

1. Einleitung

1.1 Geschichte der Erforschung des Hodgkin-Lymphoms

Bei lymphoproliferativen Erkrankungen des Menschen werden die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) dem Hodgkin-Lymphom (HL) gegenübergestellt. Das Hodgkin-Lymphom zählt in den westlichen Ländern (Nordamerika und Europa) zu den häufigsten malignen Lymphomen. In der „Revised European-American Lymphoma“ (R.E.A.L.-)Klassifikation [1] und der daraus hervorgegangenen WHO-Klassifikation [2] wird das Hodgkin-Lymphom in zwei Erkrankungen unterteilt: 1) Klassisches Hodgkin-Lymphom (englisch: classical Hodgkin lymphoma; cHL), das histologisch weiter unterteilt wird in Mischtyp, nodulär-sklerosierender Typ, lymphozytenreicher Typ und lymphozytenarmer Typ und 2) Lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom (englisch: lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma; LPHL). Da sich die hier durchgeführte Arbeit mit dem cHL befasste, beziehen sich auch die nachfolgenden Ausführungen ausschliesslich auf diese Erkrankung.

Histologisch zeichnet sich das cHL durch das Vorkommen weniger (meist weniger als ein Prozent des gesamten Zellgutes) großer dysplastischer Zellen aus, die in einen ausgedehnten Hintergrund reaktiver Zellen eingebettet sind [3]. Die Tumorzellen des cHL werden als Hodgkin-Zellen bezeichnet, wenn sie einkernig sind und als Reed-Sternberg (RS)-Zellen, wenn sie mehrkernig sind.

Seit 1832 Thomas Hodgkin das erste Mal das HL beschrieb [4], gab die nach ihm benannte Erkrankung immer wieder Anlass zu heftigen Kontroversen. Dabei stand lange Zeit die Frage im Vordergrund, ob die nur wenigen HRS-Zellen überhaupt die malignen Zellen repräsentieren. Während die Malignität der HRS-Zellen heute nicht mehr in Frage gestellt wird, traten Fragen wie die der zellulären Abstammung der HRS-Zellen und der Pathogenese in den Vordergrund.

Ein erster Hinweis auf den lymphatischen Ursprung des cHL ergab sich durch die konstante Expression des TNF (Tumornekrosefaktor)-Rezeptors CD30, der sonst nur auf wenigen aktivierten B- und T-Zellen vorkommt [5]. Weiterführende immunhistologische Analysen zum Nachweis B- und T-Zell-charakteristischer Antigene verliefen zumeist enttäuschend, da sich diese nur in einem kleinen Teil der cHL nachweisen ließen: Nur etwa 20% waren für B-Zell-Marker wie z.B. CD20 und etwa 15% für T-Zell-Marker wie z.B. CD3 positiv [6-10].

Darüber hinaus war häufig nur ein geringer Teil der HRS-Zellen innerhalb eines Falls für diese Marker positiv, so dass vielfach von einer aberranten Expression dieser Moleküle ausgegangen wurde. Die Etablierung von Hodgkin-Zelllinien brachte ebenfalls keine eindeutige Klärung, da diese Zelllinien sowohl von B-Zellen und T-Zellen als auch von anderen Zellarten abstammen [11;12].

Weitere Versuche, den lymphatischen Ursprung der HRS-Zellen durch molekularbiologische Untersuchungen mittels Southern Blot oder PCR an Gesamtgewebs-DNA-Extrakten zu bestätigen oder zu widerlegen, blieben wenig erfolgreich, da klonale Umlagerungen der Antigen-Rezeptorgene (Immunglobulin (Ig)-Gene und T-Zellrezeptorgene) nur in wenigen Fällen nachweisbar waren [13-17] und nicht sicher den HRS-Zellen zugeordnet werden konnten.

