

Aus dem Institut für allgemeine Pathologie  
Der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*TP53-abhängige DNA-Reparatur- und Regulationsmechanismen  
im klassischen Hodgkin-Lymphom und B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Petereit  
aus Staßfurt

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. Michael Hummel

                                         2. PD Dr. Wolfram Klapper

                                         3. Prof. Dr. Matthias Dobbelstein

Datum der Promotion: 18.11.2011

---

1	Einleitung .....	1
1.1	Maligne Lymphome .....	1
1.1.1	Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) .....	1
1.1.2	Hodgkin-Lymphom (HL) .....	2
1.1.2.1	Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen).....	3
1.1.2.2	Immunphänotyp und Ursprung der HRS-Zellen.....	4
1.1.2.3	Genetische Aberrationen in HRS-Zellen .....	5
1.2	Regulation von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose .....	5
1.2.1	Zellzyklus .....	5
1.2.2	DNA-Reparatur .....	7
1.2.3	Apoptose.....	8
1.3	Tumorsuppressorgen <i>TP53</i> .....	9
1.3.1	<i>TP53</i> -Struktur .....	9
1.3.2	Aktivierung und Funktion von <i>TP53</i> .....	10
1.3.3	Regulation von <i>TP53</i> .....	12
1.3.4	Auswirkungen von Defekten des <i>TP53</i> -Gens und Störungen des <i>P53</i> -Signalwegs in Lymphomen.....	13
1.4	Aufgabenstellung der Arbeit .....	14
2	Material und Methoden .....	16
2.1	Material .....	16
2.1.1	Zelllinien .....	16
2.1.2	Primer .....	17
2.1.3	Reagenzien .....	17
2.1.3.1	Geräte und Reagenzien für die Behandlung der Zelllinien.....	17
2.1.3.2	Reagenzien und Materialien für den Westernblot.....	17
2.1.3.3	Puffer.....	18
2.1.3.4	Gele .....	19
2.1.3.5	Reagenzien und Materialien für die Klonierung.....	19
2.1.3.6	RNA-Isolierung.....	19
2.1.3.7	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	20
2.1.3.8	Reagenzien und Materialien für die Genexpressionsanalyse.....	20
2.1.3.8.1	cDNA-Synthese .....	20
2.1.3.8.2	In-vitro-Transkription.....	20
2.1.3.8.3	cDNA-, cRNA-Aufreinigung und Fragmentierung.....	20

---

2.1.3.8.4	Hybridisierung .....	20
2.1.3.8.5	Färbereagenzien.....	20
2.1.3.8.6	Puffer .....	21
2.1.3.8.7	Microarrays.....	21
2.1.3.8.8	Software.....	21
2.1.3.8.9	Affymetrix-Gerätekomponenten .....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Kultur von humanen Zelllinien .....	22
2.2.2	Zellbestrahlung .....	22
2.2.3	Zellyse und Bestimmung der Zellzahl.....	23
2.2.4	Bradford-Assay .....	23
2.2.5	Westernblot .....	24
2.2.5.1	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen .....	24
2.2.5.2	Immunoblot.....	25
2.2.5.3	Blocken .....	25
2.2.5.4	Immunodetektion .....	26
2.2.5.5	Detektion.....	26
2.2.5.6	Aktin-Kontrolle.....	26
2.2.6	Isolierung von Gesamt-RNA.....	27
2.2.7	Quantifizierung von Nukleinsäuren (Nanodrop).....	27
2.2.8	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von TP53 .....	28
2.2.9	Agarosegelelektrophorese .....	29
2.2.10	Ethidiumbromidfärbung .....	30
2.2.11	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	30
2.2.12	Klonierung.....	30
2.2.12.1	Ligation .....	30
2.2.12.2	3`-A-Überhang .....	31
2.2.12.3	Transformation.....	31
2.2.12.4	Kolonie-PCR.....	32
2.2.13	Sequenzierung .....	33
2.2.14	Sequenzauswertung .....	33
2.2.15	Qualitätsanalyse der Gesamt-RNA im Bioanalyzer.....	34
2.2.16	Genexpressionsanalyse (GeneChip Array).....	34

---

2.2.16.1	GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array.....	36
2.2.16.2	Herstellung Biotin-markierter Proben für die Affymetrix-Chip-Hybridisierung 36	
2.2.16.2.1	Erststrangsynthese der cDNA.....	36
2.2.16.2.2	Zweitstrangsynthese .....	37
2.2.16.2.3	Aufreinigung der Doppelstrang-cDNA .....	37
2.2.16.2.4	In-vitro-Transkription (IVT).....	37
2.2.16.2.5	Aufreinigung der Biotin-gelabelten cRNA.....	38
2.2.16.2.6	Fragmentierung der cRNA .....	38
2.2.16.3	Hybridisierung .....	38
2.2.16.4	Waschen und Färben.....	39
2.2.16.5	Scannen der GeneChips .....	39
2.2.16.6	Daten-Analyse.....	39
2.2.16.6.1	Analyse der Arrays .....	39
2.2.16.6.2	Normalisierung und Qualitätskontrolle .....	40
2.2.16.6.3	Vergleichende Analyse.....	41
2.2.16.6.4	Filtern von Genen .....	42
2.2.16.6.5	Statistische Analyse.....	42
2.2.16.6.6	Interpretation der Genexpression.....	42
3	Ergebnisse .....	43
3.1	Veränderung der Zellmorphie durch die Behandlung (IR + STS) der Lymphomzelllinien .....	43
3.2	Proteinexpression im P53-Signalweg verschiedener Lymphom-Zelllinien.....	44
3.2.1	Konstitutive TP53- und P21-Proteinexpression in cHL-Zelllinien mit Vergleich zu verschiedenen B-NHL-Zelllinien .....	44
3.2.2	TP53- und P21-Proteinexpression der cHL- und B-NHL-Zelllinien nach Induktion des P53-Signalwegs.....	47
3.2.3	Zusammenfassung der Proteinexpressionsmuster und Auswahl der Zelllinien für Genexpressionsanalysen.....	51
3.2.4	Bestimmung der Inkubationsdauer nach der Zellbestrahlung.....	53
3.2.5	Qualitäts- und Quantitätskontrolle der Westernblots .....	54
3.3	Amplifikation der gesamten kodierenden Region des <i>TP53</i> -Gens und seine Darstellung in der RT-PCR.....	55

---

3.4	Mutationsanalyse der kodierenden Sequenz des <i>TP53</i> -Gens in cHL- und B-NHL-Zelllinien .....	56
3.5	Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA und cRNA für die Genexpressionsanalyse .....	61
3.6	Expressionsänderung der durch DNA-Schädigung induzierten Gene in verschiedenen Lymphom-Zelllinien .....	63
3.6.1	Ziele der Genexpressionsanalyse .....	63
3.6.2	Qualitätsanalyse der Microarrays (GeneChips) .....	64
3.6.3	Auswahl und Funktionszuordnung der strahleninduzierten Gene.....	64
3.6.4	proliferations- und apoptoseassoziierte Gene.....	67
3.6.5	proliferations- und apoptoseassoziierte Gene mit strahlungsinduzierter Expressionsänderung in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mit physiologischer TP53- und P21-Proteinexpression.....	68
3.6.6	proliferations- und apoptoseassoziierte Gene mit strahlungsinduzierter Expressionsänderung in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mit unphysiologischer TP53- und P21-Proteinexpression.....	70
4	Diskussion .....	81
4.1	Mutationsstatus des <i>TP53</i> -Gens in B-Zell-Lymphomen.....	82
4.2	Funktionalität des TP53-Proteins in B-Zell-Lymphomen.....	85
4.3	Analyse der Funktionalität des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose in B-Zell-Lymphomen auf genomweiter Ebene.....	88
4.3.1	Genregulation des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose in B-Zell-Lymphomzelllinien mit gestörter TP53-Proteinfunktion .....	88
4.3.1.1	cHL-Zelllinien.....	88
4.3.1.2	CLL-Zelllinie .....	92
4.3.1.3	DLBCL vom GCB-Typ .....	92
4.3.2	Genregulation des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mit intakter TP53-Funktion .....	93
4.3.2.1	DLBCL-Zelllinien vom ABC-Typ .....	93
5	Zusammenfassung .....	94
6	Abkürzungsverzeichnis.....	96
7	Literaturverzeichnis.....	97
8	Danksagung .....	105
9	Erklärung.....	106

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind bösartige Tumore des lymphatischen Systems und machen 3-4 % aller Krebserkrankungen aus (1) (2). Von einer Mutterzelle ausgehend bilden sie monoklonale Neoplasien von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten oder NK-Zellen (2). Die malignen Lymphome werden in zwei Gruppen eingeteilt: in die Gruppe der Hodgkin-Lymphome (HL) und in die heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Diese Einteilung und die weitere Unterteilung der NHL erfolgt nach der WHO-Klassifikation anhand zytomorphologischer, klinischer, immunphänotypischer und molekulargenetischer Merkmale (3).

### 1.1.1 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL)

Zu den NHL zählen alle malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems, die nicht die Diagnosekriterien für das HL (siehe 1.1.2) erfüllen. Ihre Inzidenz liegt bei 10-15/100.000 (1). Die Gruppe der NHL fasst eine Vielzahl von verschiedenen Lymphom-Krankheiten zusammen, die sich in ihrer feingeweblichen Struktur, ihrer genetischen Konstellation und in ihrem Krankheitsverlauf unterscheiden. Die Vielzahl der NHL-Krankheiten entsteht durch die verschiedenen Ursprungszellen, den B-Zellen und den T-Zellen (bzw. den mit T-Zellen verwandten NK-Zellen), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Reifung entarten können. Während der Reifung durchlaufen die B-Zellen wesentlich mehr Differenzierungs-, Aktivierungs- und Proliferationsschritte als die T-Zellen. Da insbesondere die verschiedenen Differenzierungsschritte die Gefahr genetischer „Unfälle“ in sich tragen, weisen die B-NHL eine deutlich größere Formenvielfalt und Häufigkeit auf als die T-NHL. Etwa 80-90 % der NHL gehen aus der B-Zell-Reihe hervor (1).

Die Art der Ursprungszelle und die Ereignisse einer malignen Transformation, wie chromosomale Translokationen, bestimmen die Merkmale einer Lymphomkrankheit und deren klinischen Verlauf. Es gibt aggressive, schnell wachsende (hochmaligne) NHL und indolente, langsam wachsende (niedrig maligne) NHL (1) (2).

Die aggressiven NHL wachsen rasch und metastasieren früh. Durch ihre hohe Proliferationsrate sind sie aber chemotherapeutisch meist gut behandelbar und können teilweise geheilt werden. Aggressive NHL sind z.B. das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) und das Burkitt-

Lymphom (BL). Es gibt aber auch aggressive NHL mit ungünstigem klinischem Verlauf, die nicht heilbar sind, wie das Mantelzelllymphom (MCL).

Die indolenten NHL, wie z.B. das folliculäre Lymphom (FL) oder die chronische lymphatische Leukämie (CLL) breiten sich nur langsam aus. Sie lassen sich therapeutisch gut zurückdrängen und als chronische Erkrankungen über längere Zeiträume kontrollieren, werden derzeit aber als nicht heilbar eingestuft (1).

Für die verschiedenen NHL-Subtypen werden unterschiedliche Therapiestrategien eingesetzt. Indolente Lymphome werden im Anfangsstadium zunächst meist nur beobachtet. Im fortgeschrittenen Stadium werden Chemotherapien überwiegend in Kombination mit einer Antikörpertherapie eingesetzt. Die aggressiven NHL werden frühzeitig mit Chemotherapie, meist in Kombination mit einem Antikörper, behandelt. Bei den B-NHL ist Rituximab, ein Antikörper gegen das B-Zell-Oberflächenmolekül CD20, besonders wirksam (1).

Charakteristisch für NHL ist das Auftreten von Chromosomentranslokationen. So ist beim Burkitt-Lymphom (BL) typischerweise die Translokation t(8;14) vorhanden, beim Mantelzelllymphom (MCL) die t(11;14) und beim folliculären Lymphom (FL) die t(14;18). Dies sind Translokationen mit Beteiligung von Onkogenen und Immunglobulinschwerkettengen (*IGH*). Durch die Translokation gelangt im Fall des BL das Onkogen *C-MYC*, beim MCL das *ZYKLIN D1*-Gen und beim FL das *BCL-2*-Gen unter die Kontrolle der regulatorischen Elemente des *IGH*-Gens. Die Folge ist eine Überexpression des *C-MYC*-, *ZYKLIN D1*- bzw. *BCL-2*-Gens. Die *ZYKLIN D1*- und *C-MYC*-Überexpressionen führen dabei zu einer gesteigerten Proliferation, während die *BCL-2*-Überexpression eine Blockade der Apoptose verursacht. Beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) tritt in einem Teil der Fälle die Translokation t(3;14) auf, die zu einer *BCL-6*-Überexpression und dadurch zu einer Differenzierungsblockade der B-Zellen führt (2). Somit stellen diese Translokationen einen entscheidenden Schritt bei der malignen Transformation der betroffenen Zelle dar.

### **1.1.2 Hodgkin-Lymphom (HL)**

Den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) wird das Hodgkin-Lymphom (HL) gegenübergestellt. Das charakteristische Merkmal des Hodgkin-Lymphoms sind die malignen einkernigen Hodgkin- und mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) (4). Mit 25% aller nodalen Lymphome ist das HL eines der häufigsten malignen Lymphome der industrialisierten Welt, die Inzidenz beträgt 3/100 000 (2).



Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1832 von Thomas Hodgkin (5). Um 1900 wurden die typischen HRS-Zellen von Carl Sternberg und Dorothy Reed identifiziert (6) (7) (8).

Anhand des Immunphänotyps und der Zusammensetzung des umgebenden zellulären Infiltrats werden zwei Formen des HL unterschieden, das klassische HL (cHL) mit 95% der HL-Fälle und das noduläre lymphozytenprädominante HL (NLPHL). Das cHL wird weiter unterteilt in den nodulär sklerosierenden Typ (60% der HL-Fälle), Mischtyp (29%), lymphozytenreichen Typ (5%) und lymphozytenarmen Typ (1%). Die einzelnen cHL-Formen unterscheiden sich dabei nicht in ihrer Prognose. Sowohl die Prognose als auch die Therapieentscheidung sind nicht von der cHL-Form abhängig, sondern vom klinischen Stadium (4) (9).

