B. Hirsch¹ · F.K. Braun² · N. Al-Yacoub² · C. Assaf² · M.E. Kadin³ · W. Sterry² · J. Eberle² · H. Dürkop¹

¹ Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin

² Hauttumorzentrum Charité, Campus Charité Mitte, Berlin

³ Dept. of Dermatology and Skin Surgery, R.W. Medical Center, Providence RI, USA

Kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom

Apoptoseresistenz durch CD30-induzierte cFLIP-Expression

CD30 und CD95 gehören zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) Rezeptoren. Sie werden auf den Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) und des systemischen bzw. kutanen anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphoms (sALCL bzw. cALCL) exprimiert. Im normalen lymphatischen Gewebe sind lediglich wenige aktivierte Lymphozyten CD30-positiv [1]. Aufgrund seiner nahezu selektiven Expression eignet sich CD30 sehr gut als therapeutische Zielstruktur [2]. Die Kenntnis der Effekte, die durch die CD30-Aktivierung ausgelöst werden, ist allerdings eine weitere Grundvoraussetzung für diese Anwendung.

An sALCL-Zelllinien wurde bereits gezeigt, dass die Ligation des CD30-Rezeptors zum Zellzyklusarrest und zum Überleben der Zelle führt [3, 4]. Über den CD30-Stimulus wird bei sALCL-Zellen sowohl der kanonische als auch der nichtkanonische NF- κ B- („nuclear factor kappa B“-) Weg aktiviert. Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges ist durch die Degradation des Inhibitors I κ Ba gekennzeichnet. I κ Ba hält im unstimulierten Zustand die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 im Zytoplasma. Der CD30-Stimulus führt zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und nachfolgenden proteasomalen Degradation von I κ Ba, wodurch die Translokation von p50 und p65 in den Zellkern mit entsprechender Genaktivie-

rung erfolgt. CD30-Stimulation führt ferner zur Aktivierung des NIK-vermittelten nichtkanonischen NF- κ B-Weges mit Prozessierung von p100 zu p52 [4].

CD95-Stimulation führt bei CD95-responsiven Zellen zur Multimerisierung des Rezeptors und zur Formation eines „todesinduzierenden Signalkomplexes“ (DISC), der das Adapterprotein FADD enthält und über den es zur Autoaktivierung der proapoptotischen Initiator-Caspasen 8 und 10 kommt. Bei der DISC-Formation ist ferner cFLIP beteiligt, ein katalytisch inaktives Procaspase-8/10-Homolog, welches mit Caspase-8 um den Einbau in den DISC kompetitiert und gegen die Apoptoseauslösung wirkt [5]. Es wurden 3 Splice-Varianten von cFLIP identifiziert: cFLIP_(long), cFLIP_(short) und cFLIP_(R). Für alle 3 Formen ist eine antiapoptotische Funktion beschrieben [6]. Die Initiator-Caspasen aktivieren Effektor-Caspasen, insbesondere Caspase-3, die den Abbau einer Vielzahl essenzieller Zellbestandteile vornimmt, was zum Zelltod führt [7].

Viele hämatologische Tumoren sowie sALCL-Zelllinien sind durch CD95-Resistenz gekennzeichnet ([8], und eigene unveröffentlichte Untersuchungen). Im Gegensatz zu den hier analysierten cALCL-Zelllinien können bei sALCL-Zelllinien keine „CD30/CD95-crosstalk-Versuche“ durchgeführt werden, da der CD95-Signalweg blockiert ist.

Ergebnisse

CD30-Stimulation führt in cALCL-Zellen zur NF- κ B-Aktivierung und cFLIP-Induktion, CD95-Stimulation löst Caspase-Aktivierung und Apoptose aus

Die Oberflächenexpression von CD30 und CD95 wurde bei den 4 cALCL-Zelllinien (JK, Mac-1, Mac-2A, Mac-2B) durchflusszytometrisch gesichert (■ Abb. 1 a, ■ Abb. 2 a).

