

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reverse Transkription der IkappaB $\alpha$ -mRNA in Hodgkin-Zelllinien

Von 7 untersuchten Hodgkin-Zelllinien (HDLM-2, KM-H2, HD-Myz, L428, L591, L540 und L1236) zeigten sich nach Durchführung einer reversen Transkription, Amplifikation und Sequenzierung in den Linien KM-H2 und L428 auf RNA-Ebene Mutationen, die zur Translation eines trunkierten IkappaB $\alpha$ -Proteins führen.

In der Linie L428 wurde in der Nukleotid-Position 893<sup>68</sup> eine Punktmutation gefunden, die das Basentriplett „CAG“ des Wildtyps zu dem Stopcodon „TAG“ umwandelt und somit zum Abbruch der Translation führt. Das Transkript der Zelllinie KM-H2 weist zwei Deletionen auf, es fehlen die Basenpaare zwischen den Positionen 509 und 613 sowie zwischen den Positionen 618 und 640. Diese Mutationen führen zum Frame-Shift und lassen in Position 715 das Stopcodon „TGA“ entstehen.

```
w.t.: 501 ATCCTGAGCTCCGAGACTTTCGAGGAAATACCCCCCTACACCTTGCCCTGTGAGCAGGGCT
      |||||||
KM-H2: 501 ATCCTGAG-----

w.t.: 561 GCCTGGCCAGCGTGGGAGTCCTGACTCAGTCCTGCACCACCCCGCACCTCCACTCCATCC
      ||||
KM-H2: 509 -----TCCA---

w.t.: 621 TGAAGGCTACCAACTACAATGGCCACACGTGTCTACACTTAGCCTCTATCCATGGCTACC
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
KM-H2: 513 -----GGCCACACGTGTCTACACTTAGCCTCTATCCATGGCTACC

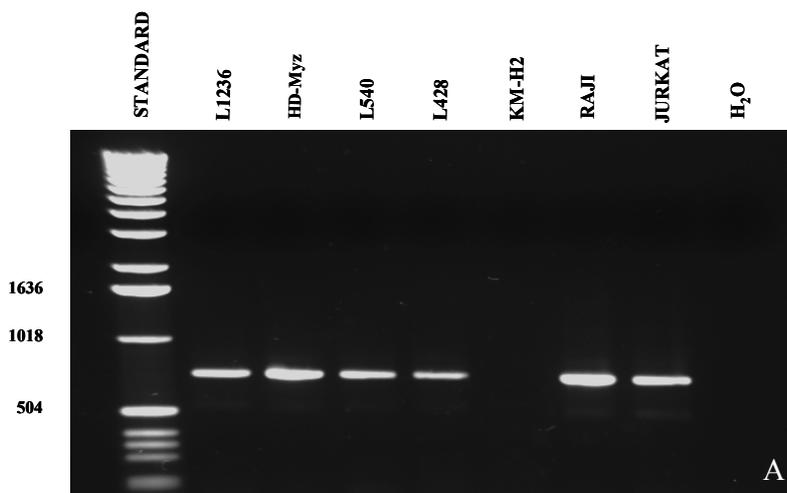
w.t.: 681 TGGGCATCGTGGAGCTTTTGGTGTCC TTGGGTGCTGATGTCAATGCTCAGGAGCCCTGTA
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
KM-H2: 553 TGGGCATCGTGGAGCTTTTGGTGTCC TTGGGTGCTGATGTCAATGCTCAGGAGCCCTGTA
```