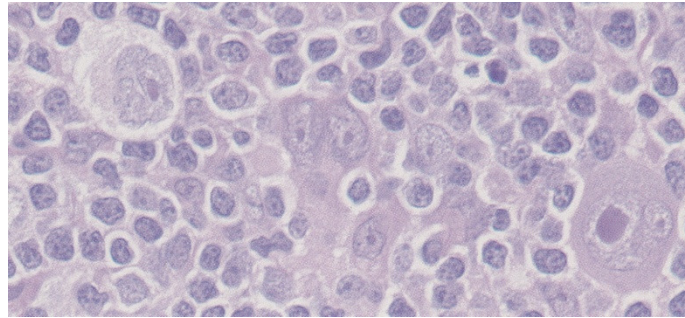
Die Therapie besteht in einer kombinierten Chemotherapie mit anschließender Strahlentherapie, in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium. Im Vergleich zu vielen anderen Malignomen sind Hodgkin Lymphome sehr strahlensensibel und reagieren sehr empfindlich auf Chemotherapie. Die Mehrzahl der Patienten kann mit Hilfe einer Hochdosis-Chemotherapie meist in Kombination mit Radiotherapie geheilt werden. Die Heilungsrate beträgt 80%, in frühen Stadien sogar 90%, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 90% und auch fortgeschrittene Stadien sowie Rezidive sind grundsätzlich heilbar (1) (2) (9). Damit ist das HL deutlich besser therapierbar als die NHL.

#### 1.1.2.1 *Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen)*

Hodgkin-Zellen sind große, einkernige Zellen mit betonten Nukleoli. Reed-Sternberg-Zellen sind noch größer, besitzen eine bizarre Zellform und sind mehrkernig. Zellfusionen konnten als Ursache für die Mehrkernigkeit und die bizarre Zellform ausgeschlossen werden (10). Die mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen gehen vermutlich aus den einkernigen Hodgkin-Zellen durch Endomitose (Vermehrung der Chromosomenzahl ohne Kernteilung) hervor (11) (4). Es scheinen daher massive Störungen in der Mitosephase des Zellzyklus der HRS-Zellen vorzuliegen.

Die HRS-Zellen bilden den malignen Anteil des cHL, machen aber nur etwa 1-5% der Tumormasse aus (6). Obwohl HRS-Zellen eine hohe Expression von Proliferationsmarkern (z.B. Ki-67) aufweisen, akkumulieren sie nicht zu einer großen Zellzahl. Dies weist ebenfalls auf gestörte Mitosen hin (12). Die restlichen 95-99% des cHL-Gewebes bestehen aus einem polymorphen Infiltrat von verschiedenen Immun- und Entzündungszellen (T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, eosinophile Granulozyten). Dieses Infiltrat reaktiver Zellen wird von den HRS-Zellen durch die Sekretion verschiedener Zytokine und durch die Expression von

bestimmten Oberflächenmolekülen rekrutiert. Die angelockten Entzündungszellen produzieren wiederum parakrine Signale, die essenziell sind für das Überleben der HRS-Zellen (9).



**Abbildung 1: Klassisches Hodgkin-Lymphom (H&E-Färbung)**

Charakteristische Tumorzellen, entsprechend Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen, eingebettet in einen reaktiven Hintergrund (Giemsa-Färbung). (Hiddemann, Dreyling, Stein „Lymphome – Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien“, Thieme 2005)

*1.1.2.2 Immunphänotyp und Ursprung der HRS-Zellen*

Der TNF-Rezeptor CD30 ist ein Oberflächenmolekül aktivierter B- und T-Lymphozyten, der von allen HRS-Zellen des cHL exprimiert wird und so zur Diagnose des cHL entscheidend beiträgt. Im Übrigen ist der Immunphänotyp der HRS-Zellen eher heterogen. In immunhistochemischen Analysen werden viele Oberflächenmoleküle nur in einem Teil der cHL-Fälle nachgewiesen und bei diesen auch nur in einem Teil der HRS-Zellen. Der Granulozytenmarker CD15 wird häufig exprimiert. Nur 15-20% der cHL-Fälle sind positiv für den B-Zell-Marker CD20 (4). HRS-Zellen zeigen weiterhin praktisch nur B-Zell-Eigenschaften, die assoziiert sind mit antigenpräsentierender Funktion und der Interaktion mit T<sub>H</sub>-Zellen. Durch diese kommunizieren sie mit dem Infiltrat reaktiver Zellen, welches sie umgibt (4) (9). Andere B-Zell-Gene werden kaum exprimiert, insbesondere die Komponenten des B-Zell-Rezeptors fehlen. Dafür exprimieren HRS-Zellen in einem Teil der Fälle zusätzlich Oberflächenmarker anderer hämatopoetischer Zelllinien, wie z.B. von T-Zellen (z.B. Granzym B, CD3, CD4), dendritischen Zellen (z.B. CCL17, Fascin) und myeloischen Zellen (z.B.  $\alpha$ 1-Antitrypsin, CSF1R, CD15) (4) (9). Aufgrund der nicht eindeutigen Expression von Oberflächenmolekülen eines bestimmten Zelltyps des hämatopoetischen Systems war lange Zeit die Herkunft der HRS-Zellen rätselhaft.

Erst durch Einzelzell-PCR-Analysen von HRS-Zellen konnten klonale Umlagerungen von Immunglobulin-(IG-)Genabschnitten und somatische Hypermutationen von umgelagerten IgV-Genen nachgewiesen werden (4) (9) (13) (14). Diese beweisen, dass HRS-Zellen von reifen Keimzentrums-B-Zellen abstammen (4) (9) (13) (15) (16). Reife B-Zellen produzieren

Immunglobuline (IG) und exprimieren sie als B-Zell-Rezeptor (BCR) auf ihrer Zelloberfläche. Jedoch lässt sich, trotz eindeutiger B-Zell-Herkunft der HRS-Zellen, in praktisch allen Fällen des cHL keine IG-Expression in den HRS-Zellen nachweisen (17) (18) (19). Eine fehlende IG-Expression/B-Zell-Rezeptor-Expression führt normalerweise zum Sterben der Keimzentrums-B-Zellen durch die Apoptose (programmierter Zelltod), da zu ihrem Überleben das Signal eines funktionalen B-Zell-Rezeptor/IG notwendig ist (2). In den HRS-Zellen führt die fehlende IG/BCR-Expression jedoch nicht zum programmierten Zelltod, was auf eine Blockierung der Apoptose in HRS-Zellen hinweist.

### 1.1.2.3 Genetische Aberrationen in HRS-Zellen

Die Blockierung der Apoptose der HRS-Zellen stellt wahrscheinlich das Schlüsselmoment in der Pathogenese des cHL dar. Aus diesem Grund sind Aktivatoren und Inhibitoren der Apoptose (*TP53*, *FAS*, *CASPASE 8*, *CASPASE 10*, *FADD*, *BAD*, *ATM*, *BCL2*) auf genetische Aberrationen untersucht worden. Doch Mutationen wurden nur selten gefunden. Analysen des Tumorsuppressorgens *TP53* waren dabei jedoch auf die typischen *hot spot*-Regionen begrenzt (9) (20) (21) (22).

Während viele B-Zell-NHL typische pathogenetische Translokationen aufweisen (siehe 1.2), sind im cHL multiple, nur teilweise wiederkehrende, numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen in den HRS-Zellen präsent (4) (23) (24) (25) (26). Die Ursache des abnormen Karyotyps und der genomischen Instabilität ist ungeklärt und das Wissen über erworbene Mutationen in HRS-Zellen begrenzt.

## 1.2 Regulation von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose

Die Regulation von Zellproliferation, DNA-Reparatur und Zelltod erfolgt durch sehr komplexe und eng miteinander verknüpfte Signalwege. Störungen der Proliferations- und Zelltodkontrolle begünstigen die Malignomentstehung und finden sich in allen malignen Tumoren.

### 1.2.1 Zellzyklus

Der Zellzyklus teilt sich in Interphase und Mitose (Kern- und Zellteilung) auf. Die Interphase wiederum wird in G1-Phase (Zellwachstum und Ergänzung von Zellbestandteilen), S-Phase (Synthese von DNA und Histonen) und G2-Phase (Vorbereitung auf die Mitose) unterteilt (siehe

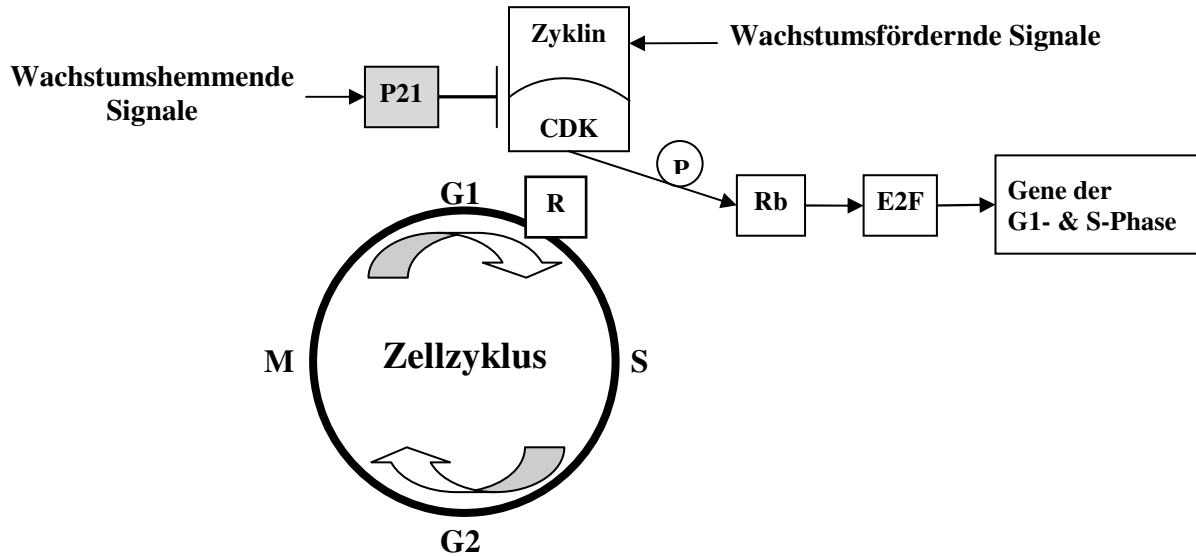
Abb. 2). Die Schlüsselrolle in der Steuerung des Zellzyklus nehmen die Proteinfamilien der Zykline und der Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) ein. Die Zyklinexpression schwankt abhängig von der Phase des Zellzyklus und wird durch wachstumsfördernde Signale (z.B. vermittelt durch RAS, MAPK, NFκB) gesteigert. Zykline binden die CDKs und bilden Zyklin/CDK-Komplexe. Dadurch werden die CDKs aktiviert und bewirken wiederum ihrerseits durch Phosphorylierung die Aktivierung verschiedener Zellzyklusproteine, die zum Fortschreiten des Zellzyklus führen.

Das Fortschreiten durch den Zellzyklus wird durch den Rb-Signalweg kontrolliert. Rb wird in der G1-Phase durch verschiedene Zyklin/CDK-Komplexe phosphoryliert. Dadurch verliert Rb seinen hemmenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor E2F und setzt diesen frei. E2F bewirkt anschließend die Aktivierung der Transkription von Genen der G1- und S-Phase (Gene der DNA-Replikation) und damit die Progression des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase (27). CDK-Inhibitoren hemmen Zyklin/CDK-Komplexe, die an der Rb-Phosphorylierung beteiligt sind. Dadurch können CDK-Inhibitoren die Freisetzung von E2F blockieren und ein Fortschreiten der Zelle aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verhindern. Einer der wichtigsten CDK-Inhibitoren ist P21<sup>WAF1/CIP1</sup>. P21 ist ein zentraler Bestandteil der Kontrollpunkte (*checkpoints*) des Zellzyklus (siehe 1.2.2) und entscheidend an der Hemmung des Rb-Signalwegs und damit an der Vermittlung des Zellzyklusarrests beteiligt (28). P21 wird durch das Tumorsuppressorprotein TP53 induziert.

Insgesamt lassen sich drei Gruppen von zellzyklusregulierenden Proteinen beschreiben:

- Zellzyklusproteine (z.B. Zykline, CDKs, CDKIs)
- Proteine für metabolische Prozesse des Zellzyklus (z.B. DNA-Polymerasen)
- regulatorische Proteine (TF (z.B. TP53), TF-assoz. Proteine (z.B. Rb, E2F, B-MYB, C-JUN) und Wachstumsfaktoren) (29).

Die Gene dieser drei Gruppen wirken auf den Zellzyklus entweder positiv ein, also wachstumsfördernd, oder negativ und damit wachstumshemmend.



### Abbildung 2: Zellzyklus

**M:** Mitose; **G1:** G1-Phase; **S:** S-Phase; **G2:** G2-Phase; **R:** Restriktions- bzw. Kontrollpunkt.

Der G1-Restriktionspunkt (Kontrollpunkt) kontrolliert den Progress des Zellzyklus durch die G1- und S-Phase. Wachstumsfördernde Signale führen zu einer Steigerung der Zyklin-Expression. Die nachfolgende Bildung von Zyklin/CDK-Komplexen aktiviert den Rb-Signalweg und führt zur Transkription von G1- und S-Phase-Genen, die ein Fortschreiten des Zellzyklus bewirken. Wachstums-hemmende Signale aktivieren CDK-Inhibitoren wie P21, die den Zellzyklusarrest vermitteln.

### 1.2.2 DNA-Reparatur

Die Dauer und Abfolge der Zellzyklusphasen werden von Kontrollpunkten, den *checkpoints*, überwacht (30). Unter Kontrollpunkten versteht man Signalwege für das Zellüberleben, DNA-Reparatur und Zellzyklusübergänge. Kontrollpunkte werden durch zellzyklusstörende Defekte wie DNA-Schädigung aktiviert, vermitteln den Zellzyklusarrest, die Reparatur des DNA-Schadens und bestimmen nach erfolgter Reparatur die Fortsetzung des Zellzyklus (31). Kontrollpunkt-Komponenten sind die Kinasen ATM, ATR und DNA-PK. Bei DNA-Schädigung, wie z.B. durch ionisierende Strahlung verursachte Doppelstrangbrüche, phosphorylieren ATM, ATR und DNA-PK die Kontrollpunkt-Kinasen CHK1 und CHK2 (28) (31) (32). Dies wiederum führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des Tumorsuppressorproteins TP53, das eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Kontrollpunkte spielt. TP53 induziert daraufhin den CDK-Inhibitor P21, welcher durch CDK-Hemmung zum Zellzyklusstop führt, solange bis der DNA-Schaden repariert ist (30) (32). Neben P21 induziert TP53 weitere Gene, die den Zellzyklusarrest vermitteln wie *GADD45*, *14-3-3-σ* und *REPRIMO*. Hauptvermittler des Proliferationsstopps ist jedoch das P21-Gen bzw. P21-Protein, das Bestandteil des G1-, S- und G2/M-Kontrollpunkts ist und somit in jeder Zellzyklusphase zum Arrest führen kann (33) (34)

(35) (36). Weiterhin reguliert TP53 die Expression verschiedener Gene, die an unterschiedlichen Signalwegen der DNA-Reparatur wesentlich beteiligt sind (33) (37). Ist die Reparatur nicht erfolgreich, wenn z.B. die Zahl der Doppelstrangbrüche zu hoch ist, leitet TP53 die Apoptose ein (28).

