

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München,
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier)

**DYSREGULATION DES NF- κ B-SYSTEMS BEI AKUTER
MYELOISCHER LEUKÄMIE**

Bastian Baumgartner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. K. Brand
2. Univ.- Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 01.12.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Gewidmet
meinen Eltern

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Brand durchgeführt. Dem Direktor des Instituts Herrn Prof. Dr. D. Neumeier, sowie Herrn Prof. Dr. K. Brand möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Brand. Er hat mir die Gelegenheit gegeben, durch diese Arbeit nähere Einblicke in die Welt der Wissenschaft zu bekommen und mir eine exakte und professionelle Arbeitsweise anzueignen. In ihm habe ich eine besondere Spezies des bayerischen „Wadlbeißers“ kennen gelernt und mir die große Hartnäckigkeit und Begeisterungsfähigkeit zum Vorbild genommen, um das Thema AML anzugehen und über einen langen Zeitraum zu bearbeiten.

Für die Bereitstellung von AML-Proben und die Unterstützung dieser Studie danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Christoph Nerl, Chefarzt 1. Medizinische Abteilung, Akademisches Lehrkrankenhaus München-Schwabing, Herrn Dr. C. von Schilling, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Frau Dr. C. Waterhouse, 1. Medizinische Abteilung, Akademisches Lehrkrankenhaus München-Schwabing, Herrn Dr. C. Schmid, 3. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern sowie ganz herzlich Frau Dr. M. Adam vom Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Brand bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Marion Wagner für die vielen interessanten und anregenden Gespräche, sowie die intensive Zusammenarbeit beim Projekt AML. Gerade in der Endphase des Projektes war Sie ein wichtiger Ansprechpartner.

Besonderer Dank gilt Frau Sharon Page für die umfangreiche Unterstützung während meiner Doktorarbeit auf allen Ebenen. Bei jeglicher Art von Problemen stand Sie mir mit Rat und Tat zur Seite und motivierte in schwierigen Situationen.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Martina Quirling für die freundschaftliche Zusammenarbeit, sowie für die Korrektur von Teilen des Manuskripts.

Für die rasche Einarbeitung in alle Bereiche des Labors, sowie für die erfrischenden Gespräche im Labor möchte ich mich bei Frau Tamara Eisele herzlich bedanken.

Ein herzliches Dankeschön für die kollegiale und vor allem freundschaftliche Zusammenarbeit und die interessanten Diskussionen, die Gott sei Dank nicht nur die Laborarbeit betrafen, geht an Frau Bernadette Donath, Herrn Nikolaus Jilg, Frau Carmen Sydlik und Frau Nadja Kern.

Ein besonderer Dank auch an Margit Obst, Marion Barchfeld und Doris Schmidbauer vom Hämatologielabor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar für Ihre Bereitschaft, die vielen Blutausstriche zu färben und mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Ferner möchte ich mich für die Hilfe bei den statistischen Ausarbeitungen der Arbeit bei Michael Henning vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie, Klinikum rechts der Isar, bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern danken. Mit großem Interesse und stetiger Aufmunterung haben sie mein Studium und die Doktorarbeit begleitet. In Höhen und Tiefen fand ich in Ronsolden stets einen Ort der Ruhe und Erholung. Nicht zuletzt haben sie mich finanziell unterstützt und gefördert. Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Stefan Reiter, dem ich wahrscheinlich zu verdanken habe, dass ich an der Computertechnik noch nicht vollends gescheitert bin.

Wissenschaft braucht Unterstützung, nicht nur in Form von Personal, sondern auch in Form von finanziellen Mitteln. Daher gebührt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Kommission für Klinische Forschung der TU München für die Förderung Dank.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten NF- κ B/Rel-Untereinheiten und inhibitorischen I κ B-Proteine.....	3
Abbildung 2: Aktivierungsschema von NF- κ B.	4
Abbildung 3: Der IKK-Komplex als zentrale Schaltstelle der NF- κ B-Aktivierung.	6
Abbildung 4: NF- κ B Aktivierung in AML und Analyse der NF- κ B-Dimere.....	25
Abbildung 5: Zusammensetzung der NF- κ B-Dimere.....	26
Abbildung 6: Lokalisierung von NF- κ B in AML-Blasten	30
Abbildung 7: Erhöhte IKK-Aktivität in AML.....	31
Abbildung 8: I κ B- und IKK-Konzentrationen in Blasten.....	32
Abbildung 9: NF- κ B-Aktivierung in verschiedenen FAB-Subtypen	35
Abbildung 10: Einflüsse von TNF und LPS auf das NF- κ B-System in kultivierten Blasten.....	37
Abbildung 11: Inhibierung des NF- κ B-Systems in Blasten durch PSI	38
Abbildung 12: Rolle von NF- κ B bei Malignität.....	45

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Morphologische und immunologische Charakteristika zur Klassifizierung der AML	11
Tabelle 2: Angaben zu den einzelnen Patienten und zum verwendeten Probenmaterial.....	27
Tabelle 3: Daten zur Immunphänotypisierung	28
Tabelle 4: Experimentelle Daten zu den untersuchten Patienten.....	33

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ac-	Acetyl-
Act1	NF-κB-Aktivator 1
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
Ak	Antikörper
Ala-	Alanin-
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AP-1	Activator protein-1
ARA-C	Cytosin-Arabinosid
ARD	Ankyrin repeat domain
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2/-3	B-cell CLL/Lymphoma-2/-3
BFM-Protokolle	Berlin-Frankfurt-Münster-Protokolle
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
Ci	Curie
Cl	Chlorid
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
cons.	Konsensussequenz

cpm	Counts per minute
CSF	Colony-stimulating factor
CTP	Cytidintriphosphat
cyMPO	Myeloperoxidase
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dup	Duplikation
ECL	Enhanced chemiluminescence
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	Endothelial leucocyte adhesion molecule-1
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FAB	French-American-British Cooperative Group
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure

HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HLH	Helix-Loop-Helix
HNE	Hydroxynonenal
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HTLV-1	Human T cell leukaemia virus type-1
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Ig	Immunglobulin
Ig κ	Immunglobulin κ -leichte Kette
IKK	I κ B-Kinase
IKKAP1	IKK-associated protein 1
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
inv	Inversion
IP	Immunpräzipitation
I κ B	Inhibitor-kappa B
IRF-1	Interferon regulatory factor-1
KA	Kinaseassay
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
Ko	Kontrolle
LDL	Low density Lipoprotein
LLnL	N-acetyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal
LPS	Lipopolysaccharid

Lys	Lysozym
LZ	Leuzin-Zipper
M	Mol pro Liter
M0-M7	AML-Subtyp nach FAB-Klassifizierung
M4Eo	M4 mit Eosinophilie
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MG	Molekulargewicht
MGSA/GRO- α	Melanocyte growth stimulatory activity/growth regulated protein
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
MMP-9	Matrix-Metalloprotease-9
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
μ Ci	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol pro Liter
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuklearfaktor-kappa B
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear localisation site
nm	Nanometer

OD	Optische Dichte
oxLDL	Oxidiertes LDL
p	kurzer Chromosomenarm
PB	Peripheres Blut
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC 5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSI	N-Benzyloxycarbonyl-Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-leucinal
q	langer Chromosomenarm
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	Serin
SZT	Stammzelltransplantation
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units
uPA	Urokinase-plasminogen-activator

VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
INHALTSVERZEICHNIS.....	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das NF- κ B-System.....	1
1.1.1 Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie und I κ B- Inhibitorproteine	1
1.1.2 Die Aktivierung des NF- κ B-Systems.....	2
1.1.3 Regulation der NF- κ B-Aktivierung.....	5
1.2 Akute myeloische Leukämie	7
1.3 Rolle von NF- κ B bei malignen Erkrankungen.....	10
1.4 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei AML.....	11
1.5 Fragestellung	12
2 MATERIAL UND METHODIK.....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Antikörper.....	13
2.1.2 Reagenzien.....	15
2.2 Methodenteil.....	15
2.2.1 Zellkultur	15

2.2.2	Präparation von AML-Blasten und Kontrollzellen.....	16
2.2.3	Endotoxin-Test	16
2.2.4	Zytotoxizitätstest (WST-Test)	17
2.2.5	Isolierung nukleärer und zytosolischer Extrakte	17
2.2.6	Gelretardierungsassay.....	18
2.2.7	Supershift-Analyse	19
2.2.8	Panoptische Färbung nach Pappenheim	19
2.2.9	Immunfluoreszenz	20
2.2.10	Western Blot-Analyse.....	20
2.2.11	Immunpräzipitation und Assoziationsassay	21
2.2.12	Kinaseassay.....	22
2.2.13	Immunphänotypisierung von AML-Blasten.....	22
2.2.14	Statistische Auswertung.....	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Aktivierung von NF- κ B bei AML und Analyse der Dimere.....	24
3.2	Lokalisierung von NF- κ B im Zellkern der AML-Blasten.....	29
3.3	Erhöhte Aktivität des IKK-Komplexes	29
3.4	Konzentrationen von I κ B und IKK	34
3.5	Unterschiede zwischen AML-Subtypen.....	34
3.6	Modulation von NF- κ B in kultivierten Blasten durch TNF und LPS	36
3.7	Verwendung von Proteasominhibitoren	36
4	DISKUSSION	39
4.1	Dysregulation des NF- κ B/Rel-Systems bei akuter myeloischer Leukämie	39
4.2	Veränderte IKK-Aktivität in Tumorzellen	40
4.3	Subtypspezifische Unterschiede bei AML	41

4.4	Zusammensetzung von NF- κ B bei malignen Prozessen	42
4.5	Dysregulation von I κ B	42
4.6	NF- κ B und Apoptose.....	43
4.7	Bedeutung von NF- κ B bei Malignität	44
5	ZUSAMMENFASSUNG	48
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	49
7	ANHANG	59
7.1	Publikationen	59
7.2	Lebenslauf	60

1 EINLEITUNG

1.1 Das NF- κ B-System

Transkriptionsfaktoren der Nuklearfaktor κ B (NF- κ B)/Rel-Familie sind zentral an der Regulation zahlreicher Gene bei entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt (6,7,26,44,98) und in zunehmendem Maße wird ihre Rolle bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose aufgedeckt (10,55,62,99). Eine Dysregulation des NF- κ B-Systems wird sowohl bei akuten, als auch chronisch entzündlichen Prozessen, sowie bei malignen Erkrankungen diskutiert (10,11,17,25,45,62,84). Schwerpunkt dieser Arbeit soll die Erforschung der Bedeutung von NF- κ B bei malignen Prozessen sein, im speziellen bei AML.

1.1.1 Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie und I κ B-Inhibitorproteine

NF- κ B/Rel-Proteine

Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie bestehen aus zwei Untereinheiten, die miteinander Homo- oder Heterodimere bilden. Der bisher am häufigsten identifizierte NF- κ B-Komplex ist aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA) zusammengesetzt (6,61,87) (Abb. 1). Diese können teilweise durch c-Rel, p52 oder RelB, sowie die Vorläuferproteine p105 (p50) und p100 (p52) ersetzt sein (6,9,47,93). Allen NF- κ B/Rel-Proteinen gemeinsam ist eine sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD, 300 Aminosäuren), deren Bestandteile für die Dimerisierung (Dimerisierungsdomäne, DD), DNA-Bindung (Helix-Loop-Helix-Motiv, HLH) und nukleäre Translokation („nuclear localization sequence“, NLS) verantwortlich sind (61,72,81). Zur Komplexbildung mit den inhibitorischen I κ B-Proteinen tragen die NLS, ferner zusätzlich eine C-terminal zur NLS gelegene Region der RHD bei (72). Darüber hinaus verfügen Untereinheiten, wie z.B. p65 über einen N-terminalen Anteil in ihrer RHD, die sogenannte NF- κ B/Rel/dorsal (NRD)-Domäne, die ebenfalls für die Interaktion mit den I κ B-Proteinen verantwortlich ist (7,72).

I κ B-Proteine

Im Zytosol unstimulierter Zellen wird der dimere NF- κ B-Komplex durch Bindung an verschiedene I κ B-Inhibitorproteine, z.B. I κ B- α , - β oder - ϵ , neutralisiert (6,87,88,92) (Abb.1). Daneben können die NF- κ B-Vorstufenproteine p105 (I κ B- γ) und p100 (I κ B- δ) ebenfalls inhibitorische Funktionen übernehmen (7,61,81). Allen Inhibitoren gemeinsam ist ein Abschnitt mit mehreren Ankyrin-Motiven (ARD, „ankyrin repeat domain“), der entscheidend für die Bindung des NF- κ B-Dimers und die damit verbundene Maskierung der NLS ist (9,61,72). Die Vorläuferproteine p105 und p100 verfügen sowohl über die für NF- κ B-Proteine typische RHD, als auch eine C-terminale ARD, was die beiden Funktionen dieser Proteine widerspiegelt.

1.1.2 Die Aktivierung des NF- κ B-Systems

Eine Vielzahl von Stimuli (s.u.) führt zur Aktivierung von NF- κ B (6,9). Eine Stimulation der Zelle induziert zunächst die Phosphorylierung der inhibitorischen I κ B-Proteine an spezifischen N-terminalen Serinresten (I κ B- α an Ser-32/Ser-36, I κ B- β an Ser-19/Ser-23 und I κ B- ϵ an Ser-18/Ser-22), sowie die anschließende Ubiquitinmarkierung an spezifischen Lysinresten (Abb. 2) (54,87). Es folgt der Proteasom-vermittelte Abbau der Inhibitorproteine und die Translokation des nun freigewordenen und damit aktivierten NF- κ B-Dimers in den Zellkern, wo dieser Faktor an regulatorische κ B-Promoter- und Enhancer-Elemente bindet und in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die spezifische Expression zahlreicher Gene steuert (6,7,9,54,61).

Mehr als 150 verschiedene Stimuli und Bedingungen vermögen das NF- κ B-System zu aktivieren, wie z.B. Zytokine (TNF, IL-1), Viren (HTLV-1) und virale Produkte, Wachstumsfaktoren und verschiedene Formen von Stress, so z.B. physikalische (UV-Licht), oxidative oder umweltbedingte Stressfaktoren (Schwermetalle, Zigarettenrauch) (7,9,23,47,69,70,81).

Die Aktivierung von NF- κ B induziert die Expression von sehr vielen Genen, die an der Regulation von entzündlichen und immunologischen Prozessen sowie an Proliferation, Differenzierung und Apoptose, auch an Abläufen der Onkogenese beteiligt sind (siehe Diskussion) (7,9,47,55,69,70,73). Darüber hinaus bewirkt NF- κ B die Produktion von Proteinen, die ihrerseits NF- κ B aktivieren, so z.B. TNF oder IL-1 (58,70). Das

Inhibitorprotein I κ B- α unterliegt ebenfalls der transkriptionellen Regulation durch NF- κ B und erlaubt dadurch eine strenge Autoregulation des Systems.

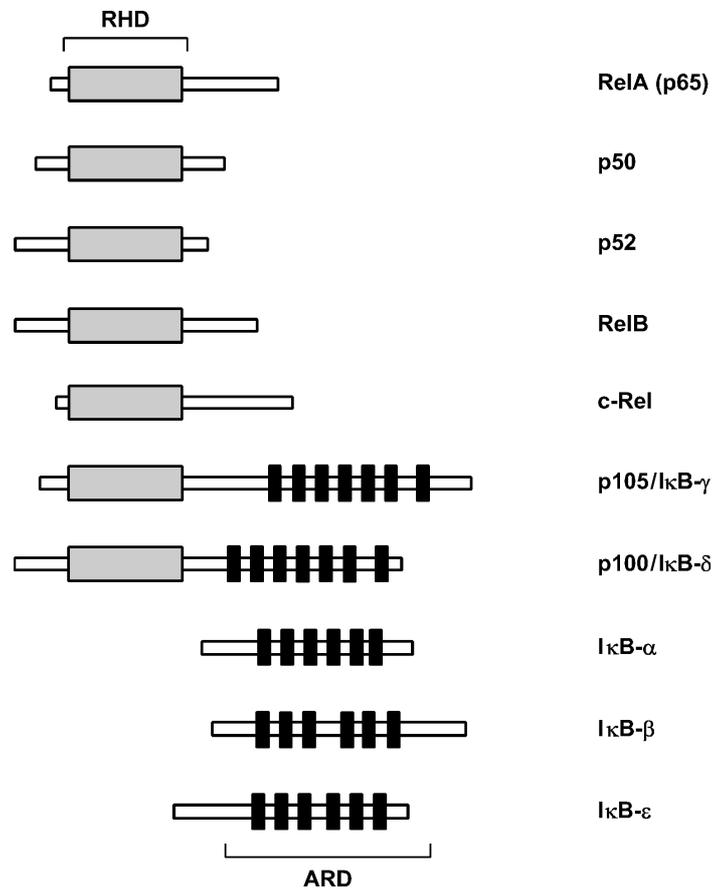


Abbildung 1: Schematische Darstellung der wichtigsten NF- κ B/Rel-Untereinheiten und inhibitorischen I κ B-Proteine.

Gemeinsames Merkmal der NF- κ B/Rel-Proteine ist eine konservierte Region, die als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet wird. Für die inhibitorischen Proteine I κ B- α bis - ϵ ist eine Wiederholung mehrerer Ankyrin-Motive (ARD, „ankyrin repeat domain“) charakteristisch. Die Vorläuferproteine p105 (I κ B- γ) und p100 (I κ B- δ) besitzen sowohl eine RHD, sowie auch eine ARD.

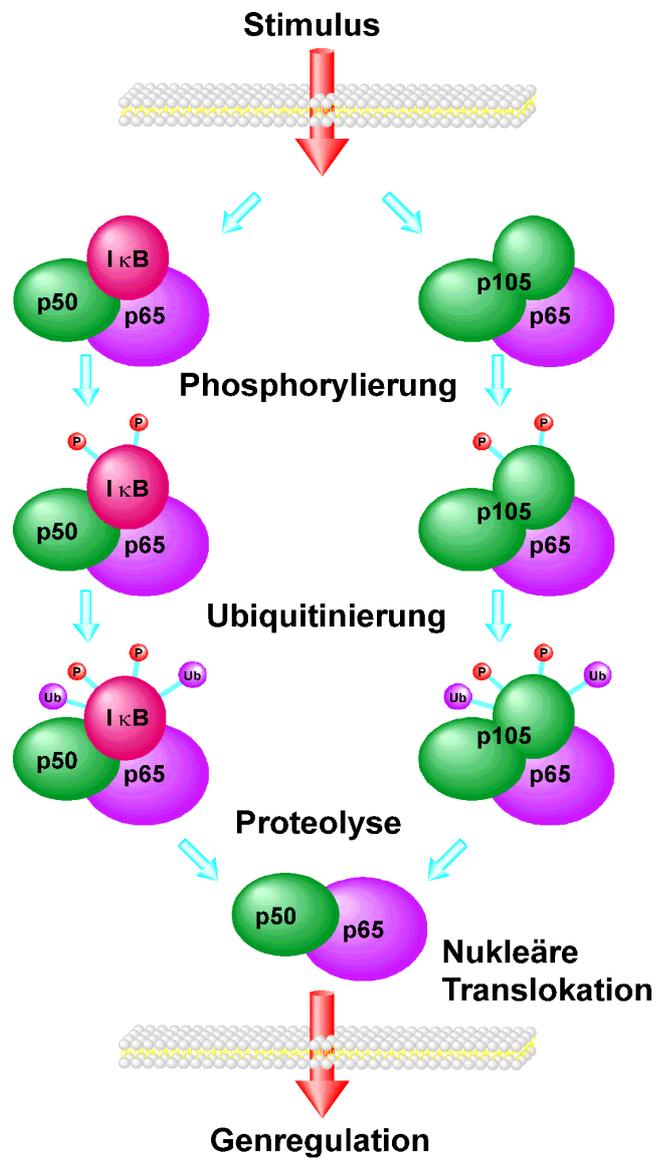


Abbildung 2: Aktivierungsschema von NF-κB.