**Abb.8:** IkappaB $\alpha$ -Sequenzauswertung der Zelllinie KMH<sub>2</sub>

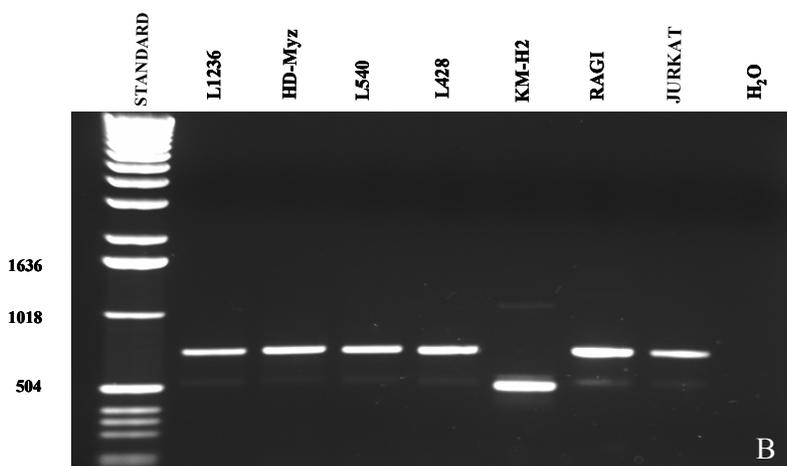
### 3.2 Genomische PCR aus Zelllinien-DNA

Der Abschnitt, in dem mittels RT-PCR die beschriebenen Mutationen gefunden worden sind, wurde auch aus präparierter Zelllinien-DNA amplifiziert und sequenziert. Hierzu wurden die Primer I und II der Einzelzell-PCR benutzt. Bei der Gelelektrophorese der Amplifikate zeigten sich in den 5 HD-Zelllinien L1236, HD-Myz, L540, L428 L591 und HDLM-2, sowie in den Kontrollzelllinien Raji und Jurkat Banden in der erwarteten Höhe von etwa 770 Oligonukleotiden für das Primerpaar I, bzw. ca. 800 für das Primerpaar II. Im Falle der trunkierten Zelllinie KMH2 konnte das Primerpaar I seine homologe Sequenz nicht finden, da sie im Bereich der Deletion liegt. Entsprechend ließ sich bei der Gelelektrophorese kein Amplifikationsprodukt nachweisen. Die Amplifikation mit dem Primerpaar II zeigte entsprechend der Deletion eine Bande in der ungefähren Höhe von 500 Basenpaaren.

Die Ergebnisse der genomischen PCR entsprachen bei Sequenzierung denen der RT-PCR, im Falle der Punktmutation und Deletion fand sich ausschließlich die mutierte Form nachweisen.



**A:** Bei der HD-Zelllinie KM-H2 zeigt sich bei der Amplifikation mit dem Primerpaar I kein Produkt.



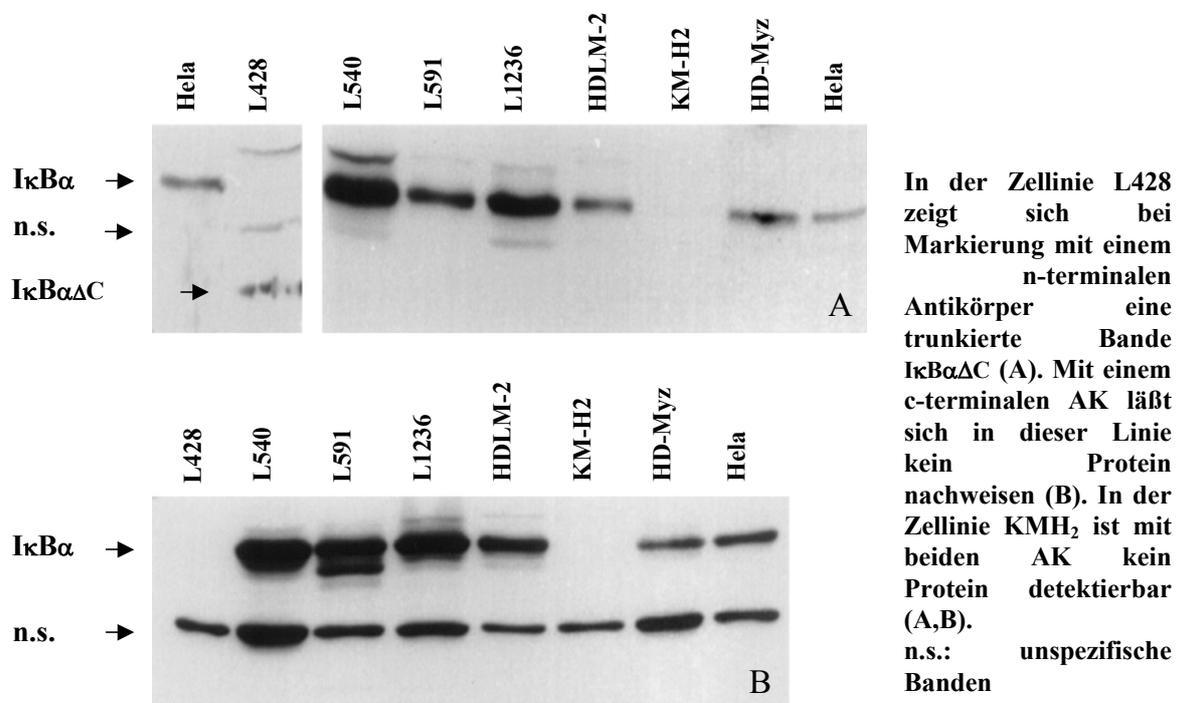
**B:** Bei Benutzung des Primerpaars II stellt sich eine verkürzte Bande dar.