Die CD30-vermittelte Aktivierung von NF- κ B wurde mittels Immunoblot analysiert. 30 min CD30-Stimulation führt bei den 4 Linien zur Degradation des NF- κ B-Inhibitors I κ Ba und damit zur Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges (■ Abb. 1 b, oberer Teil). Die Prozessierung von p100 zu p52 spiegelt die Aktivierung des nichtkanonischen NF- κ B-Weges in den 4 cALCL-Zelllinien nach 16-stündiger CD30-Stimulation (■ Abb. 1 b, unterer Teil) wider. Die Expression von 4 bekannten CD30-regulierten Genen (cFLIP, TRAF1, cIAP2 und A20) wurde mittels RQ-RT-PCR („real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction“) mit und ohne CD30-Stimulation bestimmt. Bei allen 4 Zelllinien konnte eine signifikante CD30-vermittelte Induktion dieser Gene dargestellt werden (■ Abb. 1 c). Es konnte eine massive

cFLIP-Expressionssteigerung auf Proteinebene nach 16-stündiger CD30-Stimulation mittels Immunoblot in den 4 cALCL-Zelllinien nachgewiesen werden (■ **Abb. 1 d**).

Die durch CD95-Stimulation vermittelte Caspase-8- und Caspase-3-Aktivierung wurde mithilfe von Immunoblot-Analysen dargestellt. Die Zugabe des CD95-agonistischen CH11-Antikörpers (50 ng/ml) induziert nach 8 Stunden bei den 4 cALCL-Zelllinien eine Caspase-8- und -3-Aktivierung (■ **Abb. 2 b**). Die durchflusszytometrische Analyse (Annexin-V/PI) belegt die CD95-induzierte Apoptose (■ **Abb. 2 c**).

CD30/CD95-Kostimulation und cFLIP-Inhibition an der cALCL-Zelllinie Mac-2B

Um die intrazellulären Effekte und Auswirkungen der CD30-Stimulation beschreiben zu können, haben wir CD30/CD95-Kostimulationen an der cALCL-Zelllinie Mac-2B durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst 16 Stunden CD30-stimuliert, anschließend folgte eine CD95-Stimulation von 8 Stunden. Von den CD30-, CD95- und CD30/CD95-stimulierten Zellen sowie den unstimulierten Kontrollzellen wurden Proteinlysate hergestellt und cFLIP, Caspase-8 und Caspase-3 mittels Immunoblot analysiert. Die GAPDH- (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-) Expression diente als endogene, nichtregulierte Kontrolle.

Konstitutiv exprimiertes cFLIP (■ **Abb. 3 a, Spur 1**) wird im Zuge der 8-stündigen CD95-Stimulation komplett degradiert (■ **Abb. 3 a, Spur 2**). Caspase-3 und Caspase-8 werden durch den CD95-Stimulus aktiviert, was durch das Auftreten der 17-kDa-Bande im Falle der Caspase-8 und 17/19-kDa-Banden im Falle der Caspase-3 dargestellt ist (■ **Abb. 3 a, Spur 2**). 16 Stunden CD30-Stimulation führt zur signifikanten Expressionssteigerung von cFLIP, ohne dass sich die Caspase-8- oder Caspase-3-Aktivität verändert (■ **Abb. 3 a, Spur 3**). Die Kombination von CD30-Stimulation, gefolgt von einer CD95-Stimulation führt dazu, dass cFLIP nicht vollständig degradiert wird, wie es durch alleinige CD95-Stimulation der Fall ist. Die Aktivität der Caspase-8

Pathologie 2010 · [Suppl 2] 31:193–198 DOI 10.1007/s00292-010-1372-4
© Springer-Verlag 2010

B. Hirsch · F.K. Braun · N. Al-Yacoub · C. Assaf · M.E. Kadin · W. Sterry · J. Eberle · H. Dürkop
**Kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom.
Apoptoseresistenz durch CD30-induzierte cFLIP-Expression**

Zusammenfassung

Die Stimulation der TNF-Rezeptoren CD30 und CD95 induziert gegensätzliche Effekte. CD30- und CD95-induzierte Effekte sind bei kutanen ALCL- (cALCL-) Zellen bisher nicht beschrieben. Wir haben daher an cALCL-Zelllinien untersucht, ob CD30- und CD95-stimulierbar sind und ob CD30-Stimulation die CD95-Signaltransduktion beeinflusst.