Erst die Entwicklung von Techniken zur Isolation von Einzelzellen aus Gewebeschnitten eröffnete die Möglichkeit der direkten Analyse der Antigen-Rezeptorumlagerung in einzelnen HRS-Zellen [18]. Hierbei erwies sich die Isolierung von Einzelzellen mittels hydraulischer Mikromanipulation aus immungefärbten Gefrierschnitten als zuverlässigste Methode. Mit Hilfe der Einzelzellanalyse konnten in den isolierten HRS-Zellen klonal umgelagerte Ig-Gene nachgewiesen und somit der Nachweis erbracht werden, dass HRS-Zellen in nahezu allen Fällen von B-Zellen abstammen [19;20]. Es konnte gezeigt werden, dass die klonal umgelagerten Ig-Gene zumeist zahlreiche somatische Mutationen aufweisen. In etwa 25-30% der Fälle führen diese Mutationen zu einem Verlust der Kodierungsfähigkeit [21-24]. Obwohl die Kodierungsfähigkeit der Ig-Gene in den HRS-Zellen der meisten cHL-Fälle erhalten bleibt, lässt sich eine Ig-Expression in den HRS-Zellen nicht nachweisen [19;25-27]. Daher ist vermutlich ein Defekt in der Transkriptionsmaschinerie und nicht das Auftreten von „Crippling Mutations“ für die Abwesenheit der Ig-Expression verantwortlich.

Eine fehlende Ig-Expression führt unter physiologischen Bedingungen zur Apoptose der betroffenen B-Zellen. In den HRS-Zellen führt das Fehlen der Ig-Expression allerdings nicht zum programmierten Zelltod [28], was auf eine Blockierung der Apoptose in diesen Zellen hindeutet. Als ein Kandidat kommt das zentrale Tumorsuppressorprotein p53 in Betracht, da auch in HRS-Zellen regelmäßig eine Überexpression von p53 beobachtet wird [29-35].

1.2 Zellzyklusregulierung und Apoptose

Sowohl der Zellzyklus als auch die Apoptose sind in vielerlei Hinsicht reguliert (siehe Abbildung 1-1). Dabei kann man die Vielzahl an Genen, die in diese Regulation involviert sind, in zwei Hauptgruppen einteilen: 1.) die Onkogene, die die Zellproliferation anregen können und 2.) die Tumorsuppressorgene, deren Aufgabe in der Hemmung der Zellteilung und der Induktion des programmierten Zelltods liegt.

Zu den als Onkogenen bezeichneten Proteinen zählen häufig auch Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. In Tumoren liegen Onkogene häufig amplifiziert vor. Daraus resultiert eine erhöhte Expression und damit verbunden eine Überfunktion des Proteins („gain of function“). Beispiel für Onkogene sind z.B. *ras* [36] und das murine *double minute Gen 2* (*mdm2*), das als Hauptgegenspieler von p53 agiert [37] und nachfolgend noch näher erläutert wird (siehe Abbildung 1-1).