**Abb.9:** Amplifikationsprodukte der genomischen IkappaB $\alpha$ -PCR

### 3.3 Western-Blot zum Nachweis der IkappaB $\alpha$ -Translationsprodukte

Der Western-Blot diente zum Nachweis und zur Bestimmung der Größe des IkappaB-Translationsproduktes. Die Proteinanalyse mittels Western-Blot wurde mit zwei Antikörpern durchgeführt, von denen einer den N-terminalen Teil des Proteins, der andere ein C-terminales Epitop erkennt. Es wurden die IkappaB $\alpha$ -Proteine der zuvor schon mittels der reversen Transkription untersuchten Zelllinien untersucht. Dabei ließ sich in den fünf Hodgkin-Zelllinien HDLM-2, HD-Myz, L591, L540 und L1236, die auf RNA-Ebene keine Mutation aufwiesen, mit beiden Antikörpern ein Protein der erwarteten Größe von 38 kD nachweisen.

Die Analyse der Zelllinie L428 mit dem Antikörper gegen den N-terminalen Anteil erbrachte den Nachweis eines um ca 8 kD trunkierten IkappaB $\alpha$  Proteins. Dieses Produkt von 30 kD entspricht in seiner Größe dem Protein, das sich aus der m-RNA mit dem Stopcodon „TGA“ in Position 893 ableiten läßt. Eine Wildtypform des IkappaB $\alpha$  ließ sich in der Zelllinie L428 nicht darstellen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die in dieser Zelllinie auf RNA- und DNA-Ebene erhoben wurden. Die Western-Blot-Analyse der Zelllinie KM-H2, die auf RNA-Ebene zwei Deletionen aufwies, zeigte weder mit dem N- noch mit dem C-terminalen Antikörper ein spezifisches Produkt.



**Abb.10:** Western-Blot-Analyse des IkappaB $\alpha$ -Proteins

### **3.4 Nachweis von IkappaB $\alpha$ -RNA in Hodgkin-Gewebe mittels *in situ*-Hybridisierung**

In Lymphknoten-Gewebe von Hodgkin-Patienten wurde zur Beantwortung der Frage, ob und in welcher Menge Transkripte des IkappaB $\alpha$ -Gens in den Hodgkin-Zellen vorliegen eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Hybridisiert wurden 20 Schnitte aus Hodgkin-Fällen des gemischtzelligen und nodulär-sklerosierenden Typs. Alle Fälle wurden zur Kontrolle mit einer IkappaB $\alpha$ -Antisense Probe hybridisiert.

