

## 3. Ergebnisse

### 3.1 PCR-Analyse

#### 3.1.1 *mdm2-Einzelzell-PCR-Analyse*

##### 3.1.1.1 *Etablierung der mdm2-Multiplex-Einzelzell-PCR*

Zur Überprüfung von somatischen Mutationen im *mdm2*-Gen der HRS-Zellen musste eine DNA-basierte Multiplex-PCR etabliert werden, da die Amplifikation von RNA an aus Gewebeschnitten isolierten Einzelzellen mit den bisherigen zur Verfügung stehenden Methoden nicht zuverlässig möglich ist. Um die kodierenden Exonanteile des *mdm2*-Gens in voller Länge darstellen zu können, ist eine Positionierung der PCR-Primer in den flankierenden Intronsequenzen notwendig. Da zu Beginn dieser Arbeit die genomische Struktur des humanen *mdm2*-Gens nicht bekannt war, mussten die Intronanteile zwischen den Exons 3 bis 7, die den p53-bindenden Anteil repräsentieren, zunächst ermittelt werden.

Hierfür wurden, basierend auf der humanen mRNA und der bekannten murinen genomischen Struktur, PCRs durchgeführt, die in der Lage waren, die entsprechenden Intronanteile zu amplifizieren und damit einer entsprechenden Sequenzanalyse zugänglich zu machen.

Die ersten orientierenden Intron-überspannenden PCR-Ansätze ergaben teilweise erhebliche Abweichungen zwischen der bekannten Größe der murinen *mdm2*-Introns und der Größe der amplifizierten humanen *mdm2*-Introns (Tabelle 3-1). Der Übergang von Exon 2 zu Exon 3 war auf muriner Ebene nicht bekannt. In allen Fällen mussten verschiedene PCR-Bedingungen ausgetestet werden, um die entsprechenden Intronanteile darstellen zu können. So sind z.B. für kleinere DNA-Fragmente von 200 bp wesentlich geringere Primer-extensionszeiten in der PCR erforderlich, als für ein Fragment von 4000 bp.

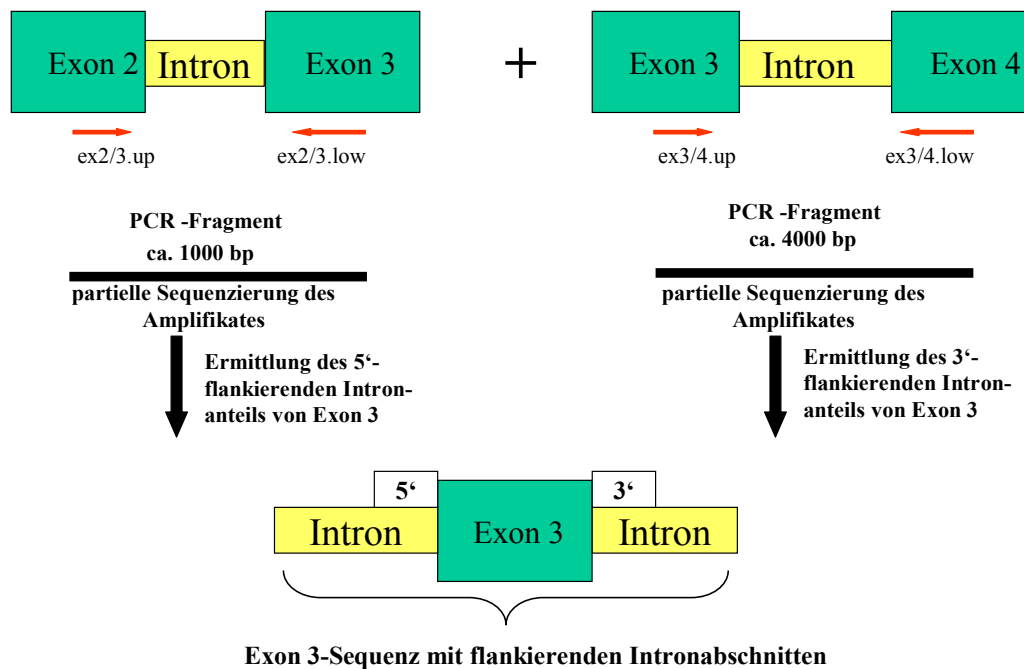
Durch die Sequenzierung der mittels PCR erhaltenen Intronanteile konnten die Intron/Exon-Übergänge ermittelt werden. In Abbildung 3-1 ist dies beispielhaft für die Ermittlung der Exon 3 flankierenden Intronabschnitte gezeigt, Abbildung 3-2 beschreibt die PCR-Strategie für die Exons 3 bis 7. Die ermittelten flankierenden Intronbereiche der Exons 3 bis 7 dienen nun als Grundlage für die Selektion von PCR-Primern, um die zwischenliegenden kodierenden Abschnitte aus einzelnen HRS-Zellen zu amplifizieren.

**Tabelle 3-1:** Erwartete und tatsächliche Fragmentgrößen der humanen mdm2-Intron/Exon-DNA-Sequenzen.

Lokalisation der Exon-Primer	Erwarte Fragmentgröße (Maus) in bp	Amplifizierte Fragmentgröße (Mensch) in bp <sup>#</sup>
Exon 2/3	n.b.*	ca. 200
Exon 3/4	ca. 4000	ca. 4000
Exon 4/5	ca. 2000	ca. 2000
Exon 5/6	1750	ca. 2000
Exon 6/7	ca. 5000	3000 >= Ex6/7 < 4000
Exon 7/8	331	ca. 200

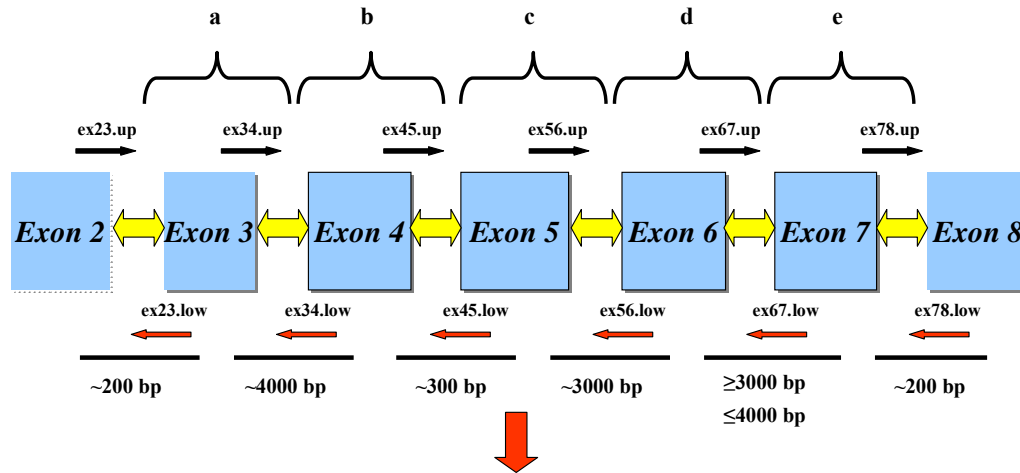
\*: Genaue Lage von Exon 2 nicht bekannt (siehe Text).

#: Sequenzierung nur der flankierenden Intronanteile, deshalb keine präzisen Angabe zur Länge des gesamten Exons.



**Legende:**  PCR- und Sequenzierprimer

**Abbildung 3-1:** Ermittlung der DNA-Sequenz mit flankierenden Intronsequenzen für das Primerdesign der mdm2-Multiplex-PCR am Beispiel von Exon 3.



Ermittlung der Exon-/Intronübergänge durch Sequenzierung der Amplikate und Zusammenstellung der Sequenzen zur Primerermittlung der mdm-Multiplex-PCR

Legende:



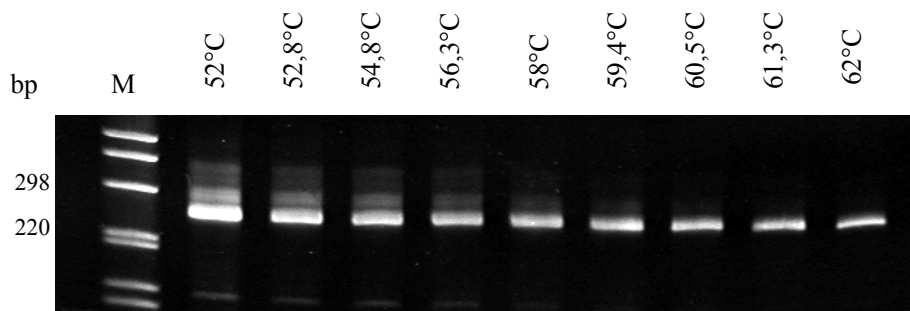
a-e : amplifizierte Exons 3 bis 7 einschließlich flankierender Intronanteile

**Abbildung 3-2:** Ermittlung der Sequenzen für die Exons 3 bis 7 für die Multiplex-PCR.

Für die parallele Amplifikation der verschiedenen mdm2-Exons aus einer Einzelzelle müssen in der Primäramplifikation alle hierfür benötigten Primer in einer einzigen PCR eingesetzt werden. Diese setzt voraus, dass die insgesamt 10 Primer, die für die Amplifikation der Exons 3 bis 7 des mdm2-Gens erforderlich sind, keine nennenswerten Primer-Di- oder Multimere bilden, die die Amplifikation eines oder mehrerer Exons in einem Multiplex-PCR-Ansatz verhindern. Um die geeigneten Reaktionsbedingungen zu finden, bei denen eine sehr gute Darstellung einzelner mdm2-Genkopien gelingt, musste zunächst für jedes der Primerpaare die optimalen PCR-Bedingungen ermittelt werden. Diese Optimierung wurde für jedes Primerpaar sowohl für die Primäramplifikation als auch für die Reamplifikation durchgeführt, so dass insgesamt zehn Singleplex-PCRs optimiert werden mussten, bevor die Optimierung für die Multiplex-PCR mit dem Primergemisch von 10 Primern in der Primäramplifikation erfolgen konnte.

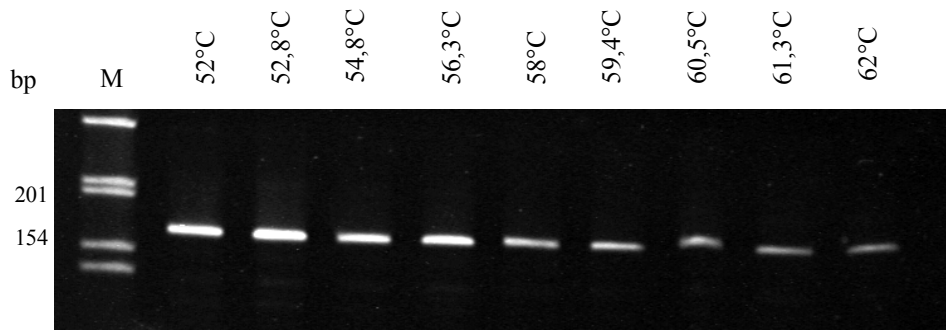
Hierzu wurden in den **Primäramplifikationsansätzen** für jedes Primerpaar jeweils einer der Parameter wie die Magnesiumchloridkonzentration, die Primeranlagerungstemperatur und die Primerkonzentration variiert, um die geeignete Kombination für die jeweilige Singleplex-PCR zu ermitteln. Diese Optimierung gestaltete sich für die verschiedenen Primerpaare unterschiedlich schwierig, wobei für die Ermittlung der geeigneten Reaktionsbedingungen der Singleplex-PCRs der Exons 6 und 7 die umfangreichsten Anpassungen erforderlich waren.