Die Zellen wurden CD30/CD95-stimuliert bzw. CD30/CD95-kostimuliert und die mRNA von CD30-induzierbaren Genen (cFLIP, TRAF1, cIAP2 und A20) mittels semi-quantitativer („real-time“) PCR nach reverser Transkription (RQ-RT-PCR) sowie auf Proteinebene (IκBα, p100/p52, Caspase-8, -3 und cFLIP) mithilfe von Immunoblots analysiert. cFLIP wurde durch den Einsatz lentiviral-basierender, shRNA-Technik inhibiert. Die Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Wir zeigen, dass CD30-Stimulation von cALCL-Zellen zur NF-κB-Aktivierung und cFLIP-Expression, CD95-Stimulation hingegen zur Apoptoseinduktion führt. CD30-Vorstimulation inhibiert CD95-getriebene Apoptose. Dieser Effekt wird, wie wir mittels cFLIP-siRNA-Experimente zeigen konnten, über CD30-induziertes cFLIP vermittelt.

Unsere Versuche demonstrieren den starken antiapoptotischen Effekt, der durch CD30-Stimulation erzielt wird. Bei der Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze mit CD30-Antikörpern bei ALCL-Lymphomen sollte der antiapoptotische Effekt dieser Antikörper berücksichtigt werden.

Schlüsselwörter

CD30 · Signaltransduktion · „Nuclear factor kappa B“ · cFLIP · Anti-apoptotisch

cFLIP diminishes CD95-induced apoptosis of CD30-stimulated cutaneous anaplastic large T cell lymphoma (cALCL) cells

Abstract

Stimulation of the TNF receptors CD30 and CD95 exerts opposite effects. Crosstalk of both receptors is unknown. We aimed to reveal regulatory mechanisms of CD30-induced effects on CD95 signaling of cALCL cell lines.

“CD30/CD95 crosstalk analysis” was performed in cALCL cell lines by comparison of CD30 or CD95 stimulation and CD30/CD95 costimulation. Receptor expression and induction of apoptosis was investigated by flow cytometry. mRNA expression of CD30-inducible genes (cFLIP, TRAF1, cIAP2, and A20) was compared by semiquantitative reverse transcription (RT-RQ-) PCR in stimulated and unstimulated cells. Protein expression of IκBα, p100/p52, caspase-8, caspase-3, and cFLIP was analyzed by immunoblotting. A lentiviral-based shRNA-mediated approach was used to inhibit cFLIP expression.

CD30/CD95 crosstalk experiments revealed that CD30 ligation leads to NFκB-mediated cFLIP upregulation in cALCL cells, which in turn enhanced resistance to CD95-mediated apoptosis. This effect is based on the CD30-induced upregulation of cFLIP. Knockdown of cFLIP restores sensitivity to CD95-mediated apoptosis.

We conclude that the anti-apoptotic function of CD30 antibodies should be kept in mind if CD30 antibody-based therapeutic concepts for ALCL lymphoma are considered.

