest *in vitro* durch Caspase-3, einer Apoptose-spezifischen Protease, gespalten, wodurch ein proapoptotisches Fragment entsteht. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Expression einer verkürzten bcl-2 Mutante bestätigt, die vermehrt zur Apoptose führt (41, 42). Es gibt Hinweise dafür, dass bcl-2 als Anti-Oxidans wirken kann, die entsprechenden Befunde sind aber umstritten. Die Aufklärung der Kristallstruktur von bcl-x_L zeigte strukturelle Homologien zu den Colocinen, bakteriellen Proteinen, die in der Lage sind, Poren auszubilden. In Experimenten mit rekombinanten Proteinen der bcl-2 Genfamilie und künstlichen Lipidmembranen konnten elektrophysiologisch Ionenströme gemessen werden, woraufhin für bcl-2 eine Funktion als Ionenkanal postuliert wurde (43). Unklar ist zur Zeit, ob diese Kanäle mit der Freisetzung mitochondrialer Proteine bei der Apoptose in Zusammenhang stehen, da bcl-2 und bcl-x_L unter anderem an der Mitochondrienmembran lokalisiert sind (44).

Proteine der bcl-2 Familie interagieren über verschiedene Cofaktoren mit Mitgliedern einer weiteren wichtigen apoptose-regulierenden Familie, den Caspasen. Die Klonierung des ced-3 Gens aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* zeigte eine Homologie zu dem humanen Protein ICE (interleukin-1 converting enzyme) auf, einer Cysteinprotease, die aus dem Vorläuferprotein pro-IL-1 β das biologisch aktive IL-1 β freisetzt. Damit war das erste Mitglied einer ständig wachsenden Familie von Proteasen definiert, die als Effektoren bei dem Prozess der Apoptose wirken. Diese Klasse von Proteasen wird als Caspasen (cysteine aspartate-specific proteases) bezeichnet, da sie ein konserviertes Cystein enthalten und nach Aspartat in der Position P1 spalten (45). Sie werden als ca. 35 KDa grosse Proenzyme synthetisiert und sind in der aktiven Konformation heterotetramere Proteine aus ca. 10 KDa und zwei ca. 20 KDa grossen Untereinheiten (46). Neben der autokatalytischen Aktivierung scheinen die Proteasen sich zum Teil auch gegenseitig zu aktivieren. Inzwischen wurden mindestens 11 Mitglieder dieser Familie

kloniert. Eine phylogenetische Analyse erlaubt eine Einteilung in zwei Untergruppen. Dabei scheint die ICE-Untergruppe (Caspase-1, -4 und -5) überwiegend bei Entzündungsreaktionen eine Rolle zu spielen. Die ced-3 Untergruppe (Caspase-2, -3, -6, -9 und -10) ist für den Prozess der Apoptose wichtig. Caspasen stellen somit eine neue Klasse von Proteinen dar, die während der Apoptose aktiviert werden und spezifisch spalten. Sie sind damit wichtige Proteine im Signaltransduktionsweg der Apoptose. Die Spaltung des ICAD Proteins (Inhibitory Caspase Activated Desoxyribonuclease), das aus Mastzellen isoliert wurde, hat die Freisetzung der Endonuclease CAD zu Folge, die wiederum für die charakteristische DNA-Fragmentierung verantwortlich ist (47-49). Die Aktivität der Caspasen scheint somit wichtig zu sein, um die notwendigen Apoptose-Effektoren einer Zelle zu aktivieren. Die Aktivierungskaskade der Caspasen ist bisher am besten bei der Apo-I/FAS induzierten T-Zell Apoptose untersucht (siehe unten).

Die funktionelle Verbindung zwischen den beiden zentralen Familien der Apoptoseregulation ist neben möglicherweise weiteren noch nicht identifizierten Molekülen das Protein Apaf-1. Die biochemische Aufreinigung Apoptose-induzierender Faktoren aus dem Cytosol apoptotischer HeLa Zellen führte zur Identifikation der Proteine Apaf-1, Apaf-2 und Apaf-3 (apoptotic protease activating factor). Apaf-3 konnte als Caspase-9 identifiziert werden und ist damit zu Ced-3 homolog. Apaf-1 ist das lange gesuchte humane Homolog zu Ced-4, während Apaf-2 das Protein Cytochrom c ist. Es konnte gezeigt werden, dass Ced-4 sowohl mit Ced-9 (homolog zu bcl-2) als auch mit Ced-3 (homolog zu Caspase-3) assoziieren kann und einen "Apoptosom" genannten Komplex bildet. Die Expression von Ced-4 in humanen Zellen konnte ebenso eine Assoziation mit bcl-2 und Caspase-9, d.h. einen trimolekularen Komplex herstellen. Interessanterweise kann bax- α diese Assoziation blockieren. Ced-4 und das Homologe Apaf-1 spielen somit eine zentrale Rolle im Signaltransduktionsweg der Apoptose, indem sie die Proteine der bcl-2 Familie und die Caspasen biochemisch verbinden (50, 51). Cytochrom c scheint in humanen Zellen ein wichtiger Cofaktor für die Aktivierung der Caspase-9 zu sein, die wiederum ihrerseits Caspase-3 aktiviert; dieser Prozess ist dATP abhängig (52).

Neben der bcl-2 Familie und den Caspasen stellen die IAP-Proteine eine weitere wichtige apoptoseregulierende Familie dar. Zur Zeit sind 6 humane Mitglieder der IAP-Familie (Inhibitor of Apoptosis) identifiziert worden: NAIP, c-IAP1, C-IAP2, XIAP, Survivin und BRUCE. IAP-Proteine binden an Caspasen und inhibieren so deren Aktivierung. Auf diese Weise besteht die Hauptfunktion der IAP-Proteine in der Regulation der Caspasen. Die Mitglieder der IAP-Familie haben somit eine antiapoptotische Funktion (53).

Mit der Identifikation des Apo-I/Fas-Rezeptors (CD95) und seines Liganden wurden weitere wichtige Mediatoren der Apoptose identifiziert. Die Bedeutung des Fas/Fas-L-Systems wurde zunächst in lpr Mäusen klar. Diese Mäuse besitzen einen Gendefekt im FAS-Rezeptor und leiden unter Lymphoproliferation und systemischer Autoimmunität. Mäuse, die einen Gendefekt im Fas-Liganden haben (gld-Mäuse), leiden ebenfalls unter Lymphadenopathie und Autoimmunität (54, 55). Der gegen den Apo-I/Fas-Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper, Anti-Apo-I/Fas, oder der Apo-I/Fas-Ligand führen zur Induktion von Apoptose bei einer Reihe von unterschiedlichen Zelltypen. Entsprechend dem Phänotyp der lpr und gld Mäuse ist die Hauptfunktion des Fas/Fas-L-Systems jedoch bei der Differenzierung des Immunsystems und hier insbesondere bei der T-Zellentwicklung und Funktion zu sehen. Der Apo-I/Fas-Rezeptor gehört zur Familie der TNF/NGF-Rezeptoren, die gekennzeichnet sind durch cysteinreiche, extrazelluläre Domänen sowie eine zytoplasmatische "death domain" (56). In den letzten Jahren konnten Rezeptor-assoziierte Proteine identifiziert werden, die an der Signalweiterleitung in der Zelle beteiligt sind. Nach Trimerisierung des Apo-I/Fas-Rezeptors durch den Fas-Liganden oder Anti-Fas-Antikörper kommt es zur Assoziation des Adapterproteins FADD (FAS associated death domain) an die "death domain" des Rezeptors. An FADD bindet über die "death effector domain" pro-FLICE (FADD like-ICE). Nach Assoziation dieses Komplexes wird aus pro-FLICE die aktive Caspase FLICE (Caspase-8) durch proteolytische Spaltung freigesetzt (57, 58). Diese wiederum kann weitere Caspasen, wie Caspase-3 aktivieren und so die proteolytischen Spaltungen, die zum Zelltod führen, auslösen. Ein ähnlicher Signalweg ist für den TNF-Rezeptor aufgezeigt worden.

1.1.4 Apoptoseresistenz und maligne Lymphome

Die Deregulation der Expression oder Funktion Apoptose-regulierender Gene trägt ganz entscheidend zur Pathogenese maligner Erkrankungen insbesondere maligner lymphatischer Erkrankungen bei. So führt die konstitutive Überexpression von bcl-2 zur Entstehung follikulärer Lymphome (12, 22, 59-61). Bcl-2 Expression spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der Pathogenese der B-CLL (62, 63).

Die Expression von bcl-x_L führt über die konstitutive Aktivierung des Interleukin-6 Signalwegs wahrscheinlich beim multiplen Myelom zu verstärkter Apoptoseresistenz und trägt so zur Pathogenese dieser Erkrankung bei (64).

Eine chromosomale Translokation führt bei niedrigmalignen MALT-Lymphomen zur konstitutiven Überexpression eines Mitgliedes der IAP-Famile und so wahrscheinlich zu erhöhter Apoptoseresistenz (65).

Mutationen im bcl-6 Gen spielen möglicherweise eine ähnliche Rolle bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen und führen dort zu verstärkter Apoptoseresistenz (66, 67).

Die Deregulation apoptose-regulierender Gene spielt nicht nur eine zentrale Rolle in der Pathogenese maligner Lymphome, sondern stellt wahrscheinlich auch einen zentralen Mechanismus bei der Entstehung von Therapieresistenz dar. So kann beispielsweise die Überexpression von bcl-2 oder die Blockade des FAS/FAS-L Systems zytostatika-induzierten Zelltod hemmen (13, 68). Umgekehrt kann die Überexpression proapoptotischer Gene, z.B. der bcl-2 Familie, Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika aber auch gegenüber antikörpervermitteltem Zelltod wiederherstellen (14, 69-71). Interleukin-6 kann beim multiplen Myelom die apoptose-induzierende Wirkung von Glucocorticoiden inhibieren (72).