Nachdem die entsprechenden Bedingungen für die einzelnen Singleplex-PCRs der Primäramplifikationen eingestellt waren, mussten für die Singleplex-PCRs der **Reamplifikationen** ebenfalls die einzelnen Parameter (s.o.) ausgetestet werden. Auch hier waren für die Ermittlung der geeigneten Reaktionsbedingungen der Singleplex-PCRs der Exons 6 und 7 umfangreichere Anpassungen erforderlich als für die Singleplex-PCRs der Exons 3 bis 5. Abbildung 3-3 zeigt hier beispielhaft die Temperaturoptimierung der Singleplex-PCR im Reamplifikationsansatz für den *mdm2*-Genabschnitt von Exon 6. Bei 52°C wurde das stärkste Amplifikat für Exon 6 erhalten, zusätzlich traten jedoch noch weitere Banden auf, die unspezifisch waren und mit steigender Temperatur schwächer wurden. Es zeigte sich aber auch, dass mit steigender Primeranlagerungstemperatur das Exon 6-Amplifikat schwächer wurde. Um ein optimales PCR-Ergebnis mit den Exon 6-Primern zu erreichen, stellt sich eine Primeranlagerungstemperatur von 58°C im Reamplifikationsansatz am günstigsten dar, da hier bei ausreichend starkem Produkt keine unspezifischen Banden auftreten. Bei der Temperaturoptimierung des Reamplifikationsansatzes für Exon 7 (Abbildung 3-4) wurde hingegen bei einer Primeranlagerungstemperatur von etwa 53°C das beste Ergebnis erzielt. Um in der Reamplifikation zu viele unterschiedliche Reaktionsbedingungen zu vermeiden, sollten die PCR-Bedingungen für möglichst viele Primerpaare gleich gestaltet werden. So konnten die PCR-Bedingungen für die Reamplifikation der Exons 3 bis 5 gleich gewählt werden. Für die PCR-Bedingungen der Reamplifikation der Exons 6 bis 7 mussten andere Bedingungen gewählt werden (Primerannealing 54°C), da unter den Bedingungen zur Amplifikation von Exon 3 bis 5 keine Amplifikation der Exons 6 und 7 möglich gewesen wäre (siehe auch 2.2.11.2).



**Abbildung 3-3:** Temperaturoptimierung der Reamplifikation des *mdm2*-Exon 6.

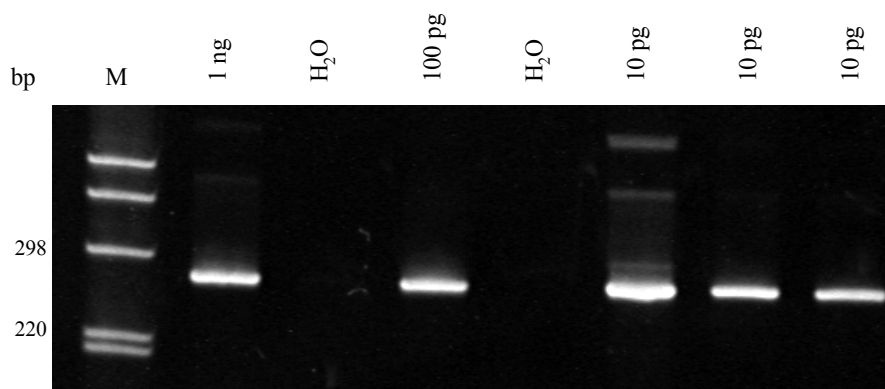
In der Primäramplifikation wurden 25 µg DNA der Zelllinie L540 eingesetzt. Aufgetragen sind 8 µl des Reamplifikationsansatzes. Die Reamplifikation wurde mit unterschiedlichen Primeranlagerungstemperaturen durchgeführt. **M:** Marker. Dargestellt ist ein 6%iges Polyacrylamidgel nach Ethidiumbromidfärbung.



**Abbildung 3-4:** Temperaturoptimierung der Reamplifikation des mdm2-Exon 7.

In der Primäramplifikation wurden 25 pg DNA der Zelllinie L540 eingesetzt. Aufgetragen sind 8 µl des Reamplifikationsansatzes. Die Reamplifikation wurde mit unterschiedlichen Primeranlagerungstemperaturen durchgeführt. **M:** Marker. 6%iges Polyacrylamidgel nach Ethidiumbromidfärbung.

Nachdem die jeweiligen Reaktionsbedingungen für die zehn Singleplex-PCRs der Exons 3 bis 7 sowohl für die Primäramplifikation als auch für die Reamplifikation für jedes Primerpaar einzeln bestimmt waren, mussten diese Reaktionsbedingungen für die Multiplex-PCR der Exons 3 bis 7 angepasst werden (2.2.11.2). Hierzu mussten die PCR-Bedingungen so eingestellt werden, dass der gemeinsame Einsatz aller 10 Primer in der Primäramplifikation den Nachweis von Zelllinien-DNA verschiedener Verdünnungen bis zu 10 pg (entspricht etwa dem Äquivalent an genomischer DNA einer einzelnen Zelle) ermöglicht. Erst der sensitive Nachweis dieser Menge gewährleistet auch den Nachweis von Einzelkopiesequenzen der mdm2-DNA aus den isolierten Einzelzellen. Abbildung 3-5 zeigt exemplarisch, dass unter den zuvor optimierten Bedingungen der Nachweis von 10 pg Zelllinien-DNA für das Exon 3 konstant möglich war.

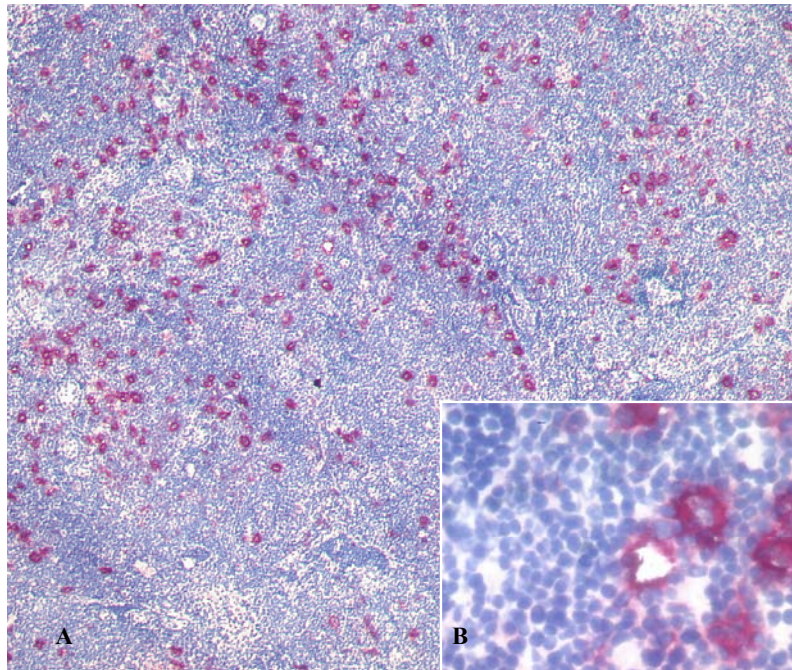


**Abbildung 3-5:** Reamplifikationsansatz von mdm2 für das Exon 3, Verdünnungsreihe.

Verwendete Primer: mdm2- Reamplifikationsprimer für Exon 3 (siehe 2.2.11.2). Aufgetragen wurden 8 µl aus dem Reamplifikationsansatz. **M:** Marker. Amplifiziert wurde DNA der Zelllinie L540. 6%iges Polyacrylamidgel nach Ethidiumbromidfärbung.

### 3.1.1.2 Ergebnisse der *mdm2*-Einzelzell-PCR-Analyse

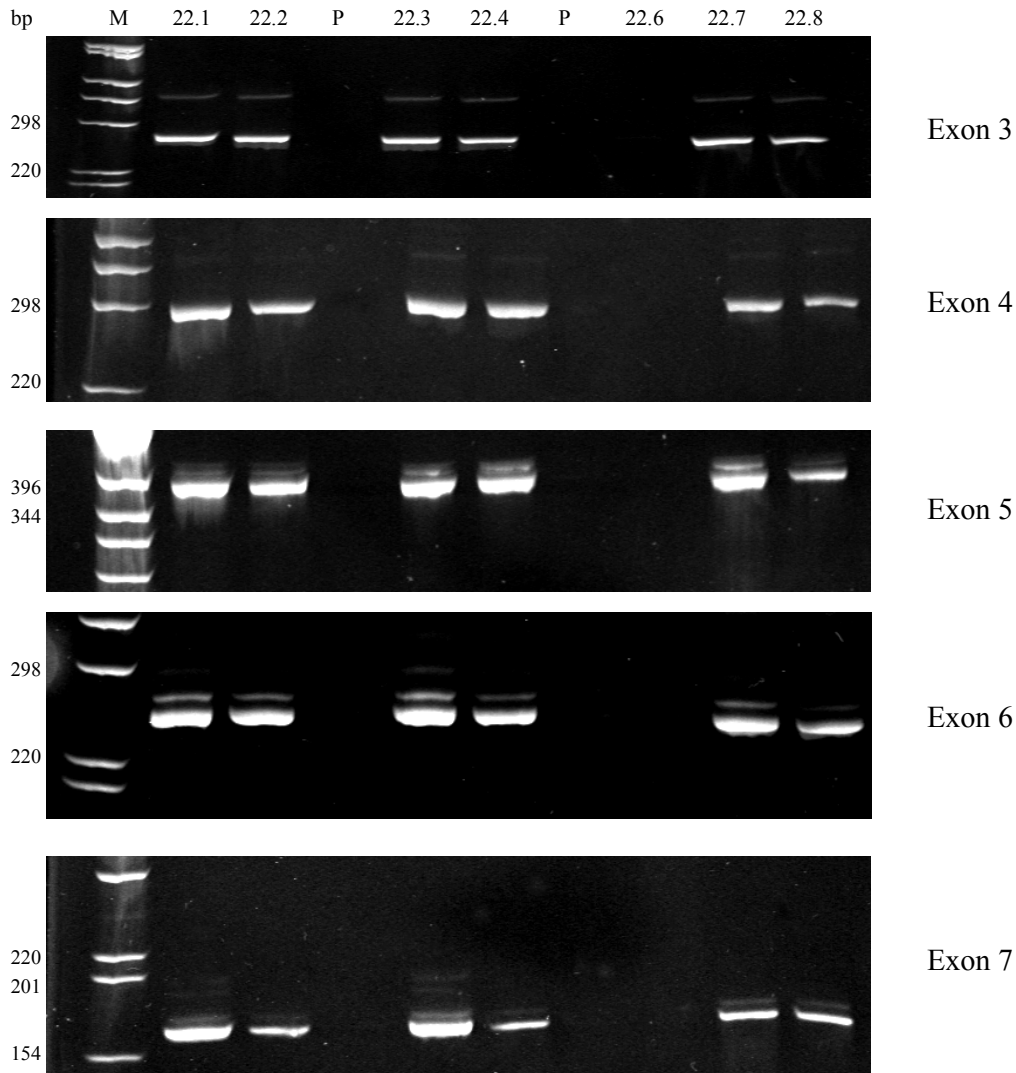
Aufgrund des sehr geringen Anteils von Tumorzellen (HRS-Zellen) in Gewebeproben von cHL-Fällen führen Untersuchungen an Gesamtgewebs-DNA-Extrakten nicht zu eindeutig den HRS-Zellen zuzuordnenden Ergebnissen. Daher ist die Isolierung einzelner HRS-Zellen notwendig, um Genveränderungen den Tumorzellen zuordnen zu können. In Abbildung 3-6 ist die immunhistologische Darstellung der CD30-Expression zu sehen, die in allen HRS-Zellen nachweisbar ist. Die so durch Morphologie identifizierbaren und markierten Tumorzellen wurden per Mikromanipulation isoliert und einer Multiplex-PCR zur Amplifikation der Exons 3-7 des *mdm2*-Gens unterzogen. Diese *mdm2*-Multiplex-PCR wurde im Rahmen der Arbeit etabliert (3.1.1.1).