Es zeigte sich, daß in nahezu allen Fällen die morphologisch als Hodgkin- oder Reed-Sternberg-Zellen zu identifizierenden Zellen eine sehr deutliche Markierung aufwiesen, was einer starken Expression der IkappaB $\alpha$ RNA entspricht. Die umliegenden Zellen hingegen zeigten bis auf einige reaktive Lymphozyten kein bzw. ein deutlich schwächeres Signal. Die Hybridisierung von fünf verschiedenen B-Zell-Leukämien (B-CLL) zeigte in weniger als 1% der Zellen ein Signal sowie in fünf Fällen von Non-Hodgkin-Lymphomen des T-Zell-Typs (T-NHL) in weniger als 10% der Tumorzellen eine verstärkte Expression von IkappaB-RNA. In drei Fällen von infektiöser Mononukleose (IM) zeigten nur reaktive Lymphozyten ein geringes Signal. Dieses Ergebnis diente als interne Kontrolle, daß die *in situ*-Hybridisierung gelungen ist und zeigte gleichzeitig deutlich, daß die Expression in den Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms die in gesunden Zellen oder denen anderer Erkrankungen an Stärke deutlich übertrifft.

Sowohl in den Hodgkin-Fällen als auch in den genannten Kontrollfällen zeigte sich bei der Hybridisierung mit einer IkappaB $\alpha$ -Sense-Probe kein Signal.

**Tab.6: Detektion der IkappaB $\alpha$ -RNA in HRS-Zellen und reaktiven Lymphozyten**

Fall	Typ	Tumorzellen		Bystander-Zellen	
		Anzahl pos. Zellen (%)	Intensität	Anzahl pos. Zellen (%)	Intensität
1	ns	80-90	++	<20	+
2	ns	60-70	++	<10	+
3	mc	60	+++	<3	+
4	mc	70-80	++	<20	++
5	mc	30	++	<3	+
6	mc	40	++	<10	+
7	mc	50	++	<3	+
8	mc	<10	+	<20	+
9	mc	10	+	<3	+
10	mc	80	+++	<10	+
11	mc	90	+++	<20	++
12	ns	95	++	<20	+
13	ns	90	+++	<20	+
14	mc	80-90	++	<10	++
15	ns	90	+++	<20	++
16	ns	60	+++	<10	+
17	ns	90	+++	<3	+
18	ns	60	++	<20	+
19	ns	10	+	<3	+
20	ns	30	++	<10	++

