

## 4. Diskussion

### 4.1 Interaktion zwischen p53 und MDM2

In einer Vielzahl von Tumorarten ist das Gleichgewicht zwischen MDM2 und p53 gestört. Eine der Ursachen dieser Störung können Mutationen des p53-Gens sein, wie sie in etwa 50% aller Tumoren vorkommen. Durch diese Mutationen kommt es vielfach zur Expression eines funktionell inaktiven p53-Proteins mit einer verlängerten Halbwertszeit, das in den Zellen akkumuliert und seine Funktionen nicht ausüben kann. In den Hodgkin und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen von klassischen Hodgkin-Lymphomen (cHL) wird ebenfalls regelmäßig sowohl eine Überexpression des Tumorsuppressorproteins p53 [29-35] als auch seines wichtigsten zelleigenen Gegenspielers MDM2 beobachtet [29;158]. Die Überexpression von p53 in den HRS-Zellen des cHL wurde deshalb als Indikator für die Anwesenheit von Mutationen im p53-Gen gesehen, und es wurde vermutet, dass diese eine wichtige Rolle in der Pathogenese des cHL spielen [29-35]. Allerdings zeigten die Untersuchungen von *Küpper et al.* an isolierten einzelnen HRS-Zellen mittels Einzelzell-Multiplex-PCR, dass p53 nicht mutiert vorliegt, so dass eine Überexpression von p53 damit nicht erklärbar ist [158]. Untersucht wurden hierbei die p53-Exons 5 bis 9, in denen 98% aller Mutationen in Tumoren detektiert wurden [148].

Als weitere Erklärung für die p53-Überexpression können aber alternativ auch Defekte in den Bindungspartnern von p53 in Betracht kommen. Hierbei sind vor allem p14<sup>ARF</sup>, virale Proteine oder der wichtigste zelluläre Kooperationspartner von p53, das MDM2-Protein [57;104;151] zu nennen.

Als Indiz für eine Beteiligung von MDM2 an der gestörten Regulation der p53-Expression ist dessen Überexpression in den HRS-Zellen des cHL zu nennen [29;158]. Die gestörte Interaktion zwischen MDM2 und p53 könnte möglicherweise eine kritische Rolle bei der Entwicklung des cHL spielen. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Vermutung durch die Analyse des MDM2-Moleküls auf DNA-, RNA- und Proteinebene sowie durch die Analyse weiterer, im Rahmen der Apoptose bzw. Zellzyklusregulierung beteiligter Moleküle für das cHL nachgegangen werden.

#### **4.1.1 Analyse des zellulären p53-Kooperationspartners MDM2 im Hodgkin**

Eine Erklärung für die Überexpression von p53 und MDM2 könnten Mutationen in der p53-bindenden Region des *mdm2*-Gens sein, wodurch MDM2 nicht mehr in der Lage ist, die Expression und Aktivität von p53 zu regulieren. Die Analyse des *mdm2*-Gens im cHL gestaltet sich schwierig, da bei dieser Lymphomentität die Tumorzellen (HRS-Zellen) nur einen sehr kleinen Anteil aller Zellen ausmachen, die in einen ausgedehnten Hintergrund reaktiver Zellen eingebettet sind [3]. Aufgrund dieses geringen Anteils der HRS-Zellen in Gewebeproben (ungefähr 1-2% aller Zellen) führen Untersuchungen an Gesamtgewebs-DNA-Extrakten nicht zu Ergebnissen, die den HRS-Zellen zuzuordnen sind. Erst die Entwicklung von Techniken zur Isolation von Einzelzellen aus Gewebeschnitten schaffte die Möglichkeit der direkten DNA-Analyse aus HRS-Zellen [18] und somit der direkten Zuordnung der Ergebnisse zu den Tumorzellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb zur molekularbiologischen Charakterisierung des *mdm2*-Gens einzelne HRS-Zellen aus immungefärbten Gefrierschnitten mittels Mikro-manipulation isoliert. Ausgewählt wurden hierfür fünf Fälle von cHL. Mögliche *mdm2*-Mutationen in der p53-bindenden Region wurden mit einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *mdm2*-Multiplex-PCR (2.2.11.2) untersucht, die in der Lage ist, den zu untersuchenden Abschnitt des *mdm2*-Gens aus einer einzelnen Zelle (Einzelkopie) zur Darstellung zu bringen. Mit Hilfe dieser PCR wurde der Bereich des *mdm2*-Gens amplifiziert, der für die *mdm2*-Exons 3 bis 7 kodiert (p53-bindende Region) und einer nachfolgenden Sequenzanalyse unterzogen. Insgesamt wurden 121 Zellen fünf verschiedener cHL isoliert. Aus diesen 121 Zellen konnten durch Reamplifikation der einzelnen Exons insgesamt 254 Amplifikate generiert werden. Die Sequenzierung dieser 254 *mdm2*-spezifischen PCR-Produkte und deren Datenbankvergleich führte nicht zum Nachweis von Tumorzell-spezifischen Mutationen, die eine Veränderung im MDM2-Protein zur Folge gehabt hätten. Das Fehlen von Mutationen in der p53-bindenden Region des *mdm2*-Gens lässt in Verbindung mit dem ausbleibenden Nachweis von Mutationen im p53-Gen selbst [158;160] die Schlussfolgerung zu, dass im cHL die Interaktion von p53 und MDM2 nicht durch strukturelle Veränderungen beeinträchtigt ist.