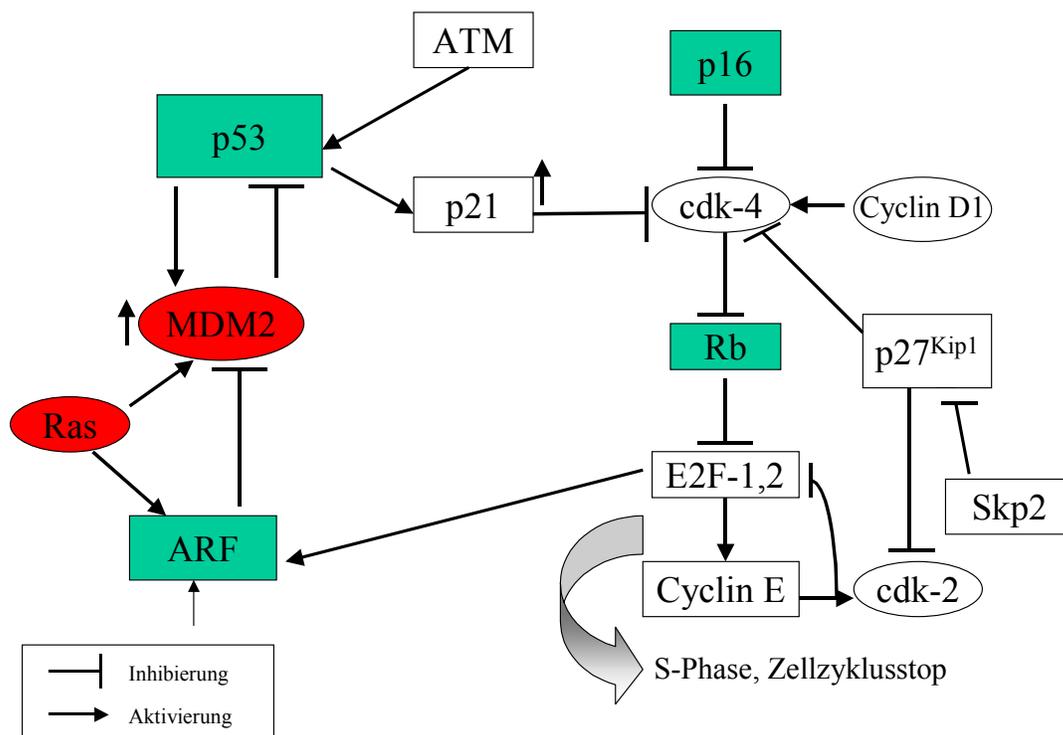


Abbildung 1-1: MDM2 und p53 im Zusammenspiel mit anderen regulatorischen Proteinen beim cHL.

Dargestellt sind exemplarisch Proteine, die in Zusammenhang mit den zentralen Proteinen MDM2 und p53 stehen und bei Zellzyklusregulierung und/oder Apoptose eine Rolle spielen. Bei grün unterlegten Molekülen handelt es sich um Tumorsuppressormoleküle, bei rot unterlegten Molekülen um Onkogene.

Tumorsuppressorgene besitzen im Unterschied zu den Onkogenen eine wachstumshemmende und zumeist differenzierungsinduzierende Funktion und können ebenfalls als Transkriptionsfaktoren wirken. In Tumoren sind Tumorsuppressorgene häufig mutiert bzw. deletiert, woraus ein teilweiser oder vollständiger Verlust der Funktionalität resultiert („loss of function“).

Eines der Hauptmoleküle aus dieser Gruppe ist hierbei das als „Wächter des Genoms“ bezeichnete p53-Protein, das Tumorsuppressoraktivität besitzt [38-41]. Bei p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in Tumoren häufig mutiert ist [42].

1.2.1 Das Tumorsuppressorgen p53

p53 zeigt sowohl zellzyklusregulierende als auch apoptoseinduzierende Wirkung, die über die Regulation der Expression verschiedener Gene entfaltet wird (Abbildung 1-1). Für die Tumorsuppressorfunktion von p53 ist seine Fähigkeit, das Wachstum potenzieller Tumorzellen zu verhindern, zentral.

1.2.1.1 Struktur von p53

Das p53-Gen, lokalisiert auf dem Chromosom 17p13, kodiert einen Transkriptionsfaktor mit drei Funktionsdomänen (siehe Abbildung 1-2):

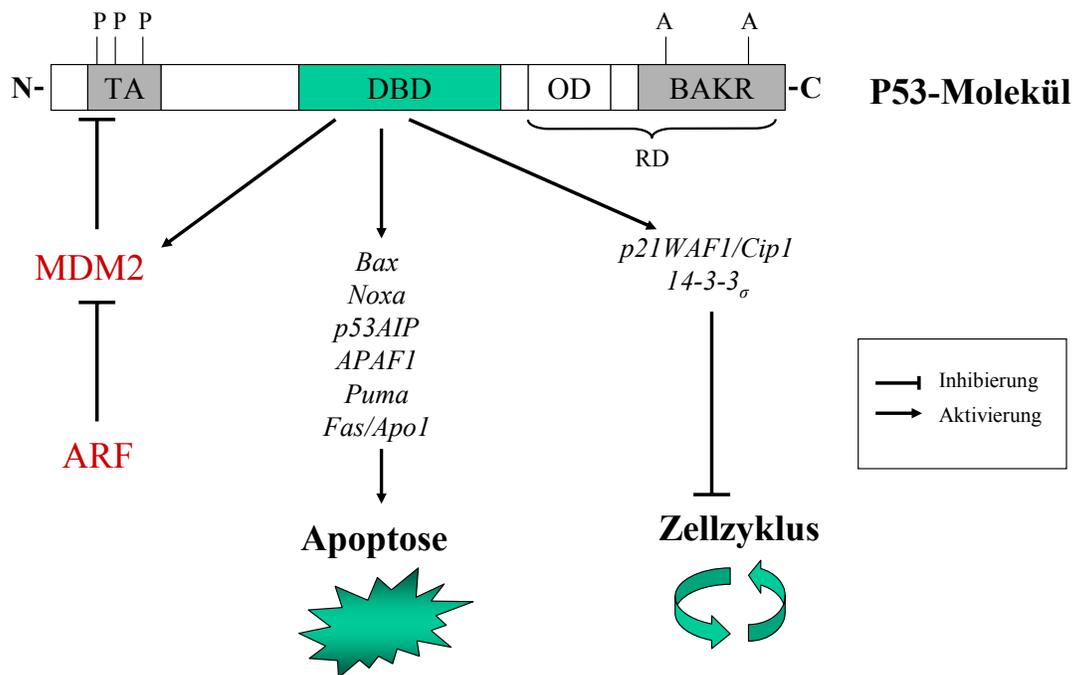
- (1) einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA), die die Aminosäuren 1 bis 50 überspannt [43;44],
- (2) einer zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD), die die Aminosäuren 102 bis 292 umfasst,
- (3) einer komplexen C-terminalen Regulatordomäne (RD), die eine Oligomerisierungsdomäne (AS 320-356) sowie eine basische Domäne zur Feinregulation der DNA-Bindung (AS 363-393) enthält [45-54].