Die Aufklärung von Apoptoseresistenzmechanismen bei malignen Lymphomen trägt daher nicht nur zum Verständnis der Pathogenese maligner Lymphome bei, sondern führt möglicherweise auch zur Entwicklung neuer verbesserter Therapiemöglichkeiten.

1.2 Apoptose und Zellzyklus bei malignen Zellen

Apoptose und Zellzyklus sind eng miteinander verknüpfte und fein regulierte Prozesse, die Gewebeentwicklung, Differenzierung und Homöostase regulieren (8). Es gilt bereits seit längerem als gesichert, dass die Dysregulation von Genen, die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen, zu malignem Zellwachstum führen kann (73). So führt beispielsweise beim Mantelzell-Lymphom in etwa 80% der Fälle die t(11;14) Translokation zur konstitutiven Überexpression von Cyclin D1 (bcl-1), einem positiven Regulator des Zellzyklus (74). Cyclin D1 aktiviert sogenannte cyclin-abhängige Kinasen (cdk: cyclin dependent kinases), die wiederum über die Aktivierung von Rb- (Retinoblastom) Proteinen und weitere Kaskadenschritte die Zellzyklusprogression vorantreiben können. So kann Cyclin D1 beispielsweise beim Mantelzell-Lymphom zum deregulierten und somit malignen Wachstum der Zellen beitragen. Ähnliche chromosomale Translokationen können auch bei einem Teil der Fälle beim multiplen Myelom zur Überexpression von Cyclin D1 führen (75).

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass neben der Deregulation des Zellzyklus verstärkte Apoptoseresistenz ein weiterer wichtiger Mechanismus für die Entwicklung maligner Tumore darstellt (12, 22, 59-61). Diese pathogene Bedeutung von Apoptoseresistenzmechanismen wurde als erstes für die Entstehung neoplastischer B-Zellerkrankungen gezeigt (siehe auch unten).

Die enge regulatorische Verknüpfung von Proliferation und Apoptose zeigt sich durch eine Reihe zentraler Beobachtungen. So konnte zum einen gezeigt werden, dass der Eintritt in die S-Phase, einem initialen Schritt der Zellzyklusprogression, während des Prozesses der Apoptose auftreten kann. Entzieht man beispielsweise ruhenden epithelialen Prostatazellen Testosteron als wichtigen Überlebensfaktor, dann treten diese Zellen in die S-Phase des Zellzyklus ein, bevor sie, ohne den Zellzyklus weiter zu durchlaufen, via Apoptose absterben (76). Zum anderen zeigt sich, dass zentrale Regulatoren des Zellwachstums häufig eine zellbiologische Doppelfunktion haben und sowohl Zellzyklus als auch Apoptose regulieren. So ist die Expression wichtiger Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D, c-Myc, Rb und p53 nicht nur assoziiert mit Proliferation,

sondern auch mit Zelltod (77-80). Entsprechend ergibt sich, dass die Deregulation solcher Gene zu malignem Zellwachstum führt. Das Tumorsuppressorgen p53 beispielsweise unterdrückt bzw. verhindert unkontrolliertes Wachstum durch Inhibition von Zellzyklus und Induktion von Apoptose. Die Induktion von Apoptose durch p53 wird zumindest teilweise durch seine Funktion als transkriptioneller Regulator von Mitgliedern der bcl-2 Genfamilie sowie von Apo-I/FAS vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass p53 z.B. die Transkription der proapoptotischen Gene bax und Apo-I/FAS steuern kann (80, 81).

Ein zentraler Regulator des G1/S-Übergangs des Zellzyklus ist der Transkriptionsfaktor E2F. So kontrolliert E2F beispielsweise die Transkription einer Reihe von Genen, die für Proteine kodieren, welche wichtig für die Zellzyklusprogression während der S-Phase sind; zu diesen Proteinen gehören Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase und DNA-Polymerase α (82, 83). E2F wird seinerseits zumindest teilweise durch das Rb-Protein (und verwandte Moleküle) reguliert. E2F kann an Rb-Proteine binden (84). Nach Phosphorylierung von Rb durch Cyclin/cdk-Komplexe wird E2F freigesetzt, das auf diese Art aktiviert werden kann. Die Überexpression von E2F-1, einem Mitglied der E2F-Genfamilie, in Fibroblasten führt zum Eintritt der Zellen in die S-Phase und zur Induktion von Apoptose (85-87). Die Blockade von E2F in einer normalen (nicht malignen) epithelialen Zelllinie durch die Expression dominant-negativer Mutanten führt zu einer verstärkten Apoptoseresistenz dieser Zellen, während überraschenderweise die Proliferationsrate dieser Zellen nicht beeinflusst ist (10). Dies weist darauf hin, dass die Zellzyklusprogression am G1/S-Übergang möglicherweise durch einen weiteren E2F-unabhängigen Mechanismus reguliert wird. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Blockade von E2F in einer normalen epithelialen Zelllinie tumorigenes Wachstum dieser Zellen in SCID-Mäusen induziert (10). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in anderen experimentellen Systemen gemacht werden. So entwickeln E2F-1-“knock-out“-Mäuse, also Tiere, die kein funktionelles E2F-1 Gen mehr besitzen, maligne Tumore (88). Diese Beobachtungen weisen auf eine Funktion von E2F als Apoptoseregulator und Tumorsuppressor hin und unterstreichen, dass verstärkte Apoptoseresistenz ein zentraler Schritt in der Pathogenese maligner Tumore darstellt. Ähnlich

wie E2F hat auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zellbiologische Doppelfunktion als Zellzyklus- und Apoptoseregulator (Bargou et al., 1997). Im Unterschied zu E2F, das eine proapoptotische Wirkung besitzt, hat NF- κ B eine antiapoptotische Wirkung. Möglicherweise trägt die konstitutive Aktivität von NF- κ B zum malignen Wachstum von Hodgkin-Lymphomen bei (siehe auch unten: Die Rolle von Apoptoseresistenzmechanismen bei der Pathogenese maligner Lymphome).

1.3 Rolle von Apoptoseresistenzmechanismen bei der Pathogenese maligner Lymphome

1.3.1 Apoptoseresistenzmechanismen und Non-Hodgkin-Lymphome

Die grundsätzliche Bedeutung von Apoptoseresistenzmechanismen für die Pathogenese maligner Erkrankungen wurde, wie bereits oben erwähnt, als erstes bei Non-Hodgkin-Lymphomen beschrieben (Tsujimoto et al., 1984). Hier führt bei follikulären B-Zell-Lymphomen die chromosomale t(14;18)-Translokation zur konstitutiven Überexpression von bcl-2, dessen anti-apoptotische Wirkung zur Entstehung maligner Lymphome entscheidend beiträgt (Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto and Croce, 1986; Tsujimoto et al., 1984; Vaux et al., 1988). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Überexpression des IgH/Bcl-2 Fusionsgens in lymphoiden Zellen transgener Mäuse zu einem verlängerten Überleben der B-Zellen mit konsekutiver Hyperplasie der Lymphfollikel und einer Vergrößerung der B-Zell-Kompartiments führt (89). Eine verstärkte Entwicklung von Tumoren konnte insbesondere in bcl-2 und c-myc doppelt transgenen Mäusen beobachtet werden (90).

Bei CLL-Zellen findet sich ebenfalls eine konstitutive bcl-2 Expression (63). Hier konnte beispielsweise eine t(18; 22) Translokation festgestellt werden, die zu einer Positionierung des bcl-2 Gens neben das Ig λ Leichtkettengen auf Chromosom 22 führt (62). In der Mehrzahl der Fälle führen bei der CLL allerdings nicht chromosomale Translokationen, sondern andere Mechanismen zur bcl-2 Expression. Ob hier bcl-2 die gleiche Rolle spielt wie bei follikulären Lymphomen, ist allerdings noch unklar.

Bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen (diffuse large cell lymphoma) finden sich gehäuft Mutationen im 5'-nicht-translatierten Bereich des bcl-6 Gens, einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der bei der Keimzentrumdifferenzierung des lymphatischen Systems eine wichtige Rolle spielt. Die Mutationen im bcl-6 Gen führen vermutlich zu verstärkter Apoptoseresistenz und tragen so möglicherweise zur Pathogenese der hochmalignen Lymphome bei (66, 67).

Beim multiplen Myelom findet sich eine starke Expression von $bcl-x_L$, einem antiapoptotischen Mitglied der $bcl-2$ Familie. Hierbei scheint die konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Interleukin-6 zu einer hohen Expression von $bcl-x_L$ zu führen, das so wahrscheinlich zum malignen Wachstum von Myelomzellen beitragen kann (64). Dieser Apoptoseresistenzmechanismus spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Entstehung von Zytostatikaresistenz (siehe unten: Apoptose und Therapieresistenz bei malignen Lymphomen).

Bei niedrigmalignen MALT-Lymphomen scheint die $t(11;18)$ Translokation eine entscheidende pathogenetische Rolle zu spielen. Diese Translokation führt möglicherweise zur Überexpression des Apoptoseinhibitors API2, einem Mitglied der IAP Familie, der so zur Entstehung des malignen Wachstums von MALT-Lymphomen beitragen kann (Dierlamm et al., 1999).

1.3.2 Apoptoseresistenzmechanismen und Morbus Hodgkin

Während die molekularen Grundlagen für Apoptoseresistenz und Tumorentstehung bei Non-Hodgkin-Lymphomen zum Teil bereits recht gut untersucht sind, waren die pathogenetischen Mechanismen beim Morbus Hodgkin bis vor kurzem noch völlig unklar. In den letzten Jahren gab es jedoch Hinweise, dass auch bei der Pathogenese des Morbus Hodgkin Apoptoseresistenzmechanismen eine wichtige Rolle spielen (91, 92).