Um zu überprüfen, ob Mutationen in den nicht durch die Einzelzell-PCR untersuchten Bereichen vorhanden sind, wurde der vollständige kodierende Bereich des *mdm2*-Gens mittels RT-PCR aus der RNA verschiedener Hodgkin-Zelllinien und anderer Zelllinien

amplifiziert und sequenziert. Eine Ausdehnung dieser RNA-Untersuchungen auf einzelne, aus Gewebeschnitten isolierten Zellen ist mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden leider nicht möglich, so dass diese Untersuchungen nur an Zelllinien möglich waren. Für alle untersuchten Zelllinien konnte hierbei das „full length“-Transkript mit einer Länge von 1607 bp nachgewiesen und amplifiziert werden (siehe Tabelle 3-3). Die Sequenzierung des kompletten kodierenden Bereiches des *mdm2*-Gens ergab keine Mutationen oder Spleissvarianten, die zu einer Veränderung der Funktionalität des MDM2-Proteins geführt hätten. Damit widerlegen unsere Untersuchungen die Ergebnisse von *Garcia et al.*, die bei Untersuchungen an verschiedenen Hodgkin-Zelllinien (L428, KMH2, L540, HDLM2) mehrere Spleissformen der *mdm2*-mRNA fanden [171]. Dabei fehlte den kürzeren Spleissvarianten die nukleäre Exportsequenz (NES, siehe 1.2.2.1), was eine Akkumulation von MDM2 im Zellkern erklären könnte. Allerdings zeigen unsere Untersuchungen keine vergleichbaren Spleissvarianten, so dass wir diese Hypothese nicht bestätigen können.

Eine weitere häufig beobachtete Ursache für die verstärkte Expression von Genen beruht auf einer genomischen Amplifikation des zugrunde liegenden Genomabschnittes [119;172;173]. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, haben wir den *mdm2*-Genbereich in verschiedenen Zelllinien mit einer Realtime-PCR auf DNA-Ebene untersucht. Hierfür wurden eigens für die Realtime-PCR generierte *mdm2*-Primer eingesetzt (siehe Tabelle 2-11). Zum Vergleich wurde neben der Analyse des *mdm2*-Gens von jeder Zelllinien-DNA auch eine PCR mit einem sog. „single copy gene“ durchgeführt. Dabei handelte es sich um das *gapdh*-Gen. Während in den meisten Zelllinien die PCR-Produktmengen entstanden, die mit den physiologischerweise zu erwartenden zwei Genkopien vereinbar waren, wurden in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 drei Kopien und in einer Hodgkin-Zelllinie, der L1236, eine Kopie des *mdm2*-Gens nachgewiesen. Der Nachweis von nur einer *mdm2*-Kopie in der Hodgkin-Zelllinie L1236 steht im Einklang mit zytogenetischen Untersuchungen [168;169], in denen ein Verlust des *mdm2*-Chromosomenabschnitts 12q13-14 im zweiten Allel beschrieben wurde.