ns: nodulär-sklerosierend

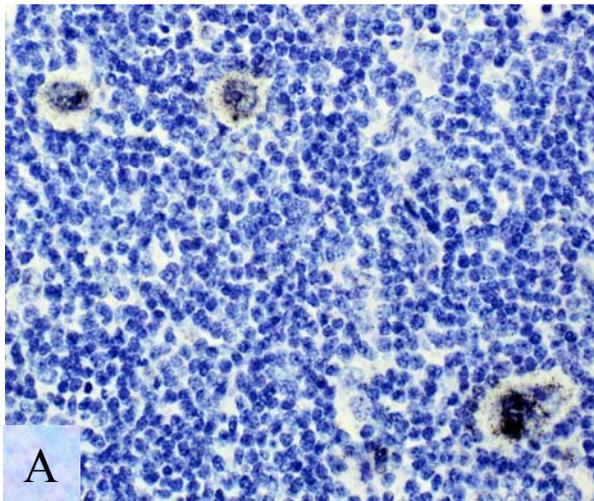
mc: gemischtzellig

+: schwach

++: mittel

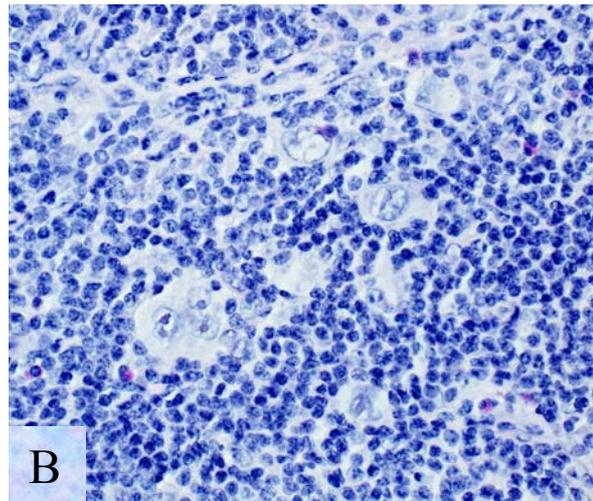
+++ : stark

**Abb.10: *In situ*-Hybridisierung der IkappaB $\alpha$ -mRNA in HRS-Zellen und Kontrollen**



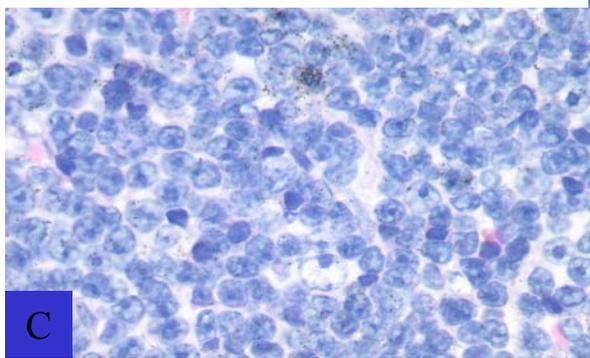
**A**

**A:** die Hybridisierung mit der Antisense-Probe zeigt eine deutliche Anhäufung der Silbergrains in den Tumorzellen



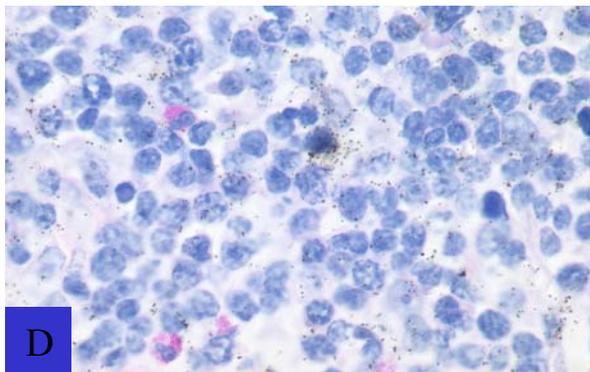
**B**

**B:** die Markierung mit einer sense-Probe zur Kontrolle zeigt keine mRNA-Markierung



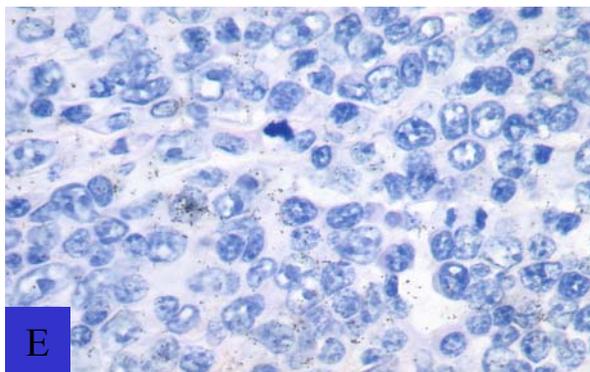
**C**

**C:** B-CLL: ganz vereinzelt zeigen die tumorösen Zellen eine Markierung



**D**

**D:** IM: lediglich einzelne reaktive Lymphozyten sind deutlich markiert



**E**

**E:** bei einem T-NHL zeigt sich in weniger als 10% der Tumorzellen ein Signal

### 3.5 Analyse des IkappaB-Gens in Einzelzellen

Die Ergebnisse der IkappaB $\alpha$ -RT-PCR in den Hodgkin-Zelllinien warfen die Frage auf, ob auch in HRS-Zellen aus HD-Patienten Mutationen zu finden sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurde, entsprechend der Lage der Mutationen in den Zelllinien, die C-terminale Hälfte des Gens untersucht (Pos. 2283 bis Position 4391 nach Ito <sup>56</sup>). Hierzu wurden aus Lymphknoten-Gefrierschnitten von 10 verschiedenen Hodgkin-Patienten Einzelzellen isoliert und jede einer semi-Nested-PCR zugeführt. Um die gewünschte Gensequenz in ihrer ganzen Länge aus einer einzigen Kopie amplifizieren zu können, erfolgte die Amplifikation in drei Teilabschnitten. Anschließend wurden die Amplifikate sequenziert.

