

**Analyse isolierter, individueller  
Tumorzellen des klassischen Hodgkin-  
Lymphoms auf Mutationen im mdm2-Gen-  
Lokus**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des**

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Ulrike Treichel**

aus Preetz

Berlin 2004

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Stein am Institut für Pathologie,  
Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Stein  
Institut für Pathologie  
Campus Benjamin Franklin  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. V. A. Erdmann  
Institut für Chemie-Biochemie  
Freie Universität Berlin

Disputation am 21.03.2005

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst angefertigt wurde und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Ulrike Treichel

Berlin, den

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Geschichte der Erforschung des Hodgkin-Lymphoms.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Zellzyklusregulierung und Apoptose.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Das Tumorsuppressorgen p53 .....	4
1.2.1.1 Struktur von p53.....	4
1.2.1.2 Funktionen von p53.....	5
1.2.1.3 Regulation von p53 .....	6
1.2.2 Das Onkogen mdm2.....	7
1.2.2.1 Struktur von MDM2.....	8
1.2.2.2 Funktion von MDM2 .....	9
1.2.2.3 Regulation von p53 durch MDM2 .....	9
1.2.2.4 MDM2 bindende Proteine.....	10
1.2.3 Auswirkung von p53- und MDM2-Defekten in Lymphomen .....	11
<b>1.3 Aufgabenstellung der Arbeit .....</b>	<b>12</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Gewebe.....	13
2.1.1.1 Gefriermaterial .....	13
2.1.1.2 Paraffinmaterial, Gewebearrays .....	13
2.1.2 Zelllinien .....	13
2.1.3 Reagenzien .....	15
2.1.3.1 Reagenzien für die Immunhistologie .....	15
2.1.3.2 Reagenzien für die SSCP .....	17
2.1.3.3 Reagenzien und Materialien für den Western Blot .....	18
2.1.3.4 Puffer.....	19
2.1.3.5 Gele .....	20
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Nukleinsäureisolierung.....	21
2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA.....	21
2.2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA.....	21
2.2.2 Gelelektrophorese.....	21
2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese .....	21
2.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese .....	22
2.2.3 Anfärbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Makromolekülen .....	22
2.2.3.1 Ethidiumbromidfärbung .....	22
2.2.3.2 Silberfärbung.....	22
2.2.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten .....	23
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	23
2.2.6 Sequenzierung .....	23
2.2.7 Auswertung .....	24
2.2.8 Färbung von Gewebeschnitten .....	25
2.2.8.1 Schneiden der Gewebeproben.....	25
2.2.8.2 Fixierung und Vorbehandlung der Gewebeschnitte.....	25

2.2.8.3	Immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten.....	26
2.2.8.3.1	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Methode .....	26
2.2.8.4	Immunhistologische Färbungen von Gefrierschnitten .....	27
2.2.9	Isolierung von DNA einzelner Zellen aus immungefärbten Schnitten .....	28
2.2.9.1	Hydrierung eingefrorener Schnitte.....	28
2.2.9.2	Einzelzellisolierung.....	28
2.2.10	Proteinase-K-Verdau isolierter Einzelzellen.....	29
2.2.11	PCR (Polymerasekettenreaktion).....	29
2.2.11.1	RT-PCR.....	29
2.2.11.1.1	RT-PCR zum Nachweis von atm.....	29
2.2.11.1.2	RT-PCR zum Nachweis von mdm2.....	31
2.2.11.1.3	RT-PCR zum Nachweis von p14 <sup>ARF</sup> .....	32
2.2.11.2	mdm2-Multiplex-Einzelzell-PCR .....	34
2.2.11.3	Realtime-PCR zum quantitativen Nachweis von mdm2.....	38
2.2.12	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP)-Analyse.....	40
2.2.13	Zellkultur von humanen Zelllinien.....	40
2.2.14	Western Blot.....	41
2.2.15	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Assay).....	42
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>PCR-Analyse.....</b>	<b>44</b>
3.1.1	mdm2-Einzelzell-PCR-Analyse.....	44
3.1.1.1	Etablierung der mdm2-Multiplex-Einzelzell-PCR.....	44
3.1.1.2	Ergebnisse der mdm2-Einzelzell-PCR-Analyse .....	49
3.1.2	Analyse der mdm2- und p14-RNA-Transkripte in verschiedenen Hodgkin-Zelllinien .....	55
3.1.3	Analyse der mdm2-Genkopienzahl ausgewählter Tumorzelllinien .....	58
<b>3.2</b>	<b>MDM2-Proteinexpression .....</b>	<b>59</b>
3.2.1	MDM2-Proteinexpression in Hodgkin-Zelllinien (Western Blot).....	59
3.2.2	Immunhistologische Untersuchungen an MDM2 .....	60
<b>3.3</b>	<b>Analyse von MDM2-beeinflussenden Proteinen.....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Immunhistologische Färbungen an Proteinen der Apoptose und Zellzyklusregulierung .....	61
3.3.2	Untersuchung verschiedener ATM-Regionen mit Hilfe von SSCP-Gelen.....	66
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Interaktion zwischen p53 und MDM2.....</b>	<b>69</b>
4.1.1	Analyse des zellulären p53-Kooperationspartners MDM2 im Hodgkin.....	70
<b>4.2</b>	<b>Die Überexpression von p53 und MDM2 im Kontext der Zellzyklusregulation beim cHL .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>Welche Proteine spielen beim p53-vermittelten Zelltod eine Rolle und warum gehen die HRS-Zellen trotz Überexpression von intaktem p53 beim cHL nicht in Apoptose? .....</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>80</b>

<b>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>82</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>8. DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>100</b>
<b>9. LEBENSLAUF .....</b>	<b>102</b>