Keywords

CD30 · Signal transduction · “Nuclear factor kappa B” · cFLIP · Anti-apoptotic

Abb. 3 ▲ CD30/CD95-Kostimulation und RNAi-vermittelte Inhibition von cFLIP in der cALCL-Zelllinie Mac-2B. Die cALCL-Zelllinie Mac-2B wurde CD30-, CD95- und CD30/CD95-stimuliert und anschließend mittels Immunoblot und Durchflusszytometrie untersucht. Die Proteinlysate der mit einem isotypspezifischen Kontrollantikörper (IgG₃, 500 ng/ml) behandelten Zellen (**a**, Spur 1), 8 Stunden CD95-stimulierter Zellen (**a**, Spur 2, CH11 10 ng/ml), 16 Stunden CD30-stimulierter Zellen (**a**, Spur 3, Ki-1 500 ng/ml) sowie der 16 Stunden CD30-stimulierter und 8 Stunden CD95-stimulierter Zellen (**a**, Spur 4, Ki-1 500 ng/ml, CH11 10 ng/ml) wurden mittels cFLIP-, Caspase-8-, Caspase-3-, GAPDH-Antikörper analysiert. Die Analyse der GAPDH-Expression diente als endogene Kontrolle. Konstitutiv exprimiertes cFLIP (**a**, Spur 1) wird durch 8-stündige CD95-Stimulation komplett degradiert (**a**, Spur 2). 16 Stunden CD30-Stimulation führt zur signifikanten Expressionssteigerung von cFLIP_(long) ohne Beeinflussung der Caspase-8 oder -3 (**a**, Spur 3). Die Kombination von CD30-Stimulation, gefolgt von einer CD95-Stimulation, führt lediglich zu einer partiellen cFLIP-Degradation. Der CD30-Stimulus inhibiert die CD95-vermittelte cFLIP_(long)-Degradation (Vergleich **a**, Spur 2 gegen Spur 4). Unter diesen Bedingungen werden deutlich inhibierte Banden für aktive Caspase-8 und Caspase-3 detektiert (**a**, Spur 4). Die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose ist in **b** dargestellt. cFLIP wurde durch den Einsatz lentiviral-basierender shRNA-Technik inhibiert und anschließend Stimulationsexperimente und Analysen analog der nativen Zellen durchgeführt. Die Analyse der cFLIP-inhibierten, CD30/CD95-stimulierten Zellen ist in **a** (Spur 5 und 6) sowie **b** (Spur 5) wiedergegeben. Ein repräsentativer cFLIP_(long) Immunoblot von Kontrollvektor- („mock“; **c**, Spur 1), „scrambled^{RNAi}“ (**c**, Spur 2) und cFLIP^{RNAi}-behandelter Mac-2B Zellen ist dargestellt (**c**, Spur 3). (Aus [14], mit freundl. Genehmigung der Nature Publishing Group)

und Caspase-3 wird deutlich inhibiert (**Abb. 3a**, Spur 4).

Die Apoptoseinduktion wurde durchflusszytometrisch bestimmt (**Abb. 3c**). Die konstitutive Apoptoserate liegt bei etwa 4%. Der CD95-Stimulus induziert Apoptose, und es werden etwa 37% Annexin-V/PI-positive Zellen gemessen (**Abb. 3b**, Spur 2). CD30-Stimulation allein beeinflusst die konstitutive Apoptose nicht (**Abb. 3b**, Spur 3). Die Kombination von CD30-Stimulation, gefolgt von der CD95-Stimulation führt zu einer fast vollständigen Inhibition (etwa 7%) der Apoptoserate (**Abb. 3b**, Spur 4). Um die Bedeutung der CD30-induzierten cFLIP-Expression zu analysieren, haben wir cFLIP durch den Einsatz lentiviral-basierender shRNA-Technik inhibiert und anschließend Stimulationsexperimente und Analysen wie zuvor bei den nativen Zellen durchgeführt (**Abb. 3b**). Die cFLIP_(long)-Protein-Expression wird durch cFLIP^{RNAi} signifikant inhibiert und die Immunoblot-Analyse zeigt eine deutlich schwächere cFLIP_(long)-Bande als in den Lysaten der mit dem leeren Vektor transfizierten („mock“) und mit nichtfunktioneller RNAi-behandelten Zellen („scrambled^{RNAi}“; **Abb. 3c**). Bei den cFLIP-inhibierten, CD30/CD95-stimulierten Zellen, kommt der CD30-vermittelte antiapoptotische Effekt, der bei den nativen Zellen zur Caspase-8- und Caspase-3-Inhibition führt, nicht zum Tragen (**Abb. 3a**, Vergleich Spur 4 und 6). Ferner lässt sich die Wiederherstellung der CD95-Sensitivität nach cFLIP-Inhibition gut auf zellulärer Ebene darstellen. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt eine signifikante Induktion von Apoptose nach CD30/CD95-Stimulation, in den cFLIP-inhibierten Zellen (**Abb. 3b**, Spur 5).