Die DNA-Bindungsdomäne von p53 weist mehrere Regionen auf, in denen sehr oft Mutationen gefunden wurden [55]. Diese führten dazu, dass p53 in mehr als 50 % aller humanen Tumoren inaktiviert vorliegt [56].

1.2.1.2 Funktionen von p53

p53 funktioniert als ein „durch DNA-Schäden induzierbarer“ sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor [41;57-63], der als Tetramer an die DNA bindet und die Expression einer großen Anzahl von Genen kontrolliert [36], die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose spielen.

Treten keine DNA-Schädigungen auf, wird die p53-Transkriptionsaktivität auf sehr geringem Niveau gehalten [64]. Sie wird allerdings bei Bedarf über Signalwege aktiviert, die die Phosphorylierung des p53-Proteins induzieren [65-68].



Modifiziert aus: „*Current Opinion in Genetics & Development*“ [69].

Abbildung 1-2: Regulation und Funktionen von p53.

TA: N-terminale Transaktivierungs-/Transreprimierungsdomäne, DBD: DNA-bindende Domäne, RD: die C-Terminale Regulatordomäne, die die Oligomerisierungsdomäne (OD) und die basische allosterische Kontrollregion (BAKR) beinhaltet. Einige der Aminosäurepositionen, an denen p53 phosphoryliert wird (Serin 15, 20 und 46) bzw. acetyliert wird (Lysin 320 und 382) sind markiert.

1.2.1.3 Regulation von p53

Das p53 Protein kommt normalerweise nur in geringen Konzentrationen im Kern der Zelle vor und hat eine kurze Halbwertszeit. Als Antwort auf zelluläre Stresssignale wird p53 aktiviert, akkumuliert im Kern der Zelle und übt seine Funktionen aus [70;71]. Die Aktivität von p53 wird durch Partnerproteine reguliert, von denen das MDM2-Protein der wichtigste Bindungspartner ist (siehe ausführlich in 1.2.2). Zusätzlich erfolgt die Regulation über eine Reihe miteinander verknüpfter posttranslationaler Mechanismen [72-76]:

- **Ubiquitinylierung und Sumoylierung:** Neben der Regulation der p53-Stabilität über eine Rückkopplungsschleife mit MDM2 (1.2.2.2), wird die Halbwertszeit von p53 auch über die Interaktion von MDM2 mit p14^{ARF} beeinflusst [77-80]. Daneben sorgt die Fähigkeit von MDM2, Ubiquitin auf p53 zu übertragen (E3 Ligaseaktivität) ebenfalls zu einer Änderung der Proteinstabilität von p53. Das ubiquitinylierte p53 wird aus dem Kern ins Cytoplasma exportiert, wo es durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird [81-83]. Zusätzlich zur Ubiquitinylierung wird p53 mit **SUMO-1** modifiziert [84-86]. Hierbei handelt es sich um ein kleines ubiquitinverwandtes Protein, das an Zielproteine mittels Enzymkaskaden konjugiert wird. Dies führt gleichzeitig zu einer Steigerung der E3 Ligase Aktivität von MDM2 gegenüber p53 [87] und somit zu einem verstärkten Abbau von p53.