Defekte der DNA-Reparatur sind entscheidend an der Entstehung von Tumoren beteiligt, oft durch Störungen im ATM-P53-P21-Signalweg (30). Deregulation der Kontrollpunkte führt zu Aneuploidie und komplexem Karyotyp (28) (30). So kommt es bei Inaktivierung von P21 nach einem DNA-Schaden zur Entkopplung von S-Phase und Mitose, so dass die Zellen DNA akkumulieren, ohne sich zu teilen, und polyploid werden (28).

### **1.2.3 Apoptose**

Die Apoptose ist eine Form des Zelltods, der sogenannte programmierte Zelltod. Das Prinzip der Apoptose besteht in einer kaskadenartigen Aktivierung der Caspasen-Familie. Die Caspasen führen zum Abbau von Aktin (Zytoskelett) und Lamin (Zellkernmembran) und zur Aktivierung von DNasen (DNA-Abbau) bis sich die Zelle in kleine Vesikel abschnürt, welche von Fresszellen aufgenommen werden (28). Es gibt zwei Wege der Apoptose, die zur Caspasen-Aktivierung führen, den intrinsischen Weg und den extrinsischen Weg.

Der intrinsische Weg wird aktiviert durch starke DNA-Schädigung und Versagen von DNA-Reparaturmechanismen, Hypoxie oder Wachstumsfaktorverminderung. Die Zelltodsignale werden hierbei durch das Tumorsuppressorprotein TP53 gesteuert und über die Mitochondrien vermittelt. Doppelstrangbrüche, wie sie von ionisierender Strahlung verursacht werden, sind die schwerwiegendste Art der DNA-Schädigung. Das Sensormolekül ATM erkennt den DNA-Schaden und aktiviert TP53. TP53 wirkt als Transkriptionsfaktor und induziert daraufhin proapoptotische Gene (z.B. *BAX*) (38). Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c und ATP aus der Mitochondrienmembran, welche dann durch Bindung von APAF-1 und Procaspase-9 einen Komplex, das sogenannte Apoptosom, bilden. Über das Apoptosom werden Caspasen aktiviert, die den Zelltod herbeiführen (28) (38) (39). Reguliert wird der mitochondriale Apoptoseweg entscheidend durch die BCL-2-Familie, welche aus proapoptotischen Mitgliedern wie BAX, BAK, BAD, NOXA und PUMA und antiapoptotischen Mitgliedern wie BCL-2 und BCL-XL besteht. Die BCL-2-Familie wiederum wird durch TP53 reguliert. TP53 induziert proapoptotische Mitglieder der BCL-2-Familie und hemmt antiapoptotisches BCL-2. Weiterhin blockiert TP53 die Familie der Apoptose-Inhibitoren (IAPs; z.B. SURVIVIN) (28).

Der extrinsische Apoptose-Weg dient der Gewebe-Homöostase und Immunität und wird über Todesrezeptoren ausgelöst (34). Er kann ebenfalls durch TP53 aktiviert werden, indem TP53 die Induktion der Todesrezeptoren TRAIL, DR4, DR5/KILLER, CD9 und des FAS/APO-1-Liganden vermittelt (39) (33).

Jede Beeinträchtigung der TP53-Funktion (z.B. Mutationen des *TP53*-Gens oder seiner Zielgene) führt zur Deregulation des Apoptose-Signalweges und begünstigt die Tumorgenese (40).

### 1.3 Tumorsuppressorgen *TP53*

*TP53* ist ein Tumorsuppressorgen, das das unkontrollierte Wachstum genomisch geschädigter Zellen verhindert (41). Im komplizierten Netzwerk der Signalwege von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose nimmt *TP53* eine zentrale Rolle ein. *TP53* regelt essenziell die Kontrollpunkte der Zellproliferation und bildet einen Knotenpunkt in den Kontrollwegen zur Erkennung und Eliminierung von DNA-Schäden (33). Bei zellulärem Stress antwortet *TP53* mit einer adäquaten Anpassung der Genexpression, die für den Erhalt der genomischen Integrität sorgt. Dabei zeigt *TP53* proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung. Weiterhin ist *TP53* beteiligt an der Regulation von Angiogenese, Autophagie, oxidativem Stress, Hypoxie, Energiestoffwechsel und Glykolyse (42) (43) (44). Mit diesen Prozessen kann *TP53* ebenfalls zur Tumorsuppression beitragen.

#### 1.3.1 *TP53*-Struktur

Das *TP53*-Gen ist auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert. Das TP53-Protein ist 393 Aminosäuren (AS) lang und wird in drei Funktionsdomänen unterteilt (siehe Abbildung 3).

1.) **N-terminale Transaktivierungsdomäne** (AS 1-70; Exone 1-4)

Hier kommt es zu multiplen posttranslationalen Modifikationen und Interaktionen mit regulatorischen Proteinen wie MDM2 und p300/CBP, die zur TP53-Funktion und TP53-Stabilität beitragen.

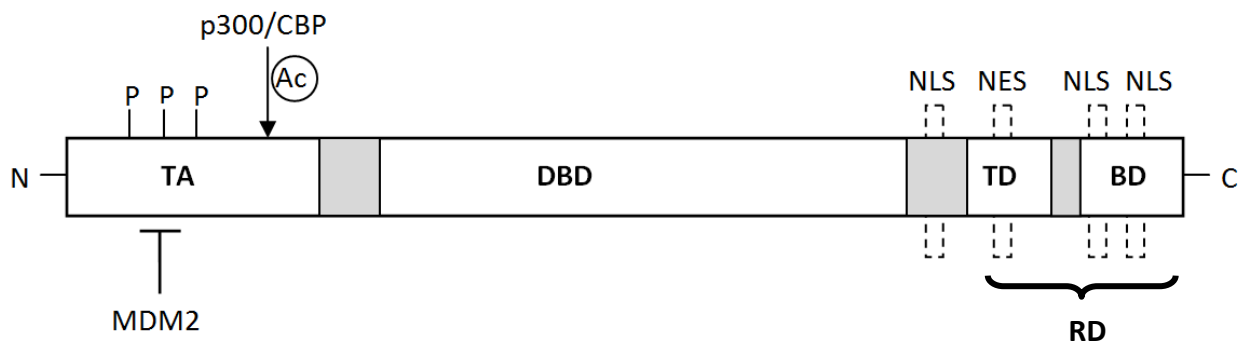
2.) **Zentrale DNA-Bindungsdomäne** (AS 102-292; Exone 4-8)

Durch diese Domäne erfolgt die Bindung an sequenzspezifische DNA-Elemente.

### 3.) C-terminale Regulatordomäne

Die C-terminale Domäne besteht aus der Oligomerisierungsdomäne bzw. Tetramerisierungsdomäne (AS 323-356; Exone 9-10) und der C-terminalen Basisdomäne (AS 363-393; Exone 10-11). Auch die Basisdomäne ist Objekt multipler post-translationaler Modifikationen, die die TP53-Funktion regulieren.

Zwischen N-Terminus und C-Terminus besteht eine Wechselwirkung. Beide tragen zur Stabilität, Aktivität, Konformation und DNA-Bindungsaktivität von TP53 bei (37) (39) (45).



**Abbildung 3: Struktur des TP53-Moleküls**

Vom N-Terminus zum C-Terminus enthält das TP53-Molekül die Transaktivierungs-/Transreprimierungsdomäne (TA), die DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die C-terminale Regulatordomäne (RD). Die C-terminale Regulatordomäne beinhaltet die Oligomerisierungs- bzw. Tetramerisierungsdomäne (TD), die C-terminale Basisdomäne (BD) sowie Kernlokalisierungs- (NLS) und Kernexportsignale (NES) (siehe 1.5.3). MDM2 hemmt TP53 durch Interaktion mit der Transaktivierungsdomäne. Phosphorylierung (P) dieser Region unterbricht die MDM2-TP53-Interaktion und aktiviert TP53. Acetylierung der Transaktivierungsdomäne verstärkt die TP53-Aktivierung.

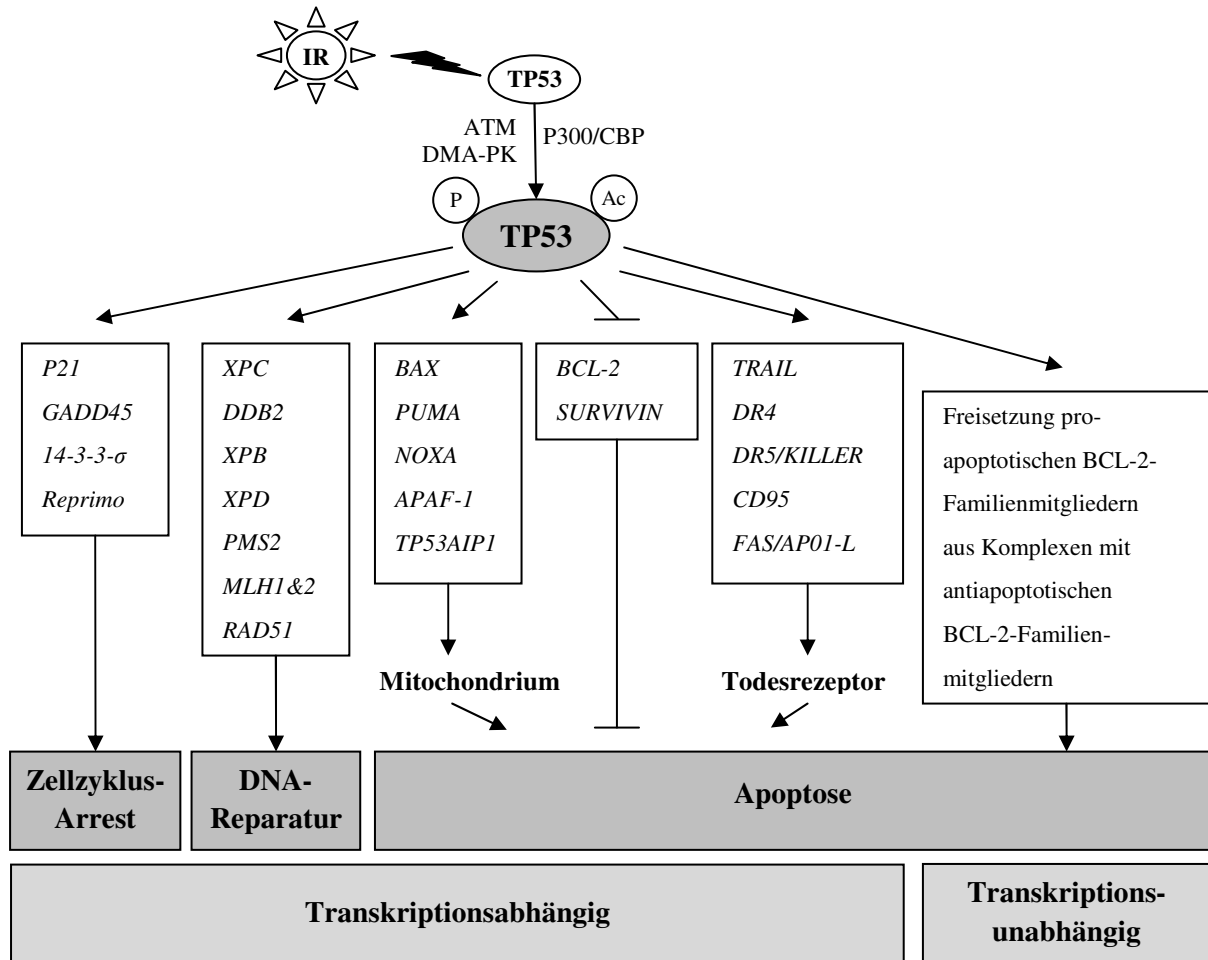
### 1.3.2 Aktivierung und Funktion von TP53

TP53 wird durch eine Vielzahl von zellulären Stresssignalen aktiviert. Vor allem genotoxischer Stress (DNA-Schaden durch z.B. ionisierende Strahlung) und Onkogen-Aktivierung, aber auch oxidativer oder physiologischer Stress, wie Hypoxie oder Nährstoffmangel, induzieren die Expression von TP53 und führen zu einer Akkumulation von TP53 im Zellkern (42) (46) (44). Posttranslational wird TP53 stabilisiert und aktiviert. Anschließend bindet TP53 als tetramerer Transkriptionsfaktor sequenzspezifisch an die DNA seiner Zielgene und steigert oder verringert ihre Expression. TP53 reguliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die in die Signalwege der Tumorsuppression eingreifen. Somit erfüllt TP53 seine Tumorsuppressorfunktion hauptsächlich als Transkriptionsfaktor, der durch die Induktion oder Repression der Expression seiner Zielgene zur Synthese von Proteinen führt, die den Zellzyklus

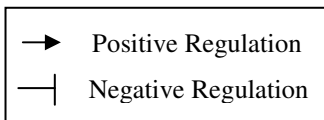


anhalten und die DNA-Reparatur gewährleisten (siehe 1.2.2) oder die Apoptose einleiten (siehe 1.2.3).

Neben seiner Hauptfunktion als Transkriptionsfaktor besitzt TP53 auch eine transkriptionsunabhängige Funktion. So kann TP53 im intrinsischen Apoptoseweg direkt zum Mitochondrium translozieren und dort apoptosehemmende Komplexe aus pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie unterbrechen, wodurch die proapoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie aktiviert werden (36) (47) (48).