Unsere Daten schließen somit eine *mdm2*-Genamplifikation als Ursache für die MDM2-Überexpression im cHL aus und widerlegen die Ergebnisse von *Küpper et al.*, die mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) Amplifikationen im *mdm2*-Gen beschrieben haben [158].

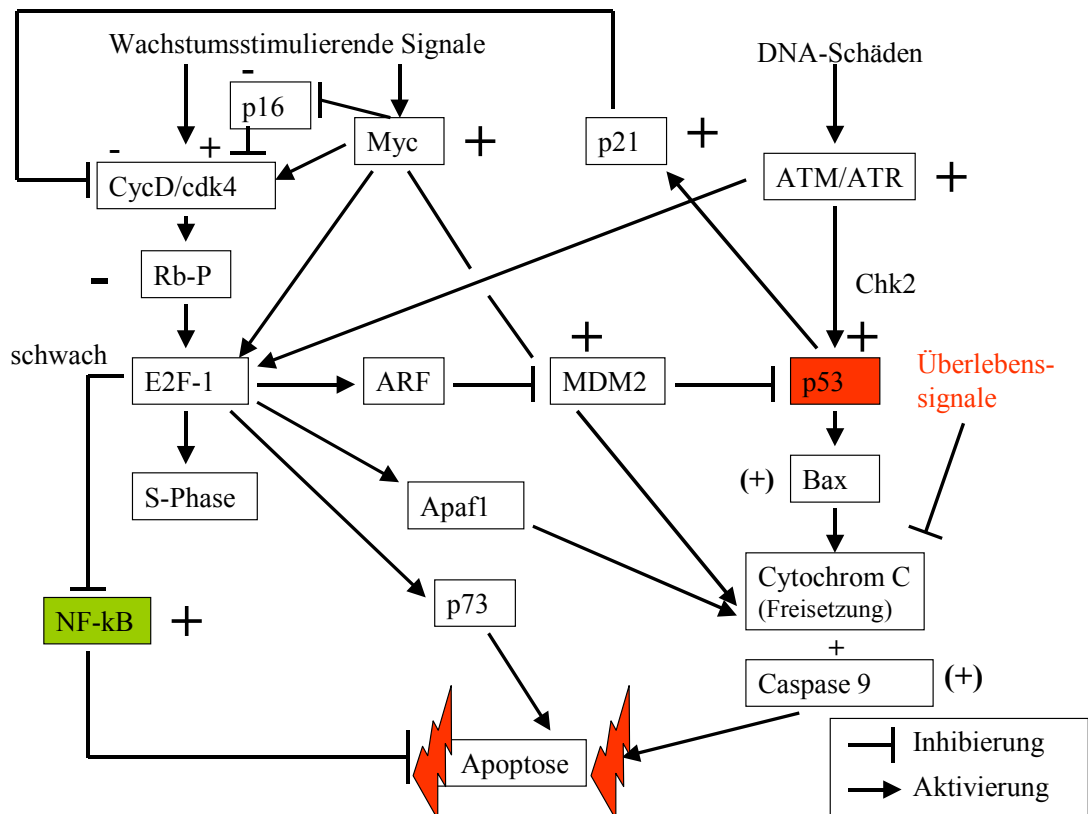
## **4.2 Die Überexpression von p53 und MDM2 im Kontext der Zellzyklusregulation beim cHL**

