

Christian Gerold Scheuerpflug
Dr. med.

Molekulare und funktionelle Charakterisierung des CD95-SIGNALWEGS bei peripheren T-Zellen, Tumorzelllinien und Patienten mit Leukämien

Geboren am 27.12.1965 in Darmstadt

Reifeprüfung am 19.06.1986 in Seeheim-Jugenheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1987 bis SS 1994

Physikum am 05.04.1989 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Johann Wolfgang von Goethe Universität Frankfurt
Christian Albrechts Universität Kiel
State University of New York (SUNY), New York, USA

Praktisches Jahr an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Harvard Medical School, Boston, USA

Staatsexamen am 10.08.1994 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

Mit der Entdeckung von Apoptose auslösenden Antikörpern vor 10 Jahren wurde die Bedeutung des programmierten Zelltodes für den multizellulären Organismus in voller Tragweite erkannt.

Die Apoptose ist schon in der Embryonalentwicklung für die Differenzierung der Gewebe sehr wichtig, ebenso im ausgewachsenen Körper für ihre Homöostase. Eine ganz besondere Rolle spielt sie für das Immunsystem. Bereits heute zeigt sich, wie es zu schweren Erkrankungen kommt, wenn das streng kontrollierte Apoptose-System fehlerhaft gesteuert wird. Ein Überhandnehmen der Apoptose kann zu Immundefekten (zum Beispiel AIDS), Degeneration von Nervenzellen (zum Beispiel M. Parkinson) oder auch zum Verlust von Muskelzellen (Progressive Muskeldystrophie) führen. Dagegen führt ein zu wenig an Apoptose zu Autoimmun-Erkrankungen (zum Beispiel Systemischer Lupus Erythematodes) oder auch zu Tumoren (zum Beispiel Leukämien, Osteosarkome, Neuroblastome).

Ziel dieser Arbeit war es, den Apoptose-Signalweg bei im Kindesalter auftretenden Leukämien besser zu verstehen. Dazu wurden zuerst normale periphere T-Lymphozyten untersucht. Diese sind CD95-resistent und haben den CD95-L auf dem Transkriptionslevel nur gering exprimiert. Ändert sich der Aktivierungszustand dieser

Zellen, wird der CD95-Rezeptor hoch exprimiert. Unstimulierte periphere T-Lymphozyten dagegen exprimieren den CD95-Rezeptor auf ihrer Oberfläche nur gering. Nach Aktivierung mit PHA und IL-2 wird dieser Rezeptor innerhalb von Stunden hochreguliert, ohne daß die peripheren T-Lymphozyten Apoptose-sensitiv werden. Erst nach vier Tagen mit IL-2-Stimulierung werden die Zellen CD95-sensitiv, das CD95-Antigenmuster auf der Oberfläche verändert sich dabei nicht. Es konnte nun nachgewiesen werden, daß sich Caspase-8 bei den resistenten peripheren T-Lymphozyten nicht an den DISC bindet. Dagegen findet man diese Protease bei den sensitiven peripheren T-Lymphozyten im DISC, und dieser aktiviert dann die Apoptose. Der Mechanismus der Caspase-Assoziation an den DISC ist noch unbekannt. Durch Verhinderung der Caspase-8-Bindung kann jedoch der Apoptose-Typ-1 blockiert werden.

Gleichzeitig wurde eine Korrelation des Apoptose hemmenden Proteins Bcl-x_L mit dem Sensitivitätsverhalten von peripheren T-Lymphozyten gefunden. In unstimulierten peripheren T-Lymphozyten war Bcl-x_L auf RNA- wie auch auf Proteinebene nicht nachweisbar. Nach der Aktivierung wurde Bcl-x_L stark hochreguliert. Wurden die Zellen nach vier Tagen wieder CD95-sensitiv, war Bcl-x_L nicht mehr nachzuweisen. Dieser Mechanismus hemmt den Apoptose-Typ-2. Das geschieht dadurch, daß Bcl-x_L an Caspase-9 bindet und so die Formierung des Apaf-1/Cytochrom c/dATP/Caspase-9-Komplexes verhindert. Weil beide CD95-Signalwege bei Tag1-aktivierten peripheren T-Lymphozyten blockiert sind, kommt es zur vollständigen Resistenz.