**Abbildung 3-6:** Immunhistologische Darstellung des CD30-Rezeptors in den HRS-Zellen eines cHL-Falles.

CD30-positive HRS-Zellen wurden aus dem Gewebe durch Mikromanipulation (2.2.9.2) isoliert. A zeigt in der Übersicht einen Teil des Gewebes in 40facher Vergrößerung, B in 400facher Vergrößerung einen Gewebesausschnitt nach Isolierung des Kerns einer HRS-Zelle durch Mikromanipulation.

Diese *mdm2*-Multiplex-PCR umfasste die Amplifikation der *mdm2*-Exons 3 bis 7, die für den p53-bindenden Abschnitt kodieren. In Abbildung 3-7 sind beispielhaft die Amplifikate mehrerer isolierter Zellen aus einer Zellisolierungssitzung nach Durchführung der *mdm2*-Multiplex-PCR dargestellt.



**Abbildung 3-7:** Analyse der *mdm2*-Amplifikate einzelner HRS-Zellen für die Exons 3 bis 7. Aufgetragen sind die Amplifikate einzelner isolierter Zellen und Pufferproben aus einer Zellisolationssitzung (jeweils 8  $\mu$ l). **M:** Marker, **P:** Pufferproben, **22.1-22.8:** Bezeichnung der isolierten Zellen. 6%iges Polyacrylamidgel nach Ethidiumbromidfärbung.

Für die isolierten Zellen 22.1 bis 22.4 und die Zellen 22.7 und 22.8 konnte für die Exons 3 bis 7 jeweils das erwartete Amplifikat entsprechender Größe nachgewiesen werden. Von der isolierten Zelle 22.6 konnte dagegen für keines der Exons die entsprechende DNA-Sequenz amplifiziert werden.

Bei der Untersuchung einzelner Zellen aus Schnittpräparaten lässt sich das gewünschte PCR-Produkt nicht in allen Zellen darstellen, da der zu amplifizierende Anteil des Genoms zum Teil nicht in der isolierten Schnittebene vorhanden ist. Aufgrund des negativen Ausfalls in zahlreichen Zellen ist es erforderlich, sehr viele Zellen zu isolieren und der zweistufigen

„nested PCR“ zu unterwerfen, um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 121 HRS-Zellen von fünf verschiedenen Hodgkin-Fällen (siehe Tabelle 3-2) isoliert. Aus jeder dieser isolierten Zellen können theoretisch nach der Reamplifikation bis zu fünf verschiedene mdm2-Amplifikate entstehen, entsprechend den jeweils amplifizierten Exonabschnitten. Tatsächlich konnten nicht immer aus jeder Zelle alle fünf Exons amplifiziert werden, so dass die Anzahl der Amplifikate für jedes Exon unterschiedlich ist. Insgesamt entstanden aus den 121 isolierten Zellen mittels mdm2-Multiplex-PCR 254 Amplifikate der Exons 3 bis 7 des mdm2-Gens, die für die p53-bindende Stelle des Proteins kodieren. Die PCR-Produkte wurden sequenziert und mit den zuvor für die mdm2-Multiplex-PCR ermittelten Sequenzen der Exons 3 bis 7 mit den jeweils flankierenden Intronanteilen (siehe Abbildung 3-1) verglichen. In Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9 ist dies exemplarisch für Sequenzen des Exons 3 bzw. Sequenzen des Exons 6 dargestellt.

Die Analyse der Sequenzen der 254 Amplifikate erbrachte keinen Nachweis von Mutationen in den Exons 3 bis 7 des mdm2-Gens (p53-bindende Region) bei HRS-Zellen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenzen geführt hätte. Nur in den Sequenzen von zwei Amplifikaten wurden Basenaustausche nachgewiesen, die die Aminosäuresequenz des mdm2-Proteins jedoch nicht beeinflussten. Die DNA einer isolierten Zelle wies in der DNA-Sequenz des Exon 5-Amplifikates an einer Stelle auf dem einen Allel ein Adenosintriphosphat und auf dem anderen Allel ein Guanosintriphosphat auf.

Aufgrund der enormen Sensitivität der Einzelzell-PCR und der damit verbundenen Kontaminationsgefahr war das Mitführen von zahlreichen Negativkontrollen zwingend notwendig. So wurde zum Ausschluss bzw. Nachweis der zufälligen Amplifikation von aus beschädigten Zellen freigesetzten DNA-Fragmenten nach jedem zweiten Zellisolierungsvorgang eine Probe des Puffers, mit dem die immungefärbten Schnitte während des „Zellpickens“ überschichtet sind, entnommen und ebenfalls der zweistufigen mdm2-PCR unterworfen. Zur Auswertung herangezogen wurden nur Amplifikate der Zellen aus Zellisolierungssitzungen, bei denen die Pufferproben negativ blieben. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 3-7. Bei den der zweistufigen mdm2-PCR unterzogenen Pufferproben zeigten sich keine mdm2-spezifischen PCR-Produkte. Insgesamt wurden 48 Pufferproben entnommen, aus denen nach Einsatz in der mdm2-Multiplex-PCR 240 PCR-Produkte entstanden, von denen nur in 4 Proben Amplifikate (~ 1%) nachgewiesen wurden. Dies belegt die Spezifität und Reinheit der durchgeführten Zellisolierung und der Single-Copy-PCR.



**Tabelle 3-2:** mdm2-Analyse isolierter HRS-Zellen aus fünf Fällen von cHL.

Fall-Nr.	Zahl der isolierten Zellen*	Sequenzen pro Exon				
		Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7
<b>1</b>	27	14	10	7	9	11
<b>2</b>	28	10	11	13	6	11
<b>3</b>	30	12	13	5	4	13
<b>4</b>	20	13	13	12	12	11
<b>5</b>	16	7	9	8	8	12
<b>Σ</b>	<b>121</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>45</b>	<b>39</b>	<b>58</b>
		<b>254</b>				

\*: Angegeben sind alle in den ausgewerteten Picksitzungen gepickten Zellen.

Abbildung 3-8: Vergleich von mdm2-Sequenzen des Exons 3 aus den isolierten HRS-Zellen des Falles 4.

**Vergleich von Exon 3-DNA-Sequenzen:**

<u>exon3</u>	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	CCACAGATGT <u>TTCATGATT</u> <u>CCAGTTTCA</u> <u>TCG</u> TGTCCTT TTTTCCTTG <u>TAGGCAAATG</u> <u>TGCAATACCA</u> <u>ACATGTCTGT</u> <u>ACCTACTGAT</u> <u>GGTGCTGTAA</u>
	<b>up-Primer</b> →
22c1exon3	.....
22c2exon3	.....
22c3exon3	.....
22c4exon3	.....
22c7exon3	.....
22c8exon3	.....
22c9exon3	.....
22c10exon3	.....
<u>exon3</u>	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	<u>CCACCTCACA</u> <u>GATTCAGCT</u> <u>TCGGAACAAG</u> <u>AGACCCTGGT</u> <u>TAG</u> TATTTT GTCTCGTGTA ACTTTTAAGA ATAATTTATT TTATGAAGTG ATAAACTAAA
22c1exon3	.....
22c2exon3	.....
22c3exon3	.....
22c4exon3	.....
22c7exon3	.....
22c8exon3	.....
22c9exon3	.....
22c10exon3	.....
<u>exon3</u>	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	TTTCGTATAC CTCAATTGTA GCATGGCTCT GTAATAAAA TTGTATGTGC ATAGCTTAAA GTGTGCTACC <u>TCTGGCGTAA</u> CTGCGTGGAG
	← <b>low-Primer</b>
22c1exon3	.....
22c2exon3	.....
22c3exon3	.....
22c4exon3	.....
22c7exon3	.....
22c8exon3	.....
22c9exon3	.....
22c10exon3	.....

Legende:  
exon3: Exon 3-Sequenz mit flankierenden Intronanteilen  
 22c1exon3 bis 22c10exon3: Exon 3-Sequenzen aus isolierten HRS-Zellen des Falles 4  
 Die kodierende Sequenz von Exon 3 ist kursiv und unterstrichen dargestellt.  
 . : Übereinstimmung von DNA-Sequenz der isolierten Zelle und Vergleichssequenz  
 → : Primer

Abbildung 3-9: Vergleich von mdm2-Sequenzen des Exons 6 aus den isolierten HRS-Zellen des Falles 4.

**Vergleich von Exon 6-DNA-Sequenzen:**

<u>exon6</u>	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	ATTG <b>TGCTTT</b>	<b>TAAGTGCCTA</b>	<b>CAAGC</b> TTGCC	AATGATAAAT	TTGGT <b>TTT</b> TGA	ATGTGTGCAG	TAGTTCATAC	TAAGTATGTA	TGTAGAAGTC	TGGTTAGATC	
	<b>up-Primer</b> →										
22c1exon6	.....										
22c2exon6	.....										
22c3exon6	.....										
22c5exon6	.....										
22c7exon6	.....										
22c8exon6	.....										
22c10exon6	.....										
<u>exon6</u>	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	CAGCTTAATA	CAAATTTT <b>T</b> A	TTCTAAAATG	TACATCTCTT	GTTATTTTTT	TTTTTTCTGT	CTACA <b>AGGAA</b>	<b>AATATATACC</b>	<b>ATGATCTACA</b>	<b>GGAACTTGGT</b>	
22c1exon6	.....										
22c2exon6	.....										
22c3exon6	.....										
22c5exon6	.....										
22c7exon6	.....										
22c8exon6	.....										
22c10exon6	.....										
<u>exon6</u>	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....	..... .....  .....
	<b>AGTAGTCAAT</b>	<b>CAGCAGG</b> GTA	AGTTAATTTT	<b>GAGCATCATG</b>	<b>GATAAATACC</b>	ATAAAAACGT					
	← <b>low-Primer</b>										
22c1exon6	<b>R</b> .....	.....									
22c2exon6	.....	.....									
22c3exon6	.....	.....									
22c5exon6	.....	.....									
22c7exon6	.....	.....									
22c8exon6	.....	.....									
22c10exon6	.....	.....									