Hodgkin-Lymphome sind durch das Vorhandensein charakteristischer mono- bzw. multinukleärer Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS) Zellen gekennzeichnet, welche die eigentlichen malignen Zellen darstellen. Die zelluläre Herkunft dieser Zellen ist nicht in allen Fällen eindeutig zu klären. Man geht heute davon aus, dass die Mehrzahl der Fälle B-zellulären Ursprungs sind (5); dennoch scheint ein geringer Teil der Fälle T-zellulärer und möglicherweise sogar myeloischer Herkunft zu sein (93, 94). So zeigen beispielsweise Analysen von Hodgkin-Zelllinien, dass diese Zellen eine grosse phänotypische und genotypische Heterogenität zeigen. So finden sich hier Linien mit B-zellulären, T-zellulären als auch myelo-monozytären Charakteristika (92, 95). Eine Hodgkin Zelllinie mit myelo-monozytären Charakteristika zeigte in einem SCID-Mausmodell das gleiche Wachstumsmuster wie es bei dem Patienten beobachtet werden konnte, von welchem die Zelllinie isoliert worden war (93). In den meisten Fällen finden sich pro Zelllinie sogar phänotypische und

auch genotypische Charakteristika verschiedener hämatopoetischer Linien: Meist liegt eine Kombination aus lymphozytären und myelo-monozytären Markern vor. Zwei Hodgkinzelllinien (L428, SUP-HD) zeigen sogar sowohl ein T-Zellrezeptor- als auch ein Immunglobulinrearrangement zusammen mit myelo-monozytären Oberflächenmarkern wie c-fms und CD15 (92, 95). CD30 ist ein typisches Zelloberflächenantigen von H/RS-Zellen, es findet sich aber auch nicht in allen Fällen exprimiert (96). Interessanterweise zeigen sowohl immunhistochemische als auch "single-cell"-PCR Untersuchungen primärer H/RS Zellen eine Koexpression verschiedener hämatopoetischer Linienmarker, ähnlich wie dies bei H/RS Zelllinien gefunden wird (95, 97). Gemeinsame Merkmale der zum Teil sehr heterogenen Gruppe der H/RS Zellen sind die charakteristische Morphologie sowie die Expression einer Vielzahl verschiedener Zytokine. Man nimmt an, dass zumindest eine Teil der histopathologischen als auch klinischen Symptome wie z.B. B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiss und Gewichtsverlust) durch die deregulierte Expression dieser Zytokine verursacht wird (93, 95). Zytokine, die von H/RS Zellen exprimiert werden, sind IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF etc.; so könnte beispielsweise die deregulierte Expression von IL-5 die Eosinophilie erklären, die bei manchen Patienten mit M. Hodgkin zu beobachten ist.

Der genaue molekulare Mechanismus, der zur malignen Transformation dieser Zellen und schliesslich zur Entstehung der malignen H/RS-Zelle führt, ist jedoch noch unklar. In den letzten Jahren ergaben sich jedoch zunehmend Hinweise, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B bei der Pathogenese des Morbus Hodgkin möglicherweise eine zentrale Rolle spielt.

NF- κ B ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, der ubiquitär von fast allen Zelltypen exprimiert wird; in den meisten Zellen liegt NF- κ B als inaktiver Komplex gebunden an I κ B-Inhibitorproteine vor (98). Durch unterschiedlichste zelluläre Stimulatoren wie beispielsweise Zytokine, Phorbolster, Cross-Linking von Oberflächen-Immunglobulin und virale Infektion wird der Inhibitor I κ B phosphoryliert und im folgenden proteolytisch degradiert. Dies führt zur Freisetzung und Kerntranslokation der transkriptionell aktiven Form von NF- κ B. Im Gegensatz dazu findet sich bei reifen B-Zellen und Plasmazytomzelllinien bereits eine konstitutive

Kernaktivität von NK- κ B (99). Funktionelle NK- κ B DNA-Bindungsstellen konnten in der Promotor- und Enhancer-Region verschiedener zellulärer und viraler Gene gefunden werden. Zielgene von NK- κ B sind beispielsweise unterschiedliche Zytokine und Zytokinrezeptoren, I κ k, c-myc und HIV-1; eine Reihe dieser Gene sind in die Regulation der Akutphase-Antwort, Inflammation, Lymphozytenaktivierung, Zellwachstum und Differenzierung involviert.

Sowohl NK- κ B als auch I κ B gehören zu Multigen-Familien. Fünf NK- κ B Familienmitglieder konnten bislang in Säugerzellen identifiziert werden: NK- κ B1 (p50 und seine Precursor-Form p105), p52 und sein Precursor p100, p65 (RelA), c-Rel und RelB (100). Diese Proteine besitzen eine konservierte homologe sogenannte Rel-Domäne, welche DNA-Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit I κ B-Proteinen vermittelt. Die Mitglieder der NK- κ B-Familie binden als Hetero- oder Homodimere an die entsprechenden spezifischen DNA-Bindungsmotive (99). Der induzierbare ubiquitär vorkommende NK- κ B-Komplex unterscheidet sich hinsichtlich der Untereinheitenzusammensetzung von der konstitutiven Form, die sich fast ausschliesslich in reifen B-Zellen findet. Die Hauptform von NK- κ B, die schnell nach zellulärer Stimulation induziert wird, besteht aus p50/p65 Heterodimeren. Im Gegensatz dazu setzt sich der konstitutive Komplex, der sich in reifen B-Zellen findet, aus p50/c-Rel zusammen. Plasmazellkomplexe hingegen bestehen aus p50, p52, p65, c-Rel und RelB (101-103).

Die Analyse der DNA-Bindungsaktivität von NK- κ B mittels EMSA (Electro-Mobility-Shift-Assay) in Hodgkin-Zelllinien zeigt trotz der unterschiedlichen phänotypischen Linienzuordnung dieser Zellen in allen bislang untersuchten Fällen eine starke konstitutive NK- κ B Aktivierung (92). D.h. sowohl Hodgkin-Linien mit B-zellulärer, T-zellulärer oder auch myelo-monozytärem Phänotyp zeigen als gemeinsames Merkmal eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung. Der Stärke der Bindungsaktivität ist dabei deutlich höher als die der konstitutiven Komplexe, die sich bei reifen B-Zellen finden. Supershift und Konkurrenzexperimente ergeben weiterhin, dass der konstitutive NK- κ B-Kernkomplex in Hodgkinzelllinien aus den Untereinheiten RelA (p65) und p50 besteht und sich somit von dem konstitutiven Komplex reifer B-Zellen (p50/c-Rel) unterscheidet (92). Interessanterweise konnte so wie in den meisten anderen Zelltypen auch in

Zelllinien von grosszellig anaplastischen Lymphomen (ALCL), die als Hodgkin-verwandte Lymphome gelten, keine konstitutive NF- κ B-Aktivität gefunden werden (92). Hinsichtlich Zusammensetzung und Aktivität unterscheidet sich der in Hodgkin-Zellen gefundene NF- κ B-Komplex damit von den meisten anderen untersuchten Zelltypen. In-situ-Hybridisierungsanalysen und immunhistologische Analysen von Patientenlymphknoten sowie die EMSA-Analyse von Hodgkinzellen eines malignen Perikardergusses eines Patienten weisen darauf hin, dass NF- κ B nicht nur bei Hodgkin-Zelllinien, sondern auch bei primären H/RS-Zellen hohe konstitutive Aktivität zeigt (91, 92, 104). Diese deskriptiven Beobachtungen weisen auf eine mögliche pathogenetische Rolle von NF- κ B beim M. Hodgkin hin. Durch weitere funktionelle Untersuchungen konnte diese Vermutung weiter bestätigt werden.

So konnte durch Überexpression einer dominant-negativen Mutante von I κ B- α , einem spezifischen NF- κ B-Inhibitor, in zwei verschiedenen Hodgkin-Zelllinien (L540, HD-MyZ) selektiv die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B blockiert werden (91). Die entsprechenden Klone zeigten gegenüber Wachstumsfaktorentzug eine deutlich erhöhte Apoptosesensitivität im Vergleich zu Kontrollklonen. Zusätzlich konnte eine deutliche Verlangsamung des Wachstums festgestellt werden. Zellzyklus-Analysen mit synchronisierten Zellklonen zeigten eine deutlich verlangsamte Zellzyklusprogression am G1/S-Übergang (91). Die Überexpression der dominant-negativen I κ B- α Mutante in der T-Zelllinie Molt-4 und in der epithelialen Zelllinie HeLa führte zu keiner Verlangsamung des Zellwachstums. Die Blockade der konstitutiven NF- κ B-Aktivität in Hodgkin-Zellen nach Xenotransplantation in SCID Mäuse führte zu einem deutlich gebremsten Tumorwachstum *in vivo*, vermutlich bedingt durch Zellzyklusinhibition und erhöhte Apoptosesensitivität (91). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass NF- κ B offensichtlich eine Rolle sowohl bei der Steuerung des Zellzyklus als auch der Apoptose spielt. Diese zellbiologischen Funktionen konnten mittlerweile in verschiedenen Zellsystemen beobachtet werden. So konnte u.a. gezeigt werden, dass NF- κ B Fibroblasten vor TNF- α -induzierter Apoptose schützt (105, 106).

In letzter Zeit ergaben sich erste Hinweise, über welche molekularen Mechanismen NF- κ B Zellzyklusprogression als auch antiapoptotische Effekte vermittelt. So konnte u.a. gezeigt werden, dass NF- κ B die Transkription des Zellzyklusregulators Cyclin D1 aktiviert und auf diese Weise den Retinoblastom-„Pathway“ steuern kann (107). Erste experimentelle Beobachtungen deuten daraufhin, dass NF- κ B möglicherweise auch die Transkription von Mitgliedern der antiapoptotisch wirkenden IAP-Familie induzieren kann (53). Weitere antiapoptotisch wirksame Gene, die von NF- κ B transkriptionell reguliert werden, sind A20, ein Zinkfinger Protein, und die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (108, 109). Damit spielt NF- κ B ähnlich wie E2F (siehe oben: Apoptose und Zellzyklus bei malignen Zellen) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose und des G0/G1-S Phase Übergangs des Zellzyklus.