Eine Stimulierung der Zelle führt zur Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IκB und p105/p100, was als Signal für deren Proteolyse dient. Der aktivierte NF-κB-Komplex tritt in den Zellkern über, bindet an regulatorische κB-Promotor- und Enhancer-Elemente verschiedener Gene und steuert dadurch deren Transkription.

1.1.3 Regulation der NF- κ B-Aktivierung

Für die Serin-Phosphorylierung der I κ B-Proteine, den initialen Schritt der NF- κ B-Aktivierung, werden die Kinasen IKK- α (85 kDa) und IKK- β (87 kDa) verantwortlich gemacht, die vermutlich in hetero- oder homodimerischer Form als Bestandteil hochmolekularer Komplexe (ca. 300-900 kDa) im Zytosol auftreten (6,51,54,79). Diese werden derzeit kollektiv als I κ B-Kinase (IKK)-Komplex bezeichnet, wobei der Komplex aus IKK- α , IKK- β , sowie dem Adaptorprotein IKK- γ (auch bezeichnet als NF- κ B essential modulator, NEMO; IKK-associated protein 1, IKKAP1) besteht (43,52,64,95). Die beiden kinaseaktiven Moleküle IKK- α und IKK- β weisen sehr ähnliche Primärstrukturen auf und verfügen über eine N-terminale Kinasedomäne (KD), sowie ein C-terminales Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH), das die Aktivität der KD moduliert und für die Interaktion mit dem Adaptorprotein IKK- γ benötigt wird. Zwischen diesen beiden Regionen befindet sich eine Leucin-Zipper-Struktur, die für die Bildung der Heterodimere aus IKK- α und IKK- β erforderlich ist (34,82,95,100) (Abb. 3).

Verschiedene Studien, in denen allerdings nur ein begrenztes Repertoire proinflammatorischer Substanzen verwendet wurde, lassen eine essentielle Rolle von IKK- β sowohl bei der Aktivierung, als auch der anschließenden Inaktivierung des IKK-Komplexes vermuten (41,54). Die Bedeutung von IKK- α ist bisher weniger klar definiert. Eine Beteiligung an spezifischen Signalwegen, z.B. bei der B-Zellreifung, verschiedenen proliferativen Prozessen oder Differenzierungsvorgängen der Haut, wird aber angenommen (28,50,51). Dem Adaptorprotein IKK- γ , als weiterer Komponente des IKK-Komplexes, werden neben einer Stabilisierung des IKK-Komplexes auch regulatorische Funktionen der Kinaseaktivität zugeschrieben (1,43,52,69,76,79,86).

Damit es zur Aktivierung des IKK-Komplexes kommt, müssen im Bereich der Kinasedomänen, der beiden Untereinheiten IKK- α und - β , bestimmte Serinreste phosphoryliert werden (51,54,95). Die Regulation der IKK-Aktivität erklärt man sich auf folgende Art und Weise: Zunächst liegt der Komplex unphosphoryliert in inaktiver Form vor. Kommt es zur Stimulation, werden die Kinasen – wahrscheinlich mit Hilfe von IKK- γ – phosphoryliert und aktiviert (51,54). Möglicherweise ist eine alleinige Aktivierung von IKK- β ausreichend, um den IKK-Komplex zu aktivieren (54). Vor allem die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von IKK- β führt in der Folge zu einer Autophosphorylierung der dem Komplex anliegenden IKK- α - oder auch IKK- β -Untereinheiten (54).

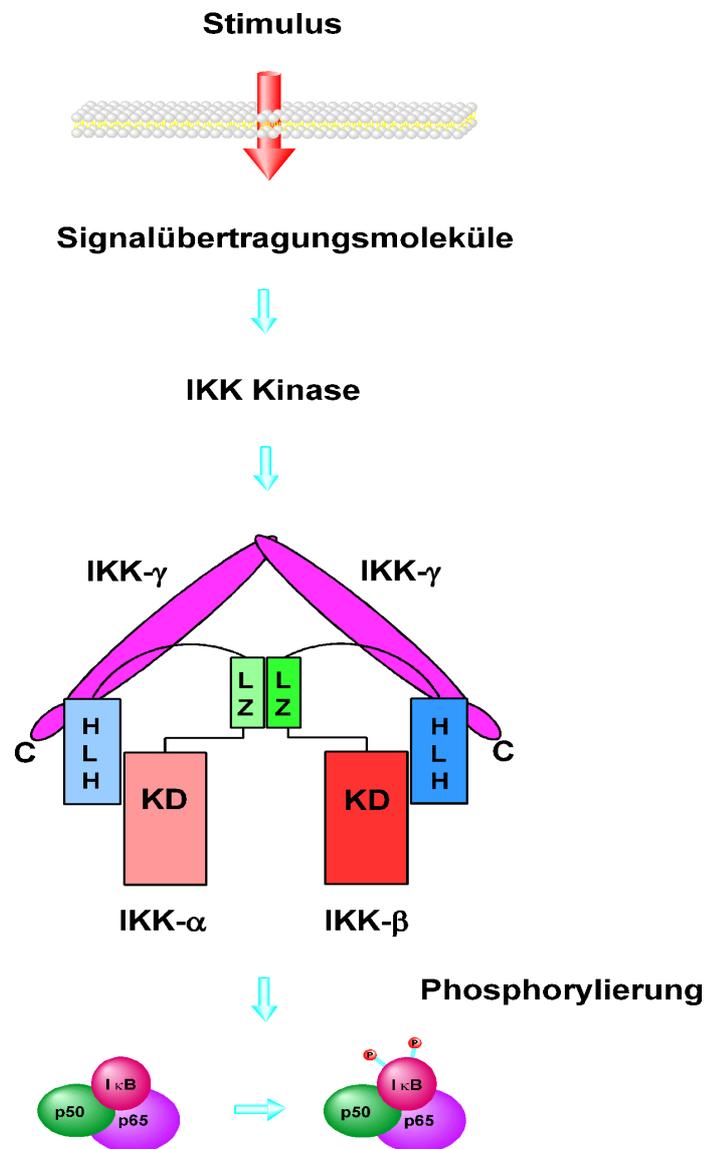


Abbildung 3: Der IKK-Komplex als zentrale Schaltstelle der NF-κB-Aktivierung.

Der Komplex besteht aus den Untereinheiten IKK-α und IKK-β, die über eine Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne, ein Reißverschlussartiges Leucinmotiv (LZ), sowie eine Kinasedomäne (KD) verfügen und für die Phosphorylierung der IκB-Proteine verantwortlichen sind. Ein weiteres Element des Komplexes stellt das Adaptorprotein IKK-γ dar, welches über eine C-terminale Region die beiden Kinasen IKK-α und IKK-β miteinander verbindet. Durch Stimulierung kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung des Komplexes durch IKK-Kinasen, die ihrerseits durch oberhalb liegende Signalübertragungsmoleküle aktiviert werden.

Der aktivierte Komplex phosphoryliert schließlich I κ B und unterliegt selbst im weiteren Verlauf einer Autophosphorylierung seines C-terminalen Endes, wodurch sich die Inaktivierung des Komplexes einleitet (54,100). Diese Einrichtung wird als Schutzvorrichtung vor einer zeitlich unkontrollierten NF- κ B-Aktivierung verstanden. Eine Dysregulation dieser Schutzeinrichtung und damit eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung wird bei verschiedenen Tumoren diskutiert (57,62).

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem IKK-Komplex um einen sehr großen Komplex (300 kDa und 700-900 kDa) handelt, der in seiner Zusammensetzung variabel ist (43,64,79,86,95,101). Diese Varianz könnte bei der Polymerisation der drei Untereinheiten entstehen, könnte aber auch darauf hindeuten, dass sich zu bestimmten Zeiten zusätzliche Funktionsmoleküle an den Komplex anlagern. Des Weiteren wird angenommen, dass verschiedene Proteine, die mit dem Komplex interagieren, an der Aktivierung von IKK- α und - β beteiligt sind (43,86,95). Weiter unklar bleibt jedoch, inwieweit Subkomplexe existieren, die eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen spezifischen Signal-übertragungswegen spielen könnten. Neuere Untersuchungen legen die Existenz zusätzlicher, möglicherweise gewebespezifischer I κ B-Kinasen neben dem „klassischen“ IKK-Komplex (IKK- α /- β /- γ) nahe, die den IKK-Komplex aktivieren können (43,86,95).

1.2 Akute myeloische Leukämie

Unter dem Begriff der akuten myeloischen Leukämie (AML) werden akute Leukämien zusammengefasst, deren Zellen sich von den verschiedenen Vorläuferstufen der Granulopoese, Monozytopoese, Erythropoese und Thrombopoese ableiten (20,29,49,63). Gemeinsames Merkmal ist die Proliferation unreifer Blasten im Knochenmark (KM) und im peripheren Blut (PB) (29,49). Die akute myeloische Leukämie macht 80% aller Leukämien im Erwachsenenalter aus und tritt überwiegend im mittleren und höheren Lebensalter auf (29,49). Im Kindesalter liegt der Anteil der AML an den akuten Leukämien bei den unter 15jährigen bei etwa 15%, es dominiert die ALL (akute lymphatische Leukämie). Betrachtet man isoliert das Neugeborenenalter, so stellt in dieser Phase die AML die häufigste Form der akuten Leukämien dar (32,74). Genetische Ursachen (z.B. Trisomie 21, Fanconi-Anämie, Blackfan-Diamond-Anämie, Kostmann-Syndrom), eine Schädigung des Knochenmarks durch chemische Substanzen (z.B. Benzol,

Zytostatika) oder ionisierende Strahlung, sowie Viren (HTLV-1, „human T cell leukemia virus type-1“) können zur neoplastischen Transformation der hämatopoetischen Stammzellen und Expansion des malignen Zellklons auf Kosten der normalen Hämatopoese führen (74). Eine akute Leukämie als Zweiterkrankung nach einer anderen Krebserkrankung ist meist eine AML (29,49). Eine wichtige Rolle spielen dabei Zytostatika (Chlorambucil, Cyclophosphamid, Melphalan). Sekundärleukämien treten 4-5 Jahre nach der Behandlung auf, mit einem abnehmenden Risiko nach 12 Jahren (32,74). Auch erworbene schwere aplastische Anämien können nach längerer Laufzeit in eine AML übergehen (32,74). Etwa 10-15% aller akuten myeloischen Leukämien entwickeln sich sekundär aus einem myelodysplastischen Syndrom (32,74).

Die klinische Symptomatik resultiert aus der Verdrängung der normalen Hämatopoese (29,49). Oft sind unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Fieber und Nachtschweiß erste Anzeichen einer AML (21,40,49). Des Weiteren stellen Gerinnungsstörungen nicht selten die Erstmanifestation einer AML dar (21,40,49,74). Unklare rezidivierende Infekte, Anämien, aber auch eine ausgeprägte Lymphadenopathie, sowie unklare Gingivahyperplasie oder Parotisschwellungen können auf eine AML hindeuten (21,40,49). Ein meningealer Befall liegt in bis zu 15% der Fälle vor (74).

Das Blutbild liefert erste Hinweise auf das Vorliegen einer akuten Leukämie (29). Häufig finden sich eine Thrombozytopenie, sowie eine Anämie, die Leukozytenzahl dagegen ist unspezifisch, d.h. sie kann normal, erhöht oder erniedrigt sein (29,49). Das Differentialblutbild weist eine stark verminderte Granulozytenzahl auf. Überwiegend, aber nicht immer, finden sich unreife Zellen, die sogenannten Blasten (21,29). Unerlässlich ist jedoch die Diagnosestellung aus dem Knochenmark. In der Regel ist das Mark hyperzellulär und enthält einen Blastenanteil von 30-100% (21,40,49). Bei weniger Blasten handelt es sich meist um ein myelodysplastisches Syndrom (49,74). Die Einteilung der AML-Erkrankungen in verschiedene Subgruppen erfolgt gemäß der FAB-Klassifizierung („French-American-British-Group“), die hauptsächlich auf morphologischen und zytochemischen Kriterien basiert, und acht unterschiedlich häufig auftretende Subtypen (M0-M7) umfasst (20,40,63) (Tabelle 1). Morphologie und Histochemie zusammen versagen in bis zu 5% der Fälle mit AML (29). Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung sind daher zu einem unverzichtbaren diagnostischen Mittel geworden, da sie eine eindeutige Klassifizierung wenig differenzierter Formen erlauben,

und aber ebenso, wie zytogenetische Befunde, wichtige Prognoseparameter darstellen (40,63).

Die Therapie der AML umfasst im Wesentlichen drei Punkte: Neben einer symptomatischen Behandlung (unterstützende Maßnahmen, wie z.B. antimikrobielle Therapie, die Substitution von Erythrozyten und Thrombozyten, Stimulation der Granulopoese durch Gabe der koloniestimulierenden Faktoren G-CSF und GM-CSF) sind dies Chemotherapie und/oder Stammzelltransplantation (SZT) nach myeloablativer Therapie (21,27,40,49). Im Mittelpunkt der Behandlung steht die Reduktion der Tumorzellen durch die Chemotherapie, welche sich in drei Phasen gliedert: Die oft sehr aggressive Induktionstherapie bis zum Erreichen der kompletten Remission, darauf folgt die Konsolidierungstherapie zur Stabilisierung der Remission und schließlich die remissionserhaltende Behandlung (27,40,49). Zur Chemotherapie der AML werden verschiedene Therapieprotokolle eingesetzt, in Deutschland ist das BFM (Berlin-Frankfurt-Münster)-Protokoll am gebräuchlichsten (29). In der Regel gibt man den Antimetaboliten Cytosin-Arabinosid (ARA-C) in konventioneller oder hoher Dosierung, kombiniert mit einem Anthracyclinderivat (z.B. Daunorubicin, Idarubicin) oder Mitoxantron, einem synthetischen Antibiotikum mit einem den Anthracyclinen vergleichbaren Wirkmechanismus (21,27,40,56,66). Daneben finden auch der Antimetabolit 6-Thioguanin, sowie der Mitose-Hemmstoff Etoposid Verwendung (21,27,40,56). Die remissionserhaltende Therapie umfasst neben intensiver Chemotherapie eine SZT (21,27,29,40,49,56). Die Indikation zur allogenen SZT stellt sich für AML-Patienten im Alter unter 50 Jahren, die sich in Remission befinden und infektfrei sind (29). Darüber hinaus existiert auch die Möglichkeit der autologen SZT (27,29). Die Prognose der AML ist abhängig vom Alter und Karyotyp des Patienten, sowie dem Typ der Leukämie und dem verwendeten Therapieschema (27,29,40). Einer der Hauptgründe für das Scheitern einer Chemotherapie ist wohl darin zu sehen, dass die verabreichten Chemotherapeutika nicht zur gewünschten Apoptose führen (53).

1.3 Rolle von NF- κ B bei malignen Erkrankungen

Neben ihrer zentralen Rolle bei entzündlichen und immunologischen Prozessen sind Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie auch durch ihre Bedeutung für Proliferation, Apoptose und Differenzierung an den Prozessen der Onkogenese beteiligt (6,10,25,98). Eine Dysregulation des NF- κ B-Systems kann zu Genexpressionsmustern führen, die für das Wachstum, die Ausbreitung und die Metastasierung von Tumoren verantwortlich sind (6,10,98). In der Mehrzahl der untersuchten Bedingungen bewirkt eine Aktivierung von NF- κ B eine Hemmung apoptotischer Prozesse durch die Induktion der Expression antiapoptotischer Gene, was möglicherweise die effektive Durchführung einer Chemotherapie beeinträchtigt (10,16,37,53). Eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Systems konnte sowohl bei hämatologischen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Hodgkin oder akuter lymphatischer Leukämie (ALL), als auch bei einigen soliden Tumoren nachgewiesen werden (15,31,33,57,65).

Interessanterweise finden sich bei einer Reihe maligner Erkrankungen des Menschen chromosomale Veränderungen oder die Amplifikation von Genen, die für NF- κ B-Untereinheiten, sowie für I κ B-Proteine einschließlich Bcl-3, kodieren (73). Zudem wurde eine ausgeprägte Homologie der N-Termini von p50, sowie p65 mit dem viralen Onkoprotein v-Rel gefunden (10). Darüber hinaus ist NF- κ B unabhängig von chromosomalen Translokationen auch direkt an den Prozessen der zellulären Transformation beteiligt. So gelang es zu belegen, dass NF- κ B durch eine Reihe viraler, transformierender Proteine aktiviert wird und in einigen Fällen sogar für die Virus-induzierte Transformation erforderlich ist. Ein Beispiel hierfür stellt das Tax-Protein des HTLV-1-Virus dar (10).

In einigen Hodgkin-, sowie ALL-Zellen, konnte eine Dysregulation der IKK-Komplex-assoziierten Signalübertragung, verbunden mit einer persistenten Aktivierung der I κ B-Kinasen und einer verstärkten I κ B-Degradierung gezeigt werden (58). Weiterhin führt auch das Onkogen Tax durch Assoziation mit IKK- α und IKK- β in HTLV-1-infizierten T-Zellen zu einer dauerhaften Aktivierung dieser kinaseaktiven Untereinheiten und somit zu einer Aktivierung von NF- κ B (42,83). Zusätzlich konnten in einigen Hodgkin-Zellen Punktmutationen im I κ B- α -Gen nachgewiesen werden (36,94). Daraus resultiert ein C-terminal verkürztes Protein, welches nicht in der Lage ist, mit p65 zu interagieren (36,94).