Insgesamt konnte aus diesen 10 Fällen von 420 isolierten Zellen 226 Sequenzierungsergebnisse erhalten werden. Diese Anzahl entsprach zwischen 5 und 11 Amplifikaten pro Teilabschnitt. Hierbei zeigte sich in 9 der 10 Fälle eine korrekt kodierende Sequenz. In einem Fall zeigte der Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz jedoch eine Punktmutation, die zum Abbruch der Translation führt. In der Sequenz dieses Falles ist an der Position 3398 im Basentriplett TGT die letzte Base ausgetauscht gegen Adenin, so daß das Stopcodon TGA entstanden ist. Das translatierte Protein hat nach Abbruch eine Länge von 214 statt 317 Aminosäuren. Von dem Genabschnitt, in dem diese Mutation gefunden wurde, wurden insgesamt 11 Amplifikate erzeugt. Hiervon zeigten 4 ausschließlich die mutierte Form, bei 3 fand sich an der entsprechenden Stelle eine Überlagerung der Basen Adenin mit dem Wildtyp Thymin, bei den 3 übrigen war nur der Wildtyp zu finden.

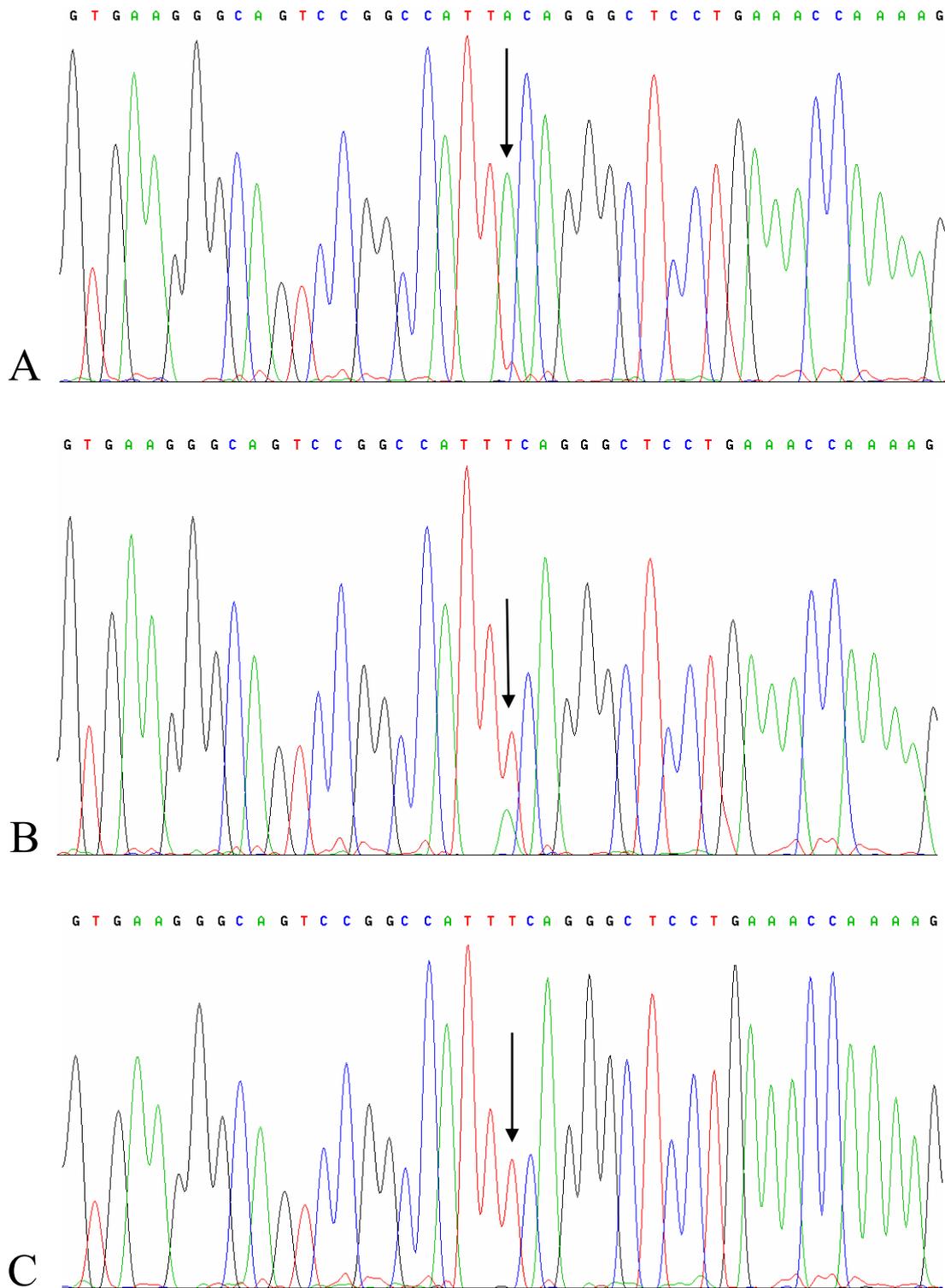
Es zeigten sich weiterhin vereinzelt Mutationen im Intronbereich sowie, abweichend von der von Ito et al. veröffentlichten Sequenz, in 5 Fällen ein Austausch der Basen C und T in Position 2333.