Die Deregulation von NF- κ B in H/RS-Zellen führt dort somit offensichtlich sowohl zu verstärkter Apoptoseresistenz als auch zu verstärkter Proliferation - möglicherweise via transkriptionell vermittelter Überexpression zellzyklus-regulierender Gene wie Cyclin D1 und antiapoptotisch wirkender Gene wie Mitglieder der IAP-Familie. Da es direkte Hinweise für eine erhöhte NF- κ B-Aktivität auch in primären H/RS-Zellen gibt, ist die Deregulation dieses Transkriptionsfaktors und die damit verbundene Deregulation von Apoptose und Zellzyklus somit möglicherweise ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese des Morbus Hodgkin. Die potentiell transformierende und somit tumorigene Wirkung von aktiviertem NF- κ B konnte auch in Tax-transgenen Mäusen beobachtet werden. Dort führt die Überexpression von Tax, einem Aktivator von NF- κ B, zur Entstehung maligner Tumore, die erfolgreich mit p65 Antisense-Oligonukleotiden behandelt werden können (110).

Da NF- κ B desweiteren ein wichtiger transkriptioneller Aktivator inflammatorischer Gene wie beispielsweise verschiedener Zytokine ist, könnte die hohe konstitutive Aktivität von NF- κ B auch die deregulierte Expression von Zytokinen durch H/RS-Zellen und damit möglicherweise auch einen Teil der klinischen und histopathologischen Charakteristika dieser Erkrankung erklären (siehe auch oben).

Die genaue molekulare Ursache, die zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivität in H/RS-Zellen führt, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Die Analyse der Expression von p65, p50 und c-Rel ergab bisher keinen Unterschied zwischen Hodgkin-Zelllinien und anderen Zelltypen (92). Northern-Blot Analysen der Hodgkin-Zelllinien HD-MyZ, KMH-2, HDLM-2, L540 sowie primärer Hodgkinzellen, die aus einem malignen Perikarderguss isoliert wurden, zeigten eine deutliche Erhöhung der I κ B- α -mRNA-Expression im Vergleich zu anderen Zelltypen. Diese Beobachtung spiegelt die hohe NF- κ B-Aktivität in H/RS-Zellen wieder, da NF- κ B ein positiver transkriptioneller Regulator seines eigenen Inhibitors I κ B- α ist (92). Im Gegensatz zur mRNA-Expression finden sich in H/RS-Zelllinien nur geringe I κ B- α -Proteinmengen (92). Somit sind die verringerten I κ B- α -Proteinmengen zumindest in Hodgkin-Zelllinien wahrscheinlich die unmittelbare Ursache für die erhöhte konstitutive NF- κ B-Aktivität. Die molekulare Ursache wiederum für die niedrigen I κ B- α -Proteinmengen sind unklar. Erste Untersuchungen weisen aber darauf hin, dass zum einen Mutationen in den I κ B-Genen (also den NF- κ B-Inhibitoren) zum anderen eine aberrante Aktivierung des IKK-Komplexes (I κ B-Kinase), der über Phosphorylierung und anschließender Degradation von I κ B NF- κ B aktivieren kann, hier möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen (104, 111).

1.4 Apoptose und Therapieresistenz bei malignen Lymphomen

1.4.1 P-Glykoprotein und Zytostatikaresistenz

Die Entwicklung von Therapieresistenz z.B. gegenüber Zytostatika (Zytostatikaresistenz, “drug resistance“) ist das Hauptproblem in der Behandlung maligner Erkrankungen. Das genauere Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Entstehung von Therapieresistenzen zugrunde liegen, könnte zur Entwicklung neuer Substanzen und neuer Therapieansätze führen, welche die Behandlungsmöglichkeiten therapierefraktärer Malignome verbessern könnte. Die Überexpression von transmembranen “Pumpen“-Proteinen, die Zytostatika wie beispielsweise Anthrazykline aus der Zelle heraustransportieren können, stellt einen wichtigen Resistenzmechanismus dar. Wie sich in den letzten Jahren zeigte, ist Apoptoseresistenz ein weiterer zentraler Resistenzmechanismus, der wahrscheinlich nicht nur bei der Entstehung von Zytostatikaresistenz, sondern auch bei der Resistenz gegenüber immunologischen Therapieansätzen eine Rolle spielt.

Das am besten untersuchte Protein mit einer “Pumpen“-Funktion ist das P-Glykoprotein (MDR1: multidrug resistance gene). Die Expression von MDR1 ist bei verschiedenen malignen Erkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert (112). Entsprechende klinische Versuche, mittels sogenannter “drug sensitizer“, wie z.B. Calciumantagonisten, die Funktion von MDR1 zu unterdrücken und so die Zytostatikaresistenz zu brechen, sind bislang fehlgeschlagen. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Expression von MDR1 führen, könnten daher zur Entwicklung neuer Therapieansätze therapierefraktärer Malignome führen.

So konnte gezeigt werden, dass genotoxischer Stress durch Zytostatika oder UV-Strahlung zur Aktivierung des MDR1 Promotors führen kann (113). Dabei scheinen insbesondere DNA-Sequenzen eine Rolle zu spielen, an die sogenannte Y-Box-Proteine, wie z.B. YB-1, binden können (114). Die Überexpression des Y-Box Faktors YB-1 in Zelllinien führt zur Überexpression von MDR1 und zur Zytostatikaresistenz gegenüber Doxorubicin (115). In Gewebeproben von Mammakarzinompatientinnen konnte eine Assoziation zwischen verstärkter Expression von YB-1 im Zellkern und MDR1 Expression gefunden werden. In normalem (nicht malignem)

Brustepithel konnte weder eine YB-1 Expression noch eine MDR1 Expression nachgewiesen werden (115). Eine Assoziation zwischen YB-1 Kernexpression und P-Glykoprotein-Expression konnte auch beim Osteosarkom gefunden werden (116). Diese Beobachtungen weisen auf eine wichtige Rolle von Y-Box-bindenden Proteinen bei der Regulation der MDR1 Expression und bei der Entstehung von Zytostatikaresistenz hin. Wahrscheinlich sind neben Y-Box Proteinen noch weitere Moleküle an der Regulation der MDR1 Genexpression beteiligt; die genauen Mechanismen der MDR1-vermittelten Zytostatikaresistenz sind daher noch weiterhin unklar.

1.4.2 Apoptose und Zytostatikaresistenz

Neben der Bedeutung für die Pathogenese maligner Erkrankungen spielt Apoptose eine weitere wichtige Rolle bei Entstehung von Therapieresistenz. So konnte gezeigt werden, dass Zytostatika Tumorzellen via Apoptose abtöten können; somit sind Apoptoseresistenzmechanismen auch von unmittelbarer Bedeutung für die Entwicklung von Zytostatikaresistenz. D.h. zusätzlich zur Überexpression von "Pumpen" wie das P-Glycoprotein, die Zytostatika aus der Tumorzelle heraustransportieren können, ist die Reduktion von Apoptosesensitivität ein weiterer wichtiger zellulärer Resistenzmechanismus (13). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *bcl-2* Zellen *in vitro* resistenter gegenüber zytostatischer Behandlung macht (13). Umgekehrt kann *in vitro* die Behandlung mit *bcl-2* antisense Oligonukleotiden bzw. die Überexpression proapoptotischer Gene der *bcl-2* Familie, wie z.B. *bik/nbk* oder *bax*, die Empfindlichkeit resistenter Lymphomzellen und Mammakarzinomzellen gegenüber unterschiedlichen Zytostatika wie Cytosinarabinosid, Epirubicin und Methotrexat, aber auch gegenüber Glucocorticoiden wiederherstellen (69-71).

Ein weiteres Molekül der *bcl-2* Familie, *bcl-x_L*, ist wahrscheinlich an der Resistenzentwicklung beim Plasmozytom (multiples Myelom) beteiligt. Hier führt IL-6 über die konstitutiven Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges zur Überexpression von *bcl-x_L* (64). Gleichzeitig kann IL-6 die apoptose-induzierende Wirkung von Glucocorticoiden beim multiplen Myelom hemmen (72). Interessanterweise kann IL-6 bei Myelomzellen nicht nur Glucocorticoid-, sondern auch Apo-I/FAS-vermittelten Zelltod inhibieren (117). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass durch

IL-6 vermittelte intrazelluläre Apoptoseresistenzmechanismen, wie z.B. die Induktion von bcl-x_L, an der Entstehung von Zytostatikaresistenz beim multiplen Myelom beteiligt sind. Somit ist Interleukin-6 nicht nur ein wichtiger Wachstumsfaktor, sondern wahrscheinlich auch ein Resistenzfaktor bei dieser Erkrankung.

1.4.3 Antikörper vermittelter Zelltod und immunologische Therapieresistenzmechanismen

Obwohl nach wie vor die Behandlung mit Polychemotherapie den Standard in der Therapie der malignen Lymphome darstellt, erlangte in den letzten Jahren die Immuntherapie mittels monoklonaler Antikörper zunehmende Bedeutung. So zeigten sowohl monoklonale anti-CD20 (Rituximab) als auch gegen Oberflächenimmunglobulin gerichtete anti-idiotypische Antikörper in ersten klinischen Studien signifikante Ansprechraten bei niedrigmalignen Lymphomen (118, 119). Die genauen Mechanismen, die *in vivo* den Anti-Tumor-Effekt monoklonaler Antikörper vermitteln, sind bislang unklar. Aufgrund von *in vitro* Beobachtungen mit Hilfe von Zelllinien und aufgrund von Tiermodellen geht man davon aus, dass ein Teil der Wirksamkeit dieser Antikörper durch den Fc-Teil vermittelt sind, d.h. zum einen auf komplement-vermittelter Zellyse und zum anderen auf der sogenannten antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity) beruht (120, 121). Die entsprechenden immunologischen Effektorzellen sind Zellen der myeloischen Reihe, die über Bindung des Fc-Teils eines Antikörpers an den aktivierenden Fc γ -Rezeptor (Fc γ RIII) aktiviert werden und so die Zielzelle, die durch spezifische Bindung eines monoklonalen Antikörpers sozusagen markiert ist, gezielt eliminieren können. Ein weiterer wichtiger Wirkmechanismus monoklonaler Antikörper ist die direkte Induktion von Apoptose ohne Rekrutierung und Aktivierung immunologischer Effektorzellen.