**Abbildung 4: Funktionen von TP53**



**IR:** ionisierende Strahlung; **P:** Phosphatrest; **Ac:** Acetylrest

### **1.3.3 Regulation von TP53**

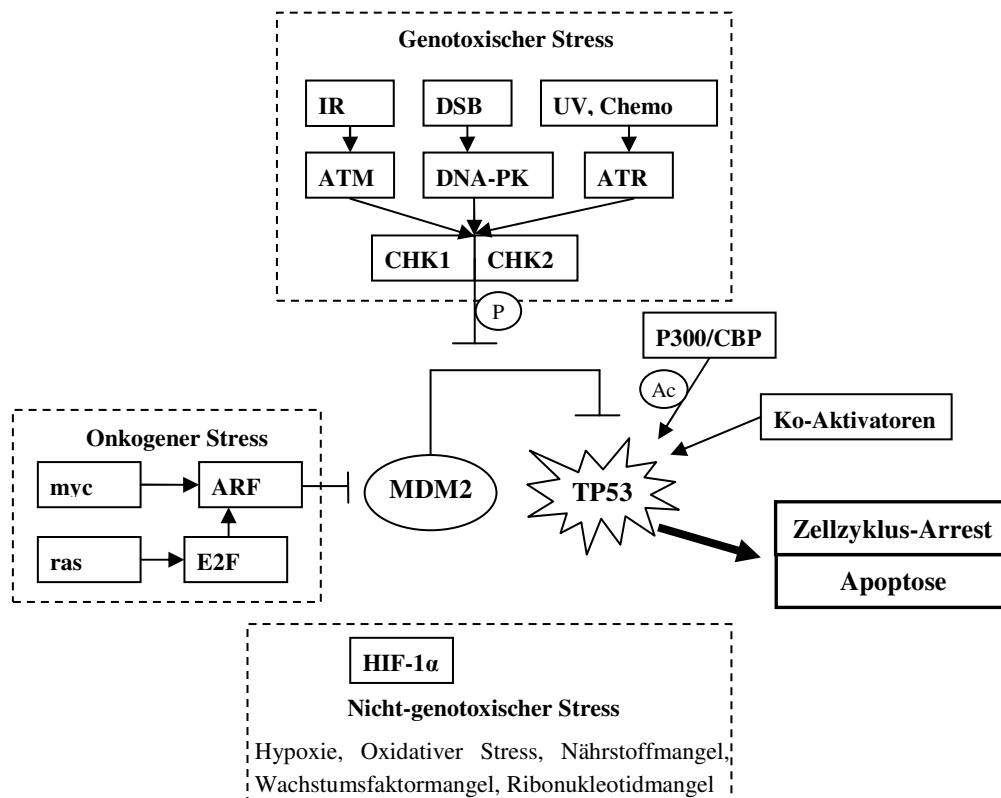
Das TP53-Protein weist in ungestressten Zellen nur eine geringe basale Expression auf und besitzt eine kurze Halbwertszeit (34) (43). Die TP53-Konzentration wird hauptsächlich durch MDM2 bestimmt. In Abwesenheit von Stresssignalen wird TP53 von MDM2 gebunden und inaktiviert. MDM2 ist eine Ubiquitinligase, welche Ubiquitinreste auf TP53 überträgt, wodurch TP53 vom Proteasom erkannt und abgebaut wird. Weiterhin regelt MDM2 den Export von TP53 aus dem Zellkern. MDM2 steht mit TP53 über eine negative Rückkopplungsschleife in Verbindung (41).

Stresssignale führen durch eine Hemmung von MDM2 zur TP53-Aktivierung und steigern die TP53-Halbwertszeit von Minuten auf Stunden. Die MDM2-Hemmung erfolgt durch Phosphorylierung von TP53 in der MDM2-Bindungsregion durch die Kinasen CHK1, CHK2, ATM, ATR und DNA-PK sowie durch die ebenfalls ATM-vermittelte Phosphorylierung von MDM2 (35) (46) (41).

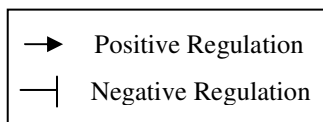
Weitere Modifikationen durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten (durch verschiedene Kinasen) und Acetylierung von Lysinresten (durch die Acetyltransferasen CBP, p300, PCAF) steigern die TP53-Stabilität und die Stärke der TP53-DNA-Bindung (37) (46). Die unterschiedlichen Stresssignale führen dabei über unterschiedliche Signalwege durch Aktivierung bestimmter Kinasen zur Aktivierung und Stabilisierung von TP53 (Abbildung 5) (42). So bewirken DNA-Schäden, verursacht durch ionisierende Strahlung, über ATM und CHK2 eine Aktivierung des TP53-Netzwerks und UV-Strahlung und Chemotherapeutika führen über ATR zur TP53-Aktivierung (35) (43). DNA-Doppelstrangbrüche werden über die DNA-PK registriert. Aberrante Wachstumssignale durch Onkogen-Expression (z.B. Ras oder c-Myc) induzieren die TP53-Stabilität über ARF (49).

Aktiviertes und stabilisiertes TP53 akkumuliert im Kern, wo es an spezifische DNA-Sequenzen bindet und zur Induktion, aber auch Repression der Transkription einer Vielzahl von Zielgenen führt. Die Art der Stresssignale bestimmt durch das Muster der TP53-Modifikation das Transkriptionsprofil der Zielgene (37) (50). Neben der TP53-Modifikation durch Proteinkinasen, Phosphatasen, Acetylasen, Deacetylasen, Ubiquitinligasen, Deubiquitinasen können auch Ko-Aktivatoren oder die TP53-Konzentration die TP53-Antwort beeinflussen (41) (46) (51).

Die Aktivierung oder Repression der Transkription von Zielgenen erfordert die TP53-Lokalisation im Zellkern. Dafür sorgen nukleäre Lokalisierungssignale (NLS), die sich im C-Terminus des TP53-Proteins befinden. Der Kernexport wird durch nukleäre Exportsequenzen (NES) sowie durch MDM2 geregelt (41) (43).



**Abbildung 5: Regulation und Aktivierung von TP53**



P: Phosphatrest; Ac: Acetylrest

### 1.3.4 Auswirkungen von Defekten des TP53-Gens und Störungen des P53-Signalwegs in Lymphomen

Maligne Tumore entstehen durch Mutationen in Onkogenen (aktivieren die ungehemmte Zellteilung), in Tumorsuppressorgenen (hemmen die unkontrollierte Zellteilung) oder in Genen, die in DNA-Replikation oder Reparatur eingreifen.

Die Bedeutung des Tumorsuppressorgens *TP53* zeigt sich in der großen Anzahl von *TP53*-Mutationen in Krebszellen. In ungefähr 50% aller menschlichen malignen Tumoren findet sich ein mutiertes *TP53*-Gen (33) (48). In den restlichen 50% der Tumore, in denen *TP53* selbst nicht mutiert vorliegt, zeigen sich fast immer Mutationen oder Fehlregulierung der *TP53*-Zielgene oder *TP53*-Interaktionsgene, die Störungen im P53-Signalweg hervorrufen (35).

Dabei weist das *TP53*-Gen ein ungewöhnliches Mutationsspektrum auf. In Tumorsuppressorgenen finden sich meist Deletionen, die zu ihrer Inaktivierung führen. Bei *TP53* handelt es sich dagegen hauptsächlich (zu 95%) um Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne, die zu einem Aminosäureaustausch führen (34) (39). *TP53*-Mutationen führen so häufig nicht einfach nur zu einem Funktionsverlust (*loss of function*) des TP53-Proteins, sondern oft zu einem überexprimierten TP53-Protein mit verlängerter Halbwertszeit (*gain of function*), wobei *TP53* vom Tumorsuppressorgen zum Onkogen wird (37).

Chemotherapie und Strahlentherapie entfalten ihre Wirkung über den P53-Signalweg. Sie schädigen die DNA der Krebszelle so stark, dass TP53 aktiviert wird, das Wachstum der Krebszelle hemmt und den Zelltod einleitet, vorausgesetzt, der P53-Signalweg ist intakt. Beeinträchtigungen der TP53-Funktion führen zu Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie (39) (28).

Immunhistologische Untersuchungen zeigen, dass TP53 sowohl in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) als auch in HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) überexprimiert vorliegt (52) (53) (54) (22). Die Akkumulation von TP53 in den Tumorzellen lässt sich jedoch nicht durch das Vorhandensein von Mutationen im *TP53*-Gen erklären (20) (21) (22). In B-NHL finden sich trotz einer TP53-Überexpression nur in einer Minderheit der Fälle *TP53*-Mutationen (55). Im cHL zeigen sich keine Mutationen im *TP53*-Gen (22) (20) (56) (57) bzw. nur sehr vereinzelt (58) (59) (60).

## 1.4 Aufgabenstellung der Arbeit

Das Schlüsselmoment in der Pathogenese des cHL bildet die Blockierung der Apoptose in den HRS-Zellen (siehe 1.1.2.3). Zudem weisen HRS-Zellen eine Fehlregulation des Zellzyklus mit gestörten Mitosen auf (siehe 1.1.2.1 und 1.1.2.4). Zentraler Regulator sowohl der Apoptose als auch des Zellzyklus ist das Tumorsuppressorprotein TP53. Immunhistologisch zeigt sich in HRS-Zellen eine Überexpression des TP53-Proteins (siehe 1.3.4).

Die Apoptose-Blockade, die Zellzyklusstörungen und die Überexpression des TP53-Proteins in HRS-Zellen lassen einen defekten P53-Signalweg vermuten. Die niedrige Inzidenz von *TP53*-Mutationen in HRS-Zellen liefert keine Erklärung für diese Störungen und lässt anderweitige Beeinträchtigungen im *TP53*-Signalweg annehmen. Allerdings wurden in HRS-Zellen bisher nur die *hot spot*-Regionen (Exon 4-8) auf *TP53*-Mutationen untersucht (siehe 1.1.2.4).

HRS-Zellen stammen ebenso wie die Zellen des B-Zell-NHL von B-Lymphozyten ab. Auch in den B-Zell-NHL finden sich trotz einer TP53-Überexpression nur in einer Minderheit der Fälle

*TP53*-Mutationen. Dies weist auf mögliche Gemeinsamkeiten hinsichtlich eines defekten P53-Signalwegs hin. Andererseits deuten verschiedene Therapieansprechraten auf Unterschiede in der Regulation des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose hin (siehe 1.3.4).

Dies führt zu folgenden Fragen, die in dieser Arbeit näher untersucht werden sollten:

- 1.) Welche Lymphomzelllinien reagieren auf Bestrahlung mit einer physiologischen TP53-Antwort?
- 2.) Welche Störungen in den Signalwegen von Zellproliferation, DNA-Reparatur und Zelltod zwischen cHL und B-NHL lassen sich nachweisen?
- 3.) Liegen außerhalb der *hot spot*-Regionen Mutationen im *TP53*-Gen vor, die bisher unbekannt sind?
- 4.) Bestehen möglicherweise Gemeinsamkeiten in der Fehlregulation des P53-Signalwegs zwischen B-Zell-NHL und cHL?

Hierfür wurden verschiedene cHL- und NHL-B-Zelllinien mit und ohne Bestrahlung auf Protein- (Westernblot) und RNA-Ebene (genomweite Genexpressionsanalyse) untersucht. Zusätzlich wurde die gesamte kodierende Region des *TP53*-Gens dieser Zelllinien sequenziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Für die Arbeit wurden verschiedene vom klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) abstammende Zelllinien und als Vergleichszelllinien verschiedene von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) abstammende Zelllinien verwendet. Sie sind in der folgenden Tabelle mit ihrer zellulären Herkunft und ihren Kulturbedingungen aufgeführt.

**Tabelle 1: Zelllinie, Zelltyp und Kulturbedingungen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft/Charakteristika/Kultivierung</b>
<b>L-428</b>	Hodgkin-Zelllinie vom <b>B-Zell-Typ</b> (cHL, nodulär sklerosierender Typ) Medium: 90% RPMI 1640, 10% FCS
<b>KM-H2</b>	Hodgkin-Zelllinie vom <b>B-Zell-Typ</b> (cHL, Mischtyp) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
<b>L-1236</b>	Hodgkin-Zelllinie vom <b>B-Zell-Typ</b> (cHL, Mischtyp) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
<b>EHEB</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (chronische lymphatische Leukämie) Medium: 90% RPMI, 20% FCS
<b>Mec-2</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (chronische lymphatische Leukämie) Medium: 90% RPMI, 20% FCS
<b>Daudi</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (Burkitt-Lymphom) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
<b>SU-DHL4</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (diffuses großzelliges <b>B-Zell</b> lymphom, Keimzentrums-Typ) Medium: 90% RPMI 1640, 10% FCS
<b>Ly-3</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (diffuses großzelliges <b>B-Zell</b> lymphom, aktivierter B-Zell-Typ) Medium: 80% DMEM, 20% Humanserum
<b>Ly-10</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (diffuses großzelliges <b>B-Zell</b> lymphom, aktivierter B-Zell-Typ) Medium: 80% DMEM, 20% Humanserum
<b>DOHH-2</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (follikuläres Lymphom) Medium: 90% RPMI, 10% FCS
<b>Granta-519</b>	<b>B-NHL-Zelllinie</b> (Mantelzelllymphom) Medium: 90% DMEM, 10% FCS

Quelle: © DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

## 2.1.2 Primer

**Tabelle 2: Primer**

Name	Sequenz 5` - 3`	Verwendungszweck
M13 Fwd (-20) (Invitrogen)	GTAAAACGACGGCCAG	Primer für den Vektor pCRII-TOPO
M13 Rev (Invitrogen)	CAGGAAACAGCTATGAC	Primer für den Vektor pCRII-TOPO
TP53 Fwd*	CCAGACTGCCTTCCGGGT (Basen 173-190 ; Exon 2)	<i>forward</i> Primer für Amplifikation der TP53-Sequenz
TP53 Rev*	TGCAAGCAAGGGTTCAAAGA (Basen 1474-1455; Exon 11)	<i>reverse</i> Primer für Amplifikation der TP53-Sequenz

## 2.1.3 Reagenzien

### 2.1.3.1 Geräte und Reagenzien für die Behandlung der Zelllinien

**Staurosporin** (Calbiochem)

**Linearbeschleuniger Clinac 600 CD** (Varian)

### 2.1.3.2 Reagenzien und Materialien für den Westernblot

**Tabelle 3: Antikörper zum Proteinnachweis**

Antikörper (Ak)	Verdünnung
Anti-TP53-Ak (Do7; Dako; Maus-Ak)	1 : 750
Anti-P21-Ak (Santa Cruz Biotechnology; Kaninchen-Ak)	1 : 400
Anti-Maus-HRP-Ak (Amersham Biotech)	1 : 10.000
Anti-Kaninchen-HRP-Ak (Amersham Biotech)	1 : 2000
Anti-Aktin Antikörper (Abcam; Maus-Ak)	1 : 40.000

**Elektrophoresepuffer (10x)**      52,3 g 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid (MOPS;  
(denaturierend)                      Sigma) (= M)  
30,3 g Tris Base (Roth)  
5 g Sodiumdodecylsulfate (= 69,3 mM) (SDS, Merck)  
1,5 g EDTA (Merck) (= 20,5 mM)  
mit Aqua dest. (Millipore) auf 500 ml auffüllen

Für die Elektrophoresekammer wird der Puffer als 1x Lösung verwendet.