Legende:

Exon6: Exon 6-Sequenz mit flankierenden Intronanteilen

22c1exon6 bis 22c10exon6: Exon 6-Sequenzen aus isolierten HRS-Zellen des Falles 4.

Die kodierende Sequenz von Exon 6 ist kursiv und unterstrichen dargestellt.

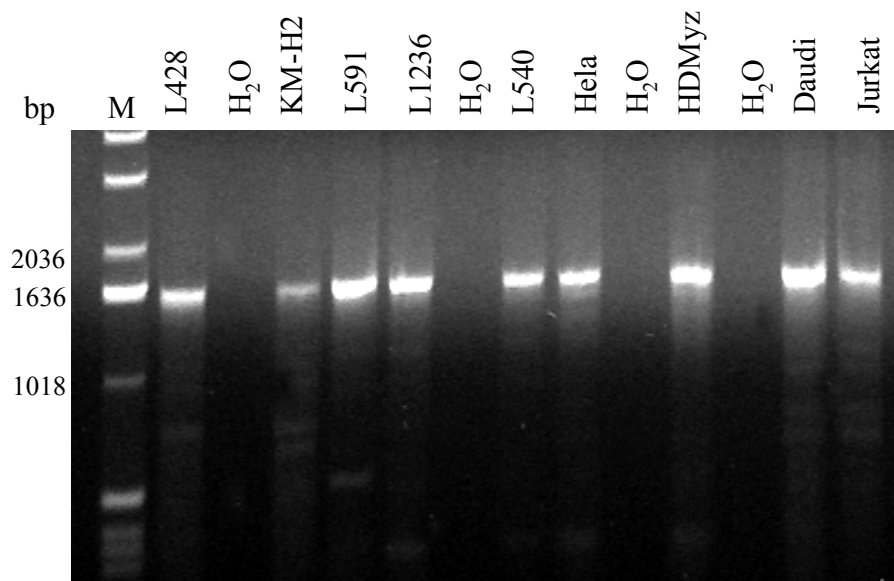
R : Es ließ sich nicht eindeutig ermitteln, ob es sich um A oder G in der entsprechenden DNA-Sequenz handelt.

. : Übereinstimmung von DNA-Sequenz der isolierten Zelle und Vergleichssequenz

→ : Primer

### 3.1.2 Analyse der *mdm2*- und *p14*-RNA-Transkripte in verschiedenen Hodgkin-Zelllinien

Zusätzlich zur Analyse der DNA-Sequenz der p53-bindenden Region des *mdm2*-Gens auf Einzelzellebene (siehe 3.1.1) wurden verschiedene Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien auf die Expression des *mdm2*-Gens untersucht. Dabei zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien nach der RT-PCR das erwartete PCR-Produkt von 1607 bp (siehe Abbildung 3-10). Dies spricht für die Expression von MDM2 in allen analysierten Zelllinien. Lediglich in der Zelllinie KM-H2 ließ sich eine deutlich reduzierte *mdm2*-RNA-Menge nachweisen. Zur Überprüfung auf das Vorliegen von Mutationen wurde das RT-PCR-Produkt, das den kompletten kodierenden Bereich des *mdm2*-Gens umfasste, sequenziert. In keiner der untersuchten Zelllinien konnte hierbei ein Aminosäureaustausch oder eine Mutation nachgewiesen werden, die zum Verlust oder der Änderung der Funktionalität des MDM2-Proteins geführt hätte (siehe auch Tabelle 3-3).

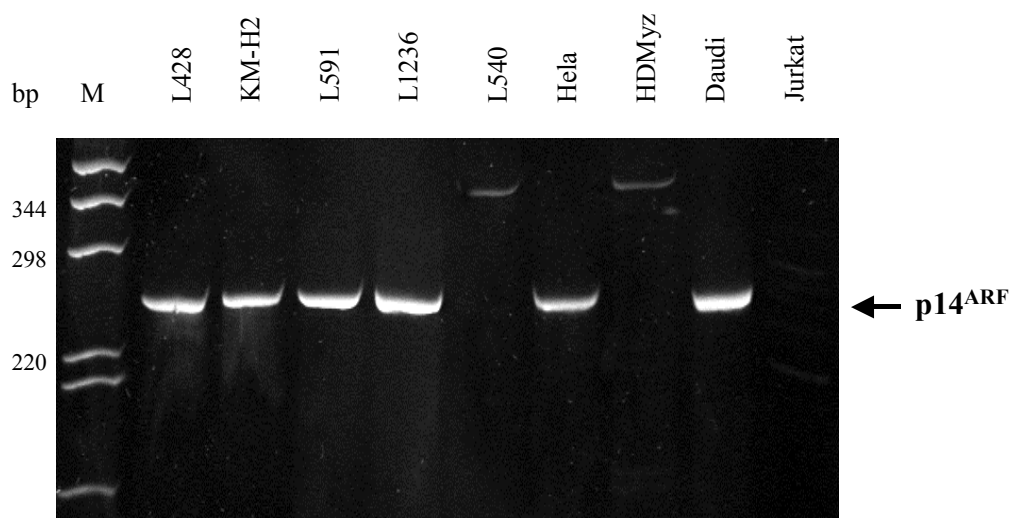


**Abbildung 3-10:** RT-PCR zum Nachweis der *mdm2*-Transkription in Hodgkin-Zelllinien und verschiedenen anderen Zelllinien.

Getestet wurden die **Hodgkin-Zelllinien** L428, KM-H2, L591, L1236 und L540, die **Non-Hodgkin-Zelllinien** Daudi und Jurkat sowie die myelomonozytische Zelllinie HDMyz und die Adenokarzinom-Zelllinie HeLa. Aufgetragen sind jeweils 8  $\mu$ l Amplifikat aus der *mdm2*-RT-PCR (siehe 2.2.11.1.2). **M:** Marker. 0,8%iges mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel.

Da sowohl auf DNA-Ebene im *mdm2*-Gen als auch auf RNA-Ebene im *mdm2*-Transkript in Hodgkin Lymphomen bzw. Hodgkin-Zelllinien keine Mutationen nachweisbar waren, wurde zusätzlich das Vorhandensein von *p14<sup>ARF</sup>*-Transkripten in verschiedenen Hodgkin-Zelllinien analysiert. *p14<sup>ARF</sup>* ist ein Tumorsuppressor, der als einer der direkten Gegenspieler von *mdm2* dessen Funktion inhibieren und die *p53*-Antwort induzieren kann, so dass auch das Fehlen des *p14<sup>ARF</sup>*-Transkriptes oder Mutationen von *p14<sup>ARF</sup>* selbst sich auf den *mdm2/p53*-Regelkreislauf auswirken können.

Daher wurden verschiedene Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien auf das Vorhandensein eines *p14<sup>ARF</sup>*-Transkriptes untersucht. Hierzu wurde in den Zelllinien ein 259 bp langer Abschnitt der *p14<sup>ARF</sup>*-mRNA (GenBank Acession.Nr. AF527803, Position 212-470) amplifiziert und sequenziert (siehe 2.2.11.1.3). In allen untersuchten B-Zelllinien und in der Zelllinie Hela (Adenokarzinom) konnte nach der RT-PCR das *p14<sup>ARF</sup>*-Transkript in der erwarteten Länge nachgewiesen werden (Abbildung 3-11). Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab auch hier keine Mutationen, die einen Funktionalitätsverlust von *p14<sup>ARF</sup>* erklären würden. Auch in den Hodgkin-B-Zelllinien (L428, KM-H2 und L1236) war das Transkript nachweisbar, wohingegen in den Zelllinien L540 (putative Hodgkin-Zelllinie vom T-Zell-Typ) und in den Zelllinien Jurkat (T-Zelllinie) und HDMyz (myelomonozytische Zelllinie) nach der RT-PCR kein *p14<sup>ARF</sup>*-Transkript detektierbar war (siehe Abbildung 3-11, Tabelle 3-3).



**Abbildung 3-11:** RT-PCR zum Nachweis der p14<sup>ARF</sup>-Transkription bei Hodgkin-Zelllinien und verschiedenen anderen Zelllinien.

Getestet wurden die **Hodgkin-Zelllinien** L428, KM-H2, L591, L1236 und L540, die **Non-Hodgkin-Zelllinien** Daudi und Jurkat sowie die myelomonozytische Zelllinie HDMyz und die Adenokarzinom-Zelllinie HeLa. Aufgetragen sind jeweils 8 µl Amplifikat aus der p14<sup>ARF</sup>-RT-PCR (siehe 2.2.11.1.2). **M:** Marker. 6%iges Polyacrylamidgel mit Ethidiumbromidfärbung.

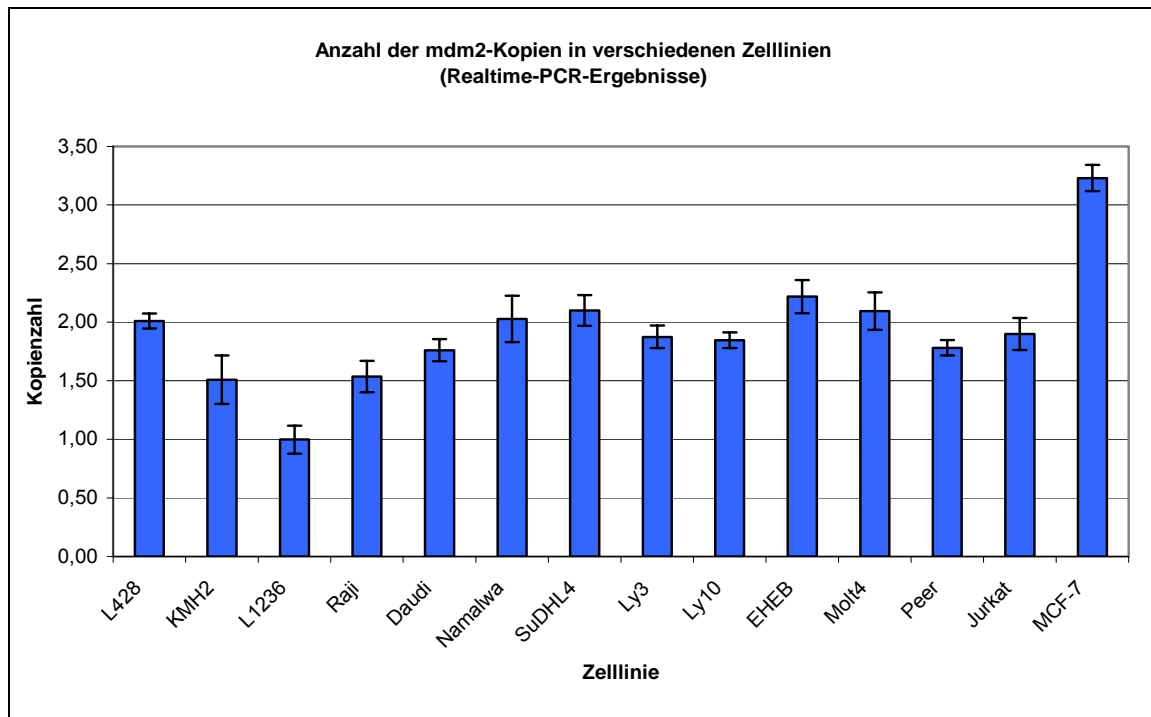
**Tabelle 3-3:** Nachweis von p14<sup>ARF</sup>- und mdm2-Transkripten in verschiedenen Hodgkin-Zelllinien und verschiedenen anderen Zelllinien.