Diskussion

CD30 eignet sich aufgrund seiner relativ selektiven Expression grundsätzlich sehr gut als therapeutische Zielstruktur [2, 9], wobei die Kenntnis der Effekte, die durch CD30-Aktivierung ausgelöst werden, eine Grundvoraussetzung für diese Anwendung ist.

cALCL-Zelllinien zeichnen sich neben CD30-Responsivität durch CD95-Sensi-

tivität aus, d. h. CD95-Stimulation führt über Caspase-8- und Caspase-3-Aktivierung zum Zelltod. Aufgrund dieser Bedingungen waren wir in der Lage „CD30/CD95-cross-talk-Versuche“ an cALCL-Zellen durchführen zu können, was durch die CD95-Resistenz bei sALCL-Zellen nicht möglich ist. Mithilfe des experimentellen Designs der CD30/CD95-Kostimulation von ALCL-Zellen konnten wir CD30-Antikörper-vermittelte antiapoptotische Effekte darstellen, die Relevanz für CD30-Antikörper-basierende therapeutische Konzepte haben.

Unsere Analysen stellen die CD30-induzierte Aktivierung einer antiapoptotischen Signalkaskade in cALCL-Zelllinien dar. Der CD30-Stimulus führt bei cALCL-, analog der sALCL-Zelllinien [4], zur Aktivierung der beiden NF- κ B-Wege. CD30-ausgelöste NF- κ B-Aktivierung führt zur cFLIP_(long)-Induktion, wodurch Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose vermittelt wird. Ein Schema dieser CD30-induzierten Effekte ist in **Abb. 4** dargestellt. Wir haben uns bei der Immunoblotanalyse auf cFLIP_(long) konzentriert, dessen Expression und antiapoptotische Bedeutung *in vivo* beschrieben ist [6]. An Hodgkin-Zelllinien konnte Mathas et al. den antiapoptotischen Effekt von cFLIP auf das CD95-Signal darstellen [10]. In Hodgkin-Zelllinien ist cFLIP allerdings nicht wie in den hier untersuchten cALCL Zelllinien durch CD30-Ligation zu stimulieren [4].

Durch den Einsatz lentiviral-basierender shRNA-Technik konnten wir cFLIP inhibieren und so dessen zentrale Rolle für die CD30-induzierte antiapoptotische Wirkung aufzeigen. Obgleich für cFLIP sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte beschrieben wurden [6, 11], konnten wir unter den Versuchsbedingungen bei den cALCL-Zelllinien lediglich einen antiapoptotischen Effekt, d. h. die Rückführung der CD95-Sensitivität nach cFLIP-Inhibition darstellen.

Die auf der Anwendung von CD30-Antikörpern basierenden therapeutischen Konzepte zur Behandlung CD30-positiver Lymphome ergaben bisher ernüchternde Ergebnisse, wohingegen z. B. Immunotoxin-konjugierte CD30-Antikörper vielversprechendere Resultate lieferten [12]. Unsere Daten zeigen, dass die al-