<b>Probenpuffer (4x)</b> <b>(denaturierend, nicht reduzierend)</b>	Roti Load 2 (Roth) Proben 4:1 mit dem Puffer verdünnen
<b>SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard</b>	(Invitrogen)
<b>NuPage® Novex Bis-Tris Gel</b>	(Invitrogen)
<b>Transferpuffer (10x)</b>	30,3 g Tris-Base (0,25 M; Roth) 144,2 g Glycin (1,92 M; Roth) mit Aqua dest. (Millipore) auf 1000 ml auffüllen. Für das Blotting wird zur 1x Lösung 20% Methanol hinzugegeben. Dazu werden für eine Kammerfüllung zu 80 ml 10x Puffer 160 ml Methanol gegeben und auf 800 ml mit Aqua dest. (Millipore) aufgefüllt. Der pH-Wert sollte 8,3 betragen.
<b>PBS-T</b>	100 ml PBS (10x) Dulbeccos's w/o Ca, Mg (Gibco BRL) 0,1% Tween 20 (Serva) mit Aqua dest. (Millipore) auf 1000 ml auffüllen.
<b>Blockierungspuffer/ Verdünnungsmedium für Antikörper</b>	100 ml PBS-T 5% Magermilchpulver (Töpfer GmbH)
<b>Detektionsreagenzien</b>	ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)
<b>Blotting Membran</b>	Hybond P (Amersham Biosciences)
<b>2.1.3.3 Puffer</b>	
<b>TAE (50x):</b>	2 M Tris-Base (Roth) 0,05 M EDTA, pH 8,0 5,7% Eisessig (J.T. Baker)



**DNA Probenpuffer:** 900 µl Aqua dest.  
**(3x)** 500 µl 10x Orange G  
 100 µl 0,25x Xylencyanol FF

**Lysepuffer für Proteinlysate:** 10 ml Lysispuffer (5x passive lysis buffer; Promega)  
 40 ml MelliporeH<sub>2</sub>O  
 1 Tablette Proteaseinhibitor (complete, EDTA-free; Roche)

#### 2.1.3.4 Gele

**NuPage® Novex Bis-Tris Gel** (Invitrogen)

**Agarose-Gel (1,5 %):** 100 ml 1x TAE-Puffer  
 1,5 g Agarose (Sigma)

Die Suspension wird in der Mikrowelle erhitzt, bis sie einmal aufgeköcht ist.

#### 2.1.3.5 Reagenzien und Materialien für die Klonierung

**TOPO TA Cloning Kit** (Invitrogen)  
**Vektor (pCR4-TOPO)** (Invitrogen)  
**TOP10 Zellen (E.coli)** (Invitrogen)  
**SOC Medium** (Invitrogen)

**LB Agar:** 185 g Luria Agar (Gibco BRL)  
 mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Zum Gießen der Platten auf ca. 40°C abkühlen lassen und Antibiotikum zugeben (z.B. Ampicillin 100 µg/ml).

#### 2.1.3.6 RNA-Isolierung

**RNeasy Mini Kit** (Qiagen)

### 2.1.3.7 *Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)*

**OneStep RT-PCR Kit** (Qiagen)

### 2.1.3.8 *Reagenzien und Materialien für die Genexpressionsanalyse*

#### 2.1.3.8.1 *cDNA-Synthese*

GeneChip Expression 3`-Amplification Reagents

One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix)

#### 2.1.3.8.2 *In-vitro-Transkription*

GeneChip Expression 3`-Amplification Reagents for

IVT-Labeling Kit (Affymetrix)

#### 2.1.3.8.3 *cDNA-, cRNA-Aufreinigung und Fragmentierung*

GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen)

#### 2.1.3.8.4 *Hybridisierung*

GeneChip Eukaryotic Hybridisation Control Kit (Affymetrix)

Hering Sperm DNA (Promega Corporation)

acetyliertes bovines Serum-Album (50 mg/ml) (Invitrogen )

2x Hybridisierungspuffer siehe 1.1.3.8.6

DEPC-H<sub>2</sub>O (Ambion)

#### 2.1.3.8.5 *Färbereagenzien*

2x MES Färbe-Puffer siehe 1.1.3.8.6

Acetyliertes bovines Serum-Album (50 mg/ml) (Invitrogen)

Ziegen-IgG (Sigma-Aldrich)

Biotinylierter Anti-Streptavidin-Antikörper (Ziege) (Vector Laboratories)

Streptavidin-Phycoerythrin (Molecular Probes)

Aqua dest. (Gibco/Ambion)

**2.1.3.8.6 Puffer**

12x MES Stock-Puffer: MES-freies, saures  
Monohydrat  
MES-Natrium-Salz  
Aqua dest.

2x-Hybridisierungspuffer: 12x MES Stock  
5 M NaCl  
0,5 M EDTA  
10% Tween 20

Stringenter Waschpuffer (B): 12x MES Stock  
5 M NaCl  
10% Tween 20  
dest. H<sub>2</sub>O

Nicht stringenter Waschpuffer (A): 20x SSPE  
10% Tween 20  
dest. H<sub>2</sub>O

**2.1.3.8.7 Microarrays**

GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array (Affymetrix)

**2.1.3.8.8 Software**

GCOS (Affymetrix)

Partek Genomics Suite (Partek)

**2.1.3.8.9 Affymetrix-Gerätekomponenten**

Steuerungsrechner (Dell)

Hybridisierungssofen (Affymetrix)

Fluidics-Station (Affymetrix)

GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultur von humanen Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Heraeus). Je nach Zelllinie dienten Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 und Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) als Nährmedien (siehe 2.1.1). Zu diesen Grundmedien wurden je nach den Ansprüchen der Zelllinien 10-20% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, Biochrom oder Invitrogen) oder 20% Humanserum (PromoCell) zugegeben. Die Zellen wurden entsprechend dem Medienvolumen und der Zellzahl in Kulturgefäßen unterschiedlicher Größe inkubiert: 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen (EasY Flask, Nunc) für ein Volumen von 5-8 ml, für größere Zellmengen erfolgte die Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup>- (EasY Flask, Nunc) bzw. 185 cm<sup>2</sup>-Schräghalsflaschen (Nunclon Flask, Nunc), deren Deckel zum Gasaustausch leicht geöffnet wurden. Je nach Proliferation bzw. Stoffwechselaktivität wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche 1:3 geteilt (Zellzahl vor Teilung ca.  $5 \times 10^5$ /ml).

Zur Expansion von empfindlichen und langsam proliferierenden Zelllinien wurden die Zellen sedimentiert, vorsichtig verbrauchtes Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

### 2.2.2 Zellbestrahlung

Zur Induktion des P53-Signalwegs wurden die Zelllinien ionisierender Strahlung ausgesetzt. Dabei wurden die Zellen in 100 ml Medium mit dem Varian-Clinac-600-CD-Linearbeschleuniger mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt (6 MV Photonen;  $\pm 2\%$  Dosisinhomogenität im Bestrahlungsfeld).

Unmittelbar vor der Zellbestrahlung erfolgte außerdem die Zugabe von Staurosporin in die Zellkulturflaschen in der Konzentration von 0,1  $\mu$ M (61) (62). Staurosporin ist ein Alkaloid, das aus dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* gewonnen wird. Es hemmt viele Proteinkinasen, indem es die Bindung von ATP an die Kinasen verhindert. Frühere Experimente zeigten, dass Staurosporin in gesunden Zellen zu G1- und G2-Arrest führt sowie in malignen Zellen den G2-Arrest hervorruft oder aber die Apoptose induziert. In TP53-defekten Zellen wird der strahleninduzierte G2-Arrest durch Staurosporin überwunden, während TP53-intakte Zellen gegenüber diesem Effekt resistent sind (63) (64). Weiterhin ist Staurosporin ein potenter Strahlensensitizer (65).

### **2.2.3 Zellyse und Bestimmung der Zellzahl**

Um alle Zellen im Zustand der exponentiellen Wachstumsphase zu ernten, wurden die Zellen einen Tag vor ihrer Verwendung nochmals geteilt bzw. mit frischem Medium versorgt. Zum Ernten der Zellen wurde der Inhalt der Zellkulturflaschen bei 1200 U/min zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet in PBS gewaschen und anschließend die Zellzahl der geernteten Zellen bestimmt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Trypanblau und PBS zu gleichen Teilen angefärbt und konnten dann in einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden. Die Zellzahl der geernteten Zellen erhielt man unter Verwendung folgender Formel:

Zellzahl = gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor ( $= 10^4$ ) x Verdünnungsvolumen.

Auf  $1 \times 10^7$  Zellen wurde 1 ml Lysepuffer (Promega; siehe 2.1.3.3) gegeben, welcher dann 15 min bei Raumtemperatur einwirkte. Ab und an wurde dabei das Lysat durch eine dünne Kanüle hin und her gezogen, um durch die Scherkräfte die Zerstörung der Zellmembranen zu unterstützen. Nach anschließender Zentrifugation bei 5.000 g für 5 min wurde der Überstand, mit den darin enthaltenen gelösten Proteinen, bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.4 Bradford-Assay**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Zelllysaten wurde der Standardassay von Bradford angewandt (66). Hierbei führen verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung von Proteinen an einen Farbstoff zu proportionalen Farbveränderungen. Der eingesetzte Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 hat in seiner an Protein gebundenen Form ein Absorptionsmaximum bei 595 nm.

Um anhand der gemessenen Absorptionswerte die Proteinmenge zu ermitteln, wurde zum Vergleich eine Eichgerade mit BSA (Bovine Serum Albumin) erstellt. Dazu wurde aus einer 10 mg/ml-Stammlösung BSA in dem Lysepuffer (Promega; siehe 2.1.3.3), in dem auch die Proben vorlagen, durch Verdünnung eine BSA-Konzentrationsreihe von 0,05-1 mg/ml hergestellt. Diese diente als Standard, als Nullwert diente der Puffer. Sowohl für die Eichkurve als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Eine fertige Stammlösung Bradfordreagenz (BioRad) bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure, wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Je 10  $\mu\text{l}$  Puffer, Probe (einfach und verdünnt 1:10, 1:20, 1:50) oder Standard wurden in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit je 200  $\mu\text{l}$  verdünntem Bradfordreagenz versetzt. Die Ansätze wurden kurz mit dem Vortexer (Scientific Industries) gemischt, zwei

Sekunden zentrifugiert und dann luftblasenfrei in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (NUNC) mit planarem Boden überführt. Damit der Farbstoff mit den Proteinen einen Komplex bilden konnte, stand die Platte ca. 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde in einem ELISA Reader (MRX, Dynex Technologies) bei 595 nm die optische Dichte (OD) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardreihe ermittelt (Revelation Software von Dynatec Corporation).

### **2.2.5 Westernblot**

Der Westernblot (syn. Immunoblot) dient dem Nachweis eines spezifischen Proteins (Antigen) in Proteingemischen mit einem spezifischen Antikörper. Dabei werden die einzelnen Komponenten des Proteingemisches elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran transferiert, dadurch immobilisiert und dort einer Nachweisreaktion unterzogen.

#### *2.2.5.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen*

Vor dem eigentlichen Westernblot wird das Proteingemisch entsprechend der Größe der Proteine in einer Gelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Auftrennung wurde die diskontinuierliche SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Laemmli angewandt (67). Durch den Zusatz des anionischen SDS zum Probenpuffer werden aufgrund seiner denaturierenden Wirkung Konformationsunterschiede zwischen den Proteinen aufgehoben. Zudem überdeckt SDS die Eigenladung von Proteinen, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen und alle Proteine eine negative Nettoladung erhalten. In eine Elektrophoresekammer (X Cell Sure Lock TM, Invitrogen Novex Mini Cell) wurden 4-12% NuPage Bis-Tris Gele (Invitrogen) eingespannt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Dabei war zu beachten, dass sich keine Luftblasen unten am Gel befanden. Vor dem Beladen der Gele mit den Proben wurden die einzelnen Geltaschen mit Hilfe einer Hamilton-Spritze mit Elektrophoresepuffer ausgespült.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:4 mit einem nicht reduzierenden Probenpuffer (Roti Load 2; Roth) versetzt, anschließend 5 min bei 95°C denaturiert (im Eppendorf Thermomixer 5436) und dann mit der Hamilton-Spritze in die Geltaschen der Gele pipettiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten (siehe 2.2.4.) wurden von diesen jeweils 25 µg als Proteinprobe eingesetzt. Zusätzlich zu den Proben wurde in eine Geltasche 10 µl eines geeigneten Größenstandards (See Blue Plus2; Invitrogen) gegeben. Der

Größenmarker besteht aus Proteinen bekannter Größe und ermöglicht dadurch die Abschätzung der Größe von Proteinen in den Proben.

Für die Elektrophorese (Power Supply ST 606 T, Gibco BRL) wurde eine Spannung von 200 V angelegt, die eine Wanderung der negativ geladenen Proteinproben durch die Gelmatrix bewirkt. Das Gel funktionierte dabei wie ein Sieb, größere Proteine wurden eher zurückgehalten und wanderten dadurch langsamer durch das Gel, so dass die Proteine der Größe nach sortiert wurden. Der im Probenpuffer enthaltene Farbstoffmarker Bromphenolblau diente als Indikator für die Lauffront des Puffers. Hatte der Probenpuffer den unteren Gelrand erreicht, wurde die Elektrophorese beendet. Da während der Elektrophorese Wärme entsteht, befand sich die Elektrophoresekammer in einem Eisbad.

### 2.2.5.2 *Immunoblot*

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran. Auf diese Weise werden die Proteine dem Antikörper-Nachweis zugänglich gemacht.