Da sowohl auf DNA-Ebene im *mdm2*-Gen als auch auf RNA-Ebene im *mdm2*-Transkript im cHL bzw. in Hodgkin-Zelllinien keine Mutationen oder andere Veränderungen nachweisbar waren, die erklären könnten, warum MDM2 überexprimiert vorliegt, wurden zusätzlich andere, das Expressionsverhalten des *mdm2*-Gens beeinflussende Faktoren in verschiedenen Hodgkin-Zelllinien analysiert. Hierbei kommt dem Tumorsuppressor p14<sup>ARF</sup> eine besondere Rolle zu, da er als einer der direkten Gegenspieler von MDM2 dessen Funktion inhibieren und die p53-Antwort induzieren kann [78;141-144]. Das Fehlen des p14<sup>ARF</sup>-Transkriptes oder Mutationen von p14<sup>ARF</sup> selbst können zu einer Akkumulation von MDM2 führen. Dies würde sich auf den MDM2/p53-Regelkreislauf auswirken, da MDM2 nicht mehr von p14<sup>ARF</sup> inhibiert werden kann und damit in der Lage ist, p53 von der Ausübung seiner Tumorsuppressoraktivitäten abzuhalten. Um die Situation von p14<sup>ARF</sup> im cHL zu beleuchten, wurden verschiedene Hodgkin-Zelllinien und -zum Vergleich- andere Zelllinien auf das Vorhandensein und mögliche Veränderungen des p14<sup>ARF</sup>-Transkriptes untersucht. In allen untersuchten B-Zelllinien und in den Hodgkin-Zelllinien vom B-Zelltyp (L428, KM-H2 und L1236) konnte nach der RT-PCR das p14<sup>ARF</sup>-Transkript in vergleichbarer Quantität nachgewiesen werden, wohingegen in den T-Zelllinien kein p14<sup>ARF</sup>-Transkript nachweisbar war. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab keine Mutationen, die einen Funktionsverlust von p14<sup>ARF</sup> erklären würden. Damit scheint p14<sup>ARF</sup> nicht unphysiologischerweise in die p53/MDM2-Interaktion oder Expression einzugreifen.

## **4.3 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?**

Neben 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 „Multi-Tissue“-Gewebearrays verwendet, die auf einem einzigen konventionellen Glasobjektträger die Gewebeanteile von 90 cHL und 4 Hodgkin-Zelllinien repräsentieren. Damit erlaubt diese Technik mit einer einzigen immunhistologischen Färbung eine Aussage über das

Expressionsverhalten des untersuchten Proteins in 90 Fällen. Neben Reagenzien wird so vor allem wertvolles Gewebematerial gespart. Mit dieser Methode wurden in dieser Arbeit insbesondere Proteine untersucht, die in Zusammenhang mit dem 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, ist hier auch das „upstream“ von p53 gelegene ATM-Protein von Bedeutung. ATM, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, aktiviert p53 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 verhindert wird [92].



**Abbildung 4-1:** „Konkurrierende“ Signalkaskaden von p53 und NF-kB in Bezug auf das Nichteinleiten bzw. Einleiten der Apoptose.

Mutationen im atm-Gen und damit verbunden die Produktion eines nicht intakten ATM-Proteins können zur Ataxia Telangiectasia führen, einer erblichen Hirnsklerose. Eine große Anzahl von Patienten leidet an Störungen der Bewegungsabläufe und Immundefekten und

entwickelt häufig B-Zell-Lymphome, die in den meisten Fällen den späteren Stadien der B-Zell-Differenzierung entstammen [174]. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass das in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involvierte ATM-Protein eine Rolle bei der Entwicklung dieser Lymphome spielen könnte. Um zu überprüfen, welche Rolle ATM beim cHL spielt und ob es in den HRS-Zellen des cHL exprimiert wird, haben wir verschiedene Hodgkin-Zelllinien mittels SSCP-Technik analysiert. In den untersuchten Hodgkin-Zelllinien konnten jedoch keine Mutationen in mehreren Mutationshotspotregionen des atm-Gens nachgewiesen werden (siehe 3.3.2). Zusätzlich zeigten von uns durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen, dass das ATM-Protein in den HRS-Zellen der Mehrzahl der cHL kräftig exprimiert wird. Dies spricht dafür, dass das ATM-Protein ständig auf auftretende DNA-Schäden reagiert und p53 aktiviert. Die Folge, d.h. das apoptotische Eliminieren der defekten HRS-Zellen, bleibt jedoch aus. Im Unterschied zu der von uns nachgewiesenen Expression von ATM in cHL wiesen *Starczynski et al.* in den meisten Fällen keine ATM-Expression nach und vermuteten als Grund inaktivierende Mutationen im atm-Gen [175]. Die von uns gewonnenen Daten legen jedoch die Vermutung nahe, dass ATM als Aktivator von p53 nicht defekt ist und die Störung der pro-apoptotischen Funktion von p53 sich nicht durch „upstream“ von p53 gelegene Mutationen erklären lässt.