Tabelle 1: Morphologische und immunologische Charakteristika zur Klassifizierung der AML

FAB	Morphologischer Typ	Häufigkeit	Immunologische Marker
M0	AML mit minimaler Markerdifferenzierung, undifferenzierte Blasten ohne Granula, nur durch Zytochemie von M1 und ALL unterscheidbar	< 5%	CD3+ CD79a+ CD22+ Myelo-/monozytäre Marker negativ
M1	AML mit deutlicher Markerdifferenzierung (aber noch ohne morphologische Differenzierung) vereinzelte, diskrete Granulation im Plasma	20%	Myelo-/monozytäre Oberflächenmarker: CD13+ CD33+ CD34+
M2	AML mit morphologischer Ausreifung, ca. 20-50% der Blasten tragen feinste Granula	30%	CDw65+ CD117+ Eine Leukose mit myelo-/monozytärer Herkunft ist in mindestens 2 dieser Marker positiv
M3	Akute Promyelozytenleukämie, die Mehrheit der Zellen sind stark granulierte Promyelozyten, z.T. zu „Auer-Stäbchen“ kristallisierte Granula	< 5%	
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie, 30-80% der Blasten sind Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten: über 20% sind monozytäre Zellen; zusätzlich bis zu 5 % z.T. unreife Eosinophile	30%	Myelo-/monozytäre Oberflächenmarker: CD13+ CD33+ CDw65+ CD117+ Eine Leukose mit myelo-/monozytärer Herkunft ist in mindestens 2 dieser Marker positiv
M4eo			
M5	a) akute Monoblastenleukämie, im Blut überwiegend Monoblasten b) akute Monozytenleukämie, Überwiegen ausreifender Monozyten	10%	
M6	Akute Erythroleukämie; 50% der Markblasten gehören zur Erythropoese, 30% Myeloblasten	< 5%	In reifer Form Anti-Glykophorin A+
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie, sehr polymorphe, z.T. vakuolisierte Blasten, z.T. mit Plasmaausläufern, z.T. Aggregation mit Thrombozyten	< 5%	CD41+ und/oder CD61+

FAB (French-American-British)-Klassifizierung der akuten Leukämien. CD, „cluster of differentiation“ (20, 29).

1.4 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei AML

Nur wenige Arbeiten haben sich bislang mit der Rolle von NF- κ B bei AML beschäftigt. Eine erste Studie zeigte eine verstärkte Zytokinexpression (IL-1 β und IL-6) in AML-Blasten und darüber hinaus in 8 von 19 Fällen eine vermehrte nukleäre Translokation von NF- κ B (35). Eine weitere publizierte Arbeit findet in 8 von 9 AML-Proben eine erhöhte konstitutive NF- κ B-Aktivität (97). Eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B konnte ebenfalls für AML-Stammzellen (CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺) aufgezeigt werden (48). Die Behandlung dieser AML-Stammzellen mit dem Proteasominhibitor MG-132 führte zu einer verminderten NF- κ B-Aktivität, einer reduzierten Expression NF- κ B-regulierter Proteine (c-IAP2, IL-6, IL-8), sowie einer erhöhten Apoptoserate dieser Zellen (48).

Neuere Studien mit dem Wirkstoff Resveratrol und Versuche mit einer Kombination aus dem Proteasminhibitor PS-341, sowie TRAIL, wiesen bei AML über eine reduzierte NF- κ B-Aktivierung eine Hemmung der Proliferation, ferner eine gestiegene Apoptoserate auf (38,78,91). Die weitere Charakterisierung dieses Systems bei AML, insbesondere die Rolle des IKK-Komplexes, dürfte gerade im Hinblick auf die Beeinflussung der Apoptoserate und somit die Heilungsaussichten von großem Interesse sein.

1.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Bedeutung des NF- κ B-Systems bei akuten myeloischen Leukämien. Folgende Ziele sollten bearbeitet werden:

- Zu Beginn der Arbeit stellte sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß eine Aktivierung des NF- κ B-Systems bei AML vorliegt. Zudem erfolgte eine Analyse der NF- κ B-Dimere und mittels Immunfluoreszenzverfahren eine zelluläre Lokalisation dieser Komplexe in den Blasten.
- Das zentrale Interesse richtete sich im Weiteren auf die zugrundeliegenden Signalübertragungsmechanismen mit Schwerpunkt auf dem IKK-Komplex.
- Darüber hinaus wurde untersucht, ob Unterschiede in der NF- κ B-Aktivität mit verschiedenen AML-Subtypen korreliert werden können.
- Zudem wurden AML-Blasten kultiviert und die Effekte verschiedener exogener Stimuli, sowie eines spezifischen Proteasminhibitors, auf das NF- κ B-System untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse sollen zu einem besseren molekularbiologischen Verständnis der AML führen und die Grundlage für diagnostische und therapeutische Ansätze liefern.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

In der vorliegenden Studie wurden folgende Antikörper (Ak) gegen folgende Antigene verwendet:

Western Blot:

I κ B- α	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
IKK- α	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
IKK- β	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen die Aminosäuren 662-680 (QED Bioscience, San Diego, USA)
IKK- α/β	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
Aktin	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Sigma, Deisenhofen)
Sekundär-Ak	Peroxidase-konjugierter, polyklonaler Ziege-Ak gegen Kaninchen-IgG. Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Ziege-Ak gegen Maus-IgG (Dianova, Hamburg) oder Peroxidase-konjugierter Esel-Ak gegen Ziege-IgG (Santa Cruz Biotechnology).

Supershift:

p52	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
p50	polyklonaler Ziege-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz)
p65	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen N-Terminus (Santa Cruz)

c-Rel	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz)
RelB	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz)

Durchflußzytometrie:

Es wurden monoklonale Ak (mAK) konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5) oder Phycoerythrin (PE) gegen folgende humane Antigene eingesetzt:

Immunphänotypisierung von AML-Blasten:

CD4-PE (SK3; IgG1) (Becton Dickinson, Heidelberg)

CD13-PE (L138; IgG1) (Becton Dickinson)

CD14-PE (MΦP9; IgG2b) (Becton Dickinson)

CD15-FITC (MMA; IgM) (Becton Dickinson)

CD33-FITC (D3HL60.251; IgG1) (Beckman Coulter)

CD34-PE (QBEnd10; IgG1) (Beckman Coulter)

CD64-FITC (22; IgG1) (Beckman Coulter)

CD65s-FITC (88H7; IgM) (Beckman Coulter)

CD117-PE (95C3; IgG1) (Beckman Coulter)

HLA-DR-PE (L243; IgG2a) (Becton Dickinson)

Für die intrazelluläre Färbung wurden Ak gegen folgende Kombinationen von Antigenen eingesetzt:

MPO/CD3-FITC/PE (H-43-5/UCHT1; IgG1/IgG1) (Caltag)

MPO/CD22-FITC/PE (H-43-5/RFB4; IgG1/IgG1) (Caltag)

MPO/Lactoferrin -FITC/PE (H-43-5/3C5; IgG1/IgG1) (Caltag)

Lysozym-FITC/PE (LZ-2; IgG1/IgG1) (Caltag)

2.1.2 Reagenzien

Lipopolysaccharid (LPS, *E.coli* 0111:B4), sowie Tumornekrosefaktor (TNF) wurden von Sigma, der Proteasominhibitor PSI von Calbiochem-Novabiochem (Bad Soden) bezogen. Alle weiteren eingesetzten Reagenzien stammten von den Firmen E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), sowie Sigma und entsprachen der „Qualität zur Synthese“.

2.2 Methodenteil

2.2.1 Zellkultur

Für eine Vielzahl von Experimenten wurden monozytäre THP-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) verwendet, die in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 7,5% fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Biochrom) bis zu einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml kultiviert wurden (37 °C, 5% CO₂). Der Endotoxingehalt des Mediums und aller Bestandteile lag unter 10 pg/ml. Sofern nichts anderes angegeben, wurden die Zellen für die Experimente in einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen pro Schale in 6-Well-Kulturplatten (Nunc, Eggenstein, Deutschland) ausgesät.

Die Isolation primärer humaner Monozyten erfolgte aus Blutproben von gesunden Spendern. Nach Abtrennung des Plättchen-reichen Plasmas (160 x g, ohne Bremse, 15 min bei RT) wurden die mononukleären Zellen durch Zentrifugation (1.300 x g, ohne Bremse, 12 min bei RT,) über einen Ficoll-Hypaqua-Gradienten (Biochrom) gewonnen, in RPMI 1640 (2% FKS) 1 : 2 verdünnt und erneut zentrifugiert (650 x g, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde zweimal in RPMI 1640 (2% FKS) gewaschen (350 x g, 10 min, RT) und in einer Dichte von $1-2 \times 10^8$ Zellen/3ml in RPMI 1640 (10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) ausgesät. Vor dem Aussäen wurde die Reinheit der Monozytenpräparation durchflußzytometrisch überprüft. Dabei zeigten etwa 90% der isolierten Zellen eine Expression von CD14. Nach zwei Stunden wurden die nicht adhärennten mononukleären Zellen durch gründliches Waschen mit RPMI 1640 (2% FKS) entfernt und die Monozyten in RPMI 1640 (10% FKS) bis zum nächsten Tag inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Nach erneutem Waschen in RPMI 1640 (2% FKS) und einer mindestens 2-stündigen Ruhepause (RPMI 1640, 10% FKS) wurden die Experimente begonnen.

2.2.2 Präparation von AML-Blasten und Kontrollzellen

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Blasten standen Proben aus Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB) von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zur Verfügung. Die morphologische Charakterisierung der AML erfolgte gemäß der FAB („French-American-British Cooperative Group“-Klassifizierung (20) unter Zuhilfenahme der panoptischen Färbung nach Pappenheim und zytochemischen Färbemethoden (Peroxidase und Esterase). Darüber hinaus wurde mittels Durchflußzytometrie eine Immunphänotypisierung der AML-Blasten durchgeführt (siehe Methodenteil, Tabelle 3).

Zur Isolierung der AML-Blasten wurde das Probenmaterial 1 : 2 mit PBS verdünnt und über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten zentrifugiert (400 x g, ohne Bremse, 30 min bei RT). Das Plättchen-reiche Plasma wurde verworfen und die mononukleären Zellen (überwiegend AML-Blasten) zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Reinheit und Zellzahl mittels SE9000 (Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt und Aliquots mit $3-5 \times 10^6$ Zellen in 0,1 ml PBS (versetzt mit jeweils 7,5 µg/ml Leupeptin, Aprotinin, Antipain, Pepstatin A und Chymostatin sowie 5 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)) bei -80°C eingefroren bzw. eine entsprechende Zellzahl direkt zur Herstellung zytosolischer und nukleärer Extrakte verwendet. Teilweise wurden die isolierten Blasten entsprechend den THP-1-Zellen kultiviert (siehe Methodenteil). Als Kontrollen dienten zum einen mononukleäre Zellen aus KM und PB von gesunden Probanden, daneben wurden auch humane Monozyten (siehe Methodenteil) und Granulozyten als Kontrollen verwendet. Die Granulozyten wurden hierfür mittels Polymorphprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen) aus Vollblut gesunder Spender isoliert. Alle Proben wurden im Einverständnis und nach den Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München von den AML-Patienten und den gesunden Spendern entnommen.

2.2.3 Endotoxin-Test

Die verwendeten Medien und Reagenzien wurden vor Beginn der Experimente auf ihren Gehalt an Endotoxin überprüft. Mit dem quantitativen, chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assay (Bio Whittaker) wurde die Endotoxin-abhängige Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bei 405 nm gemessen. Es kamen ausschließlich Substanzen zum Einsatz, deren Endotoxinkonzentration unter 10 pg/ml lag.

2.2.4 Zytotoxizitätstest (WST-Test)

Die Viabilität der Zellen wurde im kolorimetrischen WST-1-Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) kontrolliert. Nach Vorinkubation von $1,5 \times 10^5$ (THP-1) bzw. 6×10^6 (primären Monozyten) Zellen pro 150 μ l Medium in Mikrotiterplatten (Nunc) mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen wurde das Tetrazolium-Salz 4-[3-(4-Iodophenyl))-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat (WST-1) zugegeben. Die Spaltung von WST-1 zu Formazan durch Dehydrogenasen intakter Zellen wurde bei 405 nm photometrisch gemessen. Über die erhaltene optische Dichte (OD) ließ sich die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ bestimmen. Es wurden 6-fach-Bestimmungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde routinemäßig die Morphologie der Zellen beurteilt und das Verhältnis lebender zu toter Zellen nach Trypanblau-Färbung bestimmt.

2.2.5 Isolierung nukleärer und zytosolischer Extrakte

Die zellulären Extrakte wurden nach einem in der Literatur angegebenen und leicht modifizierten Verfahren (25) isoliert. Die bei der Aufreinigung des Probenmaterials und der Kontrollen gewonnenen AML-Blasten und humanen Monozyten ($1-5 \times 10^5$) sowie die THP-1 Zellen (3×10^6) wurden abzentrifugiert (200 x g, 7 min) und einmal in PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden nach erneuter Zentrifugation in 0,1 ml Puffer A (0,1 % Nonidet P-40; 10 mM Hepes, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM DTT; 300 mM Saccharose; je 1 μ g/ml Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin; 0,1 μ g/ml Leupeptin; 0,5 mM PMSF) resuspendiert und darin 5 min inkubiert, um die äußeren Zellmembranen aufzubrechen. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt (15.800 x g, 30 sec) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und auf Eis gelagert. Um eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne noch einmal in 100 μ l Puffer A gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit der oben erhaltenen zytosolischen Fraktion vereint und bei $-80^\circ C$ aufbewahrt. Die Pellets wurden daraufhin in 100 μ l Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20 % Glycerin; 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators zerstört. Durch Zentrifugation

(15.800 x g, 10 sec) ließen sich die Membranfragmente abtrennen. Die nukleären Proteinextrakte wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Wie unter 2.2.2 bereits erwähnt, wurden die AML-Blasten und die humanen Monozyten häufig nicht sofort zu Extrakten weiterverarbeitet, sondern kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet. Um die Konzentrationsverhältnisse der Reagenzien zu wahren, wurde ein Puffer A mit doppelter Konzentration aller Bestandteile verwendet, und danach, wie beschrieben, in der Extraktgewinnung fortgefahren. Bei Extrakten aus primären humanen Monozyten kam ebenfalls das hier beschriebene Verfahren zum Einsatz, allerdings wurden dabei den Puffern A und B Proteaseinhibitoren in zehnfacher Konzentration zugesetzt. Die Proteinkonzentration der zytosolischen und nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Bradford-Assays (Biorad, München) bestimmt (22). Als Meßgröße diente die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G-250 bei 595 nm durch Proteinbindung.

2.2.6 Gelretardierungsassay

Nukleäre Extrakte wurden mittels Gelretardierungsassay auf die Anwesenheit aktiver DNA-bindender Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierbei kamen doppelsträngige Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren zum Einsatz. Als NF- κ B- Konsensussequenz diente ein Oligonukleotid mit dem prototypischen Ig κ -Motiv (5'-CAGAGGGACTTTCCGAGA-3', MWG-Biotech, Deutschland). Dieses Oligonukleotid wurde in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit [α - 32 P]dCTP (>3,000 Ci/mmol) (NEN, Life Science Products, Brüssel, Belgien) markiert. Als Kontrolle für die Qualität der Probe und gleichmäßige Proteinladung wurde parallel ein Oligonukleotid mit Erkennungssequenzen für den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor Sp-1 (5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3', Sp-1 cons., Promega) verwendet, das mittels T4-Polynukleotidkinase (Roche Diagnostics) mit [γ - 32 P] ATP (>5000 Ci/mmol) (NEN, Life Science Products) markiert wurde. Die nicht gebundenen Nukleotide wurden im Falle des NF- κ B-Oligonukleotid über eine Sephadex G50-Säule, die von Sp-1-Oligonukleotid über eine Sephadex G25-Säule (Roche Diagnostics) abgetrennt. Gleiche Mengen an extrahierten nukleären Proteinen (5-10 μ g) wurden bei Raumtemperatur 30 min mit der radioaktiv markierten DNA-Probe (10 ng,

10^5 cpm) in 20 μ l Bindepuffer (20 mM HEPES, pH 7,9, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 5% Glycerin, 1 mg/ml BSA, 0,1% Nonidet P-40, 50 ng/ μ l Poly(dI-dC)) inkubiert. Nach Zugabe des Ladepuffers (0,25x TBE Puffer; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine in einem 4%igen Polyacrylamidgel in 0,25x TBE Puffer (10x TBE: 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0). Als Positivkontrollen dienten routinemäßig Extrakte LPS- und TNF stimulierter THP-1-Zellen. Zudem wurden die Extrakte der LPS- und TNF stimulierten THP-1-Zellen im Überschuss mit unmarkiertem Oligonukleotid als spezifischem Kompetitor inkubiert und aufgetrennt. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie (NEN, Life Science Products) und Densitometrie.

2.2.7 Supershift-Analyse

Die Analyse der Untereinheiten aktivierter NF- κ B-Dimere erfolgte mit Hilfe der Supershift-Analyse. Durch spezifische Bindung von Antikörpern an die entsprechende NF- κ B-Untereinheit konnte die Wanderungsgeschwindigkeit des DNA-gebundenen Komplexes in der Gelelektrophorese verringert werden. Bei der Analyse wurden folgende polyklonale Antikörper verwendet: anti-p50, anti-p65, anti-p52, anti-c-Rel und anti-RelB (siehe 2.1.1). Gleiche Mengen nukleären Extraktes (2-4 μ l) wurden mit jeweils 2 μ l der angegebenen Supershiftantikörper (Santa Cruz Biotechnology, siehe 2.1.1) für 1 h bei 4 °C präinkubiert und anschließend mit Hilfe des Gelretardierungsassay weiter untersucht (siehe 2.2.6). Als Kontrolle diente die gleiche Menge nukleären Extrakts, welche ohne Antikörper-Vorinkubation elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

2.2.8 Panoptische Färbung nach Pappenheim

Die KM- und PB-Ausstriche der Leukämiepatienten und der gesunden Probanden wurden für 2 min mit wasserfreiem Methanol dehydriert, um vor allem aus den KM-Proben störende Fettbestandteile zu entfernen. Im Anschluss daran erfolgte die Färbung der Ausstriche nach May-Grünwald-Giemsa. Anschließend wurden die Proben getrocknet und die Zellen mit Hilfe eines Leitz DMR Fotomikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) abgelichtet.

2.2.9 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde anhand eines früher beschriebenen Protokolls durchgeführt (25). Aus frischen KM- und PB-Material wurden Ausstriche angefertigt, die zuerst für 5 min in 3,7% Formaldehyd fixiert wurden. Nach einem 5 minütigen Waschschrift mit PBS erfolgte eine Inkubation der Blutausstriche für 30 min in PBS mit 0,1% BSA, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese mit 0,1% NaN_3 (Coulter Immunotech, Hamburg, Deutschland) für 10 min inkubiert und anschließend mit α -p65Mab (1:250 Verdünnung; Roche Diagnostics) über Nacht bei 4°C oder für 4 h bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurden die Blutausstriche 3x5 min in PBS gewaschen und für 60 min bei Raumtemperatur mit biotinyliertem anti-Maus IgG (H+L) (Vector Laboratories, Camon, Wiesbaden, Deutschland) inkubiert. Es folgten 3 weitere 5-minütige Waschschriffe in PBS und anschließend ein Inkubationsschritt für 30 min bei Raumtemperatur mit Streptavidin-Cy3 (Dianova, Hamburg, Deutschland). Nach einem letzten Waschschrift von 5 min in PBS, wurde der Ausstrich mit Vectashield (Vector Laboratories, Camon) Überschichtungsmedium für Fluoreszenz bedeckt. Mit Hilfe eines Leitz DMR Fotomikroskops (Leica), das mit einer Epifluoreszenzoptik ausgestattet ist, wurden von den angefertigten Immunfluoreszenzen Mikrofotographien erstellt. Um speziell die rote Cy3 Fluoreszenz zu untersuchen, wurde ein Exzitationsfilter bei 550 nm und ein Emissionsfilter bei 575 nm verwendet.