Die Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membran (Hybond-P, Amersham Bioscience) und Whatman-Filterpapier wurden auf Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde zehn Sekunden in Methanol aktiviert, kurz in Millipore H<sub>2</sub>O und für mindestens fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden in einem Bloteinsatz zwei Schwammstücke, zwei Filterpapiere, Gel, Membran, zwei Filterpapiere, zwei Schwammstücke sandwichartig geschichtet. Dieser wurde dann in einer Mini-V8-Elektrophoresekammer (Gibco BRL) fixiert und in die Kammer eingesetzt. In den Bloteinsatz wurde Transferpuffer und in die Kammer um den Bloteinsatz herum destilliertes Wasser zur Kühlung gefüllt. Durch einen senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Stromkreis erfolgte der Transfer der Proteine auf die Membran. Der Transfer fand bei 200 mA für 1,5 h im Eisbad statt (ST 606 T, Gibco BRL). Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen hafteten die Proteine an der Membranoberfläche, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten blieb.

### 2.2.5.3 *Blocken*

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran mussten zuerst die freien Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungspuffer abgesättigt werden, um eine unspezifische Interaktion der zur Detektion verwendeten Antikörper mit diesen Bindungsstellen zu vermeiden. Als

Blockierungspuffer diente eine Lösung von Milchpulver (siehe 2.1.3.2), in der die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Victor Recker Berlin<sup>36</sup>) inkubierte.

#### 2.2.5.4 Immunodetektion

Nach der Blockierung der potenziellen unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern bei 4°C über Nacht. Die primären Antikörper richten sich gegen das TP53-Protein (Do7; Dako; Verdünnung 1:750) bzw. gegen das P21-Protein (Santa Cruz Biotechnology; Verdünnung 1:400). Die verwendeten Antikörper wurden in Blockierungspuffer verdünnt. Anschließend wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten mit PBS-T (siehe 2.1.3.2) gewaschen. Die Waschschrte entfernten schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran. Danach wurden die Membranen mit den entsprechenden sekundären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Anti-Maus-HRP Antikörper; Amersham Biotech, Verdünnung 1:10.000) (Anti-Kaninchen-HRP Antikörper; Amersham Biotech, Verdünnung 1:2.000) (siehe Tabelle 3). Die sekundären Antikörper sind spezifisch gegen bestimmte Bereiche der primären Antikörper gerichtet und binden an diese. Abschließend wurden die Membranen erneut dreimal für zehn Minuten in PBS-T gewaschen.

#### 2.2.5.5 Detektion

Der sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt. Diese HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann.

Die Detektion der Banden über die Chemolumineszenzreaktion erfolgte mit den ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Die entsprechenden Signale waren nach Exposition der Membranen für 30 Sekunden bis einige Minuten mit dem HyperFilm<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences) auf diesem sichtbar.

#### 2.2.5.6 Aktin-Kontrolle

Zur Kontrolle, ob von jeder Probe die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde und somit ein relativer quantitativer Vergleich der jeweiligen Bandenstärken möglich ist, wurden alle Westernblot-Membranen einem Stripping-Protokoll unterzogen. Dabei bewirkt der Stripping-



Puffer die Denaturierung der gebundenen Antikörper und führt damit zur Aufhebung der Bindung von Primär- und Sekundärantikörpern. Nach dem Stripping kann die Membran somit einer erneuten Detektion mit Antikörpern, in diesem Fall mit einem Anti-Aktin-Antikörper, unterzogen werden (68) (69). Dazu wurden die Westernblot-Membranen nach der Detektion für 30 min bei 37°C rotierend (Biometra) in Restore Western Blot Stripping Puffer (Pierce) inkubiert. Anschließend konnten die Membranen für weitere Proteinnachweise genutzt werden und wurden, wie oben beschrieben, erneut dreimal für zehn Minuten in PBS-T gewaschen, eine Stunde in Blockierungspuffer und dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem Aktin-Antikörper (Beta-Aktin; 42 kd; Abcam; Verdünnung 1:40.000) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte, die Inkubation mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper, wieder drei Waschschrte und die Detektion der Banden über die Chemolumineszenzreaktion mit den ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences). Alle Banden sollten bei 42 kd liegen und die gleiche Stärke aufweisen.

### **2.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde mit Hilfe des RNeasy RNA-Isolations-Kits (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers gewonnen. Als Ausgangsmaterial dienten  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen pro Zelllinie. Das Zellpellet wurde direkt im RLT-Lysepuffer des Kits gelöst. Für die Homogenisierung des Lysats und Erzielung einer möglichst hohen RNA-Ausbeute wurden QIAshredder (Qiagen) eingesetzt. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden während der Versuchsdurchführung Handschuhe getragen, der Arbeitsplatz und alle verwendeten Geräte mit RNase Zap (AMBION) dekontaminiert und nur RNase-freie Gefäße verwendet. Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde nach der Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.7) bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren (Nanodrop)**

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde photometrisch mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (220-750nm) (Hewlett Packard) bestimmt. Mit diesem Gerät war es möglich, mit einem Einsatz von 1 µl der Probe die Konzentration ohne Küvette zu bestimmen. Es wurde 1 µl RNA-Probe auf das untere Messpiedestal und damit auf das Ende eines Lichtwellenleiters pipettiert und das obere Messpiedestal heruntergeklappt, wodurch ein zweiter Lichtwellenleiter mit der Probe in Kontakt gebracht wurde. Gemessen wurde die Absorption bei 260 nm. Eine

optische Dichte von 1 ( $OD_{260nm}$ ) entspricht dabei 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Zur Beurteilung der Reinheit der Nukleinsäurepräparationen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen und sollte ungefähr bei 2 liegen (bzw.  $> 1,6$ ).

### **2.2.8 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von TP53**

Bei einer RT-PCR wird mRNA durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach der Umschreibung folgt die PCR zur Amplifizierung der cDNA. Sowohl für den RT-Schritt als auch für die anschließende PCR wurde der Thermocycler TC9700 (Applied Biosystems) verwendet. Die RT-PCR wurde zum Nachweis des gesamten kodierenden TP53-RNA-Transkripts der verwendeten Zelllinien und anschließender Analyse auf Punktmutationen mittels Sequenzierung durchgeführt. Es wurden die Primer TP53-Fwd. (Basen 173-190; Exon 2) und TP53-Rev. (Basen 1474-1455; Exon 11) (siehe 2.1.2) eingesetzt. Die Entwicklung der Primer erfolgte nach Sequenzsuche des TP53-Gens bei Pubmed Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) unter Verwendung des HUSAR-Programmes. Die RT-PCR wurde unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) wie folgt durchgeführt: Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (siehe 2.2.7) wurden die RNA-Proben jeder Zelllinie auf eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$  verdünnt und je 5  $\mu\text{l}$  ( $\triangleq$  1  $\mu\text{g}$ ) Gesamt-RNA zu 45  $\mu\text{l}$  Mastermix (siehe Tabelle 4) pipettiert.

**Tabelle 4: Reagenzien für die RT-PCR**

<b>Reagenzien für Mastermix</b>	<b>Volumen</b>
5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	10 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (10mM)	2 $\mu\text{l}$
TP53-Primer for.	3 $\mu\text{l}$
TP53-Primer rev.	3 $\mu\text{l}$
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix	2 $\mu\text{l}$
RNase Inhibitor (20U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$ ( $\triangleq$ 10 Units)
RNase-freies H <sub>2</sub> O	24,5 $\mu\text{l}$
<b>Mastermix-Volumen</b>	<b>45 <math>\mu\text{l}</math></b>
Template RNA (1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ )	5 $\mu\text{l}$
<b>Endvolumen</b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>

Der RT-Schritt zur Umschreibung der mRNA und die anschließende PCR wurden mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) in einem Schritt nach dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt. Dabei sollten die PCR-Proben so lange auf Eis gestellt bleiben, bis der Thermocycler die Ausgangstemperatur von 50°C erreicht hat, erst dann wurden sie im Thermocycler platziert.

<b>Reverse Transkription</b>	30 min	50°C
<b>Initialer PCR-Aktivierungsschritt</b> (Deaktivierung der Reversen Transkriptase)	15 min	95°C
<b>Amplifikationszyklus</b>		
Denaturierung	0,5 min	95°C
Primeranlagerung	0,5 min	54°C
Synthese	1 min	68°C
	<b>40x</b>	
<b>Abschließende Synthese</b>	8 min	68°C
	∞	4°C

### 2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Größere PCR-Produkte (> 400 bp) werden in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentlänge elektrophoretisch in 0,8-2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Da die erwarteten TP53-PCR-Produkte eine Größe von ca. 1.200 bp haben, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung durch 1,5%ige Agarosegele. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst, auf 60°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (5 µl Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml)) versetzt und anschließend in einen Gelschlitten von gewünschter Größe gegossen. Zur Erzeugung der Probenaschen wurde ein geeigneter Kamm eingesteckt, der nach dem Erstarren der Agarose entfernt und das Gel mit dem Schlitten in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt wurde. Die mit Ladepuffer versetzten Proben und ein DNA Größenstandard (1 µg der 1 kb DNA Leiter, GIBCO BRL) wurden in die Taschen des Gels pipettiert und bei einer Spannung von 100 V für ca. 45 min aufgetrennt (Power Supply ST 606 T, GIBCO BRL). Während des Arbeitens mit Ethidiumbromid wurden zum Schutz vor seiner potenziell mutagenen Wirkung nitrilhaltige Handschuhe getragen.

### **2.2.10 Ethidiumbromidfärbung**

Mit Hilfe des Farbstoffes Ethidiumbromid, der sich zwischen die Basenpaare der doppelsträngigen DNA einlagert und unter UV-Licht orange fluoresziert, können die DNA-Moleküle in einem Gel sichtbar gemacht werden. Da die Agarosegele bereits Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) enthielten, konnten sie nach der Elektrophorese direkt unter UV-Licht (Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000, BioRad) betrachtet und fotografiert werden.

### **2.2.11 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Bei der *TP53*-PCR zeigten sich einige schwächere unspezifische Banden, es entstanden also mehrere PCR-Produkte. Deshalb wurde die entsprechende Bande, die bei der *TP53*-Größe von ca. 1.200 bp lag, nach der Auftrennung des PCR-Produkts aus einem Ethidiumbromid-Agarosegel mit einem sterilen Einmalskalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (250) (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Um möglichst viel des gewünschten *TP53*-PCR-Produktes bei der Aufreinigung aus dem Gel zu gewinnen, wurden größere Gele mit größeren Geltaschen gegossen und das ganze PCR-Produkt wurde zur Auftrennung hineinpipettiert.

Da UV-Licht Strangbrüche der DNA verursachen kann, wurde außerdem auch das ganze PCR-Produkt unmittelbar für die Klonierung für die gegebenenfalls anschließende Sequenzierung verwendet. Dazu wurde das PCR-Produkt direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **2.2.12 Klonierung**

#### *2.2.12.1 Ligation*

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Er wurde speziell entwickelt, um Taq-Polymerase-generierte PCR-Produkte für eine Sequenzierung zu klonieren. Taq-Polymerasen haben die Eigenschaft, ein einzelnes, überhängendes Desoxyadenosin an die 3`-Enden der PCR-Produkte zu synthetisieren. Der Plasmid-Vektor (pCR4-TOPO; Invitrogen) liegt linearisiert vor und besitzt einzelne Desoxythymidin-(T)-Überhänge an den 3`-Enden sowie eine an den Vektor kovalent gebundene Topoisomerase I. Dadurch kann das PCR-Insert effizient mit dem Vektor ligieren.

Gibt man nun den Vektor mit einem PCR-Produkt zusammen, werden die komplementären Enden durch die Ligase-Eigenschaften der Topoisomerase miteinander verbunden. Die Ligation des PCR-Produktes führt zu einer Unterbrechung des im Vektor enthaltenen *E. coli*-Todesgens *ccdB*, so dass später nur diejenigen Zellen selektiv wachsen werden, die den Vektor mit PCR-Insert in sich tragen. Ein Blau-Weiß-Screening zur Prüfung auf eine erfolgreiche Ligation ist somit nicht erforderlich. Für die Ligation wurden 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung (NaCl, MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl TOPO-Vektor für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit der Transformation fortgefahren oder die Reaktion bei -20°C über Nacht gelagert.

### 2.2.12.2 3'-A-Überhang

Da die Ligation bei aus Agarosegel isolierten PCR-Produkten oft schwierig ist, ist es hilfreich, vor der Ligation an die PCR-Produkte einen 3'-A-Überhang anzufügen. Dazu wird das aus dem Gel aufgereinigte PCR-Produkt mit einer Taq-Polymerase für 10 min bei 72°C inkubiert (TOPO TA for Sequencing; Invitrogen). Dies erfolgte in einem 30 µl-Ansatz, bestehend aus 20 µl PCR-Produkt, 3 µl 10x Puffer, 0,5 µl Ampli Taq Gold, 0,5 µl dATP, 3 µl MgCl<sub>2</sub> und 3 µl H<sub>2</sub>O.

### 2.2.12.3 Transformation

Bei dieser Methode werden kompetente Bakterienzellen (*E. coli*; TOP10-Zellen; Invitrogen) einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt, wodurch die Zellmembran vorübergehend durchlässig für DNA-Moleküle wird. Die TOP10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl DNA der Ligation versetzt, vorsichtig mit der Pipettenspitze umgerührt und dann 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 sec bei 42°C in einem Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder auf Eis überführt. Anschließend wurde zu den Zellen 250 µl SOC-Medium unter einer Sterilbank gegeben und 1 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Selektion wurden im Anschluss 10-100 µl der Bakteriensuspension auf vorgewärmte, mit Ampicillin versetzte LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Nur Zellen, die das Antibiotikaresistenzgen tragende Plasmid aufgenommen hatten, konnten selektiv auf den Ampicillin-LB-Agarplatten wachsen. Es wurden verschiedene Volumina der Bakteriensuspension ausplattiert, um eine optimale Dichte des Koloniewachstums zu gewährleisten.

#### 2.2.12.4 Kolonie-PCR

Zur Analyse der klonierten DNA-Fragmente sowie zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern M-13(-20)FOR und M13-REV durchgeführt. Dazu wurden von jeder Agar-Platte Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und mehrmals kurz in fertige PCR-Ansätze von 50 µl eingetaucht.