Eine weitere mögliche Ursache, warum HRS-Zellen nicht dem programmierten Zelltod anheim fallen, könnte neben „upstream“ von p53 gelegenen Mutationen daran liegen, dass das Tumorsuppressorprotein p53 selbst mutiert ist. Mit einem mutierten p53-Protein ließe sich auch erklären, dass das Aktivieren der „downstream“ von p53 liegenden Proteine, wie z.B. p21, nicht möglich wäre und es somit zu einer Inhibierung des Zellzyklus kommen würde. Allerdings zeigten publizierte Untersuchungen an isolierten einzelnen HRS-Zellen mittels Einzelzell-Multiplex-PCR, dass p53 nicht mutiert vorliegt, so dass eine Überexpression von p53 damit nicht erklärbar ist [158]. Diese Untersuchungen bezogen sich auf die Exons 5-9, in denen sich 98 % der bisher nachgewiesenen Mutationen befanden. Das nicht mutierte, überexprimierte p53 müsste also in der Lage sein, seine Funktionen, z.B. als Aktivator des Zellzyklusregulationsproteins p21, auszuüben. Dies ist tatsächlich der Fall, denn wir konnten nachweisen, dass p21 in ca. 80 % der Fälle deutlich in den HRS-Zellen exprimiert wird (siehe auch Tabelle 3-4). Damit konnte indirekt gezeigt werden, dass p53 intakt ist und daher die Einzelzell-PCR-Analysen, die keine Mutationen in den Exons 5-9 zu Tage brachten [158], repräsentativ für das gesamte p53-Gen sind.

Diese p53- und p21-Proteinexpressionsdaten unterstützen damit auch die Hypothese von *Ohshima et al.* und *Sanchez-Beato et al.*, dass p53 in den HRS-Zellen transkriptionell aktiv ist

und die p21-Proteinexpression induziert [176;177]. Das in den HRS-Zellen vorhandene p21 sollte den CyclinD/CDK4-Komplex inhibieren und damit verhindern, dass das Rb-Protein phosphoryliert wird. Unterbleibt die Phosphorylierung von Rb, ist das hypophosphorylierte (unterphosphorylierte) Protein nicht in der Lage, den Transkriptionsfaktor E2F-1 freizulassen und die Aktivierung von Proteinen der G1/S-Phase wie Cyclin E findet nicht statt (siehe Abbildung 4-1). Der Transkriptionsfaktor E2F-1 wurde in der Mehrzahl der von uns in Gewebearrays untersuchten cHL nur schwach exprimiert. Dennoch scheint die exprimierte Menge in den HRS-Zellen auszureichen, um Cyclin E zu aktivieren und damit den Einstieg in die S-Phase zu ermöglichen. Diese Hypothese wird dadurch bestätigt, dass Cyclin E von uns (im Gegensatz zu Cyclin D1) in den Gewebearrays bei der überwiegenden Mehrzahl der cHL nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 3-4). Dies wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt [178]. Darüber hinaus fanden *Garcia et al.* [179] in Untersuchungen an cHL heraus, dass die Mehrzahl der Fälle Cyclin E und CDK2 überexprimieren. Auch bei den von uns durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen an cHL-Fällen wurde eine starke Cyclin E-Expression nachgewiesen (siehe Abbildung 3-21). Cyclin E und CDK2 formen einen Komplex, der negativ durch die Interaktionen mit p27<sup>KIP1</sup> reguliert wird und dessen Gleichgewicht die Zellzyklusprogression in die S-Phase bestimmt. Die Beobachtung einer starken Cyclin E-Expression könnte möglicherweise das verstärkte Wachstum dieser Zellen erklären [180]. Zusätzlich führt dereguliertes Cyclin E zu gesteigerter Chromosomeninstabilität und Polyploidie [181], beeinflusst also die Prozesse, die in die sorgfältige Vermehrung und Segregation der Chromosomen involviert sind. Diese Beobachtungen gestörter Mitosen, die durch die Mehrkernigkeit der HRS-Zellen repräsentiert wird, können auch als eines der „Highlights“ der HRS-Zellen betrachtet werden.