- **Phosphorylierung:** In der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und in der C-terminalen Regulator-domäne von p53 sind mehrere Phosphorylierungsstellen enthalten, die in einem komplexen Wechselspiel die Aktivität von p53 und die Wechselwirkungen mit Partnerproteinen wie MDM2 regulieren [88]. Das „upstream“ von p53 gelegene **ATM** (*Ataxia telangiectasia mutated*), eine Serin/Threonin-Proteinkinase, aktiviert z.B. p53 (Abbildung 1-1) als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche, indem es p53 an Serin 15 phosphoryliert [89]. Dies führt zu einer verringerten Bindungsaffinität von p53 an seinen wichtigsten Bindungspartner MDM2 [90;91]. Diese Reduzierung der Bindungsaffinität wird dadurch verstärkt, dass MDM2 ebenfalls von ATM phosphoryliert wird und somit der schnelle Abbau von p53 durch MDM2 (siehe 1.2.2.3) verhindert wird [92].

- **Acetylierung:** Neben der Phosphorylierung wurde in den letzten Jahren die Acetylierung des p53-Proteins in der C-terminalen allosterischen Kontrollregion [93-96] als ein wichtiger Mechanismus bei der Aktivierung von p53 identifiziert. Die DNA-Schädigung führt - vermittelt durch die Phosphorylierung oder zusätzlich zur Phosphorylierung - zu einer Acetylierungskaskade des p53-Proteins, bei der Coaktivatoren/Histonacetyltransferasen einbezogen werden, die für die transkriptionelle Funktion von p53 entscheidend sind [97].

- **Subzelluläre Lokalisation:** Ebenfalls einer strengen Regulation unterliegt die Lokalisation von p53 und MDM2. Sowohl p53 als auch MDM2 enthalten nukleäre Import- und Exportsignale. Nach der Aktivierung übt p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor im Nukleus aus. Durch Bindung an MDM2 wird p53 im Nukleus ubiquitinyliert (s.o.) und aus dem Nukleus ins Cytoplasma exportiert, wo es anschließend proteolytisch abgebaut wird [98-101].

1.2.2 Das Onkogen mdm2

Bei der Amplifikation von Genen und der daraus häufig resultierenden Überexpression von Proteinen, die das Zellwachstum kontrollieren, handelt es sich um einen Mechanismus, durch den diese Moleküle onkogene Eigenschaften erlangen können. Die Analyse einzelner Gensequenzen aus der spontan transformierten Mauszelllinie 3T3DM [102] zeigte, dass das Produkt des **murine double minute Gen 2** (mdm2) in der Lage ist, nach Transfektion in Fibroblasten diese Zellen zu transformieren [103]. Diese Transformation äußerte sich in unkontrolliertem und tumorauslösendem Wachstum der Zellen. Die Fähigkeit von MDM2 an das Tumorsuppressorprotein p53 zu binden [104] und dieses effizient zu inaktivieren [105], rückte MDM2 damit ins Blickfeld der Tumorforschung.

1.2.2.1 Struktur von MDM2

Das *mdm2*-Gen ist auf dem Chromosom 12q13-14 lokalisiert [106]. Von MDM2 sind verschiedene Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleissen entstehen [107;108]. Dabei können aufgrund teilweise fehlender Domänen nicht alle Spleissvarianten an der Regulierung des p53 Proteins teilnehmen [108]. Das größte als „full-length“ (FL) bezeichnete Transkript kodiert für ein 90 kDa Polypeptid, das aus 491 Aminosäuren besteht [109].

Das MDM2-Protein ist aus mehreren Domänen aufgebaut (Abbildung 1-3):

- (1) einer N-terminalen Domäne (AS 1-220), die mit p53 und E2F-1 interagiert,
- (2) einer sauren Domäne (AS 150-300), die eine Bindungsstelle für ein ribosomales Protein enthält,
- (3) einer Bindungsstelle für das Retinoblastom (Rb)-Protein (AS 272-321) und
- (4) einer Ringfingerdomäne (AS 400-491), die an RNA binden kann und als E3 Ligase für die Ubiquitinylierung von p53 verantwortlich ist [110-112].

Darüber hinaus enthält MDM2 nukleäre Import- und Exportsignale [113].