2.2.10 Western Blot-Analyse

Zytosolische, sowie nukleäre Extrakte, wurden mittels Western Blot-Analyse auf Anwesenheit und Quantität bestimmter Proteine untersucht. Nach Zugabe von SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)-Probenpuffer (12,5 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,01 % SDS; 2,25 % Glycerin; 1 % Mercaptoethanol; 200 μM EDTA; 0,2 % Bromphenolblau) wurden 5-10 μg der jeweiligen Proteinextrakte 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel-Fertiggel (0,1% Sodium Dodecyl Sulfat (SDS), NovexTM Pre-Cast Gel, Invitrogen). Zur Feststellung der Proteingrößen wurde gleichzeitig ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard (Rainbow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Low Range, Biorad) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einer Spannung von 120 V und einer Laufzeit von 2 h ihrer Größe

entsprechend aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die Gele 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycin) äquilibriert und die Proteine im Wet Blot-Verfahren auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrocellulosemembran (PALL Gelman Sciences, Dreieich; 0,45 μm , Biorad; 0,8 mA/cm^2 Gelfläche, 1 h) transferiert. Die gewaschenen Membranen wurden anschließend mit Ponceau S (Sigma) gefärbt, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen zu dokumentieren. Nach 10 min wurde die Färbelösungen abgespült, das Proteinmuster fotografiert und die Membranen durch 1 stündige Inkubation mit 5 % Magermilchpulver in PBST (0,05% Tween 20 + PBS) abgesättigt, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Die Nitrocellulosemembranen wurden anschließend mit dem primären Antikörper (siehe 2.1.1; Verdünnung je nach Antikörper 1 : 200 bis 1 : 2000, jeweils in PBST + 1 % Milchpulver) für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden danach 3 x 10 min bei RT gewaschen (PBS; 0,05 % Tween 20; 1 % Milchpulver), bevor sie wiederum für 1 h bei RT mit einem sekundären, Peroxydase-konjugierten Antikörper (siehe 2.1.1; Verdünnungen in PBS; 0,05 % Tween 20 + 1 % Milchpulver, wie folgt: Anti-Kaninchen 1 : 20.000; Anti-Maus: 1 : 7.500; Anti-Ziege 1 : 20.000) behandelt wurden. Nach weiteren Waschschritten mit PBST (1 x 15 min, 4 x 5 min, RT) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen mit Hilfe des ECL-Verfahrens auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht, wozu eine signalverstärkende Chemilumineszenzreaktion (beides NEN Life Science Products) Verwendung fand. Die Proteingrößen wurden mittels standardisierter Molekülgewichtstabellen bestimmt (Amersham, Braunschweig und BioRad, München). Die anschließende Auswertung der Signale erfolgte je nach Fragestellung mittels Densitometrie bzw. durch Scannen.

2.2.11 Immunpräzipitation und Assoziationsassay

Gleiche Mengen zytosolischer und nukleärer Proteine wurden einer Immunpräzipitation (IP) in TNT Puffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1% Triton X-100; 1 mM DTT; 0,5 μM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfomyl fluoride (AEBSF); Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin jeweils 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma) unterzogen. Die Fällung (über Nacht bei 4°C) erfolgte mit 1 μg des jeweiligen Antikörpers (siehe 2.1.1) und 40 μl 6%iger Protein-A-Agarose. Nach fünfmaligem Waschen mit TNT-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und Zugabe von SDS-Probenpuffer (+10 % Glycerin) wurden die

Proteine im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die gefällten Proteine mittels Western Blot (siehe 2.2.10) detektiert.

2.2.12 Kinaseassay

Zytosolische Extrakte der AML-Blasten wurden einer IP in TNT-Puffer (TN-Puffer + 1 % Triton X-100) unterzogen. Die Präzipitation (2 h, 4 °C) erfolgte mit 1 µg eines Anti-Kinase-Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology; siehe 2.1.1 Antikörper) und 40 µl 6 %iger Protein-A-Agarose. Nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und drei weiteren Waschschrritten mit Kinasepuffer (20 mM HEPes, pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 100 µM Na₃VO₄; 20 mM β-Glycerophosphat; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5 µM AEBSF; und jeweils 0,75 µg/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) wurde die Kinaseaktivität der präzipitierten Proteine im Kinaseassay untersucht. Die Kinasereaktion (30 min, 37 °C) wurde in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP (5 µCi) (Perkin Elmer Life Sciences) mit 500 ng GST-IκB-α (Santa Cruz Biotechnology) als Substrat in Kinasepuffer durchgeführt und die Proteine anschließend im Polyacrylamidgel (0,1 % SDS) aufgetrennt (siehe 2.2.10). Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie (Perkin Elmer Life Sciences) und der Densitometrie.

2.2.13 Immunphänotypisierung von AML-Blasten

Die Zählung der weißen Blutzellen in den Proben der AML-Patienten erfolgt mit Hilfe eines STKS-Analysegerätes von Beckman Coulter. 5 x 10⁵ Zellen wurden mit dem entsprechenden mAk (10 min im Dunkeln bei RT, sättigende Ak-Konzentration) inkubiert und anschließend die roten Blutzellen mittels FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) einer hypotonischen Lyse unterzogen. Die Proben wurden mit PBS gewaschen, abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT) und in PBS resuspendiert. Für die Detektion intrazellulärer Antigene wurden Fix & Perm Cell Permeabilization Kits (Caltag) eingesetzt. Abschließend wurden mindestens 1 x 10⁴ Zellen/Probe mit Hilfe des Durchflußzytometers FACScan (Kalibrierung mit CaliBRITE, Verwendung der AutoCOMP Software, jeweils Becton Dickinson) analysiert. Die Gating-Prozedur bestand aus der Identifizierung der Blasten gemäß ihrem Scatter-Profil und der CD34- oder

CD117-Expression. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels CELLQuest Software von Becton Dickinson.

2.2.14 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel 5.0/95 eingesetzt. Unterschiede zwischen den AML-Subtypen, bezüglich NF- κ B- und IKK-Aktivität, sowie die Korrelation der Oberflächenmarker mit der NF- κ B-Aktivität in den AML-Proben wurde mit Hilfe des zweiseitigen t-Testes bewertet. Der statistische Vergleich der Mengen an I κ B- α und IKK- α zwischen Kontrollen und AML-Patienten erfolgte mittels Gauß-Test. Signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Aktivierung von NF- κ B bei AML und Analyse der Dimere

Ausgangspunkt der Untersuchung war die Frage nach dem Aktivierungsstatus von NF- κ B in AML-Blasten. Die Blasten wurden zu diesem Zweck aus Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB) von AML-Patienten isoliert. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, beinhalteten die Patientenproben einen durchschnittlichen Blastenanteil von mehr als 60 %. Weitere Informationen zu den untersuchten Patienten und den dazugehörigen Proben zeigen die Tabellen 2 und 3 mit Daten zur Karyotypisierung und Immunphänotypisierung. Die verwendeten Kontrollen (siehe Methodenteil) stammen aus dem KM und PB gesunder Spender.

Die Aktivierung von NF- κ B wurde mit Gelretardierungsassay (EMSA) bestimmt. Bei der Analyse der AML-Subtypen fiel auf, dass in allen untersuchten M4- und M5-AML-Subtypen und in der Mehrzahl der M1- und M2-AML-Subtypen, im Vergleich zu den Kontrollen, eine vermehrte Aktivierung von NF- κ B registriert werden konnte (Abb. 4A). Die Aktivierung wurde sowohl in neu diagnostizierten AML-Proben, als auch bei Rezidiven festgestellt (Abb. 4A, Tabelle 2 und 4). Tabelle 4 zeigt eine semiquantitative Analyse der erhobenen EMSA-Daten. Bei der Auswertung der Daten wurde die Qualität der einzelnen Proben berücksichtigt (Tabelle 4). Hierbei zeigte sich, dass vergleichend, sowohl bei den kryostatisch behandelten, als auch bei den frischen, sofort verarbeiteten Proben gleiche Ergebnisse bezüglich der NF- κ B-Aktivierung resultierten (Tabelle 4). In zwei von acht M1-Fällen und in zwei von acht M2-Fällen konnte keine erhöhte NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Tabelle 4). Die NF- κ B-Aktivierung ließ sich unabhängig von der Herkunft der Proben sowohl im KM, als auch im PB darstellen (Abb. 4A).

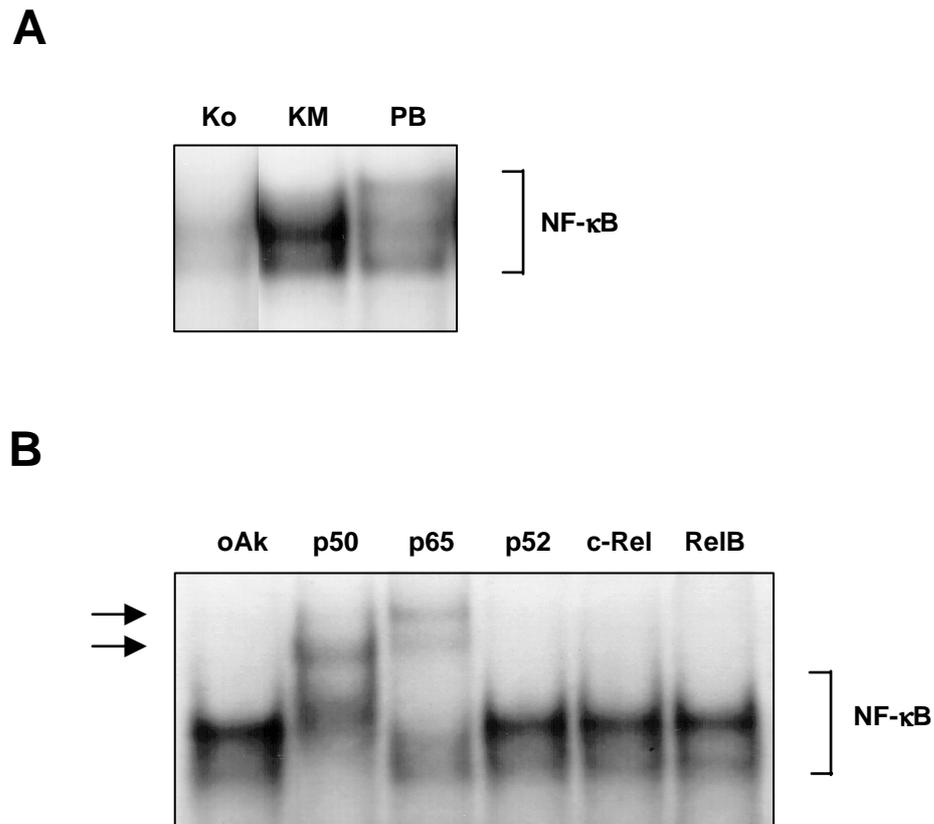


Abbildung 4: NF- κ B Aktivierung in AML und Analyse der NF- κ B-Dimere.

A) Nukleäre Extrakte wurden sowohl von Blasten (hier Subtyp M4) aus Knochenmark (KM) und peripherem Blut (PB), als auch aus Kontrollzellen (Ko) gewonnen. Die Analyse erfolgte mittels Gelretardierungsassay (M4, Patient 17 und 18; Numerierung der Patientenproben wie in Tabelle 2). Die Abbildung zeigt die Bindung von NF- κ B (Klammer) an eine prototypische κ B-Konsensussequenz. B) Supershift-Analyse der nukleären Extrakte von AML-Blasten des Subtyps M5 (Pat. 29). Für diese Untersuchung wurden die nukleären Extrakte mit polyklonalen Antikörpern gegen p50, p65, p52 sowie c-Rel und RelB präinkubiert. Die Pfeile markieren hierbei die Lage der Banden, bei denen die untersuchten Extrakte mit anti-p50 beziehungsweise mit anti-p65 präinkubiert wurden. Die Klammer zeigt die Bindung von NF- κ B an eine prototypische κ B-Konsensussequenz. Die Bezeichnung oAk besagt, dass hier nicht mit einem Antikörper präinkubiert wurde.

Anhand der Supershiftanalysen zeigte sich, dass in den Zellkernen der myeloischen Blasten in überwiegendem Maße die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 nachweisbar waren (Abb. 4B). Dies kann sowohl auf die Anwesenheit von p50/p65-Heterodimeren, als auch auf eine solche von p50 oder p65 Homodimeren hindeuten. Einige Besonderheiten ließen sich bei den undifferenzierten bzw. granulozytär-differenzierten (M1 und M2)

AML-Subtypen beobachten: In zwei Fällen von M1/M2-AML konnte bei verlängerter Exposition zusätzlich eine RelB-Bande gefunden werden (Abb. 5A, Tabelle 4). In einem weiteren Fall von M1-AML war die Darstellung einer c-Rel Bande möglich (Abb. 5B, Tabelle 4).

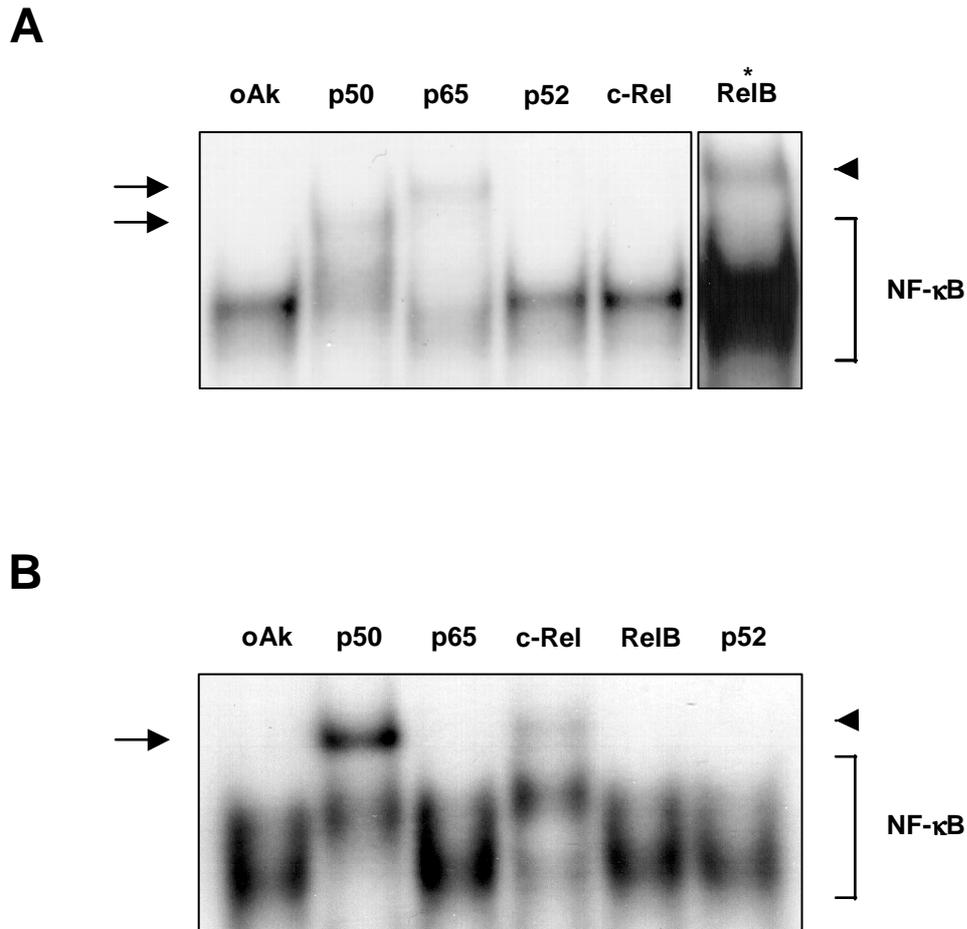


Abbildung 5: Zusammensetzung der NF-κB-Dimere

A) Supershift-Analyse der nukleären Extrakte von AML-Blasten des Subtyps M1 (Pat. 2). Für diese Untersuchung wurden die nukleären Extrakte mit polyklonalen Antikörpern gegen p50, p65, p52, sowie c-Rel und RelB präinkubiert. Die *Pfeile* markieren hierbei die Lage der Banden, bei denen die untersuchten Extrakte mit anti-p50, beziehungsweise mit anti-p65 präinkubiert wurden. Durch längere Exposition des gleichen Shift konnte eine RelB-Bande dargestellt werden. Diese ist mit einem *Pfeilkopf* markiert. Die *Klammern* zeigen die Bindung von NF-κB an eine prototypische κB-Konsensussequenz. B) Bei der Analyse einer AML M1 ließ sich neben einer p50-Bande (Pfeil), eine c-Rel-Bande darstellen (Pat. 8), die Bande wird durch einen *Pfeilkopf* markiert.

Tabelle 2: Angaben zu den einzelnen Patienten und zum verwendeten Probenmaterial

Patient	KM	PB	FAB	Blasten (%)	Krankheitsstatus	Karyotyp
1) w, 30	x		M1	85	r	n
2) w, 30	x	x	M1	92	r	n
3) m, 35	x		M1	86	d	k.a.
4) m, 69	x		M1	65	d	+13
5) m, 70		x	M1	92	d	+8; dup 1q11, 1q44
6) m, 35		x	M1	90	r	t(11;19)
7) w, 74		x	M1	89	r	k.a.
8) w, 59		x	M1	30	d	k.a..
9) w, 74	x		M2	50	r	k.a.
10) w, 41	x		M2	80	d	inv3(q21q26)/n
11) m, 77		x	M2	87	d	n
12) w, 67		x	M2	75	d	k.a.
13) m, 24		x	M2	95	d	t(8;21)
14) m, 35		x	M2	74	r	t(8;21), -Y, t(1;5), +1, -5
15) w, 37		x	M2	96	d	n
16) w, 66		x	M2	50	r	n
17) m, 56	x		M4	70	d	n
18) m, 32	x	x	M4Eo	75	d	inv16
19) m, 31	x		M4	81	r	n
20) w, 41	x		M4	90	d	t(11;16)(p15;11)
21) w, 22	x		M4Eo	80	d	inv16(p13q22); +22
22) w, 56	x		M4	53	d	n
23) m, 27		x	M4Eo	95	d	inv16
24) w, 81		x	M4	65	d	k.a.
25) w, 52		x	M4	54	d	n
26) w, 62	x		M5	88	d	k.a.
27) m, 44	x	x	M5	87	r	n
28) m, 47	x		M5	85	d	-7; t(11;17)
29) m, 73	x		M5	74	d	n
30) w, 30	x		M5	63	d	+13
31) w, 76		x	M5	85	d	n
32) w, 37		x	M5	60	d	t(9;11)
33) w, 58		x	M5	87	r	n
34) m, 38		x	M5	76	d	t(11;19) (q23;13.3), -Y
35) w, 75		x	M5	90	d	n

Die erste Spalte gibt das Geschlecht der Patienten an (w, weiblich; m, männlich), die Zahlen dahinter das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme. KM, Knochenmark; PB, peripheres Blut. FAB, French-American-British-Klassifikation der akuten Leukämien. Blasten (%), gibt den prozentualen Blastenanteil in KM bzw. PB an. Krankheitsstatus: d, *de novo*, neu diagnostizierte AML; r, Rezidiv. Karyotyp: n, normal; dup, Duplikation; t, Translokation; inv, Inversion; k.a., keine Analyse.