An welcher Stelle des Zellzyklus die Kontrollmechanismen beim cHL versagen bzw. die ständig vom hochexprimierten p53 aktivierten Proteine der Signalkaskaden Defekte aufweisen, lässt sich jedoch weder mit den im Rahmen der Arbeit ermittelten Expressionsdaten (siehe Tabelle 3-4) noch mit den Literaturdaten eindeutig klären. Wie bei anderen lymphatischen und epithelialen Neoplasien wird auch hier vermutlich eine Akkumulation genetischer und epigenetischer Alterationen zur Inaktivierung der Haupttumorsuppressorsignalwege p14<sup>ARF</sup>-p53-p21<sup>WAF1</sup> und p16<sup>INK4a</sup>-Rb und p27<sup>KIP1</sup> führen [182].

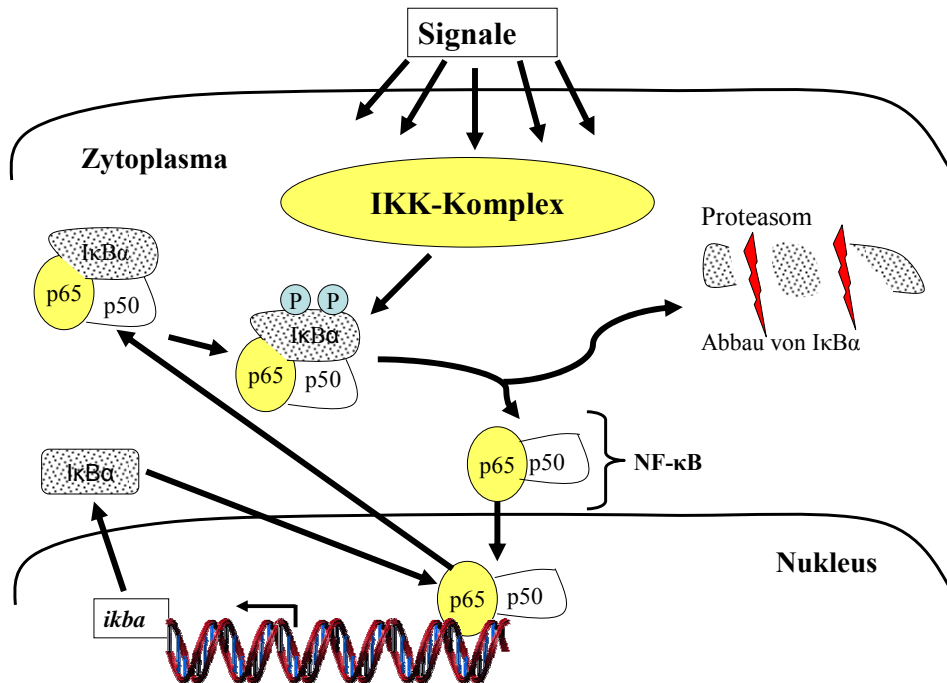
p53 spielt aber nicht nur eine Rolle bei der Zellzyklusregulierung, sondern auch bei der Induktion der Apoptose, die über die Regulation der Expression verschiedener Gene entfaltet wird. Die HRS-Zellen gehen jedoch nicht in Apoptose, so dass sich die Frage stellt, welcher Wirkmechanismus sich dem entgegenstellt. Als Kandidat und Gegenspieler zum pro-

apoptotischen p53 bietet sich hier der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an. Eine der wichtigsten Funktionen dieses Transkriptionsfaktors besteht darin, die Expression einer ganzen Reihe von Genen zu induzieren, deren Genprodukte fast ausschließlich eine proliferative und anti-apoptotische Funktion übernehmen [183]. Die Beteiligung einer gestörten Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität an der Tumorgenese zeigt sich vor allem durch eine konstitutive, von einem aktivierenden Signal unabhängige, NF- $\kappa$ B-Aktivität, wie sie in einer Vielzahl von Tumoren [184;185] beschrieben wurde.