Der erste Antikörper, bei dem eine direkte apoptoseinduzierende Wirkung beschrieben wurde, ist gegen CD95 (Apo-I/Fas), also einem Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, gerichtet (122). Neben der Induktion von Zelltod bei Zelllinien und T-Zellen konnte gezeigt werden, dass der anti-Apo-

I/Fas-Antikörper in der Lage ist, bei primären humanen CLL-Zellen (chronisch lymphatische Leukämie) nach vorheriger Aktivierung Zelltod auszulösen (63).

So konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung primärer maligner Zellen von Patienten mit B-CLL mittels SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan type1) und IL-2 zu einer deutlichen Hochregulation der Apo-I/Fas-Expression in der Durchflusszytometrie führt, während die konstitutive Apo-I/Fas-Expression unstimulierter CLL-Zellen zwar vorhanden, aber nur relativ schwach ist. Anti-Apo-I-Antikörper-Behandlung führte *in vitro* zu einer deutlichen Wachstumsinhibition von SAC/IL-2 stimulierten CLL-Zellen bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten. Mittels In-Situ-Nick-Translation und DNA-Fragmentierungsassays (Nachweis einer DNA-Ladder) konnte gezeigt werden, dass der wachstumshemmende Effekt durch Apoptoseinduktion bedingt ist. Bei unstimulierten CLL-Zellen konnte kein inhibitorischer Effekt durch Anti-Apo-I-Antikörper-Behandlung festgestellt werden. Bei einem Patienten konnte nach SAC/IL-2 Vorstimulation überraschenderweise keine Wachstumsinhibition, sondern eine Wachstumsstimulation festgestellt werden, d.h. in diesem Fall löste die Aktivierung von Apo-I/Fas statt Apoptose Proliferation aus (63). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der Apo-I/Fas-Rezeptor Zellaktivierung vermitteln kann, die entweder zu Zelltod oder Zellwachstum führen kann. Die Mechanismen, die sozusagen darüber entscheiden, ob eine Zellaktivierung zu Apoptose oder zu Proliferation führt, sind in diesem Fall nach wie vor unklar. Möglicherweise spielt hier die bcl-2 Genfamilie eine Rolle. So zeigte die Analyse der bcl-2 Genexpression eine deutliche Herunterregulation der mRNA bei Apo-I-sensitiven CLL-Zellen nach Stimulation mit SAC/IL-2; keine Herunterregulation von bcl-2 konnte bei dem Patienten beobachtet werden, dessen CLL-Zellen nach Apo-I/Fas-Stimulation proliferieren. D.h. CLL-Zellen mit konstanter bcl-2 Expression sind scheinbar resistent, Zellen von Patienten mit Herunterregulation der bcl-2 Expression nach Aktivierung sind empfindlich gegenüber einer Behandlung mit anti-Apo-I/Fas Antikörper (63). Ob bcl-2 tatsächlich Fas-vermittelte Apoptose blockieren kann, ist nach wie vor unklar; dennoch ergaben sich durch diese Untersuchungen an CLL-Zellen erste Hinweise, dass die bcl-2 Genfamilie bzw. Apoptoseresistenzmechanismen nicht nur bei der Pathogenese,

sondern auch bei der Entstehung von Therapieresistenz neoplastischer B-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Dabei spielen Apoptoseresistenzmechanismen offensichtlich nicht nur eine Rolle bei der Entstehung von Zytostatikaresistenz sondern auch bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber immuntherapeutischen Ansätzen (z.B. mit monoklonalen Antikörpern).

So spielt interessanterweise das Apo-I/Fas-System bei einem weiteren immunologischen Resistenzmechanismus eine zentrale Rolle: Beispielsweise können Tumorzellen, die den Apo-I/FAS-Liganden exprimieren, aktivierte T-Zellen sozusagen "retrograd" via Apoptose abtöten (123). Alternativ kann die Stimulation von T-Zellen durch maligne Zellen, die keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren, ebenfalls zur T-Zell-Apoptose führen; in diesem Fall exprimieren die aktivierten T-Zellen den Apo-I/Fas-Liganden selbst – es liegt damit ein autokriner Apoptosemechanismus vor (124). Auf diese Art und Weise entziehen sich maligne Zellen durch Apoptosemechanismen einer Kontrolle durch das T-Zellsystem. Somit ist das Apo-I/Fas-System, ähnlich wie die bcl-2 Familie, entscheidend sowohl am Wachstum wie auch an der Entstehung von Therapieresistenz maligner Erkrankungen beteiligt. Dies wird u.a. durch Beobachtungen unterstützt, dass das Apo-I/Fas-System auch an der Vermittlung Zytostatika-induzierter Apoptose beteiligt sein kann (68).

Da der Fas-Rezeptor recht unspezifisch von verschiedenen normalen und malignen Geweben exprimiert wird, sind entsprechende monoklonale Antikörper für die klinische Anwendung zur Therapie maligner Lymphome wahrscheinlich nicht geeignet (125, 126). Wesentlich spezifischere Antikörper, die selektiv normale und neoplastische B-Zellen binden, sind gegen den B-Zellrezeptor bzw. gegen Oberflächenimmunglobulin (sIgM) gerichtete Antikörper. Diese Antikörper können bei malignen B-Zellen aktivierungsinduzierten programmierten Zelltod auslösen. Wirkung und Wirkungsmechanismus eines anti-IgM-Antikörpers wurde an Hand eines humanen Burkitt-Lymphomlinienmodells näher untersucht. So konnte gezeigt werden, dass dem sIgM-vermittelten Zelltod die Induktion des proapoptotischen Gens der bcl-2 Familie $bax-\alpha$ vorausgeht (127), während die Expression der antiapoptotischen Proteine bcl-2 und bcl-x_L vor und nach Apoptoseinduktion unverändert bleibt. Interessanterweise zeigte sich, dass Subklone der

Burkitt Lymphomlinie BL-41, die resistent gegenüber anti-IgM-vermittelter Apoptose sind, $bax-\alpha$ nicht hochregulieren. Im Vergleich der BL-41 Subklone zeigte sich ausserdem eine deutlich höhere konstitutive Expression des proapoptotischen Proteins $bcl-x_S$ in sensitiven Zellen im Vergleich zu resistenten Zellen, die nur eine schwache $bcl-x_S$ Expression zeigen (127). Ein weiteres Gen, das durch anti-sIgM vermittelte Aktivierung hochreguliert wird, ist der Transkriptionsfaktor $Nak-1/Nur77$, dessen proapoptotische Funktion zuvor bereits bei T-Zellen nachgewiesen werden konnte (128). Auch hier zeigte sich, dass Subklone der Burkitt Lymphomlinie BL-41, die resistent gegenüber anti-IgM-vermittelter Apoptose sind, ähnlich wie $bax-\alpha$ $Nak-1/Nur77$ nicht hochregulieren. Diese Beobachtungen lassen somit eine ursächliche Funktion von $Nak-1/Nur77$ und Mitgliedern der $bcl-2$ Familie bei der sIgM-vermittelten Apoptose vermuten. Mittels retroviralem Gentransfer konnte $bax-\alpha$ in resistenten BL-41 Subklonen überexprimiert werden. In Abhängigkeit von der Stärke der Überexpression kann dadurch die Sensitivität gegenüber sIgM-vermittelter Apoptose wiederhergestellt werden (14). Diese Experimente weisen somit zum einen auf eine zentrale Rolle von $bax-\alpha$ und somit der $bcl-2$ Familie bei der sIgM-vermittelten Apoptose, zum anderen weisen sie auf mögliche Resistenzmechanismen hin, die bei der Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern eine Rolle spielen könnten. Weitere Beobachtungen, dass die Überexpression von $bcl-x_L$, aber nicht die Überexpression von $bcl-2$, anti-IgM vermittelte Apoptose blockieren kann, weisen darauf hin, dass bax und $bcl-x$, aber nicht $bcl-2$, an der Regulation dieses Apoptoseprozesses beteiligt sind (129).

Die "downstream" von $bax/bcl-x$ gelegene Effektor-Caspase-3 wird ebenfalls bei der sIgM-vermittelten Apoptose aktiviert und führt dann im weiteren zur proteolytischen Spaltung essentieller zellulärer Faktoren, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor SP-1 (130, 131). Die "upstream" von bax gelegenen Signalwege, die bei sIgM-vermittelter Apoptose eine Rolle spielen, sind bislang noch unklar. So spielt im Gegensatz zu B-CLL Zellen und aktivierten T-Zellen, die via Apo-I/FAS-Aktivierung unter bestimmten Bedingungen in die Apoptose gehen, das CD95 System bei der sIgM-vermittelten Apoptose normaler Tonsillen B-Zellen und Burkitt-

Lymphomzellen keine Rolle (132). Ebenso ist der funktionelle Zusammenhang zwischen Nak-1 und bcl-2 Familie/Caspase-3 bei der sIgM vermittelten Apoptose noch unklar.

