

Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Abteilung: Allgemeine Pathologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Stein

**Bedeutung somatischer Mutationen im nicht-kodierenden Bereich der umgelagerten
Immunglobulingene in Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen für die fehlende
Immunglobulingenexpression beim klassischen Morbus Hodgkin**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von: Jan Theil
aus : Berlin

Referent: Prof. Dr. H. Stein

Korreferent: Prof. Dr. K. Sperling

Gedruckt mit Genehmigung der
Charité-Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 12.12.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	5
1.1. Der Morbus Hodgkin	5
1.2. Ursprung der malignen Tumorzellen des Morbus Hodgkin	6
1.2.1. Histologie	6
1.2.2. Immunhistologie	7
1.2.3. Zellkulturen	8
1.2.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	8
1.2.4.1. Das Immunglobulingen (Ig Gen)	8
1.2.4.2. Ergebnisse aus Gesamtzellextrakten	11
1.2.4.3. Ergebnisse der Einzelzellisolierung	11
1.3. Stadium der B-Zellentwicklung der Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen	12
1.4. Ursachen der fehlenden Ig Genexpression in HRS Zellen	13
1.4.1. „Verkrüppelnde“ Mutationen im kodierenden Bereich des Ig Gens	14
1.4.2. Mutationen konservierter Strukturen des Ig Schwerkettenpromotors	15
1.4.3. Fehlregulation der Ig Genexpression durch Transkriptionsfaktoren	16
2. Fragestellung	19
3. Materialien und Methoden	20
3.1. Gewebematerial und Zelllinien	20
3.2. Immunhistologie	21
3.3. Einzelzellisolierung	22
3.4. Polymerasekettenreaktion	25
3.4.1. Ig Schwerkettenpromotor (IgH Promotor) PCR	26
3.4.2. E μ Enhancer PCR	28
3.5. Sequenzanalysen	30
3.6. Antigenselektion	30
3.7. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT PCR)	31
3.7.1. Ig Gentranskripte	31
3.7.2. Oct-1 RT PCR	32
3.7.3. Oct-2 RT PCR	33

3.7.4. OCA-B RT PCR	34
3.7.5. Semiquantitative RT PCR	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Ig Gentranskripte in Hodgkinzelllinien	36
4.2. Untersuchung des umgelagerten IgH Gens in Hodgkinzelllinien	36
4.2.1. Etablierung einer PCR für den umgelagerten IgH Promotor	36
4.2.2. Mutationsanalyse des IgH Promotors	36
4.2.3. Mutationsanalyse des Leaderbereiches	37
4.2.4. Mutationsanalyse des variablen Schwerketten- (VH) Bereiches	38
4.2.5 Etablierung einer PCR und Mutationsanalyse am E μ Enhancer	39
4.3. Untersuchung des umgelagerten IgH Gens in einzelnen HRS Zellen	40
4.3.1. Kriterien für die Auswahl der Fälle des klassischen Morbus Hodgkin	40
4.3.2. Ergebnisse der Einzelzellisolierung	40
4.3.3. Etablieren einer PCR für den umgelagerten IgH Promotor	40
4.3.4. Mutationsanalyse des IgH Promotors	41
4.3.5. Mutationsanalyse des Leaderbereiches	42
4.3.6. Mutationsanalyse des VH-Bereiches	43
4.3.7. Kontrollen	45
4.4. Expression der Transkriptionsfaktoren Oct-1, Oct-2, sowie des Ko-Faktors OCA-B in Hodgkinzelllinien	46
4.4.1. Nachweis von Oct-1, Oct-2 und OCA-B m-RNA	46
4.4.2. Quantifizierung der Oct-1, Oct-2 und OCA-B m-RNA	48
4.4.3. Nachweis von Oct-1, Oct-2 und OCA-B Proteinen	49
5. Diskussion	51
6. Zusammenfassung	58
7. Abkürzungen	59
8. Quellennachweis	60
Danksagung	68
Lebenslauf	69
Eidesstattliche Erklärung	70

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. H. Stein danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, für die Anleitung und die konstruktiven Vorschläge sowie für die Möglichkeit den experimentellen Teil meiner Dissertation am Institut für Pathologie der Freien Universität durchzuführen.

Frau Dr. med. T. Marafioti danke ich für die Betreuung meiner experimentellen Arbeit sowie für die Einführung in viele Aspekte der molekularen Pathologie und deren Techniken.

Herrn PD Dr. rer. nat. M. Hummel danke ich für die Unterstützung bei allen technischen Problemen, für die anregenden Diskussionen und besonders für die Betreuung meiner schriftlichen Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Alexandra Förster für die Bereitstellung und Aufarbeitung der Zelllinien sowie für ihre organisatorische Hilfe.

Mein Dank gilt auch Diana Jahnke für die Sequenzierung der PCR Produkte, Erika Protz für das Schneiden und Färben der Präparate, sowie Gudrun Demel, Hedwig Lammert und Henning Müller für die Hilfe im molekularpathologischen Labor

Des Weiteren möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der FU Berlin für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Meiner Familie – Kerstin, Robin und Jacob – und meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und Motivation.

Fußnote:

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten in der Zeitschrift Blood publiziert werden:

Theil J., Laumen H., Marafioti T., Hummel M., Lenz G., Wirth T. and Stein H.;

“Defective Octamer-dependent transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells.”

Blood (2001) 97(10): 3191 – 3196