Tabelle 3: Daten zur Immunphänotypisierung

Patient	FAB	CD4	CD13	CD14	CD15	CD33	CD34	CD64	CD65s	CD117	HLA-DR	cyMPO	Lys
1)	M1	+	+		+	+	+	+	+	+			
2)	M1		+			+	+						
3)	M1		+			+	+			+			
4)	M1	+	+		+	+	+		+				+
5)	M1		+			+	+		+	+	+		+
6)	M1		+		+	+	+	+		+	+	+	
7)	M1		+			+	+			+	+	+	
8)	M1		+			+	+			+		+	
9)	M2		+			+	+			+	+	+	
10)	M2		+			+	+			+	+	+	
11)	M2					+						+	+
12)	M2												
13)	M2	+	+		+	+	+			+	+		
14)	M2		+		+		+			+	+	+	
15)	M2		+		+	+	+	+	+	+	+	+	
16)	M2		+			+	+				+	+	
17)	M4		+			+	+	+		+		+	
18)	M4Eo		+		+	+	+	+	+	+	+	+	
19)	M4		+		+	+	+	+	+		+		
20)	M4		+			+						+	
21)	M4Eo	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	
22)	M4		+			+							
23)	M4Eo		+			+	+			+	+	+	
24)	M4		+	+	+	+					+		
25)	M4		+			+					+	+	
26)	M5	+	+		+	+		+	+		+		+
27)	M5	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+
28)	M5	+	+		+	+		+	+	+	+		+
29)	M5	+		+	+	+		+	+			+	+
30)	M5	+	+			+	+		+	+	+	+	+
31)	M5	+	+	+		+		+			+	+	
32)	M5	+			+	+		+	+	+	+		
33)	M5	+	+			+	+			+	+		
34)	M5	+				+	+	+	+	+	+	+	
35)	M5	+	+	+	+	+		+	+		+	+	

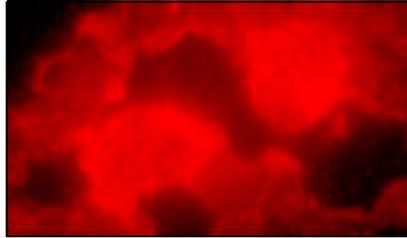
Die Patientennummern beziehen sich auf Tabelle 1. CD, „cluster of differentiation“; S, „surface“, Oberfläche; cyMPO, Myeloperoxidase; Lys, Lysozyme; HLA, Humanes Leukozytenantigen. Eine Oberflächenexpression von >20% und eine Intrazelluläre Expression von >10% der Zellen wurde mit + definiert. Die Daten der Immunphänotypisierung von Patient 12 waren nicht verfügbar.

3.2 Lokalisierung von NF- κ B im Zellkern der AML-Blasten

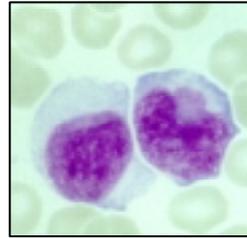
Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass die erhöhte NF- κ B-Aktivität den AML-Blasten zuzuschreiben ist und keinem andere Zelltypbestandteil der untersuchten Proben. Deshalb wurden Blutausstriche aus PB von AML-Patienten und von gesunden Probanden angefertigt. Die erstellten Ausstriche wurden dann nach Pappenheim gefärbt und ihre Zellmorphologie beurteilt (Abb. 6A). Zudem wurde mit der Esterase-Färbung zur weiteren Klassifizierung des M5-AML Subtyps gearbeitet (Abb. 6A). Die Ausstriche von derselben Patientenprobe bzw. vom selben gesunden Probanden wurden nun verwendet, um diese mittels Immunfluoreszenz-Färbetechnik (siehe Methodenteil) zu untersuchen. Hierbei wurde der p-I κ B- α -Antikörper verwendet, der in der Lage ist aktiviertes NF- κ B zu erkennen. Dieses Verfahren wurde gewählt, um aktiviertes NF- κ B im Zellkern darzustellen. Im Kern der Blasten zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal (Abb. 6A). Im Gegensatz dazu konnte in den wenigen nicht blastären Zellen der AML-Ausstriche und in den Monozyten und Granulozyten der Kontrollausstriche nur ein schwaches Signal nachgewiesen werden (Abb. 6B). Die zuvor erhobenen EMSA-Daten über die erhöhte Aktivität von NF- κ B im Kern wurden durch diese Ergebnisse gestützt.

3.3 Erhöhte Aktivität des IKK-Komplexes

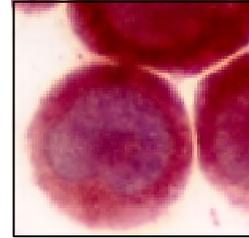
Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die beobachtete NF- κ B-Aktivität in AML Ausdruck einer erhöhten Aktivierung des IKK-Komplexes ist. Aus diesem Grund wurden zytosolische Extrakte von Blasten und Kontrollzellen mittels Kinase-Assay untersucht. Unter Verwendung zytosolischer Extrakte wurde mit Anti-IKK- α oder mit Anti-IKK- β eine Immunfällung durchgeführt. Die IKK-Aktivität wurde mit einem Kinaseassay bestimmt, bei dem das Immunpräzipitat mit dem Substrat GST-I κ B- α inkubiert wurde. In AML wurde eine deutlich höhere IKK-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet (Abb. 7A). Tabelle 4 zeigt eine semiquantitative Datenauswertung der durchgeführten Kinaseassays. Eine erhöhte IKK-Aktivität ergab sich sowohl im KM als auch PB der untersuchten AML-Proben (Abb. 7B).

A**Blasten**

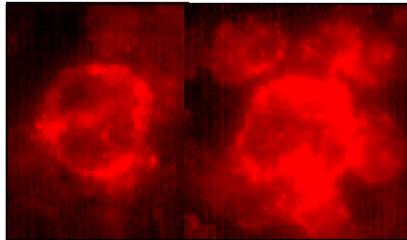
Immunfluoreszenz



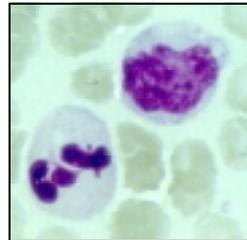
Pappenheim



Esterase

B**Normal**

Immunfluoreszenz



Pappenheim

Abbildung 6: Lokalisierung von NF- κ B in AML-Blasten

Aus PB von AML-Patienten und Gesunden wurden Ausstriche angefertigt. Unter Zuhilfenahme des p-I κ B- α -Antikörper wurde in den AML-Blasten aktiviertes NF- κ B durch Immunfluoreszenzverfahren nachgewiesen (siehe 2.2.9). A) In den Kernen der beiden dargestellten Blasten zeigte sich eine deutliche p65-Färbung. B) In der Kontrolle konnte im Kern des dargestellten Granulozyten und Monozyten nur eine schwache Färbung beobachtet werden. Ferner wurden Pappenheim- und Esterase-Färbungen angefertigt. Alle Blutaussstriche in (A) wurden von derselben M5-Probe (Pat. 27) angefertigt, die in (B) vom selben gesunden Kontrollspender.

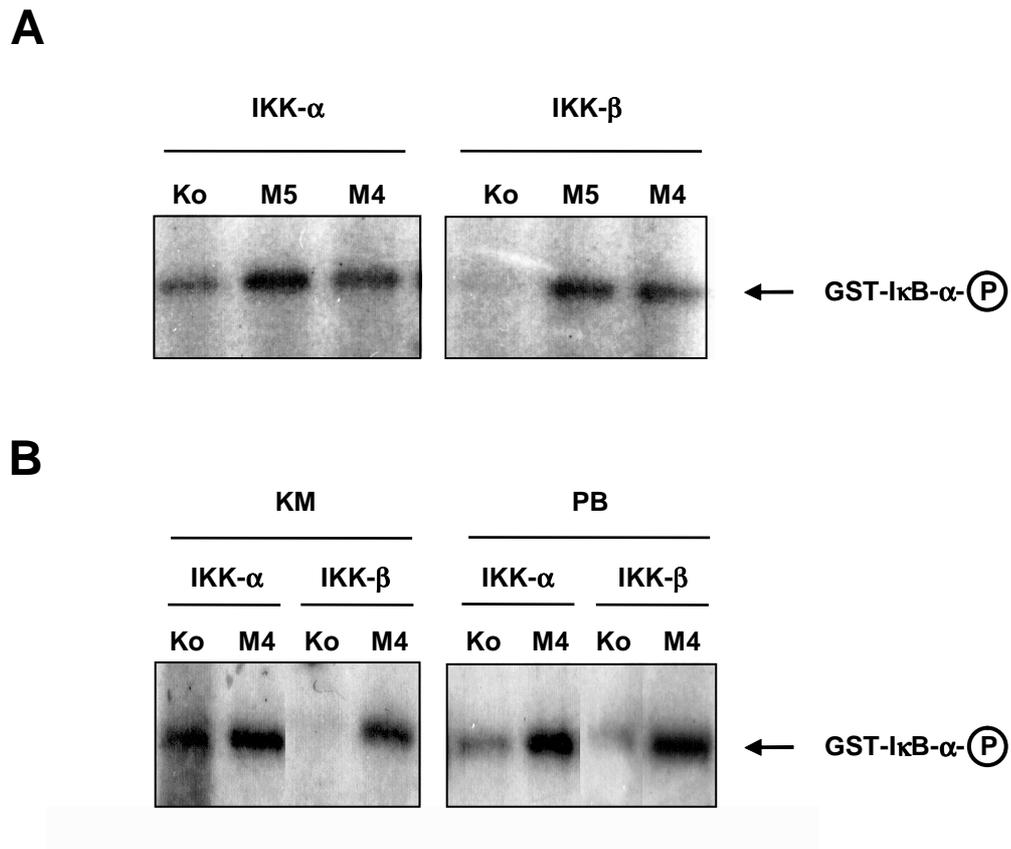


Abbildung 7: Erhöhte IKK-Aktivität in AML

In einer Immunfällung wurden zytosolische Extrakte von Blasten und Monozyten (Ko) entweder mit Anti-IKK- α oder mit Anti-IKK- β , unter Zugabe des Kinase-Substrates GST-I κ B- α inkubiert und im Anschluss mittels Kinaseassay analysiert. Die Pfeile weisen auf das mit 32 P-phosphorylierte GST-I κ B- α -Substrat hin. A) IKK-Aktivität in den AML-Subtypen M4- und M5 (Pat. 18 und 29). B) Hier wird vergleichend die Aktivierung von IKK in KM und PB bei einem Patienten mit einem AML M4-Subtyp (Pat. 18) gezeigt.

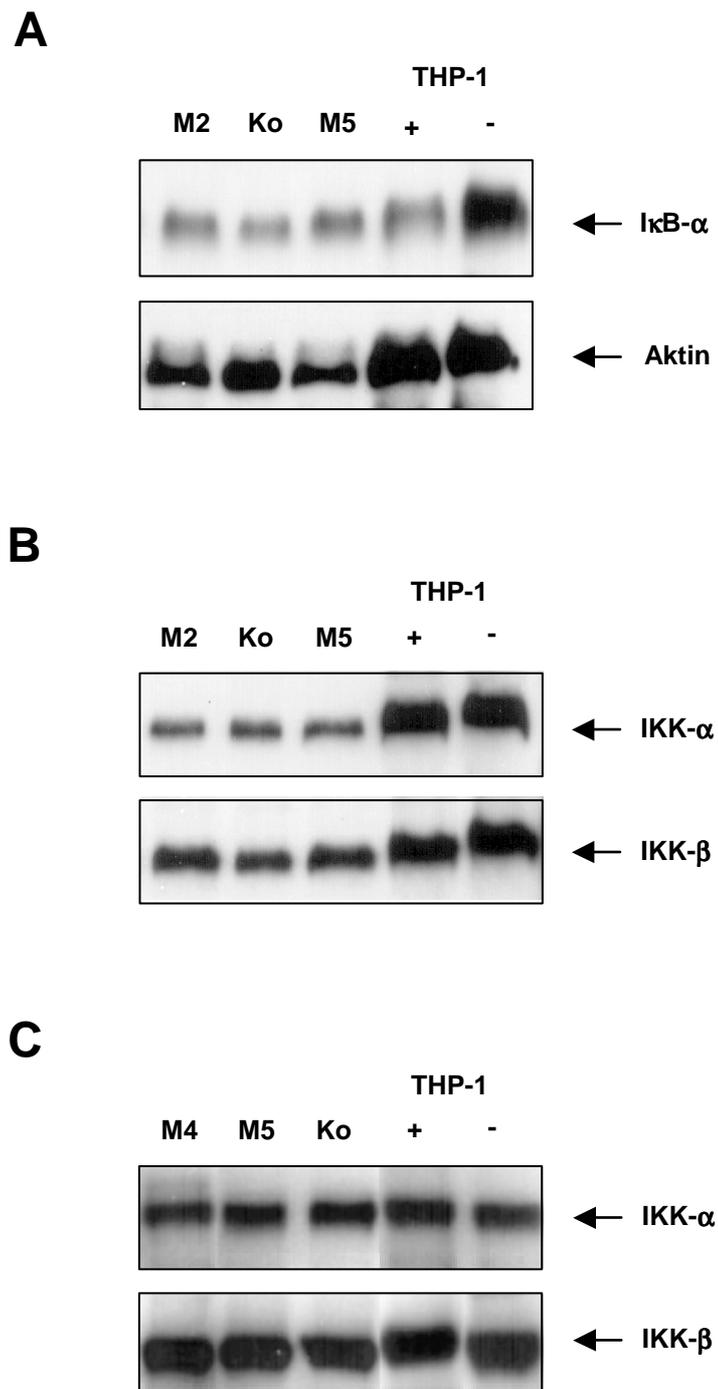


Abbildung 8: IκB- und IKK-Konzentrationen in Blasten

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurden die zytosolischen Extrakte auf den Gehalt von IκB-α, Aktin, sowie die IKK-Komplex Bestandteile IKK-α und IKK-β untersucht. A) Darstellung der untersuchten Konzentrationen von IκB-α und Aktin in den aus PB stammenden Blasten der Subtypen M2 (Pat. 11) und M5 (Pat. 27). B) und C) Analyse der IKK-α- und -β-Konzentrationen in M2 (Pat. 11), M4 (Pat. 18) und M5 (Pat. 27 in B, Pat. 29 in C) AML-Blasten. THP-1 Zellen wurden sowohl in Anwesenheit (+) wie auch Abwesenheit (-) von 1 µg/ml LPS für 60 min (A u. B) oder 1.6 ng/ml TNF für 5 min (C) inkubiert. Ko, Kontrollzellen.

Tabelle 4: Experimentelle Daten zu den untersuchten Patienten

Patient	FAB	Proben- qualität	EMSA	Supershift	Kinase Assay	Western Blot		Fluoreszenz
						<i>IκB-α</i>	<i>IKK-α</i>	
1)	M1	k	++	p50/p65	++	k.A.	+	k.A.
2)	M1	k	+	p50/p65/RelB	-	++	+	*
3)	M1	k	+	p50/p65	k.A.	+	k.A.	k.A.
4)	M1	k	+	p50/p65	-	-	k.A.	*
5)	M1	k	-	-	-	+	-	k.A.
6)	M1	k	-	-	-	+	-	k.A.
7)	M1	k	+	p50/p65	+	k.A.	+	*
8)	M1	b	+	p50/c-Rel	+	-	-	k.A.
9)	M2	k	-	-	-	-	-	k.A.
10)	M2	k	-	-	-	-	-	k.A.
11)	M2	k	+	p50/p65/RelB	+	++	+	*
12)	M2	k	+++	k.A.	k.A.	+	k.A.	k.A.
13)	M2	k	++	p50/p65	+	k.A.	k.A.	k.A.
14)	M2	b	+	p50/p65	++	-	-	*
15)	M2	k	++	p50/p65	+	-	-	k.A.
16)	M2	k	+	p50/p65	+	++	-	k.A.
17)	M4	k	+++	p50/p65	++	+	+	*
18)	M4Eo	b	++	p50/p65	++	+	-	*
19)	M4	k	+++	p50/p65	k.A.	-	k.A.	k.A.
20)	M4	k	+++	p50/p65	+++	+	-	k.A.
21)	M4Eo	k	+++	p50/p65	k.A.	++	-	k.A.
22)	M4	k	k.A.	k.A.	+	++	+	k.A.
23)	M4Eo	b	+	p50/p65	+	++	-	*
24)	M4	b	++	p50/p65	+	+	+	*
25)	M4	b	+++	p50/p65	+++	-	-	*
26)	M5	k	+++	p50/p65	k.A.	-	k.A.	k.A.
27)	M5	k	+++	p50/p65	+++	++	+	*
28)	M5	k	++	k.A.	+	k.A.	k.A.	*
29)	M5	k	+++	p50/p65	++	+	-	*
30)	M5	f	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	*
31)	M5	b	++	p50/p65	Phospho-WB	◇	◇	*
32)	M5	f	◇	k.A.	Phospho-WB	◇	◇	k.A.
33)	M5	b	+++	p50/p65	+++	-	+	*
34)	M5	b	+++	p50/p65	++	++	+	k.A.
35)	M5	k	k.A.	k.A.	+++	++	-	k.A.

Die Nummern beziehen sich auf die Patienten in Tabelle 1. Probenqualität: k, kryokonservierte Probe; f, frisch erhaltene Zellproben; b, sowohl frische als auch kryokonservierte Proben. EMSA: Gelretardierungsassay, die Daten bezüglich der NF-κB-Aktivierung wurden densitometrisch analysiert und die Aktivierungszunahme ausgehend von der Grundaktivität der Kontrollen errechnet: -, keine Zunahme; +, ≥ 1.2-fache bis <3-fache Zunahme; ++, ≥ 3-fache bis <5-fache Zunahme; +++, ≥ 5-fache Zunahme. k.A., keine Analyse. ◇, Probe wurde für Zellkulturexperimente verwendet. Supershift: Darstellung der NF-κB-Untereinheiten. Kinase-Assay: Die Aktivität des IKK-Komplexes wurde densitometrisch gemessen und die Zunahme der Aktivität wie bei EMSA bereits dargelegt beschrieben. Phospho-WB: Western Blot-Untersuchung mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes IκB-α. Western Blot: Die Proteinkonzentrationen von IκB-α und IKK-α wurden densitometrisch analysiert und die Zunahme im Verhältnis zu den Kontrollen, wie bei EMSA beschrieben, dargestellt. Fluoreszenz: *, nukleäres p65 wurde durch Immunfluoreszenz dargestellt.