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B gehört zur Familie der Rel-Proteine, die 5 Mitglieder umfasst und sich durch ihre für DNA-Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit inhibitorischen Proteinen notwendige Rel-Domäne auszeichnet. Rel/NF- $\kappa$ B-Proteine binden an eine aus 10 Basen bestehende DNA-Erkennungssequenz, die als  $\kappa$ B-Sequenz bezeichnet wird. Die Bindung findet in Form von Homo- oder Heterodimeren statt, wobei die p50/p65 (RelA)-Heterodimere am häufigsten vorkommen. Die Bindung dieser Dimere an die  $\kappa$ B-Sequenz führt wiederum zur Transkription der Zielgene [186].

Die Aktivität von NF- $\kappa$ B wird in den meisten Zellen strikt durch die inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteine reguliert [187]. Hierbei ist am meisten über die Interaktion von I $\kappa$ B $\alpha$  mit den NF- $\kappa$ B-Proteinen bekannt. Durch die Interaktion von NF- $\kappa$ B mit I $\kappa$ B $\alpha$  wird die Kern-Lokalisationssequenz von NF- $\kappa$ B verdeckt, so dass NF- $\kappa$ B in inaktiver Form im Zytoplasma gehalten wird. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch den IKK (I $\kappa$ B Kinase)-Komplex (aktiviert durch z.B. Zytokine) führt zu dessen Ubiquitinylierung und zur anschließenden Proteolyse durch das 26S-Proteasom (siehe Abbildung 4-2). NF- $\kappa$ B, das so vom Inhibitor befreit ist, transloziert zum Nukleus und induziert die Transkription der Zielgene [188-191].





Modifiziert aus: „Oncogene“ [192].

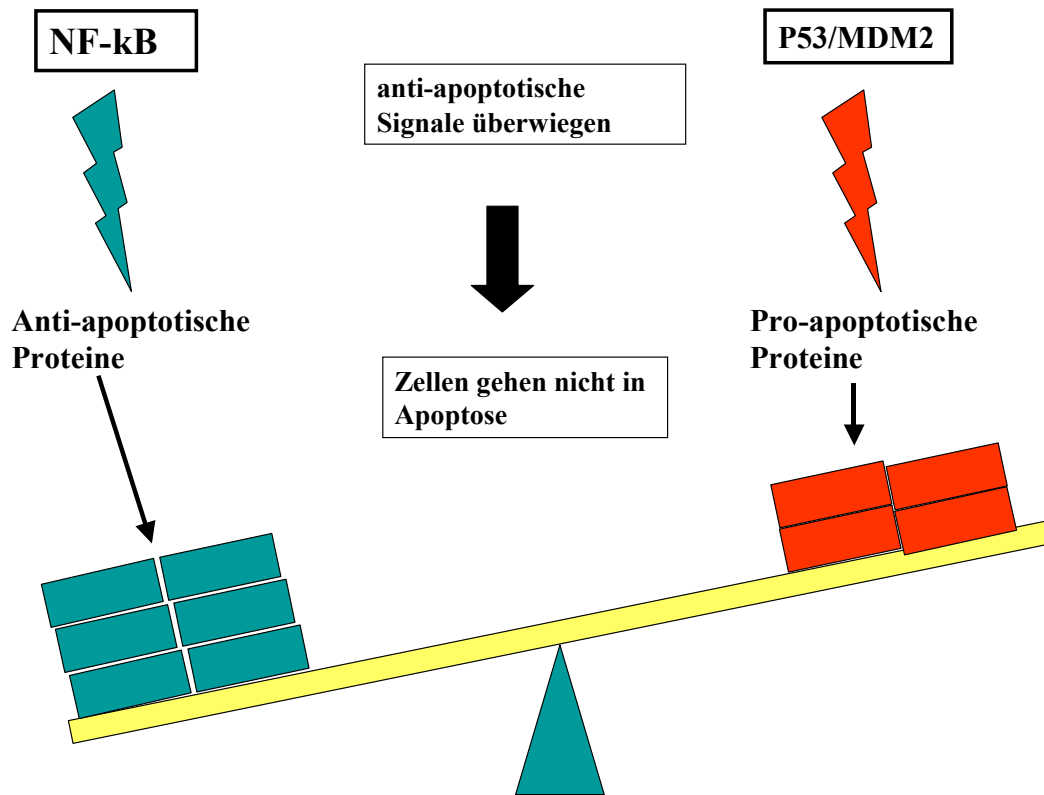
**Abbildung 4-2:** Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB.