**Tab.7:**

Fall	Anzahl isolierter Zellen	Typ	Anzahl der Amplifikate	Anzahl der Mutationen	
				Intron	Exon
<b>1</b>	72	ns	22	3; del 19bp**	<b>1 (TGT→TGA⇒Sto</b>
<b>1 (Kontrollzellen)</b>	27	ns	21	3; del 19bp**	-
<b>2</b>	38	ns	22	3	-
<b>3</b>	24	ns	20	3; del 2bp	1*
<b>4</b>	43	ns	23	6	-
<b>5</b>	53	ns	24	6	-
<b>6</b>	38	ns	24	3	-
<b>7</b>	45	ns	13	3	1*
<b>8</b>	42	ns	17	1	-
<b>9</b>	24	mc	21	4; del 19bp**	1*
<b>10</b>	21	mc	19	6	1*

\* Austausch von C gegen T in Pos. 2333 verglichen mit der veröffentlichten Sequenz von Ito et al.

\*\* Deletion war identisch



**Abb.11:** Darstellung des Stoppcodons im Fall 1 als Elektropherogramm in 3'→5'-Richtung;

**A:** Wildtypsequenz

**B:** Überlagerung von Mutation und Wildtyp (Amplifikation beider Allele)

**C:** Austausch der Base A gegen T (Entstehung eines Stoppcodons in 5'→3'-Richtung)

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Mutation nur auf einem Allel vorhanden ist. Da bei der Isolierung der Einzelzellen aufgrund der geringen Schnittdicke nicht immer der ganze Zellkern isoliert wird, kann angenommen werden, daß in den nicht überlagerten Sequenzen folglich nicht das gesamte genomische Material, d.h., beide Allele der PCR zugeführt worden sind. Somit wurde in diesem Falle nur entweder das mutierte oder das unmutierte Allel amplifiziert und sequenziert.

Zur Überprüfung, ob die beschriebene Stopcodon-Mutation Tumorzell-spezifisch ist, wurden von dem gleichen Fall zusätzlich zahlreiche nicht maligne reaktive Zellen isoliert und analysiert. Dabei ließ sich in keiner dieser Zellen die in den Tumorzellen nachgewiesene, noch andere Mutationen finden.

Die Sequenzanalyse der anderen Fälle ergab keine Hinweise auf Mutationen, die die Funktion des Translationsproduktes verändern könnten, lediglich wurde in 4 Fällen im Exonbereich an Position 2333 ein Austausch von Cytosin gegen Thymin gefunden. Diese Veränderung führt jedoch nicht zum Aminosäureaustausch, ist demnach eine stille Mutation und kann als Polymorphismus gewertet werden.

Einzelne Basenaustausche fanden sich, übereinstimmend in verschiedenen oder nur in einzelnen Fällen, im Intronbereich der HRS-Zellen. Gleiches fand sich in den untersuchten Kontrollzellen.