Anschließend wurde untersucht, wie sich das CD95-System in T- und B-Leukämie-Zelllinien verhält. Dazu wurden CD95-sensitive mit CD95-resistenten Leukämie-Zelllinien verglichen. Es zeigte sich, daß CD95-sensitive Zelllinien im Durchschnitt eine höhere CD95-Expression auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Darüber hinaus war der CD95-L konstitutiv nur auf CD95-sensitiven Leukämie-Zelllinien nachzuweisen. Nach Stimulation konnten aber alle Leukämie-Zelllinien den CD95-L stark hochregulieren. Verglichen mit B-Leukämie-Zelllinien waren T-Leukämie-Zelllinien in der Lage, den CD95-L um mehr als das 10-fache hochzuregulieren. Die anderen untersuchten Schlüssel-moleküle zeigten keine Korrelation mit der CD95-Sensitivität. Interessanter-weise wurde Bcl-x_L bei allen untersuchten Leukämie-Zelllinien gleichförmig exprimiert, so daß man von einer generellen Blockade der Typ-2-Apoptose in Leukämiezellen ausgehen kann.

Nach Zugabe des Chemotherapeutikums Doxorubicin in therapeutischer Konzentration konnte die Apoptose in T-Leukämie-Zelllinien aktiviert werden. Überraschender-weise wurde aber nur eine Hochregulierung der Transkripte des CD95-L gefunden. Alle anderen wichtigen Signalmoleküle (CD95, fadd, caspase-8), wie auch die Bcl-2-Familie (bax, bik, bcl-2, bcl-x_L) und die Caspasen (ice, ich-1, cpp32) zeigten keine Veränderung. Das bedeutet, daß die für den programmierten Zelltod nötigen Proteine bereits in der Zelle vorliegen und nicht erst hergestellt werden müssen. Dafür spricht

auch der rasche Beginn der Apoptose etwa 30 min nach der Stimulation mit Doxorubicin.

Die Untersuchungen erstreckten sich dann weiter auf Leukämiezellen von Patienten, die noch keine Therapie erhalten hatten. Dabei zeigte sich zuerst, daß alle Tumorzellen CD95-resistent waren, und auf der Oberfläche fanden sich unterschiedlich viele CD95-Rezeptoren. Die Menge von CD95 und die Resistenzstärke ließen sich nicht korrelieren. Auf der Transkriptionsebene ergab sich, daß diese Zellen den CD95-L nur gering exprimieren, dafür wurde eine Spleißform des CD95-Rezeptors (sCD95) vermehrt gebildet. Dieses lösliche Protein konnte in großer Menge im Pleuraexudat eines Patienten mit einem T-NHL nachgewiesen werden. Der lösliche Rezeptor kann den CD95-L abfangen und so zu einer CD95-vermittelten Resistenz führen. Auch die Caspasen zeigten ein aktiviertes Bild. Alle untersuchten Caspasen waren auf Transkriptionsebene hochreguliert.

Die Wichtigkeit des CD95/CD95-L-Systems bei ALPS und CSS ließ uns nach Mutationen im Bereich der Bindungsdomäne des CD95-L suchen. Es konnte gezeigt werden, daß das CD95-L-Gen keinen großen Polymorphismus aufweist. In Leukämie-Zelllinien und im Probenmaterial von Patienten mit Morbus Hodgkin fanden sich keine Mutationen im Bereich von Exon4 des CD95-L.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können für die Diagnostik und Therapie von Leukämien eine weitreichende Bedeutung erlangen. Zum einen konnte gezeigt werden, daß die histologische und phänotypische Charakterisierung von Leukämiezellen noch nicht ausreicht, um diese Tumorzellen zu definieren. Der tumorauslösende Defekt muß molekular, das heißt auf der DNA-Ebene gesucht werden. Zum zweiten ergibt sich aus dem genauen Verständnis des CD95-Signalwegs die Möglichkeit, gentherapeutisch einzugreifen. Dadurch können entweder Defekte ganz spezifisch repariert oder Fehlermöglichkeiten umgangen werden, indem die distale Apoptose über die Caspasen aktiviert wird. Dies würde zu einer drastischen Reduzierung der unspezifischen Strahlen- und Chemotherapie führen.