Eine gestörte Regulation der NF-κB-Aktivität zeigt sich in den HRS-Zellen des cHL in Form einer starken Überexpression von p50/p65, was darauf hindeutet, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB eine wichtige Rolle bei der Blockade der Apoptose in diesen Zellen spielt [193-195]. Um die Ursachen der starken Überexpression von NF-κB in den HRS-Zellen zu klären, wurden mit IκBα und IκBε die inhibitorischen Bindungspartner von NF-κB von *Bargou et al.* [193] und *Emmerich et al.* [196] auf evtl. Mutationen untersucht. In zwei Hodgkin-Zelllinien, L428 und KM-H2, wurden Mutationen im IκBα-Gen gefunden, die zu einem C-terminal trunkierten Protein führten [196] und somit erklären könnten, warum der Inhibitor IκBα – trotz konstanter Überexpression – seine Funktion, NF-κB im Zytoplasma zurückzuhalten, nicht mehr ausüben kann. Bei Untersuchungen im Gewebe an einzelnen HRS-Zellen wurden dagegen nur in einer geringen Zahl von Fällen Mutationen im IκBα-Gen [196] und im IκBε-Gen [197] gefunden, während in allen Fällen eine Überexpression von IκBα in den HRS-Zellen nachgewiesen werden konnte [196]. Die paradoxe Beobachtung, dass NF-κB trotz der ebenfalls starken Expression seines intakten Inhibitors IκBα überexprimiert ist, verdeutlicht, dass die NF-κB-Signaltransduktion in HRS-Zellen gestört ist. Die bisher gewonnenen Daten zeigen, dass die Überexpression von NF-κB nicht durch einen

einzigsten Defekt erklärt werden kann, der in allen HRS-Zellen vorhanden ist, sondern die Konsequenz der Deregulation auf zahlreichen Stufen des „NF- $\kappa$ B-Netzwerkes“ darstellt.

Die charakteristische Eigenschaft der HRS-Zellen, dass NF- $\kappa$ B in diesen Zellen überexprimiert wird, weist auf die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als ein entscheidender anti-apoptotischer Gegenspieler des pro-apoptotischen p53 hin. Durch die Inhibierung der zelleigenen konstitutiven NF- $\kappa$ B-Aktivität mittels ektopter Expression eines dominant-negativen mutierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins (I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N) konnte die funktionelle Bedeutung von NF- $\kappa$ B bei der Proliferation und Vermittlung der Apoptoseresistenz der HRS-Zellen aufgezeigt werden [194;198]. I $\kappa$ B $\alpha$  $\Delta$ N hält NF- $\kappa$ B im Zytoplasma zurück und verhindert dessen Translokation in den Zellkern. Die so transfizierten Hodgkin-Zelllinien zeigen eine gesteigerte Apoptosesensitivität beim Entzug von Wachstumsfaktoren. Im Gegensatz dazu konnte in den anderen getesteten lymphatischen und nicht-lymphatischen Zelllinien keine Veränderung des Zellwachstums beobachtet werden [194;198]. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass in HRS-Zellen NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Apoptose spielt.

Abschließend lässt sich nochmals die Frage aufgreifen, warum HRS-Zellen nicht in Apoptose gehen. Diese Frage ist jedoch nicht mit der Präsentation eines einzigen „Schuldigen“ zu beantworten. Handelt es sich hier möglicherweise um eine Konfliktsituation (Balance, siehe Abbildung 4-3), bei der die antagonistischen, anti-apoptotischen durch NF- $\kappa$ B ausgelösten Signale mit den protagonistischen, pro-apoptotischen durch p53 ausgelösten Signalen konkurrieren? Bleiben in diesem Spiel die durch NF- $\kappa$ B aktivierten Proteine „Sieger“ und verhindern die Apoptose der HRS-Zellen? Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten für das cHL lassen im Zusammenhang mit anderen, aus der Literatur bekannten Daten, diese Schlussfolgerung zumindest plausibel erscheinen.



**Abbildung 4-3:** Die anti-apoptischen Signale, die NF-κB aussendet, überwiegen die pro-apoptische Wirkung von p53 (labiles Gleichgewicht).