Die an dem BL-41 Burkitt-Lymphom-Modell beobachteten Resistenzmechanismen könnten möglicherweise auch bei der Behandlung primärer Lymphomzellen *in vivo* auftreten und weisen somit bereits auf mögliche Probleme einer Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern hin. Die bisher dargestellten Arbeiten weisen insgesamt deutlich auf die Rolle der Apoptose bei der Entstehung von Zytostatikaresistenz und immunologischer Resistenz hin. Hier scheinen insbesondere zentrale Apoptoseregulatoren wie das Apo-I/FAS System als auch die bcl-2 Familie von Bedeutung zu sein. Die weitere Aufklärung von Antikörper- und Zytostatika-vermittelten Apoptose- und Apoptoseresistenzmechanismen bei neoplastischen B-Zellen ist daher eine wichtige Voraussetzung, um in Zukunft die Behandlungsmöglichkeiten maligner Lymphome verbessern zu können.

Neben der direkten Induktion von Apoptose durch die Anwendung monoklonaler Antikörper besteht die Möglichkeit, durch die gezielte Rekrutierung und Aktivierung immunologischer Effektorzellen mittels bispezifischer Antikörper Zelltod indirekt bei malignen Zellen auszulösen. Besonders wirkungsvoll scheinen hierbei rekombinante bispezifische "single-chain"-Antikörper (bsc) zu sein. Diese Antikörper bestehen nur noch aus der V_L- und V_H-Kette der jeweiligen Bindedomäne der parentalen Antikörper. Die V_L- und V_H-Ketten sind durch kurze Linker verbunden. Auf diese Weise entsteht ein relativ kleines Molekül, das nur aus einer Peptidkette ("single-chain") besteht und somit vergleichsweise einfach als rekombinantes Protein hergestellt werden kann (133).

Im Vergleich zu herkömmlichen bispezifischen Antikörpern, die mit Hilfe der teuren und aufwendigen Hybrid-Hybridomtechnologie oder mit Hilfe des chemischen "Cross-Linking" hergestellt werden, kann man die bispezifischen rekombinanten "single-chain"-Antikörper somit relativ leicht und in grossen Mengen unter GMP-Bedingungen für die klinische Anwendung herstellen. So ist es möglich, diese Moleküle mittels eukaryontischer Expressionssysteme (z.B. CHO-Zellen) zu synthetisieren und anschliessend mit einfacher Affinitätschromatographie aus

dem Zellkulturüberstand aufzureinigen (133). Ein weiterer Vorteil dieser rekombinanten Antikörper ist ihre vergleichsweise kleine Molekülgrösse bedingt durch das Fehlen der gesamten konstanten Antikörperregion. Somit ist im Vergleich zu klassischen Antikörperformaten auch eine deutlich höhere Tumorpenetration sowie geringere Immunogenität *in vivo* zu erwarten. Zusätzlich zu diesen technischen Vorteilen haben diese "single-chain"-Moleküle im Vergleich zu anderen bispezifischen Antikörpern deutlich veränderte immunologische Eigenschaften (133, 134).

So besitzen diese Moleküle *in vitro* eine enorm hohe biologische Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass ein rekombinanter bsc CD19xCD3 Antikörper bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (10-100 pg/ml) und niedrigen E:T- (Effektor- zu Targetzell-) Verhältnissen in der Lage ist, T-Zellen zu aktivieren und humane Lymphomzellen in kurzer Zeit effizient zu lysieren (135). Damit liegt die Aktivität dieses Antikörpers um Grössenordnungen über der biologischen Aktivität konventioneller Antikörperformate. Dieser Effekt ist absolut Zielzell-spezifisch, da sowohl mit dem monoklonalen anti-CD3- als auch dem monoklonalen anti-CD19-Mutterantikörper der zytotoxische Effekt des rekombinanten bsc CD19xCD3 Antikörpers blockiert werden kann. Desweiteren werden CD19-negative Zielzellen nicht lysiert; eine T-Zellaktivierung kann nur in Gegenwart der Zielzelle – also CD19-positiver B-Zellen – festgestellt werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der rekombinante bispezifische CD19xCD3 "single-chain"-Antikörper, im Gegensatz zu anderen bispezifischen Antikörperformaten, keine T-Zell-Vorstimulation benötigt (135, 136). Diese Eigenschaft konnte auch bei einem anderen bispezifischen rekombinanten "single-chain"-Antikörper gleichen Formats, aber mit anderer Antigen-spezifität festgestellt werden (133, 134). Somit unterscheiden sich diese kleinen rekombinanten Moleküle immunologisch mindestens in zweierlei Hinsicht von herkömmlichen bispezifischen Antikörpern: 1) hohe biologische Aktivität bereits in niedrigsten Konzentrationen und niedrigen E:T Verhältnissen, 2) Aktivierung unstimulierter T-Zellen. Die molekulare Ursache dieser Eigenschaften ist bislang unklar.

Interessanterweise ist der bsc CD19xCD3 Antikörper in der Lage, bei allen bislang untersuchten CD19-positiven humanen Lymphomlinien T-Zell-vermittelten Zelltod zu induzieren; resistente Subklone konnten bislang nicht beobachtet werden. Möglicherweise lassen sich daher mit diesem Therapieansatz die bisher beschriebenen Apoptoseresistenzmechanismen umgehen.

Obwohl der genaue Mechanismus dieser hoch effizienten und raschen Induktion von Lymphomzellyse durch den bsc CD19xCD3 Antikörper *in vitro*, gerade auch im Hinblick auf die Unabhängigkeit von einer T-Zell-Vorstimulation, bislang noch unklar ist, ist dieses Molekül ein vielversprechender Kandidat zur Behandlung maligner Non-Hodgkin-Lymphome, dessen Wirksamkeit in klinischen Studien überprüft werden soll.

1.5 Literatur

1. Urba, W. J., Duffey, P. L., and Longo, D. L. 1990. Treatment of patients with aggressive lymphomas: an overview. *J Natl Cancer Inst Monogr* **10**: 29.
2. Hiddemann, W., and Unterhalt, M. 1994. Current status and future perspectives in the treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Blood Rev* **8**: 225.
3. DeVita, V. T., Jr., and Hubbard, S. M. 1993. Hodgkin's disease [see comments]. *N Engl J Med* **328**: 560.
4. Urba, W. J., and Longo, D. L. 1992. Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **326**: 678.
5. Kuppers, R., and Rajewsky, K. 1998. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* **16**: 471.
6. Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M. L., and Rajewsky, K. 1999. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **341**: 1520.
7. Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347.
8. Ellis, R. E., Yuan, J. Y., and Horvitz, H. R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663.
9. Ashwell, J. D., Berger, N. A., Cidlowski, J. A., Lane, D. P., and Korsmeyer, S. J. 1994. Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunol Today* **15**: 147.
10. Bargou, R. C., Wagener, C., Bommert, K., Arnold, W., Daniel, P. T., Mapara, M. Y., Grinstein, E., Royer, H. D., and Dorken, B. 1996. Blocking the transcription factor E2F/DP by dominant-negative mutants in a normal breast epithelial cell line efficiently inhibits apoptosis and induces tumor growth in SCID mice. *J Exp Med* **183**: 1205.
11. Holtzman, D. M., and Deshmukh, M. 1997. Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease? [news]. *Nat Med* **3**: 954.
12. Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**: 1440.
13. Reed, J. C., Kitada, S., Takayama, S., and Miyashita, T. 1994. Regulation of chemoresistance by the bcl-2 oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines. *Ann Oncol* **5**: 61.
14. Weinmann, P., Bommert, K., Mapara, M. Y., Dorken, B., and Bargou, R. C. 1997. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes human BL-41 Burkitt lymphoma cells for surface IgM-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* **27**: 2466.
15. Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., and Debatin, K. M. 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* **6**: 279.
16. Melchers, F., Haasner, D., Grawunder, U., Kalberer, C., Karasuyama, H., Winkler, T., and Rolink, A. G. 1994. Roles of IgH and L chains and of surrogate H and L chains in the development of cells of the B lymphocyte lineage. *Annu Rev Immunol* **12**: 209.
17. Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B., and Rolink, A. 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* **14**: 60.
18. Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A., and Goodnow, C. C. 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* **72**: 325.

19. Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., and MacLennan, I. C. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* **342**: 929.
20. Liu, Y. J., Mason, D. Y., Johnson, G. D., Abbot, S., Gregory, C. D., Hardie, D. L., Gordon, J., and MacLennan, I. C. 1991. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* **21**: 1905.
21. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233.
22. Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**: 1097.
23. Chao, D. T., and Korsmeyer, S. J. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **16**: 395.
24. Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E., and Oltvai, Z. N. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* **4**: 327.
25. Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [see comments]. *Nature* **369**: 321.
26. Boise, L. H., Gonzalez, G. M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C. B. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597.
27. Apte, S. S., Mattei, M. G., and Olsen, B. R. 1995. Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* **26**: 592.
28. Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Hardwick, J. M. 1996. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **379**: 554.
29. Knudson, C. M., and Korsmeyer, S. J. 1997. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* **16**: 358.
30. Knudson, C. M., Tung, K. S., Tourtellotte, W. G., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96.
31. Simonen, M., Keller, H., and Heim, J. 1997. The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem* **249**: 85.
32. Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L., and Fesik, S. W. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335.
33. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609.
34. Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**: 983.
35. Zha, H., and Reed, J. C. 1997. Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem* **272**: 31482.

36. Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A. J. 1997. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12401.
37. Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H. G., Irie, S., Fong, L., and Reed, J. C. 1994. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* **54**: 5501.
38. Blagosklonny, M. V., Giannakakou, P., el, D. W., Kingston, D. G., Higgs, P. I., Neckers, L., and Fojo, T. 1997. Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* **57**: 130.
39. Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C., and Comoglio, P. M. 1996. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *Embo J* **15**: 6205.
40. Chang, B. S., Minn, A. J., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., and Thompson, C. B. 1997. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *Embo J* **16**: 968.
41. Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J. M. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**: 1966.
42. Clem, R. J., Cheng, E. H., Karp, C. L., Kirsch, D. G., Ueno, K., Takahashi, A., Kastan, M. B., Griffin, D. E., Earnshaw, W. C., Veluona, M. A., and Hardwick, J. M. 1998. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 554.
43. Reed, J. C. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**: 773.
44. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**: 334.
45. Alnemri, E. S. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* **64**: 33.
46. Casciola, R. L., Nicholson, D. W., Chong, T., Rowan, K. R., Thornberry, N. A., Miller, D. K., and Rosen, A. 1996. Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death [see comments]. *J Exp Med* **183**: 1957.
47. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD [see comments]. *Nature* **391**: 43.
48. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175.
49. Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [see comments]. *Nature* **391**: 96.
50. Spector, M. S., Desnoyers, S., Hoepfner, D. J., and Hengartner, M. O. 1997. Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* **385**: 653.
51. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [see comments]. *Cell* **90**: 405.
52. Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147.

53. Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**: 239.
54. Ishida, Y., Ueda, G., Noguchi, K., Nagasawa, R., Hirose, S., Sato, H., and Shirai, T. 1987. Unique cell surface phenotypes of proliferating lymphocytes in mice homozygous for *lpr* and *gld* mutations, defined by monoclonal antibodies to MRL/Mp-*lpr/lpr* T cells. *Cell Immunol* **105**: 136.
55. Roths, J. B., Murphy, E. D., and Eicher, E. M. 1984. A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* **159**: 1.
56. Itoh, N., and Nagata, S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* **268**: 10932.
57. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803.
58. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505.
59. Tsujimoto, Y., and Croce, C. M. 1986. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5214.
60. Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C., and Croce, C. M. 1984. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* **224**: 1403.
61. Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440.
62. Adachi, M., and Tsujimoto, Y. 1989. Juxtaposition of human *bcl-2* and immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukemia is the result of a reciprocal chromosome translocation between chromosome 18 and 22. *Oncogene* **4**: 1073.
63. Mapara, M. Y., Bargou, R., Zugck, C., Dohner, H., Ustaoglu, F., Jonker, R. R., Krammer, P. H., and Dorken, B. 1993. APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with *bcl-2* oncogene expression. *Eur J Immunol* **23**: 702.
64. Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., Dalton, W. S., and Jove, R. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**: 105.
65. Dierlamm, J., Baens, M., Wlodarska, I., Stefanova-Ouzounova, M., Hernandez, J. M., Hossfeld, D. K., De Wolf-Peeters, C., Hagemeijer, A., Van den Berghe, H., and Marynen, P. 1999. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, *MLT*, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6 associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas [see comments]. *Blood* **93**: 3601.
66. Albagli, O., Lantoine, D., Quief, S., Quignon, F., Englert, C., Kerckaert, J. P., Montarras, D., Pinset, C., and Lindon, C. 1999. Overexpressed BCL6 (*LAZ3*) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci. *Oncogene* **18**: 5063.
67. Ye, B. H., Rao, P. H., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. 1993. Cloning of *bcl-6*, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res* **53**: 2732.

68. Friesen, C., Fulda, S., and Debatin, K. M. 1999. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* **13**: 1854.
69. Daniel, P. T., Pun, K. T., Ritschel, S., Sturm, I., Holler, J., Dorken, B., and Brown, R. 1999. Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and prevents tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* **94**: 1100.
70. Jansen, B., Schlagbauer-Wadl, H., Brown, B. D., Bryan, R. N., van Elsas, A., Muller, M., Wolff, K., Eichler, H. G., and Pehamberger, H. 1998. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* **4**: 232.
71. Wagener, C., Bargou, R. C., Daniel, P. T., Bommert, K., Mapara, M. Y., Royer, H. D., and Dorken, B. 1996. Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer* **67**: 138.
72. Grigorieva, I., Thomas, X., and Epstein, J. 1998. The bone marrow stromal environment is a major factor in myeloma cell resistance to dexamethasone. *Exp Hematol* **26**: 597.
73. Hartwell, L. H., and Kastan, M. B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**: 1821.
74. Yatabe, Y., Suzuki, R., Tobinai, K., Matsuno, Y., Ichinohasama, R., Okamoto, M., Yamaguchi, M., Tamaru, J., Uike, N., Hashimoto, Y., Morishima, Y., Suchi, T., Seto, M., and Nakamura, S. 2000. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* **95**: 2253.
75. Pruneri, G., Fabris, S., Baldini, L., Carboni, N., Zagano, S., Colombi, M. A., Ciceri, G., Lombardi, L., Rocchi, M., Buffa, R., Maiolo, A. T., and Neri, A. 2000. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14) [In Process Citation]. *Am J Pathol* **156**: 1505.
76. Colombel, M., Olsson, C. A., Ng, P. Y., and Buttyan, R. 1992. Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res* **52**: 4313.
77. Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**: 119.
78. Freeman, R. S., Estus, S., and Johnson, E. M., Jr. 1994. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* **12**: 343.
79. Haas-Kogan, D. A., Kogan, S. C., Levi, D., Dazin, P., T'Ang, A., Fung, Y. K., and Israel, M. A. 1995. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *Embo J* **14**: 461.
80. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799.
81. Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P. H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **188**: 2033.
82. Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., and Helin, K. 1993. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol* **13**: 7813.

83. Nevins, J. R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424.
84. Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., and Nevins, J. R. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**: 1053.
85. Kowalik, T. F., DeGregori, J., Schwarz, J. K., and Nevins, J. R. 1995. E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J Virol* **69**: 2491.
86. Shan, B., and Lee, W. H. 1994. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol* **14**: 8166.
87. Wu, X., and Levine, A. J. 1994. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3602.
88. Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N. J. 1996. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **85**: 537.
89. McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P., and Korsmeyer, S. J. 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**: 79.
90. Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. 1990. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* **348**: 331.
91. Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., and Dorken, B. 1997. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* **100**: 2961.
92. Bargou, R. C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M. Y., Bommert, K., Royer, H. D., Scheidereit, C., and Dorken, B. 1996. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**: 4340.
93. Bargou, R. C., Mapara, M. Y., Zugck, C., Daniel, P. T., Pawlita, M., Dohner, H., and Dorken, B. 1993. Characterization of a novel Hodgkin cell line, HD-MyZ, with myelomonocytic features mimicking Hodgkin's disease in severe combined immunodeficient mice. *J Exp Med* **177**: 1257.
94. Muschen, M., Rajewsky, K., Brauninger, A., Baur, A. S., Oudejans, J. J., Roers, A., Hansmann, M. L., and Kuppers, R. 2000. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma [In Process Citation]. *J Exp Med* **191**: 387.
95. Diehl, V., von Kalle, C., Fonatsch, C., Tesch, H., Juecker, M., and Schaadt, M. 1990. The cell of origin in Hodgkin's disease. *Semin Oncol* **17**: 660.
96. Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B., and Stein, H. 1992. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* **68**: 421.
97. Trumper, L. H., Brady, G., Bagg, A., Gray, D., Loke, S. L., Griesser, H., Wagman, R., Braziel, R., Gascoyne, R. D., Vicini, S., and et al. 1993. Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood* **81**: 3097.
98. Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**: 540.
99. Baeuerle, P. A., and Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**: 141.

100. Grilli, M., Chiu, J. J., and Lenardo, M. J. 1993. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* **143**: 1.
101. Liou, H. C., Sha, W. C., Scott, M. L., and Baltimore, D. 1994. Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Mol Cell Biol* **14**: 5349.
102. Miyamoto, S., Schmitt, M. J., and Verma, I. M. 1994. Qualitative changes in the subunit composition of kappa B-binding complexes during murine B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5056.
103. Naumann, M., and Scheidereit, C. 1994. Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *Embo J* **13**: 4597.
104. Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H. D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., and Dorken, B. 1999. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* **94**: 3129.
105. Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**: 565.
106. Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., and Verma, I. M. 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB [see comments]. *Science* **274**: 787.
107. Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. 1999. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* **19**: 2690.
108. Opipari, A. W., Jr., Hu, H. M., Yabkowitz, R., and Dixit, V. M. 1992. The A20 zinc finger protein protects cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* **267**: 12424.
109. Wong, G. H., Elwell, J. H., Oberley, L. W., and Goeddel, D. V. 1989. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**: 923.
110. Kitajima, I., Shinohara, T., Bilakovics, J., Brown, D. A., Xu, X., and Nerenberg, M. 1992. Ablation of transplanted HTLV-I Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-kappa B [published erratum appears in *Science* 1993 Mar 12;259(5101):1523]. *Science* **258**: 1792.
111. Krappmann, D., Emmerich, F., Kordes, U., Scharschmidt, E., Dorken, B., and Scheidereit, C. 1999. Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **18**: 943.
112. Schneider, J., Rubio, M. P., Barbazan, M. J., Rodriguez-Escudero, F. J., Seizinger, B. R., and Castresana, J. S. 1994. P-glycoprotein, HER-2/neu, and mutant p53 expression in human gynecologic tumors [see comments]. *J Natl Cancer Inst* **86**: 850.
113. Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., and Kohno, K. 1998. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J Biol Chem* **273**: 5997.
114. Goldsmith, M. E., Madden, M. J., Morrow, C. S., and Cowan, K. H. 1993. A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *J Biol Chem* **268**: 5856.
115. Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dorken, B., and Royer, H. D. 1997. Nuclear

- localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression [see comments]. *Nat Med* **3**: 447.
116. Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., and Iwamoto, Y. 1998. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* **4**: 2273.
 117. Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., Kufe, D. W., and Anderson, K. C. 1997. Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* **89**: 227.
 118. Davis, T. A., Maloney, D. G., Czerwinski, D. K., Liles, T. M., and Levy, R. 1998. Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone. *Blood* **92**: 1184.
 119. Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., and Levy, R. 1997. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90**: 2188.
 120. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* **6**: 443.
 121. Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N., and Anderson, D. R. 1994. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**: 435.
 122. Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**: 301.
 123. Igney, F. H., Behrens, C. K., and Krammer, P. H. 2000. Tumor counterattack--concept and reality. *Eur J Immunol* **30**: 725.
 124. Daniel, P. T., Kroidl, A., Cayeux, S., Bargou, R., Blankenstein, T., and Dorken, B. 1997. Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J Immunol* **159**: 3808.
 125. Krammer, P. H., Galle, P. R., Moller, P., and Debatin, K. M. 1998. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in normal and malignant liver, colon, and hematopoietic cells. *Adv Cancer Res* **75**: 251.
 126. Leithauser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Moller, P. 1993. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* **69**: 415.
 127. Bargou, R. C., Bommert, K., Weinmann, P., Daniel, P. T., Wagener, C., Mapara, M. Y., and Dorken, B. 1995. Induction of Bax-alpha precedes apoptosis in a human B lymphoma cell line: potential role of the bcl-2 gene family in surface IgM-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* **25**: 770.
 128. Mapara, M. Y., Weinmann, P., Bommert, K., Daniel, P. T., Bargou, R., and Dorken, B. 1995. Involvement of NAK-1, the human nur77 homologue, in surface IgM-mediated apoptosis in Burkitt lymphoma cell line BL41. *Eur J Immunol* **25**: 2506.
 129. Choi, M. S., Boise, L. H., Gottschalk, A. R., Quintans, J., Thompson, C. B., and Klaus, G. G. 1995. The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol* **25**: 1352.