3.4 Konzentrationen von I κ B und IKK

In einem weiteren Schritt wurden die Konzentrationen von I κ B- α , IKK- α und IKK- β in den zytosolischen Extrakten der AML-Patientenproben und Kontrollen mittels Western-Blot untersucht.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die Konzentration des NF- κ B-Inhibitorproteins, I κ B- α , welches ein NF- κ B-Zielgen darstellt, in den AML-Proben höher war als in den untersuchten Kontrollen (Tabelle 4; Abb. 8A). Als Positivkontrollen wurden THP-1 Zellextrakte verwendet. In THP-1 Zellen wurde nach Stimulierung mit LPS (1 μ g/ml) für 60 min ein Abbau von I κ B- α festgestellt (Abb. 8A). Ferner wurden die Proteinkonzentrationen von IKK- α/β , sowie Aktin analysiert. Hierbei wurden vergleichbare Konzentrationen von IKK- α/β , sowie Aktin in Blasten und Kontrollzellen erfasst (Abb. 8A, B und C). Auch bei der Gegenüberstellung der verschiedenen AML-Subtypen (M2, M4 und M5) ergaben sich vergleichbare Proteinkonzentrationen (Abb. 8B und C, Tabelle 4). Die in Abb. 7 dargestellte erhöhte Kinaseaktivität scheint folglich aus einer erhöhten IKK-Komplexaktivität und nicht aus einer veränderten Kinasekonzentration zu resultieren.

3.5 Unterschiede zwischen AML-Subtypen

Im Verlauf dieser Studie tauchte die Frage auf, ob es innerhalb der analysierten AML-Subtypen einen Unterschied bezüglich der NF- κ B-Aktivität gibt. Aus diesem Grund wurden verschiedene AML-Subtypen in Kinase- und Gelretardierungsassays miteinander direkt verglichen. Bei der Auswertung der Untersuchungen kristallisierten sich folgende Ergebnisse heraus: Bei den monozytär-differenzierten Leukämien M4/M4Eo (8 Fälle) und M5 (7 Fälle) ergab sich bei den EMSA-Untersuchungen eine stärkere Aktivierung der M5 (Abb. 9A, Tabelle 4). Beim Vergleich der AML-Subtypen M1 (8 Fälle) und M2 (8 Fälle) konnten keine wesentlichen Aktivierungsunterschiede beobachtet werden (Abb. 9A). Im Gegensatz dazu zeigte die Gegenüberstellung von monozytär-differenzierten (M4 und M5) und undifferenzierten bzw. granulozytär-differenzierten (M1 und M2) AML-Subtypen deutliche Unterschiede in der NF- κ B-Aktivität. Es konnte nämlich in den Zellkernen der M4/M5-Proben, im Vergleich zu den M1/M2-Proben, eine höhere NF- κ B-Aktivität gemessen werden. (Abb. 9B).

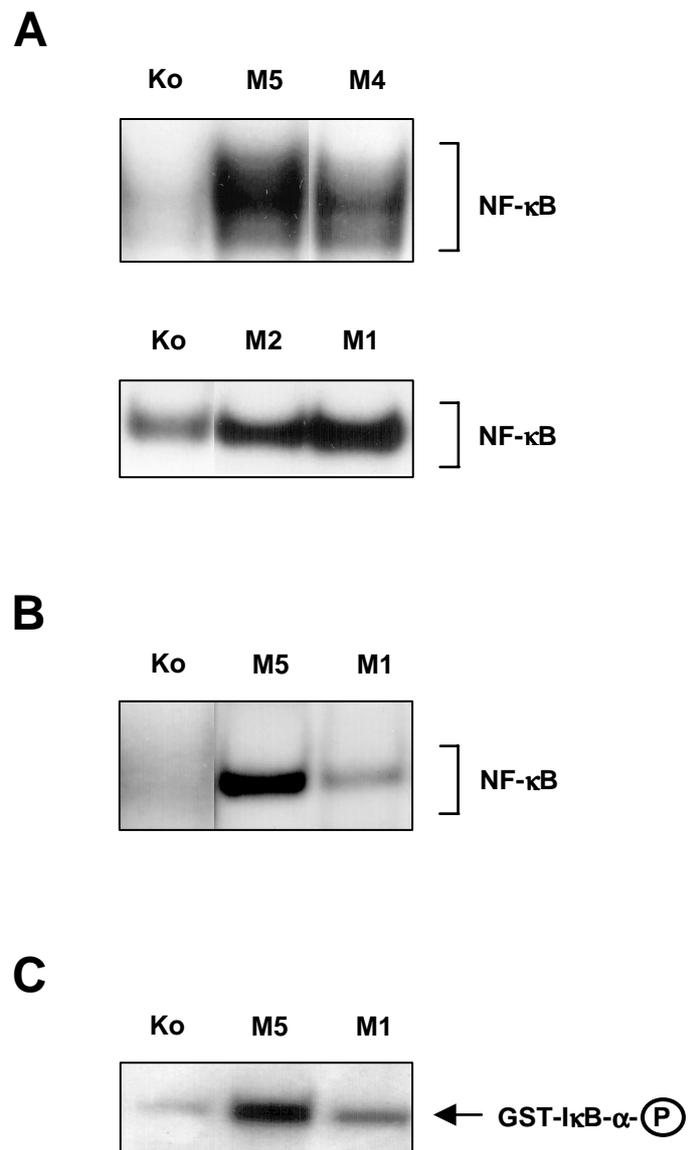


Abbildung 9: NF-κB-Aktivierung in verschiedenen FAB-Subtypen

Nukleäre Extrakte von verschiedenen AML-Subtypen wurden mittels EMSA und Kinaseassay untersucht (Pat. 2, 11, 17 und 27). A) Vergleich der NF-κB-Aktivierung zwischen den AML-Subtypen M4- und M5 und zwischen M1- und M2. B) Die Darstellung zeigt den Vergleich zwischen M1 und M5. C) Analyse der zytosolischen Extrakte derselben Patientenproben wie in B) durch Kinaseassay. Das eingekreiste P steht für die Phosphorylierung des GST-IκB-α-Substrates.

Die NF- κ B-Aktivierung (densitometrisch ausgewertet) war in den M4-Proben signifikant ($p < 0,05$) höher im Vergleich zu M1 oder M2. Ähnliche Ergebnisse konnten beim Vergleich der M5-Fälle mit M1 oder M2 erzielt werden. Eine zusätzliche Bestätigung erfuhr die EMSA-Auswertung aus der Analyse der Kinaseassay Daten. Hier wurde ebenfalls eine höhere Kinaseaktivität von M4/M5 gegenüber M1/M2 beobachtet (Abb. 9C, Tabelle 4).

3.6 Modulation von NF- κ B in kultivierten Blasten durch TNF und LPS

Im Weiteren galt unser Interesse der Frage, ob der Aktivierungsstatus sowohl des IKK-Komplexes, als auch der von NF- κ B in AML-Blasten beeinflusst werden kann. Wie im Methodenteil dargestellt, wurden Blasten aus KM und PB isoliert und für 24 h in endotoxinfreiem Medium kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Blasten zum einen für 5 min mit 1,6 ng/ml TNF, und zum anderen für 30 min mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und zytosolische, sowie nukleäre Extrakte isoliert. In Abbildung 10A ist der Effekt einer exogenen Stimulation mit TNF oder LPS auf die IKK-Aktivität in den kultivierten Blasten zu sehen. Beide Stimuli ergaben eine zusätzlichen Steigerung der IKK-Aktivität gegenüber den unbehandelten Blasten (Abb. 10A).

Aus den Western Blot-Analysen geht hervor, dass die Stimulierung mit TNF oder LPS zu einem signifikanten Abbau des Inhibitorproteins I κ B- α führte (Abb. 10B). Die Konzentrationen von IKK- α und - β erwiesen sich als konstant, ebenso die von Aktin (Abb. 10B).

3.7 Verwendung von Proteasominhibitoren

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die NF- κ B-Aktivierung in den AML-Blasten durch spezifische Inhibitoren moduliert werden kann. Wie zuvor dargelegt (3.6), wurden Blasten aus KM und PB isoliert und für 24 h in endotoxinfreiem Medium kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Blasten für 5 min mit 1,6 ng/ml TNF stimuliert. Im Unterschied zum vorher beschriebenen Versuch wurden die Blasten vor der Stimulierung mit TNF über 1 h mit dem Proteasominhibitor PSI (10 μ M) vorinkubiert. Mittels Gelretardierungsassay und Western-Blot war unter dem Einfluss von PSI eine Blockierung der NF- κ B-Aktivierung und des I κ B- α -Abbaus in den AML-Blasten nachweisbar

(Abb. 11A und B). In Abb. 11B konnte bei Zugabe von PSI über der I κ B- α -Bande eine zusätzliche Bande dargestellt werden, die von der Größe dem phosphorylierten I κ B- α entspricht, welches durch die Proteasomhemmung nicht abgebaut werden konnte. Diese belegt die Hemmung des I κ B- α -Abbaus (Abb. 11B).

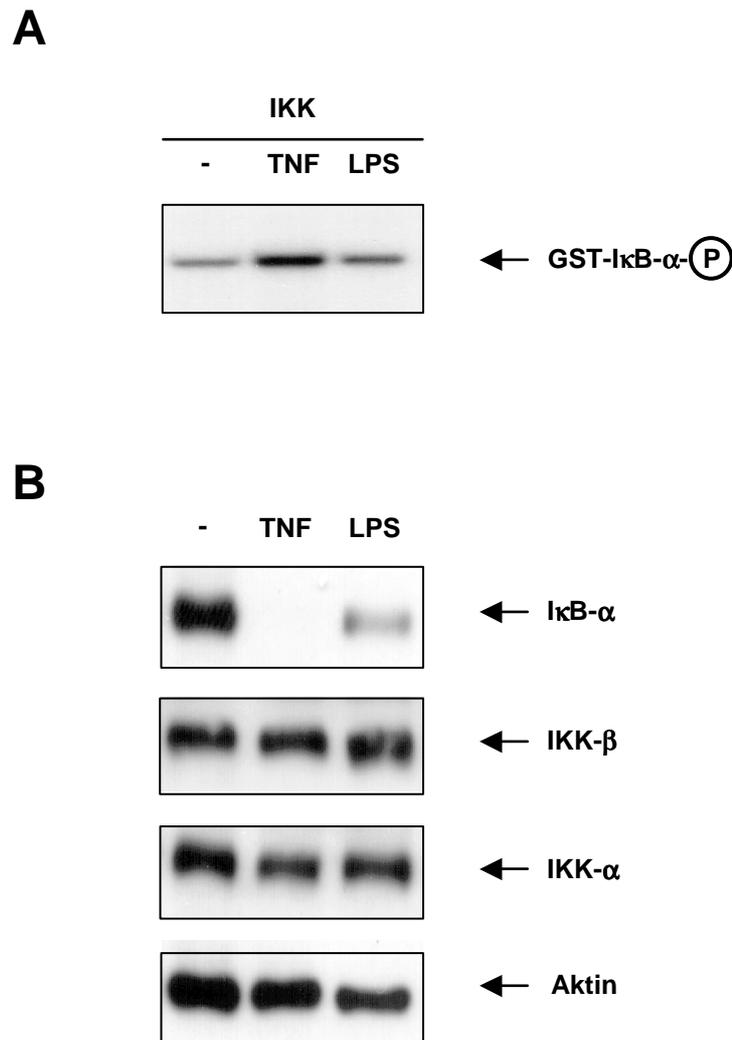


Abbildung 10: Einflüsse von TNF und LPS auf das NF- κ B-System in kultivierten Blasten

Aus PB isolierte Blasten wurden für 24 h kultiviert und anschließend mit TNF (1.6 ng/ml, 5 min) oder LPS (1 μ g/ml, 30 min) stimuliert. A) Nach Präzipitation der zytosolischen Fraktionen mit anti-IKK- α wurde mit Hilfe des Kinase-Assays die IKK-Aktivität analysiert. B) Mittels Western-Blot wurden die zytosolischen Extrakte auf ihre Proteinkonzentrationen an I κ B- α , IKK- α , IKK- β und Aktin untersucht (Pat. 23 in Abb. A u. B).

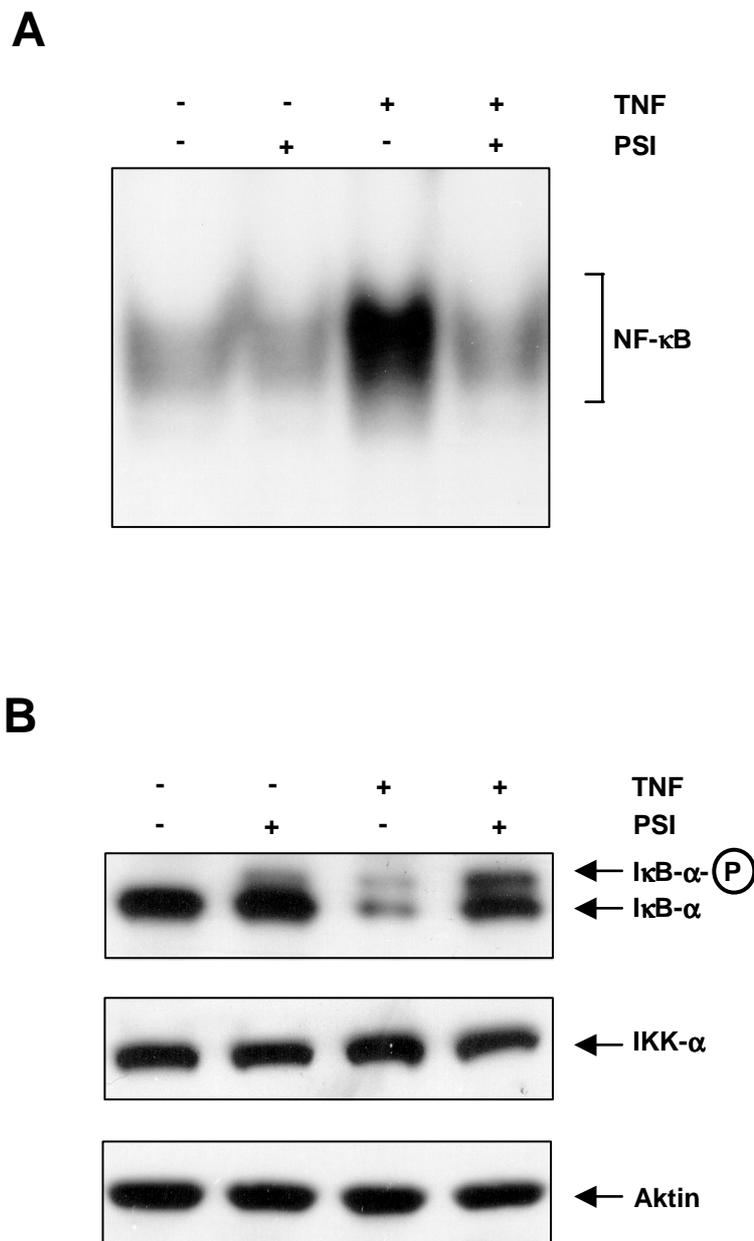


Abbildung 11: Inhibierung des NF-κB-Systems in Blasten durch PSI

A) Aus PB isolierte Blasten wurden für 24 h kultiviert und vor Stimulierung mit TNF (1.6 ng/ml, 5 min) für 1 h mit dem Proteasominhibitor PSI präinkubiert. Die gewonnenen nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Gelretardierungsassay untersucht. B) Die Analyse des Proteingehalts an IκB-α, IKK-α und Aktin wurde mittels Western-Blot durchgeführt (Pat 31). Zudem konnte phosphoryliertes IκB-α als Bande über der regulären IκB-α-Bande beobachtet werden.

Das dargestellte Experimente wurde insgesamt mit 4 verschiedenen Patientenproben (Patient 23, 24, 31 und 32) durchgeführt. In jedem der Fälle konnte durch PSI eine Blockierung der NF-κB-Aktivierung beobachtet werden.

4 DISKUSSION

Dem menschlichen Organismus stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, um sich vor der Entwicklung maligner Prozesse zu schützen. Zu diesen zählen neben der angeborenen und erworbenen Immunität auch zelleigene Programme, die vor einer unkontrollierten Zellvermehrung schützen, z.B. die Apoptose (16,62,68). Sollten diese protektiven Zellmechanismen defekt oder fehlreguliert sein, könnte dies die Entstehung von Tumoren begünstigen. Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie sind durch ihre Bedeutung für entzündliche und immunologische Prozesse, sowie für Proliferation, Apoptose und Differenzierung der Zellen auch an der Onkogenese beteiligt (10,11,73). Eine zunehmende Anzahl von Studien belegen die Beteiligung von NF- κ B an onkogenen Prozessen und weisen bei einer Vielzahl von Tumoren auf eine Fehlregulation dieses Transkriptionsfaktors hin (10,11,73). Diese Arbeit untersucht die Rolle des NF- κ B-Systems bei akuter myeloischer Leukämie (AML).

4.1 Dysregulation des NF- κ B/Rel-Systems bei akuter myeloischer Leukämie

In der vorliegenden Studie fand sich in den Kernen der AML-Blasten aus Knochenmark und peripherem Blut eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Diese Ergebnisse stimmen mit einer bereits früher durchgeführten Studie überein, die bei einer kleineren Anzahl untersuchter AML-Proben eine erhöhte Aktivierung von NF- κ B beschreibt (35,48,97). In ähnlicher Weise findet sich bei einigen anderen hämatologischen Tumoren eine erhöhte Aktivität von NF- κ B. Zu derartigen Tumoren zählen unter anderem die akute lymphatische Leukämie (ALL) sowie der Morbus Hodgkin (15,57,62,65). Auch bei einer Reihe solider Tumoren konnte diese erhöhte Aktivität nachgewiesen werden (15,58,62). Das Fusiononkoprotein Bcr-Abl, welches sowohl eine Rolle bei der Genese der chronisch myeloischen Leukämie (CML), als auch bei der ALL spielt, ist in der Lage, durch zwei unterschiedliche Mechanismen NF- κ B zu aktivieren. Einerseits kommt es durch die Expression von Bcr-Abl zu einer relativ schwachen Stimulation der nukleären Translokation von NF- κ B und andererseits zur Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität dieses Transkriptionsfaktors (62,73). Eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B konnte unter physiologischen Bedingungen in reifen B-Zellen und Nervenzellen

beobachtet werden (62,98). In B-Zellen übernimmt dieser Transkriptionsfaktor eine wichtige Aufgabe, da er zum einen das Überleben der Zelle sichert, zum anderen die kontinuierliche Zellvermehrung gewährleistet. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang darüber diskutiert, ob NF- κ B im Falle einer Entzündungsreaktion einen Schutzmechanismus darstellt, der die B-Zellen vor einer allzu schnellen Apoptose bewahrt (62,98). Gegenwärtig ist noch ungeklärt, inwieweit die Anwesenheit des aktivierten Faktors NF- κ B im Kern von Tumorzellen ein generelles Zeichen für eine maligne Entwicklung darstellt (62). Dennoch darf man darüber spekulieren, inwieweit die Anwesenheit des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B ein mögliches molekulares Bindeglied zwischen entzündlichen und malignen Prozessen darstellt. Hieraus könnte sich ein Ausgangspunkt ergeben, warum chronische Entzündungen unter bestimmten Bedingungen zur Entstehung von Tumoren führen können (5,80). Weitere funktionelle Aspekte der NF- κ B-Aktivierung, die z.B. die Apoptose, den programmierten Zelltod, betreffen, sollen später ausführlicher beleuchtet werden.