Abb. 4 ▲ CD30-induziertes cFLIP inhibiert die CD95-induzierte Apoptose bei cALCL-Zelllinien. Ligation des CD30-Rezeptors durch den CD30-Liganden oder den agonistischen CD30-Antikörper Ki-1 führt zur Multimerisierung der CD30-Rezeptoren. Die Folge ist die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges. Diese kann über die Degradation des zytoplasmatischen NF- κ B-Inhibitors IκBα bestimmt werden. Es kommt ferner zur CD30-vermittelten Initiierung des nichtkanonischen NF- κ B-Weges, dessen Aktivierung durch die p100/p52-Prozessierung gekennzeichnet ist. Die NF- κ B-Aktivierung führt u. a. zur Expressionssteigerung des antiapoptotisch wirkenden Proteins cFLIP. Erfahren CD30-vorstimulierte Zellen eine CD95-Aktivierung, so wirkt das CD30-induzierte cFLIP inhibierend auf die CD95-induzierbare Apoptose. cFLIP kompetitiert mit Caspase-8 am CD95-Rezeptor und bewirkt sowohl die Inhibition der Initiator-Caspase-8 als auch die Inhibition der exekutierenden Caspase-3. (Aus [14], mit freundl. Genehmigung der Nature Publishing Group)

leinige CD30-Stimulation keinen therapeutischen Nutzen für cALCL-Zellen vermitteln würde. Interessanterweise führt die Inhibition von NF- κ B zur Induktion von CD30-induzierter Apoptose, wie an sALCL- und cHL-Zelllinien gezeigt werden konnte [4, 13].

Fazit: Die Apoptoseresistenzinduktion ist bei der Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen mit CD30-Antikörpern limitierend. Ihr kann möglicherweise nur durch gleichzeitige pharmakologische Inhibition der NF- κ B-Aktivierung begegnet werden.

Material und Methoden

Zellkultur

Die cALCL-Zelllinien JK, Mac-1, Mac-2A und Mac-2B wurden unter Standardbedingungen kultiviert [14].

Rezeptorstimulation

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^5 /ml Medium kultiviert. Nach 24 Stunden wurde für 16 Stunden CD30-stimuliert (Ki-1, 0,5 mg/ml, selbst produziert [4]) bzw. mit dem IgG₃-Kontrollantikörper (Sigma, Taufkirchen, Deutschland, FLOPC 21, 0,5 mg/ml) behandelt. Die CD95-Stimulation (CH11, Beckman Coulter, Krefeld, Germany; 10/100 ng/ml) wurde nachfolgend für 8 Stunden durchgeführt. Von den behandelten Zellen wurde RNA und Proteinlysate für RT-PCR und Immunoblot isoliert. Die Bestimmung der apoptotischen und toten Zellen erfolgte mit dem „Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I“ (BD Biosciences Pharmingen, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland). Die Apoptose und die Bestimmung der CD30- und CD95-Expression (Ber-H2, DAKO, Hamburg, Deutschland bzw. CH11) wurde durchflusszyto-

metrisch (FACSort/CellQuest; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

Immunoblotanalyse

Der Immunoblot [4] wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt: monoklonaler cFLIP, GAPDH, IκBα und p52 (G11, 6C5, C-21, C-5, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), Caspase-3 und Caspase-8 (Asp132 und Asp384, Cell Signaling, Hamburg, Deutschland), β-Aktin (Abcam, Cambridge, England). Die Detektion erfolgte mittels HRP-konjugierter Antikörper und Chemolumineszenz (Amersham, Braunschweig, Deutschland).

RNA-Extraktion und RT-PCR

Die Gesamt-RNA der behandelten Zellen wurde mit dem „RNeasy extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die Integrität der RNA wurde mittels Kapillarelektrophorese (Bioanalyzer; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bestimmt und die reverse Transkription mit 1 mg RNA, Zufallshexamerprimern und „Multiscribe Reverse Transcriptase“ (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt (10 min bei 25°C, 30 min bei 48°C, 5 min bei 95°C). Die A20-, cIAP1-, cIAP2-, TRAF1- und cFLIP-mRNA wurde mit dem „Real-time PCR Cycler“ (TaqMan, ABI Prism 7000, Applied Biosystems) und SYBR-Green gemessen [4].