Zelllinie	mdm2	p14 <sup>ARF</sup>
L428	+	+
KM-H2	(+)	+
L591	+	+
L1236	+	+
L540	+	-
HeLa	+	+
HDMyz	+	-
Daudi	+	+
Jurkat	+	-

### 3.1.3 Analyse der *mdm2*-Genkopienzahl ausgewählter Tumorzelllinien

Mit Hilfe einer DNA-Realtime-PCR wurde analysiert, in welcher Kopienzahl das *mdm2*-Gen in verschiedenen Zelllinien vorliegt. Neben der Analyse des *mdm2*-Gens wurde von jeder Zelllinien-DNA auch eine PCR mit einem sog. „single copy gene“ durchgeführt. Dabei handelte es sich um das *gapdh*-Gen. Die Quantifizierung erfolgte, indem die Differenz aus dem  $C_T$ -Werte des *gapdh*-Gens und dem  $C_T$ -Wert des untersuchten *mdm2*-Gens gebildet wurde (siehe auch 2.2.11.3).

Bei den meisten Non-Hodgkin-Zelllinien sowie in der Hodgkin-Zelllinie L428 wurden die physiologischerweise zu erwartenden zwei *mdm2*-Genkopien nachgewiesen. In der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 ließen sich hingegen drei Kopien des *mdm2*-Gens darstellen. Diese erhöhte Kopienzahl steht im Einklang mit der Literatur, in der von einer Heteroploidie des Chromosomensatzes [167] berichtet wird. Im Gegensatz hierzu wiesen die Hodgkin-Zelllinien L1236 und KM-H2 einen  $C_T$ -Wert auf, der mit einer Kopie des *mdm2*-Gens vereinbar war. Für die Hodgkin-Zelllinie L1236 steht dieser Wert im Einklang mit der Literatur, in der von einem Verlust des *mdm2*-Chromosomenabschnitts im zweiten Allel berichtet wird [168;169].



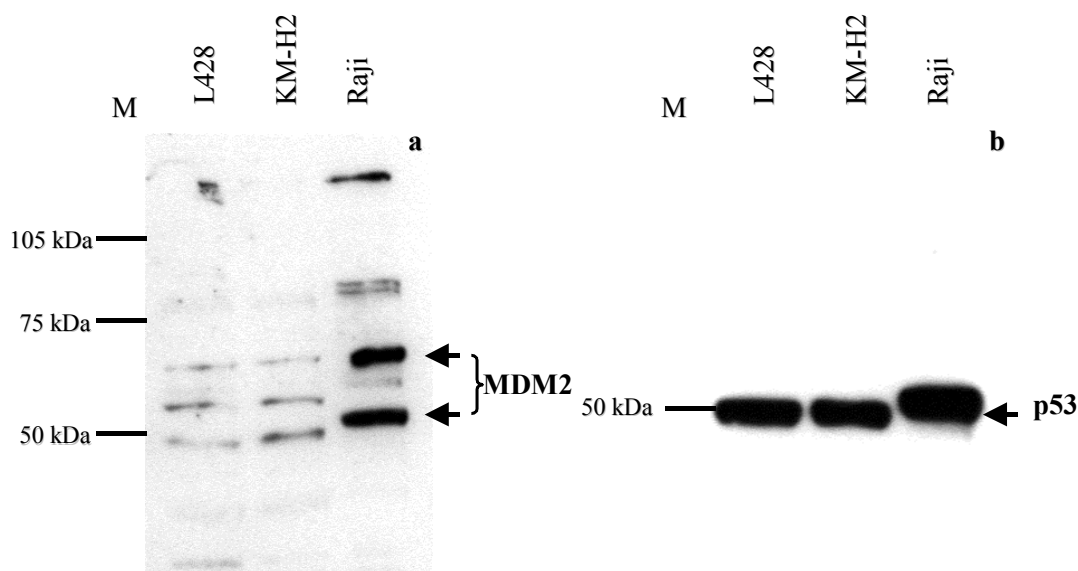
**Abbildung 3-12:** Anzahl der *mdm2*-Genkopien in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien (Bestimmung mittels Realtime-PCR).

## 3.2 MDM2-Proteinexpression

### 3.2.1 MDM2-Proteinexpression in Hodgkin-Zelllinien (Western Blot)

Der Nachweis der *mdm2*-RNA in allen Zelllinien lässt noch keine Aussage über die Darstellung und Funktionalität des Proteins zu. Daher wurden zusätzlich zur Analyse von *mdm2* auf DNA-Ebene (3.1.1) und auf RNA-Ebene (3.1.2) einige Zelllinienlysate auf das Vorhandensein des MDM2-Proteins untersucht.

Wie Abbildung 3-13 zeigt, wird das MDM2-Protein sowohl in der B-Zelllinie Raji als auch etwas schwächer in den Hodgkin-Zelllinien L428 und KM-H2 nachgewiesen. Als Kontrolle wurden die Zelllinienextrakte zusätzlich auf das Vorhandensein des p53-Proteins analysiert. Auch hier konnte in allen drei Zelllinien das Protein nachgewiesen werden, wobei ebenfalls die Zelllinie Raji das stärkste Signal aufwies. In der Zelllinie Raji liegt ein biallelischer Aminosäureaustausch vor, der zu keiner Funktionsänderung des p53-Proteins führt [170].



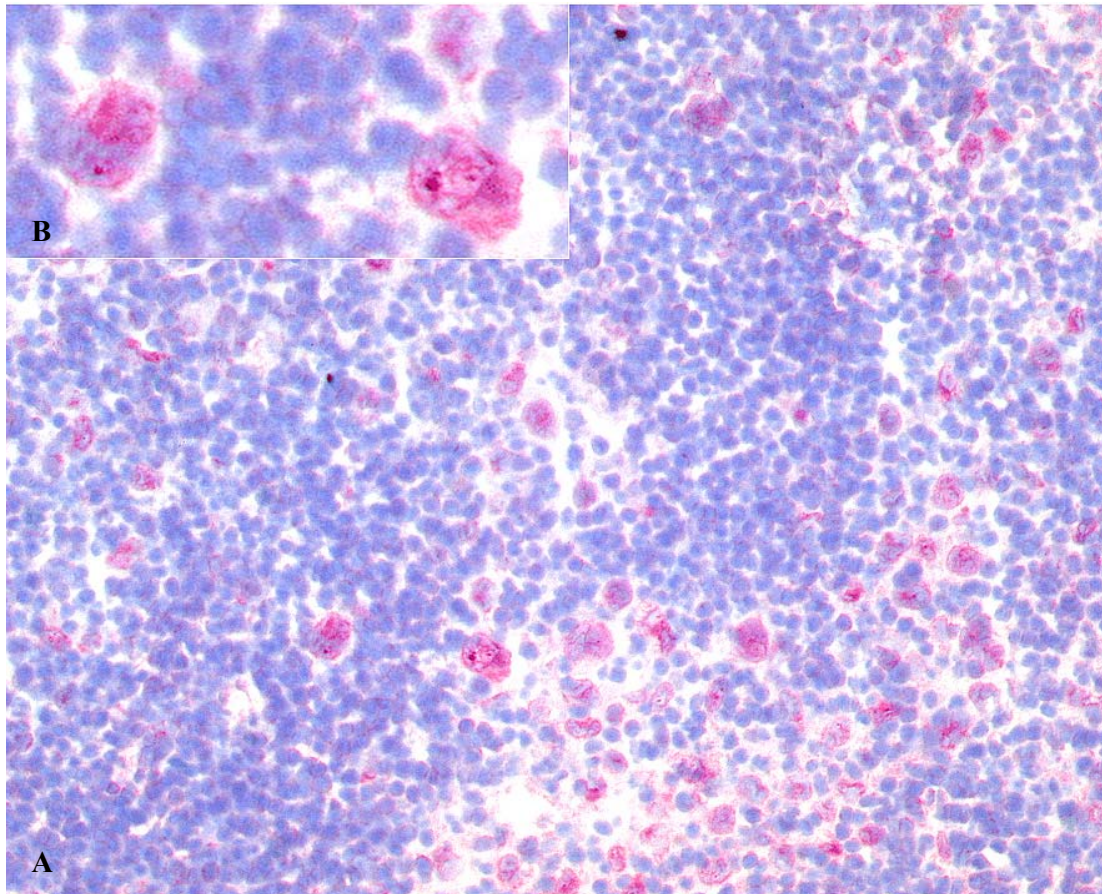
**Abbildung 3-13:** MDM2-Expression in B-Zelllinien.

Western Blot zur Darstellung von MDM2 (a) und p53 (b) in Hodgkin-Zelllinien und der Burkitt-Zelllinie Raji. Der Nachweis für MDM2 erfolgte mit einem MDM2-Antikörper (Santa Cruz), der Nachweis für p53 erfolgte mit einem p53-Antikörper (DAKO). Aufgetragen sind jeweils 50 µg Zelllysate. Die Reaktion fand unter nicht reduzierenden Bedingungen statt. **M:** Markerprotein mit Angabe der Größe in Kilodalton. Der Nachweis des MDM2-Proteins gelang nicht unter reduzierenden Bedingungen, so dass in den Experimenten unter nicht reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde. Eine genaue Größenbestimmung der Proteine war so nicht möglich.



### 3.2.2 Immunhistologische Untersuchungen an MDM2

Um das Expressionsmuster von MDM2 in cHL-Fällen zu bestimmen, wurden immunhistologische Färbungen an Gewebeschnitten durchgeführt. Da hierfür keine Paraffingängigen Antikörper verfügbar waren, wurden Gefriergewebeschnitte gefärbt. Die immunhistologischen Färbungen dieser Tumorgewebe mit dem MDM2-Antikörper zeigten in allen Fällen eine Expression von MDM2 in den Kernen der HRS-Zellen. Abbildung 3-14 zeigt dies exemplarisch für die HRS-Zellen eines cHL. Hierbei handelt es sich um Tumorgewebe des Falles Nr.5, von dem auch einzelne HRS-Zellen isoliert wurden (siehe 3.1.1.2, Tabelle 3-2).