4.2 Veränderte IKK-Aktivität in Tumorzellen

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass die erhöhte NF- κ B-Aktivität in myeloischen Blasten einhergeht mit einer erhöhten Aktivität des IKK-Komplexes. In unseren Experimenten konnte diese IKK-Aktivität durch Stimulierung mit TNF und LPS weiter gesteigert werden. Im Vergleich dazu ließ sich unter Anwendung von TNF bzw. Phorbolester bei den Experimenten mit Hodgkin- oder ALL-Zellen keine Zunahme der IKK-Aktivität beobachten (57,58). Der Einsatz proteasomspezifischer Inhibitoren führte interessanterweise sowohl in primären ALL (57), als auch in den AML-Kulturen der vorliegenden Arbeit zu einer Anhäufung von phosphoryiertem I κ B- α . Diese Beobachtung deutet auf eine Aktivierung oberhalb lokalisierter Kinasen hin und legt die Vermutung nahe, dass eine permanent ablaufende Signalübertragung in diesen Zellen zur persistierenden Aktivierung des IKK-Komplexes und damit zur konstanten NF- κ B-Aktivierung führt (57). In Hodgkin-Zellen sind zwei Mechanismen aufgedeckt worden, die zu einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B führen: Zum einen resultiert diese Aktivierung aus einer persistierenden IKK-Aktivität, zum anderen wurde in einigen Fällen eine mutierten Form des NF- κ B Inhibitorproteins I κ B- α nachgewiesen (58,94). Für die Genese von T-Zell-Leukämien ließ sich unter anderem eine Infektion mit dem HTLV-1

belegen (42,83). Das Tax-Fusionsprotein, welches in HTLV-1-infizierten T-Zellen gefunden wurde, ist in der Lage, die Aktivität des IKK-Komplexes zu beeinflussen (42,83). Eine erhöhte basale Aktivität des IKK-Komplexes, sowie eine verstärkte Phosphorylierung von I κ B- α sind charakteristisch für die Hs294T-Melanomzellen. Durch diese Vorgänge wird in den Melanomzellen eine vermehrte basale Transkription von wachstumsfördernden Proteinen wie GRO- α bewirkt („growth-regulated protein“) (33). Weiter spielen Onkogene eine wichtige Rolle bei der Regulation der IKK-Komplex-Aktivität, was der Nachweis einer verstärkten NF- κ B-Aktivität in epithelialen Rattenleberzellen belegt (4). Die Ursache liegt zum einen in der Anwesenheit des Ras-Onkogens, welches eine erhöhte Aktivität der IKK- α und auch der IKK- β -Kinase herbeiführt. Zum anderen basiert sie auf der Anwesenheit des Raf-Onkogens, welches seinerseits eine Aktivierung von NF- κ B durch Stimulierung der IKK- β -Kinase bewirkt (4).

4.3 Subtypspezifische Unterschiede bei AML

Weitere interessante Beobachtungen ergaben sich aus dem Vergleich der NF- κ B-Aktivität zwischen den AML-Subtypen. So konnte in der vorliegenden Studie eine deutlich erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den myelomonozytär (M4) bzw. monozytär (M5) differenzierten Leukämien gegenüber den frühen oder granulozytär differenzierten Leukämien (M1/M2) registriert werden. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Untersuchungen bei ALL. Hier war kein Unterschied in der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors innerhalb der verschiedenen ALL-Subtypen nachweisbar (57). Die Ergebnisse der NF- κ B-Aktivierung sind den Resultaten bei den Kinasen ähnlich. Dabei zeigte sich eine höhere Aktivität von IKK- α und - β in den AML-Subtypen M4/M5 im Vergleich zu den AML-Subtypen M1/M2. Möglicherweise ist das ein Hinweis auf differenzierungsabhängige Unterschiede in der Signaltransduktion und/oder auf verschiedene molekulare Mechanismen als Ursache der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung, wie bereits für M. Hodgkin beschrieben (58).

4.4 Zusammensetzung von NF- κ B bei malignen Prozessen

Ähnlich wie bei der ALL fanden sich im Kern der myeloischen Blasten hauptsächlich die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 (57). Die Präsenz dieser beiden Untereinheiten könnte sowohl die Anwesenheit von p50/p65 Heterodimeren, als auch die von p50 oder p65 Homodimeren bedeuten. In THP-1-Zellen, einer Zelllinie, die von einem Patienten mit einer AML M5 stammt, ließ sich im unstimulierten Zustand eine deutlich Erhöhung von p50 und p65 im Kern nachweisen (90). Die Zusammensetzung von NF- κ B variiert innerhalb verschiedener Tumoren (15,31,45). So konnten bei der Analyse der NF- κ B-Dimere bei Hodgkin-Zellen neben p50/p65- und p50/c-Rel-Heterodimeren auch p50-Homodimere gefunden werden (15,58,94). Bei Brustkrebs setzten sich die Dimere hingegen hauptsächlich aus p50, p52 und Bcl-3 zusammen (31). Die Analysen der myeloischen Leukämien in unseren Experimente ergaben in zwei Fällen von AML M1 zusätzlich die Untereinheit RelB, sowie in einem Fall von AML M1 die Untereinheiten c-Rel und p50.

4.5 Dysregulation von I κ B

Die Konzentration des NF- κ B-Inhibitorproteins, I κ B- α , war bei den akuten myeloischen Leukämien im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch die verstärkte Anwesenheit von funktionellem NF- κ B im Kern der Blasten erklären, da es sich bei I κ B- α nachgewiesenermaßen um ein NF- κ B-reguliertes Gen handelt (70,98). Die erhöhte Produktion anderer NF- κ B-Zielgene, wie z.B. der Interleukine IL-1 β und IL-6 in AML-Blasten wurde bereits anhand einer früheren Studie belegt (35). Die vermehrte Präsenz des I κ B- α Inhibitorproteins müsste den Schluss zulassen, dass es zu einer verstärkten Neutralisierung der vorhandenen aktivierten NF- κ B-Dimere kommt. Diese Vermutung scheint jedoch nicht zuzutreffen. In den dargelegten Experimenten konnte mittels Immunfluoreszenz in signifikant verstärktem Maße aktiviertes NF- κ B im Zellkern nachgewiesen werden; die Ergebnisse der Gelretardierungsassays wurden somit bestätigt. Im Gegensatz dazu wurde in ALL-Zellen und bei einigen Fällen von Morbus Hodgkin, in Anwesenheit einer konstitutiven Aktivierung von NF- κ B, ein verstärkter Abbau von I κ B- α registriert (57,58). In einigen von Morbus Hodgkin-Patienten stammenden Zelllinien ließen sich Punktmutationen im

Bereich des I κ B- α Gen aufdecken (94). Diese Punktmutationen führen zu einer Veränderung des C-terminalen Abschnitts des Proteins, wodurch die Bindung von I κ B an p65 verhindert wird (36,58,94).

4.6 NF- κ B und Apoptose

„Activate NF- κ B or die“. Diese Äußerung wurde in einem Artikel zur Rolle von NF- κ B bei Apoptose, dem programmierten Zelltod, geäußert. Und in der Tat scheint sich diese Ansicht in den meisten der durchgeführten Studien zu bestätigen (8,16). Aktiviertes NF- κ B scheint dabei eine Schlüsselrolle einzunehmen, den Ablauf apoptotischer Prozesse mit dem funktionellen Zustand der zellulären Proteinexpression zu verknüpfen (8,16). Im Falle der ALL wird angenommen, dass die konstitutive Aktivierung von NF- κ B einen wichtigen Vorgang darstellt, der das Überleben der ALL-Zelle, zum einen durch eine Blockierung der Apoptose, zum anderen durch eine verstärkte Vermehrungsrate der ALL-Zellen, gewährleistet (57). Die antiapoptotischen Eigenschaften von NF- κ B erklären sich zum Teil aus der Tatsache, dass die Expression verschiedener antiapoptotischer Gene verstärkt wird, wie z.B. der manganabhängigen Superoxid Dismutase, des Zinkfingerproteins A20, des Bcl-2-homologen Proteins A1/Bfl-1, sowie der IAP- und TRAF verwandten Proteine. Zum anderen wird die Aktivierung von apoptoseinduzierenden Proteinen, wie z.B. der Caspase-8 und dem Tumor-Suppressor-Gen p53, gehemmt (8,16,62).

Einer der Hauptgründe, warum Tumorthérapien bei Leukämien häufig nicht zum angestrebten Ziel führten, mag daran liegen, dass die verabreichten Chemotherapeutika nicht die gewünschten apoptoseinduzierenden Auswirkungen hatten (53,89). Die Ursachen könnten an den antiapoptotischen Eigenschaften von NF- κ B liegen, welche möglicherweise eine molekulare Resistenz der Leukämiezellen bewirken (53). Für primäre Leukämie-Zellen wurde eine Resistenz gegenüber einer durch natürliche Liganden (death-inducing ligands, wie z.B. TNF) oder durch Chemotherapeutika (z.B. Doxorubicin) induzierten Apoptose gezeigt, die sich negativ auf den Erfolg einer entsprechenden Therapie auswirken könnte (53). Die Antagonisierung der NF- κ B-Aktivität in Tumorzellen stellte die Sensitivität der Zelle für Apoptose dabei teilweise wieder her. Und in der Tat rief die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch den Proteasominhibitor LLnL eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer TRAIL- (TNF-related apoptosis-inducing

ligand), CD95- und TNF-Rezeptor-vermittelten Apoptoserate hervor, und zwar sowohl bei AML, als auch bei ALL (53). In der hier durchgeführten Studie konnte durch den relativ spezifischen Proteasominhibitor PSI eine markante Reduzierung der NF- κ B-Aktivität in den myeloischen Blasten erzielt werden.

Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, ergeben sich mögliche adjuvante therapeutische Ansätze, die eine Chemotherapie in Zukunft erfolgreich unterstützen könnten. Möglichkeiten sind in der Hemmung des multikatalytischen Proteasomkomplexes (78) oder in anderen Ansätzen zu sehen, die zur Reduktion der NF- κ B-Aktivität beitragen, wie z.B. das Einbringen von Decoy-Oligonukleotiden mit prototypischem κ B-Motiv (75), Peptide (60) oder systemisch wirksame niedermolekulare Inhibitoren (37,38,62). Ziel wäre es, die antiapoptotischen Eigenschaften von NF- κ B zu reduzieren und die Apoptoserate zu fördern. Gerade bei der Behandlung von Leukämien mit einem prognostisch eher ungünstigen genetischen Karyotyp, bei denen es sehr häufig zu Resistenzen während der regulären Chemotherapie kommt, könnte dieses Behandlungskonzept neue Möglichkeiten erschließen, gerade dann, wenn eine Transplantation angestrebt wird (27).

4.7 Bedeutung von NF- κ B bei Malignität

Neben ihrer zentralen Rolle bei entzündlichen und immunologischen Prozessen sind Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie aufgrund ihrer Bedeutung bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose auch an Abläufen der Onkogenese beteiligt (7,26,55,62). Eine Dysregulation des NF- κ B-Systems führt zu Genexpressionsmustern, die Wachstum, Invasion und Metastasierung von Tumoren begünstigen (59,62,98).

Mehr als 150 verschiedene Stimuli und Bedingungen vermögen das NF- κ B-System zu aktivieren, hierunter viele, die im Zusammenhang mit malignen Prozessen gesehen werden (Abb. 12). Dazu zählen Viren (HTLV-1) und deren Produkte, Onkoproteine, Mutationen, sowie proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1) und Wachstumsfaktoren. Des Weiteren führen verschiedene Formen von Stress zur NF- κ B-Aktivierung, so z.B. physikalische (ultraviolette Strahlen), oxidative und umweltbedingte Streßfaktoren (Schwermetalle, Zigarettenrauch) oder Chemikalien, die häufig Ursache einer Tumorgenese sind (8,10,23,47,70,81).

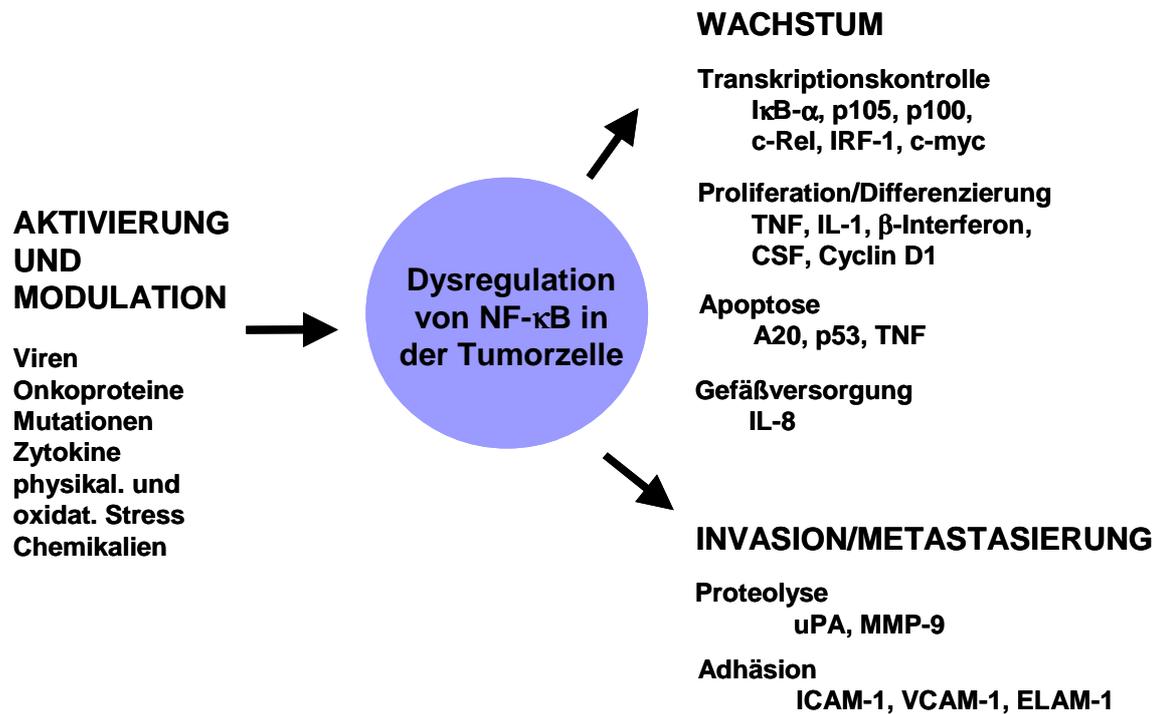


Abbildung 12: Rolle von NF- κ B bei Malignität

Auf der linken Seite der Abbildung sind eine Vielzahl von Aktivatoren und Modulatoren des NF- κ B-Systems dargestellt, für die bekannt ist, dass sie an der Tumorentstehung beteiligt sind. Diese Dysregulation von NF- κ B ist mit der Expression zahlreicher Gene assoziiert, die ebenfalls bei der Tumorgenese eine Rolle spielen (Darstellung auf der rechten Seite). Diese Proteine können sowohl Einfluss auf das Wachstum, als auch auf die Metastasierungs- bzw. Invasionsfähigkeit der Tumoren besitzen. Die Abkürzungen sind im Text bzw. in der Liste der Abkürzungen erklärt.

Auf der anderen Seite induziert aktiviertes NF- κ B die Expression von mehr als 150 Genen, von denen viele an Abläufen der Onkogenese beteiligt sind (Abb. 12) (7,10,47,55,70).

In einer Vielzahl von Studien konnte die Bedeutung einer veränderten transkriptionellen Kontrolle durch NF- κ B für die Genese von Tumoren nachgewiesen werden (10,55). Dazu zählen z.B. das Inhibitorprotein I κ B- α , c-Rel, die Vorläuferproteine p100 und p105, IRF-1 („Interferon regulatory factor-1“) sowie das Protoonkogen c-myc (77,89,98).

An der Regulation von Proliferation und Differenzierung von Tumorzellen sind viele Faktoren beteiligt (13,19,37,39). Bereits seit längerem ist die Bedeutung des Zytokins TNF als wichtigem Mediator bei entzündlichen, immunologischen und malignen Prozessen bekannt (12,18,19,71). Auf Tumorzellen hat TNF sowohl zytotoxische bzw. apoptotische

als auch wachstumsstimulierende Einflüsse, wie z.B. Zellproliferation und Differenzierung (18,71). Bei einer Reihe von malignen Tumoren konnte eine erhöhte TNF-Expression nachgewiesen werden und ist in der Regel mit einer schlechten Prognose verbunden (12,13). Weiterhin konnte bei verschiedenen soliden und hämatologischen Tumoren eine erhöhte Produktion von Interleukinen und Interferon belegt werden (35,37). IL-1 führt zu einem vermehrten Zellwachstum, hat aber auch Einfluss auf das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen (2), β -Interferon bewirkt über seine modulatorischen Eigenschaften eine veränderte zelluläre Immunantwort und begünstigt dadurch die Onkogenese (37,85). Ein weiteres NF- κ B-induziertes Genprodukt ist CSF, welches bei vermehrter Expression in Tumorzellen einerseits eine anhaltende Differenzierung und Proliferation bewirkt, andererseits aber auch den Prozess der Apoptose einleiten kann (39). Die Bedeutung von Cyclin D1 liegt in der Beeinflussung des Zellzyklus, vor allem der G1-Phase (67). Eine Überexpression von Cyclin D1 steht im Zusammenhang mit einem verstärkten Zellwachstum und Tumorgenese bei verschiedenen Tumoren (67).

Der komplexe Prozess der Onkogenese beinhaltet neben einem veränderten Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen auch ein verändertes apoptotisches Verhalten (8,16). Die durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöste NF- κ B-Aktivierung ruft eine verstärkte Expression antiapoptotischer Gene hervor, wie z.B. des Zinkfingerproteins A20 (96). Zum anderen wird aber auch die Aktivierung von apoptoseinduzierenden Proteinen, wie z.B. dem Tumor-Suppressor-Gen p53, gehemmt (8,16,62). Auf die Bedeutung von TNF für Proliferation, Differenzierung und Apoptose wurde bereits eingegangen (18,71).

Für die „Ernährung“ des Tumors und damit dessen Wachstum ist eine funktionierende Gefäßversorgung von zentraler Bedeutung. Das NF- κ B-regulierte Zytokin IL-8 scheint hier eine bedeutende Rolle bei der Angiogenese zu spielen (62,68).