Generierung der cFLIP-shRNA-Lentiviren und Transduktion der cALCL-Zelllinie Mac-2B

DNA-Oligonukleotide für beide cFLIP-shRNA-Stränge sowie die „Scrambled-Kontrolle“ wurden synthetisiert (MWG, Ebersberg, Deutschland), hybridisiert und mit HpaI/XhoI-Restriktionsstellen hinter dem U6-Promoter des pLL3.7-Vektors kloniert (Addgene, Cambridge/MA; [15]; cFLIP-shRNA: 5'-GAA-TAGACCTGAAGACAAATTCAGAGATTTGTCTTCAGGTCTATCTTTT-3', „scrambled-shRNA“: 5'-GCAG-GAGCTATGCTACCATTTCAAGAG-AATGGTAGCATA GCTCCTGCTTTT-

TT-3'). Der leere Vektor („mock“) diente als Kontrolle. Die Produktion der replikationsdefizienten Lentiviren und die Transduktion erfolgte wie beschrieben [15]. Die Transduktionseffizienz wurde durch die vektorkodierte Expression des grün-fluoreszierenden Proteins durchflusszytometrisch gemessen. Die cFLIP-Inhibition wurde mittels RT-PCR bestimmt. Gesamt-RNA wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) isoliert und die cDNA mit dem „Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads“ (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) synthetisiert. cFLIP (5'-TGTTGATGCTT-TTGACTTTC-3' und 5'-ACAGCTTT-TCTGTCCATCTT-3) und GAPDH (5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' und 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3') wurden amplifiziert (Hybridisierung 55°C/24 Zyklen).

Statistische Analyse

Für statistische Analysen wurde der „Student's t-test“ eingesetzt. Ein Unterschied von 0,05 zwischen zwei zu prüfenden Proben wurde als signifikant beurteilt.

Korrespondenzadresse

Dr. B. Hirsch
Institut für Pathologie,
Charité-Universitätsmedizin Berlin,
Campus Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin
burkhard.hirsch@charite.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Stein H, Mason DY, Gerdes J et al (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 66:848–858
2. Hirsch B, Brauer J, Fischdick M et al (2009) Anti-CD30 human IL-2 fusion proteins display strong and specific cytotoxicity in vivo. *Curr Drug Targets* 10:110–117
3. Hubinger G, Muller E, Scheffrahn I et al (2001) CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP1/WAF1) in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene* 20:590–598
4. Hirsch B, Hummel M, Bentink S et al (2008) CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am J Pathol* 172:510–520

5. Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME (1999) Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11:277–285
6. Bagnoli M, Canevari S, Mezzananza D (2010) Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42:210–213
7. Guicciardi ME, Gores GJ (2009) Life and death by death receptors. *FASEB J* 23:1625–1637
8. Li-Weber M, Krammer PH (2003) Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol* 15:145–157
9. Bartlett NL, Younes A, Carabasi MH et al (2008) A phase 1 multidose study of SGN-30 immunotherapy in patients with refractory or recurrent CD30+ hematologic malignancies. *Blood* 111:1848–1854
10. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I et al (2004) c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 199:1041–1052
11. Micheau O, Thome M, Schneider P et al (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277:45162–45171
12. Foyil KV, Bartlett NL (2010) Anti-CD30 antibodies for Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 5:140–147
13. Boll B, Hansen H, Heuck F et al (2005). The fully human anti-CD30 antibody 5F11 activates NF-κB and sensitizes lymphoma cells to bortezomib-induced apoptosis. *Blood* 106:1839–1842
14. Braun FK, Hirsch B, Al-Yacoub N et al (2010) Resistance of cutaneous anaplastic large-cell lymphoma cells to apoptosis by death ligands is enhanced by CD30-mediated overexpression of c-FLIP. *J Invest Dermatol* 130:826–840
15. Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV et al (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401–406