

## 5. Zusammenfassung

Bisherige Untersuchungen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) haben klar belegt, dass die Apoptose der Hodgkin- und Reed-Sternberg [HRS]-Zellen trotz starker Expression eines intakten p53-Moleküls blockiert ist. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass MDM2 als ein direkter zellulärer Gegenspieler von p53 an dessen Funktionsinhibierung beteiligt sein könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, zu prüfen, welche Rolle das in den HRS-Zellen exprimierte MDM2 bei der Störung des p53/MDM2-Regelkreises spielt.

Hierfür wurden 121 HRS-Zellen fünf verschiedener cHL mittels hydraulischer Mikro-manipulation einzeln isoliert und einer speziell im Rahmen dieser Arbeit entwickelten mdm2-Einzelzell-Multiplex-PCR zur getrennten Analyse der Exons 3-7 (p53-bindende Region) unterzogen. Zusätzlich wurde die Funktionalität des gesamten MDM2-Moleküls auf DNA-, RNA- und Proteinebene in Hodgkin-Zelllinien analysiert. Um die erhobenen Befunde einordnen zu können, wurden darüber hinaus immunhistologische Untersuchungen an einer Vielzahl von cHL durchgeführt, um die Rolle von Proteinen, die im Zusammenhang mit MDM2 und p53 stehen und ebenfalls an der Apoptose bzw. Zellzyklusregulierung beteiligt sind, bei der Entstehung des cHL zu bewerten.

Weder in den 121 einzeln isolierten und untersuchten HRS-Zellen noch in den Hodgkin-Zelllinien konnte auf DNA-Ebene (Exon 3-7; p53-bindende Region) ein Defekt im mdm2-Gen gefunden werden, der einen Verlust der p53-Bindungsfähigkeit erklären könnte. Die Ausdehnung der Untersuchungen auf den gesamten kodierenden Bereich des mdm2-Gens in Hodgkin-Zelllinien zeigt, dass auch hier keine Mutationen detektiert werden konnten, die eine Akkumulation von MDM2 erklären würden. Des Weiteren konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass eine Genamplifikation als Ursache für die MDM2-Überexpression ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen gegen Defekte im mdm2-Gen, die die pro-apoptotische Wirkung von p53 aufheben könnten.

Die weiterführenden immunhistologischen Untersuchungen und Untersuchungen auf RNA-Ebene an zahlreichen MDM2/p53 beeinflussten bzw. MDM2/p53 beeinflussenden Molekülen wie z.B. p14<sup>ARF</sup>, ATM und p21 bestätigten, dass p53 induzierbar und aktiv ist. Die ausbleibende pro-apoptotische Wirkung von p53 muss demnach auf andere Faktoren zurückzuführen sein.

Hier ist in erster Linie das anti-apoptotische NF- $\kappa$ B-System zu nennen, das in allen HRS-

Zellen konstitutiv überexprimiert vorliegt. Die hier vorgelegten Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass der anti-apoptotische Einfluss des NF- $\kappa$ B-Systems stärker ist als der pro-apoptotische Effekt des p53/MDM2-Systems, wodurch es zum Überleben der HRS-Zellen kommt.

## Summary

Previous investigations of classical Hodgkin Lymphoma (cHL) have shown that apoptosis is blocked in Hodgkin- and Reed-Sternberg-[HRS-] cells despite the strong expression of intact p53. Therefore, it is tempting to speculate that MDM2, the major antagonist of p53, is responsible for the inability of p53 to fulfill its pro-apoptotic function. The aim of this thesis was to identify the role of MDM2, which is expressed in HRS cells, in the disturbance of the p53/MDM2 feedback loop.

For this purpose, 121 single HRS cells from five different cHL cases were isolated and subjected to PCR analysis of exons 3 through 7 (p53-binding region) using a newly designed *mdm2* single cell multiplex PCR which was developed in the course of this work. Furthermore, we analysed the functionality of the entire MDM2 molecule at the genomic, mRNA and protein level in different Hodgkin lymphoma cell lines. In addition, several MDM2/p53 affecting and affected proteins, which are also involved in apoptosis and cell cycle regulation, were immunohistochemically stained in cell lines and cHL tissue specimens.

Neither at the DNA level (single cell analysis of exons 3 to 7, p53 binding region) nor at the mRNA level, we could find any mutations of the *mdm2* gene that could explain the loss of p53 binding-activity and *mdm2* accumulation. Furthermore, we demonstrated that MDM2 overexpression is not associated with gene amplification. These results argue against defects of the *mdm2* gene that would abolish the pro-apoptotic effect of p53.

Extended immunohistochemical stainings and analyses at the mRNA level of numerous MDM2/p53 affected e.g. MDM2/p53 affecting molecules such as p14<sup>ARF</sup>, ATM and p21 indicate that p53 is inducible and active. Therefore we conclude that other factors might lead to the incapability of p53 to initiate apoptosis.

Constitutively activated NF- $\kappa$ B is a characteristic feature of HRS cells and NF- $\kappa$ B appears to represent a key regulator in cHL. Our data demonstrate that the influence of the anti-apoptotic NF- $\kappa$ B-system is superior than the pro-apoptotic effects of the p53/MDM2 system, leading to the survival of the HRS cells.