130. Rickers, A., Brockstedt, E., Mapara, M. Y., Otto, A., Dorken, B., and Bommert, K. 1998. Inhibition of CPP32 blocks surface IgM-mediated apoptosis and D4-GDI cleavage in human BL60 Burkitt lymphoma cells [published erratum appears in Eur J Immunol 1998 Mar;28(3):1122]. *Eur J Immunol* **28**: 296.
131. Rickers, A., Peters, N., Badock, V., Beyaert, R., Vandenabeele, P., Dorken, B., and Bommert, K. 1999. Cleavage of transcription factor SP1 by caspases during anti-IgM-induced B-cell apoptosis. *Eur J Biochem* **261**: 269.
132. Daniel, P. T., Oettinger, U., Mapara, M. Y., Bommert, K., Bargou, R., and Dorken, B. 1997. Activation and activation-induced death of human tonsillar B cells and Burkitt lymphoma cells: lack of CD95 (Fas/APO-1) ligand expression and function. *Eur J Immunol* **27**: 1029.
133. Mack, M., Riethmuller, G., and Kufer, P. 1995. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7021.
134. Mack, M., Gruber, R., Schmidt, S., Riethmuller, G., and Kufer, P. 1997. Biologic properties of a bispecific single-chain antibody directed against 17-1A (EpCAM) and CD3: tumor cell-dependent T cell stimulation and cytotoxic activity. *J Immunol* **158**: 3965.
135. Loffler, A., Kufer, P., Lutterbuse, R., Zettl, F., Daniel, P. T., Schwenkenbecher, J. M., Riethmuller, G., Dorken, B., and Bargou, R. C. 2000. A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes [In Process Citation]. *Blood* **95**: 2098.
136. Daniel, P. T., Kroidl, A., Kopp, J., Sturm, I., Moldenhauer, G., Dorken, B., and Pezzutto, A. 1998. Immunotherapy of B-cell lymphoma with CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood* **92**: 4750.

1.6 Kurze Zusammenfassung

Apoptoseresistenzmechanismen spielen bei der Pathogenese maligner Lymphome eine zentrale Rolle. So konnte bei Hodgkin/Reed-Sternbergzellen eine Deregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B beobachtet werden, die zu verstärkter Apoptoseresistenz führt und so zum malignen Wachstum dieser Zellen wahrscheinlich entscheidend beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass die selektive Blockade von NF- κ B sowohl zu erhöhter Apoptosesensitivität als auch zur Inhibition der Zellzyklusprogression in kultivierten Hodgkinzellen führt. Der genaue molekulare Mechanismus der NF- κ B-Deregulation in Hodgkinzellen ist jedoch noch unklar.

Apoptoseresistenzmechanismen sind nicht nur bei der Pathogenese maligner Lymphome, sondern auch bei der Entstehung von Therapieresistenz von Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression proapoptotischer Gene der bcl-2 Familie in resistenten malignen Zellen sowohl die Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika als auch gegenüber Antikörperbehandlung wiederherstellen kann. Neben der bcl-2 Familie spielt wahrscheinlich auch das Apo-I/Fas-System eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Zytostatikaresistenz und immunologischer Resistenz. Somit stellt neben der Überexpression des P-Glykoproteins (MDR1), das als transmembranes "Pumpenprotein" Zytostatika aus der Tumorzelle heraustransportieren kann, die Deregulation Apoptose-steuernder Gene einen weiteren wichtigen Therapie-Resistenzmechanismus dar. Eine Möglichkeit, intrazelluläre Resistenzmechanismen zu umgehen, stellt die indirekte Induktion von Zelltod mit Hilfe bispezifische Antikörper dar. Durch diese Moleküle kann eine T-Zell-vermittelte Zellyse von Lymphomzellen erreicht werden.

2 Originalarbeiten zum Habilitationsthema

2.1 Apoptose und Zellzyklus bei malignen Zellen

Bargou, R.C., Wagener, C., Bommert, K., Arnold, W., Daniel, P.T., Mapara, M.Y., Grinstein, E., Royer, H.D. and Dörken, B. (1996). Blocking the transcription factor E2F/DP by dominant-negative mutants in a normal breast epithelial cell line efficiently inhibits apoptosis and induces tumor growth in SCID mice. *J. Exp. Med.* **183**, 1205-1213.

2.2 Die Rolle von Apoptoseresistenzmechanismen bei der Pathogenese maligner Lymphome

Bargou, R.C., Mapara, M.Y., Zugck, C., Daniel, P.T., Pawlita, M., Döhner, H., and Dörken, B. (1993). Characterization of a novel Hodgkin cell line HD-MyZ with myelo-monocytoid features mimicking Hodgkin's disease in SCID mice. *J. Exp. med.* **177**, 1257- 1268.

Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Mapara, M.Y., Daniel, P.T., Bommert, K., Scheidereit, C., and Dörken, B. (1996). High level nuclear NF- κ B and Oct-2 are a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**, 4340-4347.

Bargou, R.C., Emmerich, F., Mapara, M.Y., Bommert, K., Greiner, A., Royer, H.-D., Krappmann, D., Scheidereit, C., and Dörken, B. (1997). Constitutive NF- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Inv.* **100**, 2961-2969.

2.3 Apoptose und Therapieresistenz bei malignen Lymphomen

Bargou, R.C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M.Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dörken, B., and Royer, H.D. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* **3**, 447-450.

Wagener, C., Bargou, R.C., Daniel, P.T., Bommert, K., Mapara, M.Y., Royer, H.D., and Dörken, B. (1996). Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **67**, 138-141.

Mapara, M.Y., Bargou, R.C., Zugck, C., Döhner, H., Ustaoglu, F., Jonker, R. R., Krammer, P. H., and Dörken, B. (1993). APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur. J. Immunol.* **23**, 702-708.

Daniel, P.T., Kroidl, A., Cayeux, S., Bargou, R.C., Blankenstein, T., and Dörken, B. (1997). Costimulatory signals through B7.1/CD28 prevent T cell apoptosis during target cell lysis. *J. Immunol.* **159**, 3808-3815.

Bargou, R.C., Bommert, K., Weinmann, P., Daniel, P.T., Wagener, C., Mapara, M.Y., and Dörken, B. (1995). Induction of Bax-alpha precedes apoptosis in a human B lymphoma cell line: potential role of the bcl-2 gene family in surface IgM-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **25**, 770-775.

Mapara, M.Y., Weinmann, P., Bommert, K., Daniel, P.T., Bargou, R.C, and Dörken, B. (1995). Involvement of NAK-1, the human nur77 homologue, in surface IgM-mediated apoptosis in Burkitt lymphoma cell line BL41. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2506-2510.

Weinmann, P., Bommert, K., Mapara, M.Y., Dörken, B., and Bargou, R.C. (1997). Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes human BL-41 Burkitt lymphoma cells for surface IgM-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2466-2468.

Daniel, P.T., Oettinger, U., Mapara, M.Y, Bommert, K., Bargou, R.C., and Dörken, B. (1997). Activation and activation-induced death of human tonsillar B cells and Burkitt lymphoma cells. Lack of CD95 (fas/APO-1) ligand expression and function. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1029-1034.

Löffler, A., Kufer, P., Lutterbüse, R., Zettl, F., Daniel, P., Schwenkenbecher, J., Riethmüller, G., Dörken, B., and Bargou, R.C. (2000). A recombinant bispecific single chain antibody, CD19xCD3 induces rapid and high lymphoma directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* **95**, 2098-2103.

3 Danksagung

Dank schulde ich an erster Stelle Professor Dörken für die ständige Diskussionsbereitschaft und kontinuierliche Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich Dr. Kurt Bommert, Dr. Markus Mapara und Dirk Hönemann für ihre konstruktive Zusammenarbeit und zahllosen Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie der Robert-Rössle-Klinik und des Max Delbrück Centrums für molekulare Medizin für das für das sehr angenehme und stets freundliche Arbeitsklima.

Ebenfalls danken für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit möchte ich Professor Gerd Riethmüller und Dr. Peter Kufer vom Institut für Immunologie der Universität München sowie Dr. Axel Greiner vom Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die von mir vorgelegte Habilitationsschrift zu dem Thema "Die Bedeutung von Apoptoseresistenzmechanismen für die Pathogenese und Therapie maligner Lymphome" ohne fremde Hilfe verfasst wurde, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind und mir als Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

gez. Dr. med. Ralf Bargou, Berlin im Juni 2001