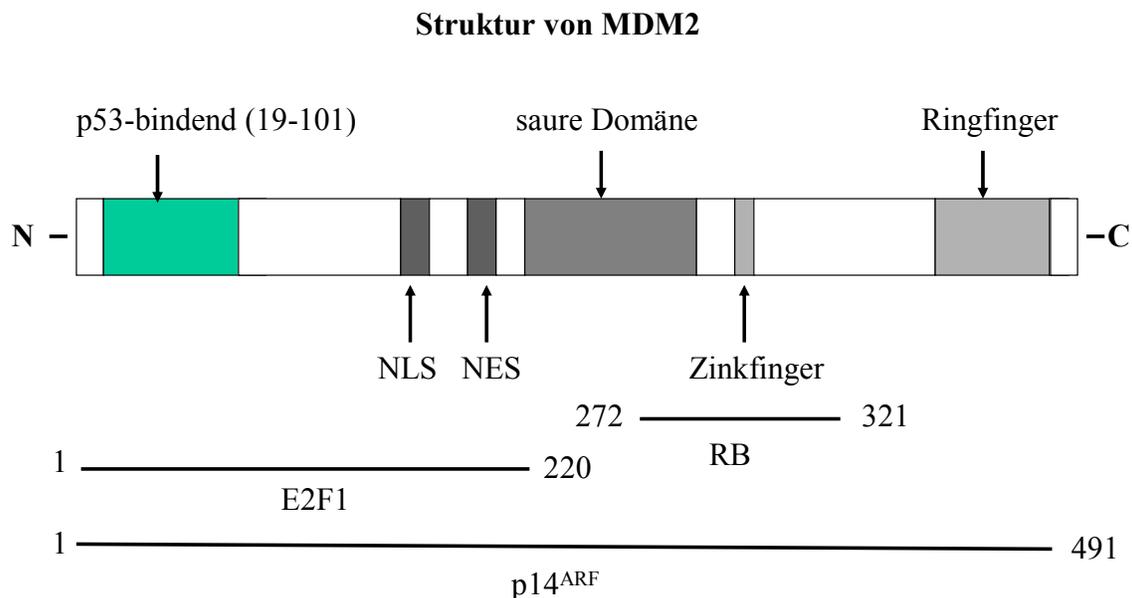


Abbildung 1-3: Domänen von MDM2 und deren Interaktionen mit anderen Molekülen. Dargestellt sind Proteine des Zellzyklus (siehe auch Abbildung 1-1), die mit bestimmten Domänen des *mdm2*-Proteins interagieren. Die Zahlen geben den jeweils betroffenen Aminosäurebereich an. Eingezeichnet sind ebenfalls das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) und das nukleäre Exportsignal (NES).

1.2.2.2 Funktion von MDM2

Die Fähigkeiten von p53 als „Wächter des Genoms“ und mächtiger Inhibitor der Zellproliferation machen eine Kontrolle seiner Aktivität während der normalen Wachstums- und Entwicklungsphase zwingend notwendig. Wichtigster zelleigener Gegenspieler ist hierbei das MDM2-Protein [72]. Da das mdm2-Gen auch ein Transkriptionstarget von p53 ist [114], entsteht ein autoregulatorischer „Feedback“-Loop, in dem p53 die Expression seines eigenen negativen Regulators aktiviert [115].

Unter physiologischen Bedingungen bindet MDM2 an p53 und trägt dazu bei, die Menge an freiem p53 auf einem geringen Niveau zu halten [116]. Die zentrale Bedeutung von MDM2 als Regulatorprotein wird auch durch die Beobachtung unterstrichen, dass homologe Deletionen im mdm2-Gen von Mäusen eine sehr frühe Letalität des Embryos zur Folge haben. Dies kann durch einen gleichzeitigen Verlust des p53-Gens rückgängig gemacht werden [117;118]. Daraus lässt sich schließen, dass MDM2 eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der p53-Aktivität besitzt. In Abwesenheit von MDM2 kommt es offenbar zu einer aberranten Aktivierung von p53, wodurch es schließlich zur Ausprägung des letalen embryonalen Phänotyps kommt. Dagegen ist eine Amplifikation des mdm2-Gens mit der Entwicklung von Tumoren verbunden, die p53 vom Wildtyp enthalten [119]. Dies führt zu der Vermutung, dass die Überexprimierung von MDM2 die normale p53-vermittelte Antwort auf „onkogenen Stress“ verhindert [72].