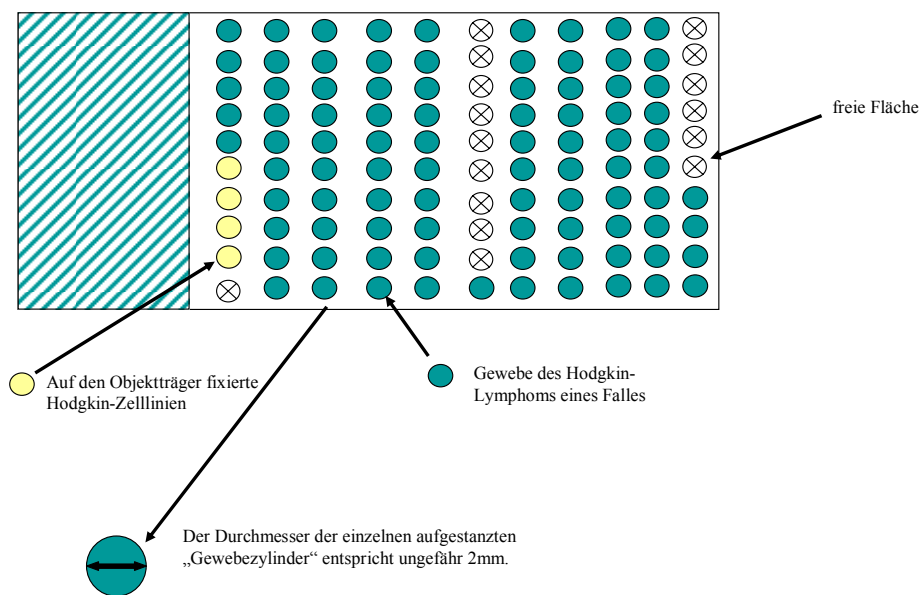
**Abbildung 3-14:** Immunhistologische Darstellung der MDM2-Expression in einem cHL-Fall. Dargestellt sind die positiv gefärbten Kerne der HRS-Zellen in der Übersicht (A) und in einem Ausschnitt des Gewebes (B).

### 3.3 Analyse von MDM2-beeinflussenden Proteinen

#### 3.3.1 Immunhistologische Färbungen an Proteinen der Apoptose und Zellzyklusregulierung

Zusätzlich zu den Untersuchungen von mdm2 auf DNA-Einzelzell-, RNA- und Protein-Ebene wurden immunhistochemische Untersuchungen für Proteine, die an Apoptose und Zellzyklusregulierung beteiligt sind, durchgeführt. Hierzu wurden sowohl einzelne Fälle als auch eine große Anzahl verschiedener cHL-Fälle auf entsprechenden Gewebearrays (schematische Darstellung siehe Abbildung 3-15) auf ihr Expressionsmuster bezüglich dieser Proteine „gescreent“. Untersucht wurden hierbei insbesondere Proteine, die in Zusammenhang mit dem zentralen hier untersuchten mdm2-Gen stehen und bei Zellzyklusregulierung und/oder Apoptose beteiligt sind. Neben p53, das als Tumorsuppressorprotein eine zentrale Rolle bei der Zellzyklusregulierung und Apoptose spielt, wurde auch das „upstream“ von p53 gelegene ATM-Protein untersucht, das eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und in der Zellzyklusregulierung einnimmt. Zusätzlich wurden noch die an der Zellzyklusregulierung beteiligten Proteine Cyclin D1, p21, p27 Kip1, Rb (Tumorsuppressorprotein) und Cyclin E untersucht. In Tabelle 3-4 und den Abbildungen Abbildung 3-16 bis Abbildung 3-23 sind die entsprechenden Expressionsmuster dargestellt.

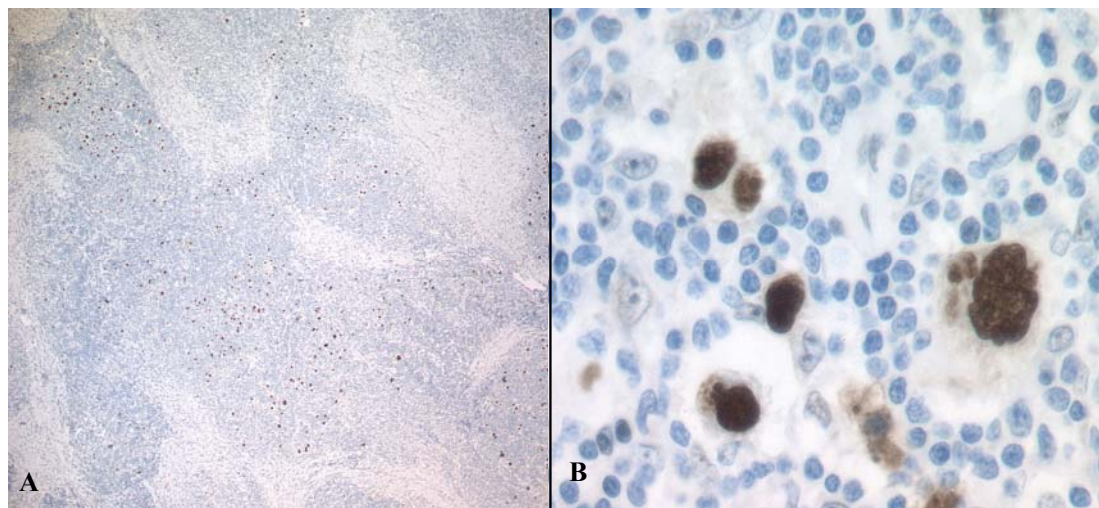
Schematische Darstellung eines Hodgkin-Gewebearrays

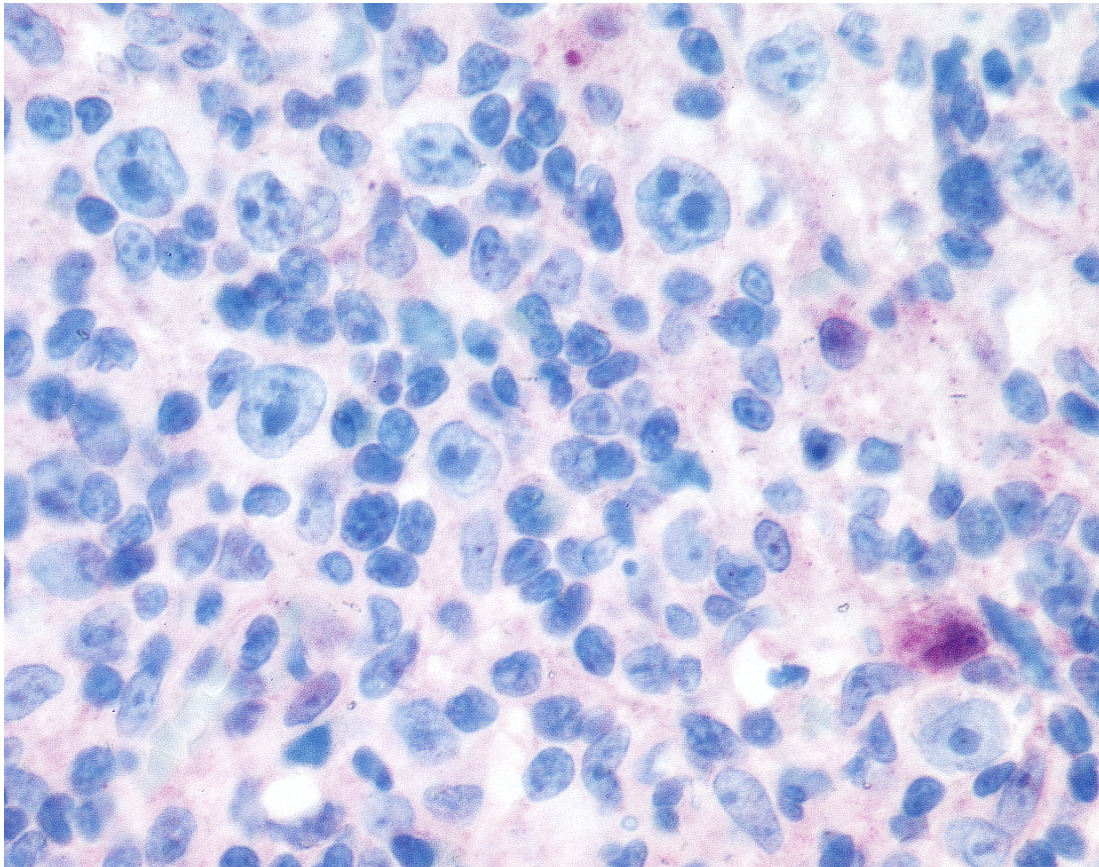


**Abbildung 3-15:** Schematische Darstellung eines Hodgkin-Gewebearrays. Die Gewebe der unterschiedlichen Fälle von cHL sind von einem „Multi-Tissue“-Block auf Objektträger aufgebracht worden (siehe 2.1.1.2).

**Tabelle 3-4:** Expressionsmuster von Zellzyklus- und Apoptose-assoziierten Antigenen beim cHL.

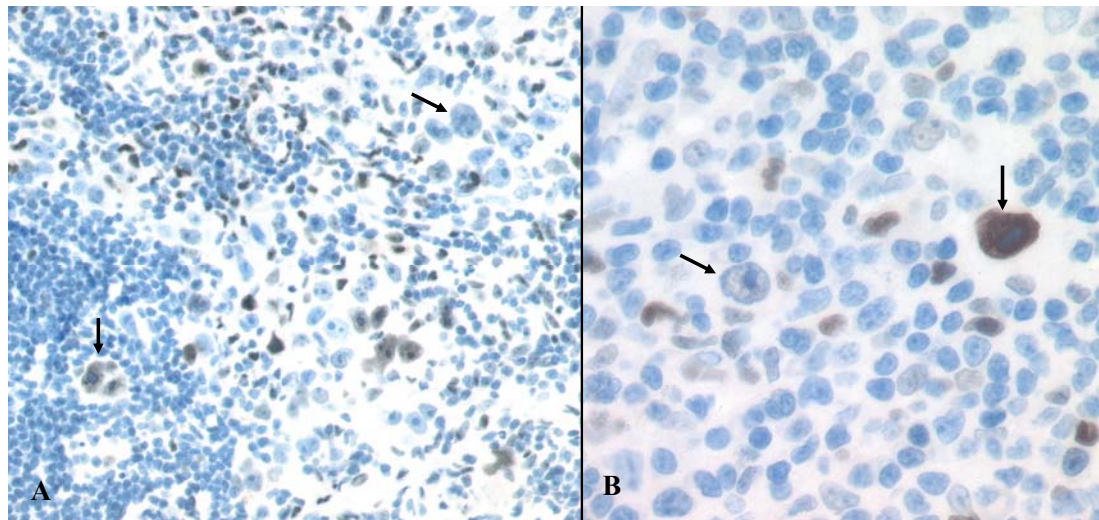
Antikörper	Anzahl untersuchter Fälle $\Sigma$	Expressionsprofil				
		neg.	< 10% +	< 50% +	> 50% +	pos.
p53	71	0	2	0	1	68
Cyclin D1	66	56	6	1	3	0
p21	64	6	6	4	27	21
p27 Kip1	68	59	3	4	0	2
Rb	71	1	0	0	2	68
Cyclin E	70	6	9	4	8	43
ATM	60	3	5	3	4	45
E2F-1	64	27	15	3	8	11

**Abbildung 3-16:** Immunhistologische Darstellung des p53-Antigens in einem Fall von cHL. Dargestellt sind die stark positiv gefärbten Kerne der HRS-Zellen in der Übersicht (A) und in einem Ausschnitt des Gewebes (B).