**Tabelle 5: PCR-Ansatz (50 µl)**

Reagenzien	Volumen
PCR-Puffer (10x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	6 µl
dNTP Mix (10mM)	1 µl
M13(-20)FOR	2 µl
M13-REV	2 µl
Taq-DNA-Polymerase (1U/µl)	0,3 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	33,7 µl
<b>Endvolumen:</b>	<b>50 µl</b>

Die PCR lief nach folgenden Bedingungen im Thermocycler ab:

<b>Initialer PCR-Aktivierungsschritt</b> (Zelllyse und Inaktivierung der Nukleasen)	10 min	95°C
<b>Amplifikationszyklus</b>		
Denaturierung	45 sek	95°C
Primeranlagerung	45 sek	55°C
Synthese	1,5 min	72°C
	<b>25x</b>	
<b>Abschließende Synthese</b>	10 min	72°C
	∞	4°C

Nach Beendigung der PCR wurden 6 µl des Ansatzes zur Überprüfung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. War ein PCR-Produkt der richtigen Größe vorhanden, wurde es aus dem restlichen PCR-Ansatz aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit) und für die Sequenzierung vorbereitet.

### **2.2.13 Sequenzierung**

Die Sequenzreaktion basiert auf einem modifizierten Verfahren der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (70). Für die Sequenzierung wurden einerseits die Klonierungsprodukte aller verwendeten Zelllinien eingesetzt sowie andererseits die direkt aus dem Gel aufgereinigten *TP53*-PCR-Produkte derselben Zelllinien. Zur Sequenzierung von direkten PCR-Produkten wurden die jeweiligen *TP53*-Reamplifikationsprimer (20 pmol) und zur Analyse der klonierten DNA-Fragmente entsprechende M13-Vektorprimer (20 pmol) eingesetzt. Als Ausgangsmaterial dienten 15 ng/100 bp PCR-Produkt bzw. 0,8 µg Plasmid-DNA. Zuerst wurde die Nukleinsäurekonzentration der für die Sequenzierung bestimmten Proben im Nanodrop bestimmt (siehe 2.2.7) und dann so verdünnt, dass die angegebenen Mengen in 8 µl für die Proben und in 2 µl für die Primer vorlagen. Das Endvolumen in jedem Sequenzierungsansatz sollte 10 µl betragen. Für jede Probe wurden Doppelansätze hergestellt, die jeweils entweder den *reverse* Primer oder den entsprechenden *forward* Primer enthielten. Zur Sequenzierung wurden die Proben an die Firma Microsynth verschickt.

### **2.2.14 Sequenzauswertung**

Die Elektropherogramme konnten mit Hilfe des frei zugänglichen Programms Chromas geöffnet, die Sequenzen grafisch dargestellt und bearbeitet werden. Soweit möglich wurde eine Konsensussequenz erstellt, die für die weitere Auswertung verwendet wurde. Die Erstellung dieser Sequenz erfolgte durch Aneinanderlegen der erhaltenen Sequenzen aus den Sequenzierungsansätzen der *forward* Primer und der *reverse* Primer, bis die Sequenz des gesamten Gens dargestellt werden konnte. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit vorhandenen Datenbanksequenzen (GenBank) verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>). BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)) ist ein Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten, eingesetzt zum Vergleich der experimentell ermittelten Nukleotidsequenzen mit bereits in einer Datenbank vorhandenen Nukleotidsequenzen (BLASTN). So wurden die erhaltenen *TP53*-Sequenzen der analysierten Zelllinien mit der *TP53*-Wildtyp-Gensequenz des Homo sapiens tumor protein TP53 (Li-Fraumeni syndrome; Accession-Nr. NM\_000546.4) verglichen und auf das Vorhandensein von Punktmutationen und weiteren Abweichungen vom Wildtyp untersucht.

### **2.2.15 Qualitätsanalyse der Gesamt-RNA im Bioanalyzer**

Vor der Qualitätsbestimmung wurde die Messung der RNA-Konzentration am Nanodrop (siehe 2.2.7) mit anschließender Verdünnung der RNA auf 200-300 ng/µl unternommen. Die Qualitätsanalyse der aufgereinigten RNA erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6000 Nano LabChip® Kits (Agilent Technologies). Das Verfahren basiert auf dem Prinzip der kapillarelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren und der Detektion des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Nano Green über einen Laser. Die hierfür erforderlichen elektrokinetischen Kräfte wurden von Pin-Elektroden aufgebaut.

Nach Angaben des Herstellers wurde der RNA-Nano-Chip mit einem Fluoreszenzfarbstoff-Gel-Gemisch beladen sowie mit je 1 µl der RNA-Proben und 1 µl eines Größenstandards (Leiter) in die entsprechenden Reservoirs (Wells) auf dem Chip. RNA-Proben und Leiter wurden zuvor 2 min bei 70°C denaturiert. Die Probenreservoirs sind durch Kapillaren verbunden, durch die sich die Proben durch elektrokinetische Kräfte kontrolliert bewegen und in ihre Probenbestandteile für die nachfolgende Detektion aufgetrennt werden.

Eine gute RNA-Qualität stellt sich im Elektropherogramm in Form von zwei sauber voneinander abgrenzbaren Spitzen (Peaks) dar, die der ribosomalen 18S-RNA und 28S-RNA entsprechen. Die Qualität der RNA wird durch die Peak-Flächenratio von 28S/18S RNA-Peaks bestimmt und sollte für qualitativ hochwertige RNA ungefähr bei 2 liegen. Minderwertige RNA-Qualität, d.h. degradierte Gesamt-RNA durch potenziell vorhandene RNasen zeigt sich durch Anwesenheit von kleineren Fragmenten, in Form von zusätzlichen kleineren Peaks sowie einem verminderten Fluoreszenzsignal der ribosomalen Peaks. Die mRNA macht nur einen sehr kleinen Teil der Gesamt-RNA aus und ihr Signal im Bioanalyzer wird durch das Signal der ribosomalen RNA überlagert, so dass sie nicht direkt beurteilt werden kann. Die Qualität der ribosomalen RNA ist jedoch ein gutes Maß für die Qualität der mRNA.

### **2.2.16 Genexpressionsanalyse (GeneChip Array)**

Die GeneChip-Technologie ermöglicht die Analyse der Expressionsstärke von tausenden von Genen gleichzeitig. Somit lassen sich Genexpressionsanalysen nahezu transkriptomweit durchführen. Als Gen versteht man in diesem Zusammenhang das fertig gespleißte mRNA-Transkript ohne Intron- und Promotorsequenzen und andere regulatorische Einheiten der DNA.



Neben den gut annotierten Genen umfasst der GeneChip auch sogenannte ESTs (expressed sequence tags). EST sind kurze cDNA-Sequenzen von Transkripten, denen noch keine genaue Funktion, d.h. kein Protein zugeordnet werden konnte.

Es gibt zwei Haupttypen von DNA-Microarrays, die cDNA-Microarrays und die Oligonukleotid-Microarrays. In dieser Arbeit wurden Letztere, die hochdichten Oligonukleotid-Microarrays (synonym GeneChip, Microarray) der Firma Affymetrix verwendet. Bei der Affymetrix-Technologie wird pro Microarray nur eine Probe (Target) hybridisiert, d.h. für die Kontrolle und die experimentelle RNA wird jeweils ein GeneChip hybridisiert. Durch ein besonderes Herstellungsverfahren der Affymetrix GeneChip-Technologie, welche Ende der 80er Jahre von S. Fodor entwickelt wurde, wird die enorm hohe Sondendichte erreicht (71). Das Verfahren besteht aus einer Kombination von Nukleotidsynthese und Photolithographie, bei der 25-mer-Oligonukleotide definierter Sequenz schrittweise, Base für Base, an genau definierten Positionen direkt auf dem Microarray synthetisiert werden (72). Auf diese Weise werden auf der GeneChip-Matrix, einem Glasträger, der in winzige Zellen, sogenannte Sondenzellen oder *Probe Cells*, unterteilt ist, 500.000 unterschiedliche Sequenzen (Oligonukleotide) immobilisiert, mit einer Kopienzahl von jeweils  $10^6$ - $10^7$ . So enthält jede dieser Zellen mehrere Millionen identische Oligonukleotide, die als Sonden fungieren und zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren dienen.

Da solch kurze Sequenzen von 25 Basen allein selten hochspezifisch für ein bestimmtes Gen sind, werden pro Transkript 11 unterschiedliche 25-mer-Oligonukleotide verwendet, die aus verschiedenen Bereichen der Zielsequenz abgeleitet sind. Diese 11 verschiedenen Sonden bzw. Sondenpaare pro Gen nennt man *Probe Set*. Ein *Probe Set* ist hochspezifisch für ein Gen/Transkript.

Für jede Sondenzelle gibt es eine Partner-Sondenzelle, zusammen bilden sie ein Sondenpaar. Ein Sondenpaar besteht aus einer *Perfect Match*-Zelle (PM) und einer *Mismatch*-Zelle (MM). Die Oligonukleotide der *Perfect Match*-Zelle entsprechen gänzlich der abgeleiteten Sequenz. Die Oligonukleotidsequenz der *Mismatch*-Zelle ist mit der der *Perfect Match*-Zelle bis auf ein Nukleotid in der Mitte identisch. Sie tragen eine Austauschbase an Position 13, die zu einer nicht optimalen Hybridisierung führt. Dies dient der Kontrolle auf nicht spezifische Bindungen.

Die Differenz aus der PM- und der MM-Intensität ist ein Signifikanzmaß für die Hybridisierungsspezifität jedes einzelnen Oligonukleotidpaares. Je nach Signifikanz werden die Oligonukleotidpaare in der Berechnung des Signalwertes gewichtet.

Das Prinzip der Oligonukleotid-Microarrays beruht auf einer Umkehrung der Northernblot-Technik und besteht in der Hybridisierung des fluoreszenzmarkierten cRNA-Targets (Proben-

RNA) mit den Oligonukleotidsonden. Je stärker die Expression eines Gens in der Zelle ist, um so größer ist die Menge an markierter Proben-RNA, die an die Oligonukleotidsonden binden kann und um so stärker ist das zu detektierende Fluoreszenzsignal. Damit lässt sich die Expression von Genen relativ quantifizieren. Voraussetzung für die Quantifizierung ist die Linearität in der Herstellung und Amplifikation der markierten cRNA aus der totalen RNA der Zellen. Während Erst- und Zweitstrangsynthese eine 1:1-Umschreibung darstellen, ist die *in vitro*-Transkription ein linearer Amplifikationsschritt (73).

#### 2.2.16.1 *GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array*

Alle Genexpressionsanalysen wurden mit dem GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array (Affymetrix) durchgeführt. Mit diesem Microarray werden über 18.000 Transkripte und Varianten erfasst, welche 14.500 der am besten charakterisierten menschlichen Gene repräsentieren. Die Sequenzen dieses Arrays entstammen der UniGene-DataBase (Built 133, 20.04.2001), abgeglichen mit weiteren Datenbanken wie Washington University EST Trace Repository und University of California, Santa Cruz Golden Path Human Genome Data Base.

#### 2.2.16.2 *Herstellung Biotin-markierter Proben für die Affymetrix-Chip-Hybridisierung*

Es wurde die RNA ausgewählter Zelllinien gewonnen (siehe 2.2.6), die RNA-Konzentration bestimmt (siehe 2.2.7) und ihre Qualität bestimmt (siehe 2.2.15). Für die Synthese doppelsträngiger cDNA wurden 3 µg totale RNA eingesetzt.

##### 2.2.16.2.1 *Erststrangsynthese der cDNA*

Die in der Gesamt-RNA enthaltene Protein-kodierende mRNA wird mit Hilfe eines T7-Oligo(dt)-Primers und des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Als Ausgangsmaterial wurden 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur Erststrangsynthese wurde das GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Primer-Hybridisierung wurde 1 µl des T7-Oligo-(dt)<sub>24</sub>-Primers (50 µM; Sequenz: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)<sub>24</sub>-3') zu den 3 µg Proben-RNA gegeben, mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt, 10 min bei 70°C inkubiert

und anschließend auf Eis gestellt. Währenddessen wurde der FirstStrand Master Mix angesetzt, bestehend aus 4 µl 5x FirstStrandMasterMix, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP (10 mM). Dieser wurde dann 2 min bei 42°C mit der Primer-hybridisierten RNA inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Reverse Transkriptase Superscript II hinzupipettiert und der Ansatz 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Es entstand ein RNA-DNA-Hybrid. Alle Inkubationen wurden im Thermocycler durchgeführt.

#### **2.2.16.2.2 Zweitstrangsynthese**

Bei der Zweitstrangsynthese entsteht aus dem RNA-DNA-Hybrid durch Abbau des RNA-Strangs und Synthese des zweiten cDNA-Strangs die doppelsträngige cDNA. Dies geschieht, indem die RNase H kleine Strangbrüche in die RNA einfügt, in die sich die DNA-Polymerase I einlagern kann und mit ihrer 5`-3`-Polymerase- und 3`-5`-Exonukleaseaktivität den RNA-Strang ersetzen kann. Mit den Reagenzien des cDNA-Synthese Kits wurde folgender Ansatz hergestellt: 91 µl RNase-freies Wasser, 30 µl 5x Second Strand Reaction Mix, 3 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl *E.coli*-DNA-Ligase (10 U/µl), 4 µl DNA-Polymerase I (10 U/µL) und 1 µl RNase H (2 U/µl). Dieser Ansatz wurde zum Ansatz der Erststrangsynthese hinzugegeben und 2 Stunden bei 16°C im Thermocycler inkubiert. Um sicherzustellen, dass der zweite cDNA-Strang auch die ganze T7-Promotorsequenz enthält, wurden anschließend 2 µl T4-DNA-Polymerase zu jeder Probe pipettiert und für weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA zu jeder Probe gestoppt.

#### **2.2.16.2.3 Aufreinigung der Doppelstrang-cDNA**

Die Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA erfolgte unter Verwendung des GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers. Die aufgereinigte cDNA konnte bei -20 °C zwischengelagert werden oder wurde der *in vitro*-Transkription zugeführt.

#### **2.2.16.2.4 In-vitro-Transkription (IVT)**

In der *in-vitro*-Transkription wird die doppelsträngige cDNA mit Biotin-markierten Nukleotiden unter ca. 300-facher linearer Amplifikation in biotinylierte cRNA umgeschrieben. Es wurden die Reagenzien des IVT-Labeling Kits (Qiagen) verwendet. Der Reaktionsansatz besteht aus 12 µl Template cDNA und 28 µl Mastermix, welcher sich zusammensetzt aus 4 µl IVT Labeling

Buffer, 12 µl Labeling NTP Mix, 4 µl Labeling Enzyme Mix und 8 µl RNase-freies Wasser. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz anzentrifugiert und dann 16 h bei 37°C im Thermocycler inkubiert.