1.2.2.3 Regulation von p53 durch MDM2

Die p53 Aktivität wird von MDM2 über drei Mechanismen reguliert:

- (1) Die Interaktion von MDM2 mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53 (TA, siehe Abbildung 1-2) führt zur Blockade der transkriptionellen Aktivität von p53 [120-122].
- (2) MDM2 fungiert als E3 Ligase (siehe auch 1.2.1.3), die p53 ubiquitinyliert [77].
- (3) MDM2 exportiert p53 aus dem Nukleus ins Cytoplasma [123] und führt es dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zu [124-127].

Andererseits kann p53 die Expression von MDM2 durch p53-responsive Elemente im Promoterbereich von MDM2 [114;115;128] aktivieren. Dies führt ebenfalls zu einer regulatorischen Rückkopplung („Feedback“-loop) [129], so dass die Konzentrationen von MDM2 und p53 in den Zellen variieren können [130]. Zusätzlich liegt in der Zelle aber auch immer ein geringer Anteil an p53-Monomeren vor, der sicherstellt, dass im Fall einer DNA-Schädigung sofort die entsprechenden Proteine aktiviert werden können. Eine weitere Möglichkeit der p53-Aktivierung nach der Einwirkung von äußeren Stressfaktoren ist die Phosphorylierung von p53 in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (z.B. an Serin 15 oder an Serin 20, siehe Abbildung 1-2) [131;132]. Dies führt zu einer Verringerung der Bindungsaffinität von p53 an MDM2 [133-135] und als Folge zu einer Dissoziation des MDM2/p53-Komplexes.

1.2.2.4 MDM2 bindende Proteine

Neben p53 gibt es auch eine Reihe weiterer Proteine, an die MDM2 binden kann (Abbildung 1-3). Die Interaktionen dieser Proteine sind jedoch bei weitem nicht so intensiv erforscht worden wie die zwischen MDM2 und p53.

Eines dieser Proteine ist das Tumorsuppressorprotein **p14^{ARF}**, auch **ARF** (*Alternative Reading Frame*) genannt. Bei diesem Tumorsuppressorprotein handelt es sich um ein alternatives Spleissprodukt des Tumorsuppressorgenlokus **p16^{Ink4a}** [136]. p14^{ARF} ist häufig in humanen Tumoren inaktiviert [137-139]. Es übt seine Funktion der Stabilisierung von p53 über die Regulation von MDM2 aus. Die Bindung von p14^{ARF} an MDM2 verhindert den Abbau und die Ubiquitinylierung (siehe 1.2.1.3) von p53 [78;140-144]. Dadurch kann p14^{ARF}, wie auch durch die direkte Bindung an p53, zu einer Stabilisierung von p53 beitragen [141] und als „upstream“-Aktivator von p53 wirken. Während p53 durch p14^{ARF} aktiviert wird, kann p53 gleichzeitig die Expression von p14^{ARF} herunterregulieren [145].

Neben p14^{ARF} spielen auch andere MDM2-assoziierte Proteine eine Rolle in der Regulierung der MDM2- und p53-Aktivitäten. Das Produkt des Retinoblastom-Gens, der Tumorsuppressor **pRB** (siehe Abbildung 1-1), kann mit z.B. mit MDM2 wechselwirken, um den Abbau von p53 zu blockieren. Der **trimere p53-MDM2-pRB-Komplex** scheint die p53-abhängigen Transkriptionsrepressionsfunktionen wiederherzustellen und ist in der Lage, die Apoptose zu induzieren [146].

Spleissvarianten von MDM2 selbst, denen unterschiedlich große Teile der p53-bindenden und der sauren Domäne sowie der Kernlokalisierungs- und Kernexportsequenzen (NLS und NES, siehe Abbildung 1-3) fehlen, werden oft in humanen Krebsarten gefunden [108]. Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen dem Auftreten von MDM2-Spleissformen und einem aggressiveren Tumorverhalten in verschiedenen Tumorarten festgestellt [108].