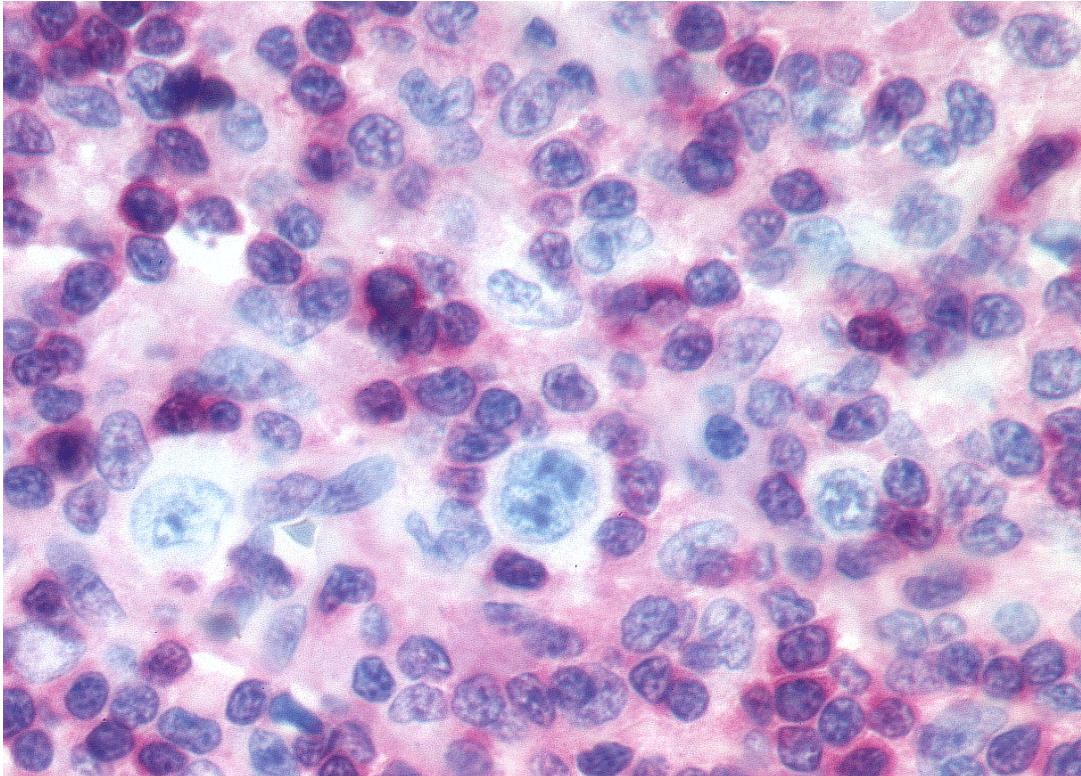
**Abbildung 3-17:** Immunhistologische Darstellung der Cyclin D1-Expression in einem Fall von cHL.

Die Kerne der HRS-Zellen sind negativ.



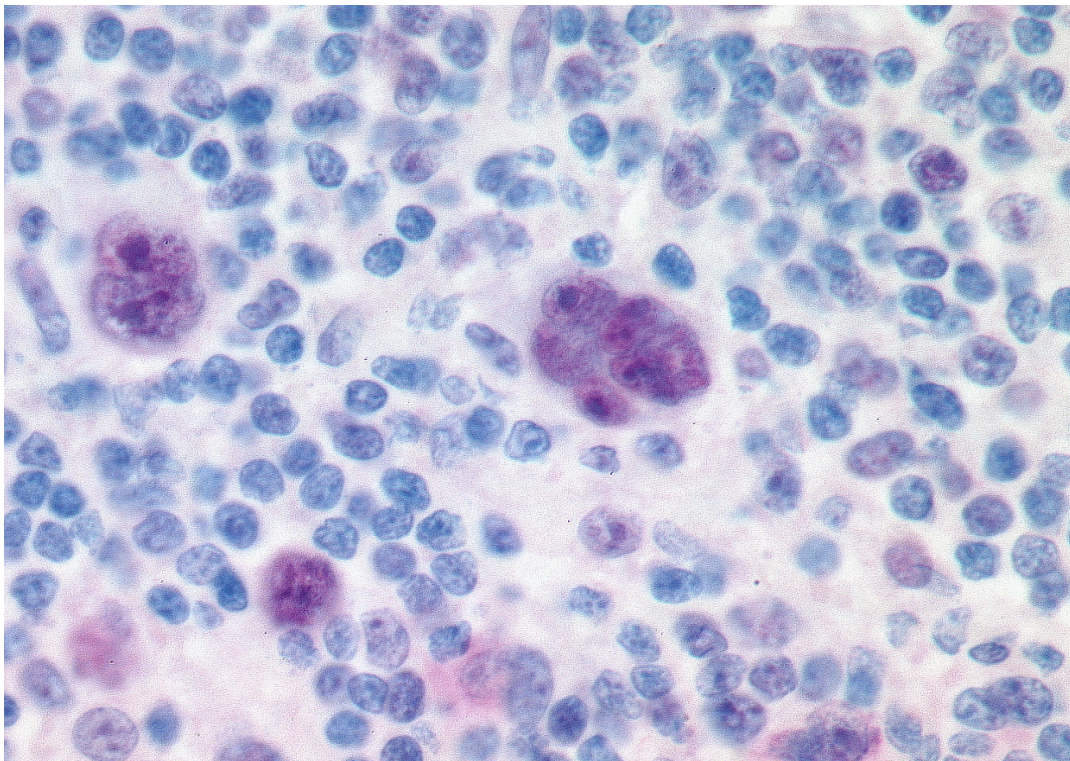
**Abbildung 3-18:** Immunhistologische Darstellung des p21-Antigens bei einem cHL-Fall.

A: In der Übersicht sind sowohl positiv gefärbte Kerne von HRS-Zellen zu sehen, als auch Kerne, in denen kein p21 exprimiert wird. B: Der Ausschnitt zeigt exemplarisch eine HRS-Zelle mit positiv gefärbtem Kern und eine HRS-Zelle, in der kein p21 im Kern exprimiert wird (siehe Pfeile).



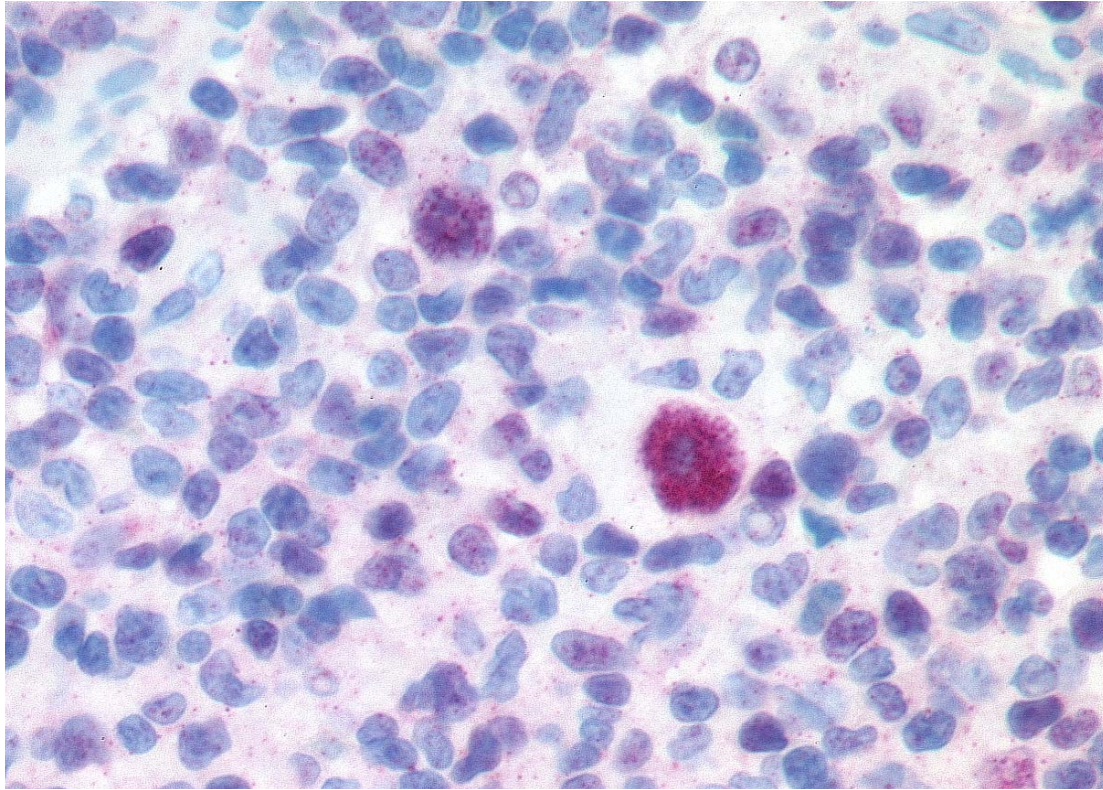
**Abbildung 3-19:** Immunhistologische Darstellung der p27Kip1-Expression bei einem Fall von cHL.

Im Kern der HRS-Zellen wird kein p27Kip1 exprimiert.