Einen wichtigen Aspekt bei malignen Prozessen stellt die örtliche Invasionsfähigkeit und die Metastasierung des Tumors dar. Interessanterweise wurde in M4/M5-Zellen eine verstärkte Expression des Proteins MMP-9, einer Metalloprotease, nachgewiesen. Die Expression dieser Metalloprotease wird durch NF- κ B reguliert. MMP-9 ist aufgrund seiner proteolytischen Fähigkeiten möglicherweise am Prozess der Invasion von Tumoren in bestimmte Regionen der Submucosa beteiligt, wie z.B. der Gingiva bei M5-Leukämiezellen (46). Ferner konnte die Bedeutung von uPA („Urokinase-Plasminogen-Activator“) als NF- κ B-reguliertem Gen für Invasion/Metastasierung und Gefäßbildung bei Tumoren

bzw. AML nachgewiesen werden (3). Hier scheint uPA ebenfalls durch proteolytische Fähigkeiten, vor allem bei der AML M5, eine Rolle im Rahmen der Metastasierung in die Submucosa zu spielen (3,30). uPA ist außerdem in der Lage, die bereits beschriebene Metalloprotease MMP-9 zu aktivieren (30).

Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Tumorzellen ist ein wichtiger Faktor bei der Metastasierung des Tumors. Die Bedeutung von NF- κ B-regulierten Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“), VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1“) und ELAM-1 („endothelial leukocyte adhesion molecule“) wurde dabei in verschiedenen Studien belegt (62).

Die Onkogenese erweist sich als ein sehr komplexer Prozess und das Verständnis für die molekularen Vorgänge, die zur Tumorbildung führen, nimmt stetig zu. Zahlreiche Studien deuten daraufhin, dass die Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie eine zentrale Schaltstelle im Rahmen der Genese vieler Tumoren einnehmen. Eine Dysregulation des NF- κ B-Systems in AML führt möglicherweise zu einer gesteigerten Expression NF- κ B-regulierter Proteine, die in den myeloischen Zellen für antiapoptotische Proteine, Zytokine sowie Proteasen kodieren. Aus diesem Grund stellt das NF- κ B/Rel-System einen potentiellen Ansatzpunkt für adjuvante Behandlungsstrategien in Ergänzung zur Chemotherapie der AML dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Studien der vergangenen Jahre zeigen eine zentrale Bedeutung von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie bei malignen Prozessen. Diese Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung des NF- κ B-Systems bei akuter myeloischer Leukämie (AML) unter besonderer Berücksichtigung des IKK-Komplexes.

Ein zentraler Punkt der vorliegenden Experimente war, den Aktivierungsstatus von NF- κ B sowie des IKK-Komplexes bei AML zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine erhöhte NF- κ B-Aktivität im Zellkern myeloischer Blasten nachgewiesen werden. Die Analyse der NF- κ B-Dimere erbrachte ein Überwiegen von p50/p65, in einigen Fällen der M1-AML konnte aber auch die Anwesenheit von RelB und c-Rel nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich in den Blasten von AML-Patienten eine erhöhte IKK-Aktivität gegenüber den entsprechenden Kontrollen. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen Blasten aus peripherem Blut bzw. Knochenmark. Die Auswertung der IKK-Proteinkonzentrationen brachte keine signifikanten Unterschiede zwischen AML-Blasten und Kontrollen hervor. Beim Vergleich der AML-Subtypen untereinander, wurden in M4- und M5-Proben eine stärker ausgeprägte NF- κ B-Aktivierung sowie eine höhere IKK-Aktivität als in Proben der Subtypen M1 und M2 beobachtet. In isolierten AML-Blasten zeigte sich nach Kultivierung *ex vivo* und anschließend exogener Stimulation mit TNF oder LPS eine verstärkte IKK-Aktivität, eine Degradierung von I κ B, sowie eine zusätzliche Aktivierung von NF- κ B. Die Vorbehandlung isolierter AML-Blasten mit dem Proteasominhibitor PSI führte zur Inhibierung des NF- κ B-Systems.

Die Ergebnisse dieses Projektes weisen auf eine Dysregulation IKK-assoziiierter Signalübertragung bei AML und eine daraus resultierende erhöhte NF- κ B-Aktivität hin. Es ist denkbar, dass sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit richtungsweisende Ansatzpunkte für diagnostische und/oder therapeutische Konzepte für AML aber auch für andere maligne Erkrankungen eröffnen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Agou F, Ye F, Goffinon S, Courtois G, Yamaoka S, Israel a, Veron M. NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem* 2002; **277**: 17464-17475.
2. Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 277-290.
3. Aref S, El-Sherbiny M, Mabed M, Menessy A, El-Refaei M. Urokinase plasminogen activator receptor and soluble matrix metalloproteinase-9 in acute myeloid leukemia patients: a possible relation to disease invasion. *Hematology* 2003; **8**: 385-391.
4. Arsura M, Mercurio F, Oliver AL, Thorgeirsson SS, Sonenshein GE. Role of the I κ B kinase complex in oncogenic Ras- and Raf-mediated transformation of rat liver epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 5381-5391.
5. Asaka M, Takeda H, Sugiyama T, Kato M. What role does Helicobacter pylori play in gastric cancer? *Gastroenterology* 1997; **113**: 56-60.
6. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996; **87**: 13-20.
7. Baeuerle PA und Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 141-179.
8. Baichwal VR, Baeuerle PA. Apoptosis: Activate NF- κ B or die? *Current Biology* 1997; **7**: R94-R96.
9. Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649-681.
10. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest* 2001; **14**: 649-681.
11. Baldwin AS. The transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 2001; **107**: 3-6.
12. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**: 135-141.

13. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation in cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; **357**: 539-545.
14. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer RD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dörken B. Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2961-2969.
15. Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer HD, Scheidereit C, Dörken B. High-level nuclear NF- κ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 1996; **87**: 4340-4347.
16. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6910-6924.
17. Barnes PJ und Karin M. Nuclear factor- κ B- a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Eng J Med* 1997; **336**: 1066-1071.
18. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 372-377.
19. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Eng J Med* 1996; **334**: 1717-1725.
20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985; **103**: 620-625.
21. Berger DP, Engelhardt R und Mertelsmann R. Das rote Buch. Hämatologische und internistische Onkologie. Verlag ecomed. 1. Auflage. 1998.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; **72**: 248-254.
23. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 1901-1909.

24. Brand K, Mackman N, Curtiss LK. Interferon- γ inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2031-2039.
25. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1715-1722.
26. Brand K, Page S, Walli AK, Neumeier D, Baeuerle PA. Role of nuclear factor- κ B in atherogenesis. *Experimental Physiology* 1997; **82**: 297-304.
27. Burnett AK, Eden OB. The treatment of acute leukemia. *Lancet* 1997; **349**: 270-275.
28. Cao Y, Bonizzi G, Seagroves TN, Green FR, Johnson R, Schmidt EV und Karin M. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 2001; **107**: 763-775.
29. Classen M, Diehl V und Kochsiek K. Innere Medizin. Verlag Urban & Schwarzenberg, München. 4. Auflage. 1998.
30. Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop* 2003; **415**: S46-S58.
31. Cogswell PC, Guttridge DC, Funkhouser WK, Baldwin Jr AS. Selective activation of NF- κ B subunits in human breast cancer: potential roles for NF- κ B2/p52 and for Bcl-3. *Oncogene* 2000; **19**: 1123-1131.
32. Creutzig U, Ritter J und Schellong G. Identification of two risk groups in childhood acute myelogenous leukemia after therapy intensification in the study AML-BFM 83 as compared with study AML-BFM 78. *Blood* 1990; **75**: 1932-1949.
33. Devalaraja MN, Wang DZ, Ballard DW, Richmond A. Elevated constitutive I κ B kinase activity and I κ B- α phosphorylation in Hs294T melanoma cells lead to increased basal MGSA/GRO- α transcription. *Cancer Res* 1999; **59**: 1372-1377.
34. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E und Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* 1997; **388**: 584-554.

-
35. Dokter WHA, Tuyt L, Sierdsema SJ, Esselink MT, Vellenga E. The spontaneous expression of interleukin-1 β and interleukin-6 is associated with spontaneous expression of AP-1 and NF- κ B transcription factor in acute myeloblastic leukemia cells. *Leukemia* 1995; **9**: 425-432.
36. Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss HD, Jundt F, Mathas S, Krappmann D, Scheidereit C, Stein H, Dörken B. 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* 1999; **94**: 3129-3134.
37. Estrov Z, Manna SK, Harris D, Van Q, Estey EH, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB. Phenylarsine oxide blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, and induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 1999; **94**: 2844-2853.
38. Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Aggarwal BB. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2003; **102**: 987-995.
39. Faderl S, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces antiapoptotic and proapoptotic signals in acute myeloid leukemia. *Blood* 2003; **102**: 630-637.
40. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL und Logo DL. Harrison`s Principle of Internal Medicine. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York. 14.Auflage. 1998.
41. Fischer C, Page S, Weber M, Eisele T, Neumeier D, Brand K. Different effects of LPS and TNF on monocytic IKK signalsome activation and I κ B proteolysis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 24625-24632.
42. Geleziunas R, Ferrell S, Lin X, Mu Y, Cunningham ET, Grant M, Connelly MA, Hambor JE, Marcu KB, Greene WC. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF- κ B involves activation of the I κ B kinase α (IKK α) and IKK β cellular kinases. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5157-5165.

43. Ghosh S und Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; **109**: S81-S96.
44. Ghosh S, May MJ und Kopp EB. NF-kappaB and REL proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune response. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 225-260.
45. Gilmore TD, Koedood M, Piffat K und White DW. Rel/NF- κ B/I κ B proteins and cancer. *Oncogene* 1996; **13**: 1367-1378.
46. Greer JP, Baer MR, Kinney MC. Acute myelogenous leukemia. In: Lee G, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Rodgers G, eds. Wintrobe`s Clinical Hematology 10th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1998; pp: 2272-2319.
47. Grilli M, Jason JS und Lenardo MJ. NF- κ B and Rel: Participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 1993; **143**: 1-62.
48. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT. Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 2001; **98**: 2301-2307.
49. Herold G. Innere Medizin. Eigenverlag 2001.
50. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K und Karin M. IKK- α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* 2001; **410**: 710-714.
51. Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 129-133.
52. Israel A. A regulator branches out. *Nature* 2003; **423**: 596-597.
53. Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, Herr I, Wirth T, Debatin KM. Inhibition of nuclear factor κ B activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 1998; **91**: 4624-4631.
54. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 621-663.
55. Karin M und Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunol.* 2002; **3**: 221-226.
56. Kimby E, Nygren P und Glimelius B. A systemic overview of chemotherapy effects in acute myeloid leukemia. *Acta Oncol* 2001; **40**: 231-252.

-
57. Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C. Transcription factor NF- κ B is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 2000; **14**: 399-402.
 58. Krappman D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dörken B, Scheidereit C. Molecular mechanisms of constitutive NF- κ B/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 1999; **18**: 943-953.
 59. Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor κ B binding sites. *J Exp Med* 1991; **174**: 1517-1526.
 60. May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, Glockner J, Pober JS, Ghosh S. Selective inhibition of NF- κ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I κ B kinase complex. *Science* 2000; **289**: 1550-1554.
 61. May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappaB and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 63-73.
 62. Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF- κ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; **1470**: M55-M62.
 63. McKenna RW. Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clinical Chemistry* 2000; **46**: 1252-1259.
 64. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 1997; **278**: 860-866.
 65. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto, N. Constitutive activation of NF-kappa B in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1999; **93**: 2360-2368.
 66. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. 8. Auflage 2001.

-
67. Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A, Cammer M, Chan A, Symons M, Stanley ER, Pestell RG. Cyclin d1 govern adhesion and motility of macrophages. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 2005-2015.
68. O'Byrne KJ, Dalgleish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000; **36**: 151-169.
69. Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn M, Ziegler-Heitbrock HWL, Neumeier D, Brand K. 4-Hydroxynonenal prevents NF- κ B activation and TNF expression by inhibiting I κ B phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11611-11618.
70. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/ NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6853-6866.
71. Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: Biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000; **119**: 1148-1157.
72. Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Huxford T und Ghosh G. Mechanism of I κ B α binding to NF- κ B dimers. *J Biol Chem* 2000; **275**: 29840-29846.
73. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; **18**: 6938-6947.
74. Ritter J. Acute myeloid leukemias. *Eur J Cancer* 1998; **34**:862-872.
75. Romano MF, Lamberti A, Bisogni R, Tassone P, Pagnini D, Storti G, Del Vecchio L, Turco MC, Venuta S. Enhancement of cytosine arabinoside-induced apoptosis in human myeloblastic leukemia cells by NF-kappa B/Rel-specific decoy oligodeoxynucleotides. *Gene Ther* 2000; **7**: 1234-1237.
76. Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G und Karin M. IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 1998; **395**: 297-300.
77. Sanceau J, Boyd DD, Seiki M, Bauvois B. Interferons inhibit tumor necrosis factor- α -mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002; **277**: 35766-35775.

-
78. Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, Ma W, Seki N, Raziuddin A, Blazar BR, Zhang X, Elliott PJ, Murphy WJ. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* 2003; **102**: 303-310.
 79. Scheidereit C. Signal transduction: Docking NF- κ B kinases. *Nature* 1998; **395**: 225-226.
 80. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; **64**: 51-68.
 81. Siebenlist U, Franzoso G und Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; **10**: 405-455.
 82. Stancovski I und Baltimore D. NF- κ B activation: The I κ B kinase revealed? *Cell* 1997; **91**: 299-302.
 83. Sun SC, Ballard DW. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene* 1999; **18**: 6948-6958.
 84. Tak PP und Firestein GS. NF- κ B: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; **107**: 7-11.
 85. Takaoka A, Taniguchi T. New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci* 2003; **94**: 405-411.
 86. Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C. Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2029-2041.
 87. Thanos D, Maniatis T. NF- κ B: A lesson in family values. *Cell* 1995; **80**: 529-532.
 88. Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P und Ghosh S. I κ B- β regulates the persistence response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell* 1995; **80**: 573-582.
 89. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Pieters R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2003; **17**: 17-25.

-
90. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; **26**: 171-176.
91. Uno K, Inukai T, Kayagaki N, Goi K, Sato H, Nemoto A, Takahashi K, Kagami K, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K, Koyama-Okazaki T, Suzuki T, Sugita K, Nakazawa S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Blood* 2003; **101**: 3658-3667.
92. Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR und Israel A. IkappaB epsilon, a novel member of the IκB family, controls RelA and cRel NF-κB activity. *EMBO J* 1997; **16**: 1413-1426.
93. Whiteside ST, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 75-82.
94. Wood KM, Roff M, Hay RT. Defective IκBα in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-κB. *Oncogene* 1998; **16**: 2131-2139.
95. Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 1997; **278**: 866-869.
96. Wu WS, Xu ZX, Chang KS. The promyelocytic protein represses A20-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31734-31739.
97. Wuchter C, Krappmann D, Cai Z, Ruppert V, Scheidereit C, Dörken B, Ludwig W-D, Karawajew L. *In vitro* susceptibility to TRAIL-induced apoptosis of acute leukemia cells in the context of TRAIL receptor gene expression and constitutive NF-κB activity. *Leukemia* 2001; **15**: 921-928.
98. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-κB/Rel and IκB gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996; **74**: 749-769.
99. Yamamoto Y. und Gaynor R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; **107**: 135-142.

100. Zandi E und Karin M. Bridging the gap: Composition, regulation and physiological function of the I κ B kinase complex. *Mol Cell Biol* 1999; **19**:4547-4551.
101. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M und Karin M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 1997; **91**: 243-252.

7 ANHANG

7.1 Publikationen

1. Page S, Fischer C, Baumgartner B, Haas M, Kreusel U, Loidl G, Hayn M, Ziegler-Heitbrock HWL, Neumeier D und Brand K. 4-Hydroxynonenal prevents NF- κ B activation and TNF expression by inhibiting I κ B phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**:11611-11618.
2. Brand K, Fischer C, Donath B, Baumgartner B und Neumeier D. Dysregulation des NF- κ B-Systems bei Arteriosklerose. *Die Medizinische Welt* 1999; **50**:316-320.
3. Bell SA, Page S, Baumgartner B, Berking C, Haas M, Eisele T, Neumeier D und Brand K. Involvement of nuclear factor- κ B in a murine model for the acute form of autoimmune-like Toxic oil Syndrom. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999; **157**:213-221.
4. Baumgartner B*, Weber M*, Quirling M, Fischer C, Page S, Adam M, von Schilling C, Waterhouse C, Schmid C, Neumeier D und Brand K. Increased I κ B kinase activity is associated with activated NF- κ B in myeloid blasts. *Leukemia* 2002; **16**: 2062-2071.

* geteilte Erstautorschaft

7.2 Lebenslauf

Bastian Andreas Johannes Baumgartner

Schulbildung

1981 – 1985	Besuch der Grundschule Velburg
1985 – 1994	Besuch des Gymnasiums Parsberg; Abitur (Leistungskurse Französisch/Geschichte)

Wehrdienst

07/1994 – 06/1995	Wehrdienst in Traunstein/Oberbayern
-------------------	-------------------------------------

Studium

1995 – 1997	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
09/1997	Ärztliche Vorprüfung und Wechsel an die Technische Universität (TU) München
03/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000 – 09/2001	Praktisches Jahr Tertial Chirurgie/ Barmherzige Brüder München Tertial Innere Medizin/ Klinikum Passau Tertial Pädiatrie/ Kinderklinik Dritter Orden Passau
11/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeiten

03/2002 – 09/2003	Arzt im Praktikum an der Kinderklinik Dritter Orden Passau
Seit 10/2003	Assistent an der Kinderklinik St. Marien in Landshut

Studienbegleitende Tätigkeiten	
	Famulaturen
03/1998	Innere Medizin im KKH Parsberg
09/1998	Chirurgie in Isoir/Frankreich
08/1999	Klinische Chemie/Immunologie/Hämatologie an TU München
10/1999	Dermatologie und Allergologie am Biederstein TU München
03/2000	Innere Medizin im KKH Parsberg
	Nebentätigkeiten
1996/1997	Hilfswissenschaftlicher Assistent am Institut für Anatomie der Universität Regensburg bei Prof. Wrobel
Weiterbildungen	
	Asthmaschulung in Gaißach
	Grundkurs Sonographie bei Prof. Dr. Kellnar in München
	Grund- und Spezialkurs Strahlenschutz in Passau (Erwerb der Fachkunde)
	EEG-Kurs bei Prof. Dr. Staudt, Kinderklinik Passau
	Kompaktkurs Notfallmedizin in Weiden
	Neuropädiatrische Ausbildung am Dr. v. Haunerschen Kinderspital bei Prof. Dr. Heinen, München
Doktorarbeit	
1998 – 2004	Dysregulation des NF- κ B-Systems bei akuter myeloischer Leukämie am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, TU München
Interessen, Hobbies	
1981 – 1992	Besuch der privaten Musikschule Parsberg (Instrumente: Akkordeon, Tenorhorn, Kirchenorgel und Klavier)
1992 bis 1993	Besuch der Kirchenmusikschule Regensburg, D-Schein für nebenberuflichen Kirchenorganist
Seit 1988 bzw. 1994	Ehrenamtliche Tätigkeit als Organist und Chorleiter, Mitglied im Vokalensemble Laaber
Sprachkenntnisse	
	Englisch, Französisch