1.2.3 Auswirkung von p53- und MDM2-Defekten in Lymphomen

In den meisten Neoplasien führen p53-Mutationen zur Expression eines trunkierten Proteins, dem eine funktionelle Aktivität fehlt und das eine längere Halbwertszeit aufweist [147-150]. Diese längere Halbwertszeit wird meistens für die immunhistologisch nachweisbare Überexpression des p53-Proteins in den Zellkernen der Tumore verantwortlich gemacht. Eine weitere mögliche Ursache für die Überexpression von p53 in Tumorzellen kann aber auch die Bindung an zelluläre Bindungspartner wie p14^{ARF}, virale Proteine oder an MDM2 sein, die so verhindern, dass p53 abgebaut wird [57;104;151]. In Tumoren ist eine MDM2-Überexpression, die in vielen Fällen aus einer Genamplifikation resultiert, als Ursache für die gleichzeitige Inaktivierung und Stabilisierung des p53-Proteins festgestellt worden [119;152]. Immunhistologische Untersuchungen haben gezeigt, daß p53 auch in verschiedenen B-Zell-NHL [153-155] und in den HRS-Zellen des cHL überexprimiert vorliegt [29;156-159]. Die Akkumulation von p53 in den Tumorzellen lässt sich jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht durch das Vorhandensein von Mutationen im p53-Gen erklären. So wurden in NHL trotz einer p53-Überexpression nur in einzelnen Fällen p53-Mutationen entdeckt [153]. Die Versuche, p53-Mutationen in HRS-Zellen von cHL-Fällen nachzuweisen, führten aufgrund des geringen Prozentsatzes dieser Tumorzellen erst durch die Entwicklung von Techniken zur Isolation von Einzelzellen aus Gewebeschnitten zu konklusiven Ergebnissen (siehe 1.1). Diese Einzelzelluntersuchungen ergaben, dass in den HRS-Zellen der cHL-Fälle keine Mutationen im p53-Gen nachgewiesen werden konnten [158;160]. Die p53-Akkumulation in den HRS-Zellen lässt sich somit nicht durch das Vorhandensein von Mutationen erklären. Dagegen zeigten Untersuchungen an Gewebeschnitten, dass der wichtigste zelluläre Kooperationspartner von p53, MDM2, sowohl im NHL [161-163] als auch in HRS-Zellen [29;158] überexprimiert vorliegt. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass bei der Entwicklung von B-Zell-NHL und cHL die Akkumulation von p53 auf eine Störung des MDM2/p53-Verhältnisses zurückzuführen ist. Ob die Störung des MDM2/p53-

Regelkreislaufs möglicherweise durch Mutationen in der p53-bindenden Region des mdm2-Gens verursacht wird, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

Die Pathogenese des cHL ist noch weitgehend ungeklärt. In den HRS-Zellen deutet die fehlende Ig-Expression, die nicht zum programmierten Zelltod führt, auf eine Blockierung der Apoptose in diesen Zellen hin. Sowohl das zentrale Tumorsuppressorprotein p53 als auch sein zelleigener Gegenspieler MDM2 liegen im cHL überexprimiert vor. Dies deutet auf eine Entkopplung des p53/MDM2-Regulationsmechanismus. Die Akkumulation von p53 in den HRS-Zellen konnte in früheren Untersuchungen (siehe 1.2.3) aber nicht durch Mutationen erklärt werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, welche Rolle das ebenfalls in den HRS-Zellen überexprimiert vorliegende MDM2 bei der Störung dieses Regelkreislaufs spielt. Hierzu sollten zunächst Hodgkin-Zelllinien auf das Vorhandensein von Mutationen und Amplifikationen des mdm2-Gens untersucht werden. Auf RNA-Ebene sollte das Vorhandensein von alternativen mdm2-Transkripten überprüft und im Western Blot die Größe des exprimierten MDM2-Proteins bestimmt werden. Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit sollte jedoch die Analyse des p53-bindenden Teils des mdm2-Gens an einzelnen aus Gewebeschnitten isolierten HRS-Zellen sein. Hierfür sollte eine große Anzahl HRS-Zellen mehrerer cHL-Fälle isoliert und einer zu entwickelnden mdm2-Multiplex-Einzelkopie-PCR unterzogen werden. Zur Einordnung der erhobenen Befunde sollten durch immunhistochemische Untersuchungen an einer Vielzahl von cHLs die Rolle verschiedener, ebenfalls an der Apoptose bzw. Zellzyklusregulierung beteiligter Proteine an der Entstehung des cHL bestimmt werden. ATM, das als wichtiges Reparatur- und Zellzyklusregulierungsprotein sowohl p53 als auch MDM2 direkt aktivieren kann (siehe 1.2.1.3), sollte schliesslich auf RNA-Ebene in diversen Zelllinien auf das Vorhandensein von Mutationen in den sogenannten „Mutationshotspotregionen“ untersucht werden.