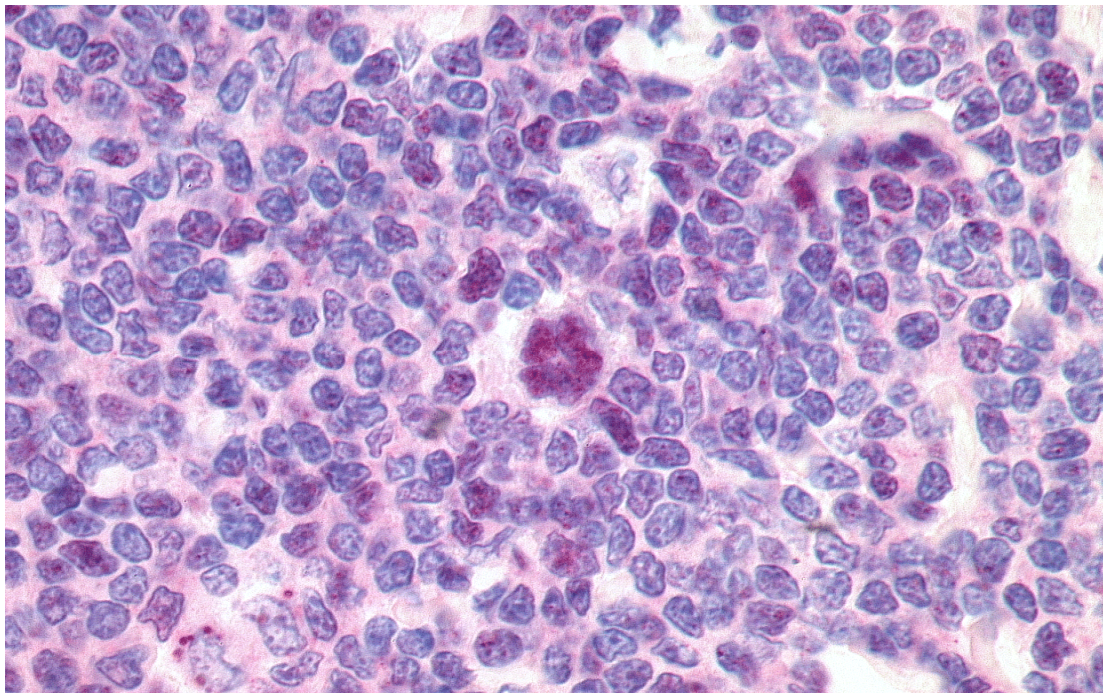


**Abbildung 3-20:** Immunhistologischer Nachweis der Rb-Expression in HRS-Zellen eines cHL-Falles.

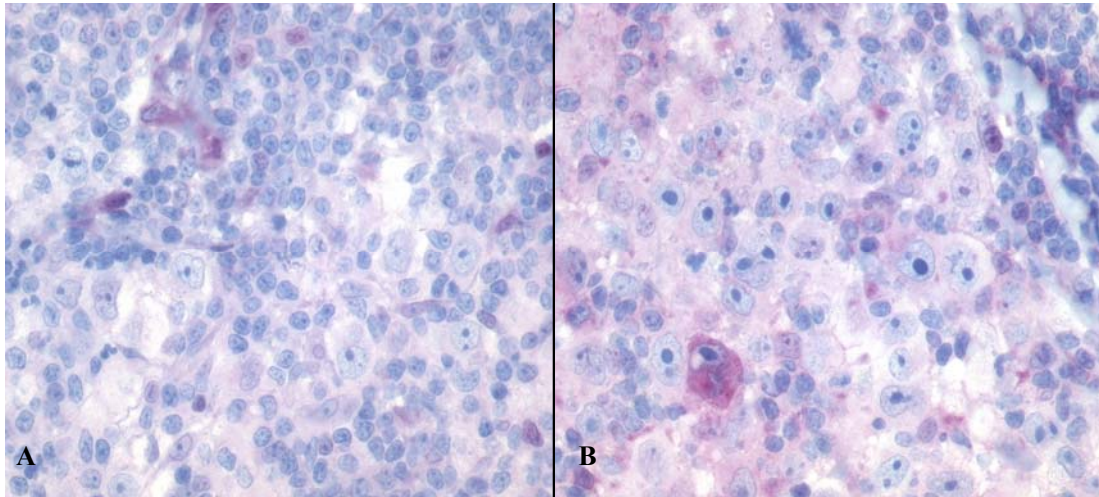
Das Rb-Protein wird in den Kernen der HRS-Zellen exprimiert.



**Abbildung 3-21:** Immunhistologischer Nachweis der Expression des Cyclin E-Proteins in den Tumorzellen eines Falles von cHL.  
Das Protein wird in den Kernen der HRS-Zellen exprimiert.



**Abbildung 3-22:** Immunhistologische Darstellung des ATM-Antigens in den Tumorzellen eines cHL-Falles.  
Das Protein wird in den Kernen der HRS-Zellen und in reaktiven lymphatischen Zellen exprimiert.



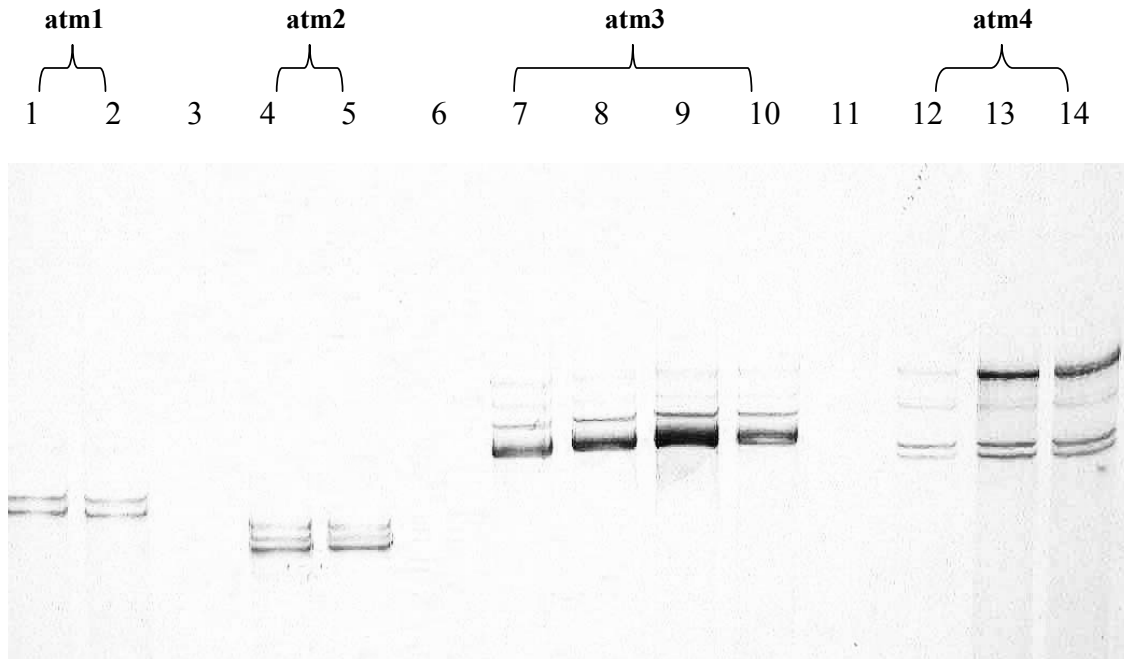
**Abbildung 3-23:** Nachweis des E2F-1-Proteins in den Tumorzellen eines Falles von cHL mittels Immunhistologie.

A: Die Kerne der HRS-Zellen sind negativ. B: In einzelnen HRS-Zellen eines cHL wird E2F-1 exprimiert.

### 3.3.2 Untersuchung verschiedener ATM-Regionen mit Hilfe von SSCP-Gelen

Neben der Analyse von Hodgkin-Zelllinien auf das Vorhandensein von  $mdm2$ - und  $p14^{ARF}$ -Transkripten (3.1.2) wurde auch das  $atm$ -Gen, das als Reparatur- und Zellzyklusregulierungsprotein eine zentrale Rolle spielt, auf RNA-Ebene in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien untersucht. Eine der Aufgaben von ATM besteht in der Phosphorylierung und dadurch stattfindenden Aktivierung von  $p53$ . Zudem kann ATM auch MDM2 direkt phosphorylieren. Mit Hilfe der SSCP-Technik wurden diverse Zelllinien auf RNA-Ebene mit sieben  $atm$ -Primerpaaren (siehe 2.2.11.1.1) auf evtl. vorhandene Mutationen in den Exons 52 bis 61 untersucht. Hierbei handelt es sich um die sogenannten „Mutationshotspotregionen“ des  $atm$ -Gens, in denen überdurchschnittlich häufig Mutationen auftreten.

Abbildung 3-24 zeigt exemplarisch das Ergebnis der SSCP mit vier Primerpaaren ( $atm1-4$ , Exons 52 bis 58), das an verschiedenen Zelllinien erhoben werden konnte. Dargestellt sind neben einer Zelllinie, die von einem Patienten mit Ataxia Telangiectasia abstammt (GM02782), noch die Adenokarzinom-Zelllinie Hela und die L540, eine putative Hodgkin-Zelllinie vom T-Zelltyp. Bei der Zelllinie GM02782 handelt es sich um eine Zelllinie, von der bekannt ist, dass sie im untersuchten Bereich keine Mutationen aufweist.



**Abbildung 3-24:** Analyse von verschiedenen Zelllinien auf Mutationen im atm-Gen mittels SSCP-Technik.

In der Abbildung ist die Analyse von Zelllinien für Amplifikate dargestellt, die mit den Primerpaaren **atm1** bis **atm4** (Exons 52 bis 58) amplifiziert wurden. Aufgetragen sind jeweils 2 µl Amplifikat aus der **atm**-RT-PCR (siehe 2.2.11.1.1). **1, 4, 7, 8, 12, 13:** HeLa; **2, 5, 10, 14:** GM02782; **9:** L540; **3, 6, 11:** H<sub>2</sub>O. 8%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel nach Silbernitratfärbung.

Aus Abbildung 3-24 ist zu ersehen, dass für die jeweiligen Primerpaare das erzielte Bandenmuster für die Zelllinien identisch ist. Eine Punktmutation oder Deletion im Amplifikat einer Zelllinie würde zu einer Konformationsänderung dieses Moleküls und damit zu einer veränderten Mobilität in der SSCP-Analyse führen.

In Tabelle 3-5 sind die Ergebnisse der SSCP-Analyse für alle untersuchten Zelllinien dargestellt. Für keine dieser Zelllinien konnte eine Mutation in der untersuchten Region der Exons 52 bis 61 festgestellt werden, die einen Verlust der Funktionalität des ATM-Proteins erklären würde.



**Tabelle 3-5:** Ergebnisse der SSCP-Analyse der Mutationshotspotregionen an sieben Abschnitten des atm-Gens (atm-Primerpaare 1 bis 7).

Zelllinie	atm1	atm2	atm3	atm4	atm5	atm6	atm7
L428	-	-	-	-	-	-	-
KM-H2	-	-	-	-	-	-	-
L591	-	-	-	-	-	-	-
L1236	-	-	-	-	-	-	-
L540	-	-	-	-	-	-	-
Hela	-	-	-	-	-	-	-
HDMyz	-	-	-	-	-	-	-
Daudi	-	-	-	-	-	-	-
Jurkat	-	-	-	-	-	-	-
*GM02782	-	-	-	-	-	-	-
*GM03189	-	-	-	-	-	-	-
*GM13328	-	-	-	-	-	-	-
*GM11261A	-	-	-	-	-	-	-

Legende:

\* : Heterozygote Ataxia Telangiectasia-Zelllinien

- : kein abweichendes Bandenmuster

Die RT-PCR erfolgte mit den entsprechenden atm-Primern wie in 2.2.11.1.1 beschrieben.