#### **2.2.16.2.5 Aufreinigung der Biotin-gelabelten cRNA**

Die Aufreinigung der Biotin-gelabelten cRNA erfolgte ebenfalls unter Verwendung des GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers. Es folgte die photometrische Quantifizierung der cRNA mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (siehe 2.2.7) mit anschließender Qualitätskontrolle im Agilent 2100 Bioanalyser (siehe 2.2.15).

#### **2.2.16.2.6 Fragmentierung der cRNA**

Bevor die markierte cRNA mit den Oligonukleotiden auf die Chips hybridisiert werden kann, muss sie fragmentiert werden, da für eine bestmögliche Hybridisierung RNA-Fragmente einer Länge von 35-200 Basenpaaren erforderlich sind. Zur Fragmentierung wurden 8 µl 5x Fragmentierungspuffer (GeneChip Sample Cleanup Module (Qiagen)) und 20 µg cRNA pipettiert. Es wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 40 µl aufgefüllt, so dass die cRNA-Konzentration im Fragmentierungsansatz 0,5 µg/µl betrug. Gegebenenfalls war es nötig, die cRNA vorher mit Rnase-freiem Wasser entsprechend zu verdünnen. Der Fragmentierungsansatz wurde 35 min bei 94°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die fragmentierte cRNA erneut der Qualitätsanalyse im Agilent 2100 Bioanalyser unterzogen, um den Fragmentierungserfolg zu kontrollieren (siehe 2.2.15).

#### **2.2.16.3 Hybridisierung**

Für die Hybridisierung wurden 200 µl Hybridisierungscocktail hergestellt, bestehend aus 180 µl Mastermix zu dem 20 µl der cRNA gegeben wurden. Zur Herstellung des Mastermixes wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert: 10 µl 20x eukaryotische Hybridisierungskontrollen (*Spike*-Kontrollen bioB, bioC, bioD, cre), welche zuvor für 5 min bei 65°C in einen Heizblock gestellt wurden, 3,3 µl B2-Kontrolloligonukleotide ( 3 nM), 2 µl Hering Sperm DNA (10 mg/ml), 2 µl BSA (50 mg/ml), 100 µl 2x Hybridisierungspuffer, 20 µl DMSO. Der Mastermixansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 180 µl aufgefüllt. Der Hybridisierungscocktail wurde gemischt, bei 99°C für 5 min, bei 45°C für mindestens weitere 5 min inkubiert und

anschließend 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Während der Inkubationszeit des Hybridisierungscocktails wurden die Microarrays, welche zuvor auf Raumtemperatur gebracht worden sind, mit 130 µl 1x Hybridisierungspuffer beladen und für 10 min bei 45°C und 60 rpm in den Hybridisierungsofen gegeben. Danach wurde der Hybridisierungspuffer wieder entfernt, der Array mit 130 µl des Hybridisierungscocktails beladen und für 16 h bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungsofen inkubiert.

#### 2.2.16.4 *Waschen und Färben*

Nach den 16 h Inkubation wurde der Hybridisierungscocktail aus den GeneChips entfernt und die Chips mit 160 µl nicht-stringentem Waschpuffer A befüllt. Dann wurden die Arrays in die Waschstation geladen und nach dem automatischen Wasch- und Fluoreszenzmarkierungsprotokoll Midi-euk2v3 gewaschen und gefärbt. Dabei wird durch abwechselnde Inkubation mit einer Streptavidin-Phycoerithrin-(SAPE-)Lösung (600 µl 2x MES-Färbe-Puffer, 48 µl acetyliertes BSA, 12 µl Streptavidin-Phycoerithrin, 540 µl Aqua dest.) und einer Antikörperlösung (300 µl 2x MES-Färbe-Puffer, 24 µl acetyliertes BSA, 6 µl Ziege-IgG, 3,6 µl biotinylierter Antikörper, 266,4 µl Aqua dest.) sowie zwischengeschalteten Waschschritten mit den Puffern A und B eine doppelte Fluoreszenzmarkierung erreicht. Hierbei bindet das Streptavidin-Phycoerythrin sowohl an die biotinylierten Nukleotide der auf dem Chip hybridisierten cRNA als auch an die biotinylierten Antikörper. Nach der Markierung wurden die GeneChips zum Scannen automatisch mit 160 µl Waschpuffer A gefüllt.

#### 2.2.16.5 *Scannen der GeneChips*

Nach dem Waschen wurden die Arrays in den Affymetrix GeneChip Scanner 3000 geladen. Dieser regt die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 532 nm an und misst das Emissionssignal bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Auflösung von 2,5 µm.

#### 2.2.16.6 *Daten-Analyse*

##### 2.2.16.6.1 *Analyse der Arrays*

Die mit dem Scanner gemessene Intensität des Lichtsignals jedes Oligonukleotides wird durch die GCOS-(GeneChip® Operating Software-)Software in eine Bildinformation übersetzt, in der

die Signalintensität als Farbkodierung dargestellt wird. GCOS führt automatisch eine erste qualitative und quantitative Datenanalyse für jedes *Probe Set* durch und erzeugt als Resultat eine CHP-Datei. Dabei erfolgt die Einteilung des Bildes in ein Raster, die Korrektur des Hintergrundsignals, die Normalisierung der verschiedenen Microarray-Images sowie für jedes *Probe Set* die Berechnung des *Probe Set*-Signals, des *Detection Call* und des *Detection p-value*. Auf der Grundlage komplexer Algorithmen berechnet GCOS die Parameter, mit denen die Messdaten beurteilt werden können. Dabei wird aus den Signalintensitäten der 11 PM-MM-Oligonukleotid-Paare jedes Transkriptes der *Detection p-value* berechnet. Der *Detection p-value* beschreibt die Verlässlichkeit des *Detection Call*. Der *Detection Call* gibt an, ob ein Transkript als *present* (exprimiert), *absent* (nicht exprimiert) oder *marginal* (zwischen *present* und *absent* liegend) eingestuft wird. Die Einstufung erfolgt abhängig vom Diskriminationswert. Der Diskriminationswert ist der Quotient aus  $(PM-MM)/(PM+MM)$ . Ist PM viel größer als MM, wird der Diskriminationswert nahe 1 und der *p-value* kleiner, d.h. signifikanter. Der Diskriminationswert wird für jedes Probenpaar kalkuliert, mit einem Schwellenwert Tau (vorher festgelegte kleine positive Zahl) verglichen und der *p-value* nach dem One-side-Wilcoxon's Signed Rank Test berechnet. Anhand von einstellbaren *p-value cut-offs*  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  werden die Grenzen zwischen *present*, *marginal* und *absent* festgelegt (bei einem *p-value* von  $\alpha_1$  bis null gilt das Signal als *present*, über  $\alpha_2$  *absent* und dazwischen als *marginal*). Das *Probe Set*-Signal ist ein quantitatives Maß, das den relativen Expressionslevel eines Transkriptes repräsentiert, und wird mittels One-Step Tukey's Biweight Estimate ermittelt [9].

#### 2.2.16.6.2 Normalisierung und Qualitätskontrolle

Vor dem Vergleich der erhobenen Microarray-Daten muss eine Normalisierung durchgeführt werden, um Variationen nicht biologischen Ursprungs (artifizielle Variabilität) wie unterschiedliche Mengen und Qualität der RNA, der Färbereagenzien, Pipettierfehler, Fehler bei der Hybridisierung etc. auszugleichen. Zur Minimierung der artifiziellen Variabilität werden eine Per-Chip-Normalisierung und eine Per-Gen-Normalisierung durchgeführt.

Die Per-Chip-Normalisierung minimiert die artifizielle Variabilität innerhalb eines Microarrays. Sie wird automatisch durch GCOS durchgeführt und als *Global Scaling* bezeichnet. Es wird angenommen, dass die mittleren Signalintensitäten der Microarrays ungefähr gleich sind, wenn gleiche RNA-Mengen für die Hybridisierung eingesetzt wurden. Auf dieser Grundlage wird beim *Global Scaling* für das Signal aller *Sonden Sets* ein bereinigter Mittelwert (*trimmed mean*) berechnet, wobei starke Ausreißer aus den Daten herausgerechnet werden. Dieser bereinigte

Mittelwert wird dann auf eine vorgewählte Durchschnittsintensität (*target signal*) festgelegt. Der Skalierungsfaktor ergibt sich aus der Formel:  $target\ signal = scaling\ factor \times trimmed\ mean\ signal$ . Dieser Skalierungsfaktor (*scaling factor*) sollte innerhalb einer Versuchsreihe um weniger als den Faktor 3 schwanken, um eine gute Vergleichbarkeit der Microarrays zu gewährleisten.

Zur Minimierung der artifiziellen Variabilität zwischen den Microarrays dient die Per-Gen-Normalisierung. Dabei wird unter Verwendung der Software GeneSpring Version 7.0 der Quotient aus der Signalintensität für Gen A in Probe x und der medianen Signalintensität für Gen A aller Microarrays berechnet.

Zur Kontrolle der Daten-Qualität dienen B2-Oligonukleotide als grundlegende Hybridisierungskontrolle sowie die Hybridisierungskontrollen bioB, bioC, bioD und cre. Weitere Kontrollparameter sind der durchschnittliche Hintergrundwert zum Prüfen auf unspezifische Fluoreszenzen, *Spike*-Kontrollen zur Kontrolle der cDNA-Synthese und der Probenaufarbeitung, die Haushaltsgene  $\beta$ -Aktin und GAPDH zur Kontrolle auf degradierte mRNA und 3`/5`- sowie M-Detektionen zur zusätzlichen Beurteilung der Qualität der Proben-mRNA und der Effizienz der cDNA-Synthese (74).

### 2.2.16.6.3 Vergleichende Analyse

Bei der vergleichenden Analyse werden Expressionsunterschiede zwischen zwei Microarrays analysiert und quantifiziert. Ein Microarray wird als *Baseline*-Microarray definiert und die Werte eines zweiten Microarrays, dem *Experiment*-Microarray, als Differenz zum *Baseline*-Microarray berechnet. Die PM-MM Differenzen jedes *Probe Sets* des *Baseline*-Microarrays werden mit den PM-MM Differenzen des entsprechenden *Probe Sets* des *Experiment*-Microarrays verglichen. Ein Algorithmus kalkuliert den *Change p-value*, der nach Abgleichung gegen einstellbare *cut-offs* umgesetzt wird in die *Change Calls: Increase, Marginal Increase, No Change, Marginal Decrease* und *Decrease*. Die Berechnung des *Change p-values* erfolgt nach dem Wilcoxon's Signed Rank Test anhand der jeweiligen 11 PM-MM-Signaldifferenzen der Probesets auf den beiden zu vergleichenden Microarrays sowie der PM-Background-Differenzen.

Ein zweiter Algorithmus berechnet den quantitativen Wert in Form einer *Signal Log Ratio* zur Basis 2. Die Quantität der Expressionsunterschiede zweier *Probe Sets* zwischen *Baseline*- und *Experiment*-Microarray wird über den *Fold Change* dargestellt; eine *Signal Log Ratio* von 1 entspricht dabei einem *Fold Change* von 2 und *Signal Log Ratio* von 2 dem *Fold Change* von 4 usw. (74).

**Tabelle 6: Algorithmus-Parameter**

Parameter	Beschreibung
Detection Call	absent, present, marginal; qualitativer Wert
Detection p-value	statistische Signifikanz des Detection Call
Change Call	increase, decrease; qualitativer Wert
Change p-value	statistische Signifikanz des Change Calls
Signal Log Ratio	quantitativer Wert; Change-Ausmaß

#### **2.2.16.6.4 *Filtern von Genen***

Um die Datenmenge einzugrenzen, wurden nur Gene mit relevantem Genexpressionsunterschied der behandelten Proben (*Experiment*-Microarray) im Vergleich zu den unbehandelten Proben (*Baseline*-Microarray) betrachtet, d.h. es wurden nur Gene mit mindestens zweifacher Genexpressionsänderung (= zweifachem *Fold Change*) weiter ausgewertet.

#### **2.2.16.6.5 *Statistische Analyse***

Es wurde die ANOVA-(one way analysis of variance-)Funktion der Partek Genomics Suite Software verwendet. Als statistischer Test wurde der Student's T-Test eingesetzt. Dieser prüft, ob sich die Differenz der Mittelwerte zweier Gruppen signifikant von null unterscheidet. Eingesetzt wurde der Student's T-Test für verbundene Stichproben. Es handelt sich um einen gepaarten T-Test, bei dem ein bestimmtes Gen in ein und derselben Probe vor und nach Behandlung untersucht wird (74).

#### **2.2.16.6.6 *Interpretation der Genexpression***

Nachdem die Gene mit relevantem Genexpressionsunterschied zwischen behandelten Proben (*Experiment*-Microarray) und unbehandelten Proben (*Baseline*-Microarray) bestimmt waren, erfolgte die biologische Interpretation. Dazu wurde nach Beschreibungen der Funktion jedes der ausgewählten Gene in verschiedenen Online-Datenbanken für Genfunktionen recherchiert: OMIM, Entrez Gene, LocusLink, HomoloGene, RefSeq, UniGene sowie zur Vervollständigung in atlasgeneticsoncology.org; genecards.org; copewithcytokines.de; ihop-net.org; reactome.org und au.expasy.org. Auch die Firma Affymetrix entwickelte eine solche Datenbank, das NetAffx Analysis Center, die kurze Beschreibungen zu Genfunktionen enthält und ebenso in die Suche einbezogen wurde.



## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Veränderung der Zellmorphologie durch die Behandlung (IR + STS) der Lymphomzelllinien**

Um eine erste Übersicht über die Auswirkung der Bestrahlung (IR) der Lymphomzellen mit vorheriger Staurosporinzugabe (STS) zu erhalten, wurde die Zahl der lebenden und der toten Zellen in den Kulturflaschen der behandelten und unbehandelten Zelllinien bestimmt (siehe 2.2.3). Dadurch konnte dargestellt werden, wie sich das Verhältnis der lebenden Zellen zu den toten Zellen durch die Behandlung änderte. Als weiterer Parameter wurde die Änderung der Zellmorphologie durch die Behandlung betrachtet, wie z.B. die Veränderung der Zellform, die Integrität der Zellwand und die Zunahme von Zelldebris, die durch das Absterben von Zellen anfällt.

Bei den cHL-Zellen zeigte sich keine Änderung der Zellmorphologie durch die Bestrahlung, aber eine deutliche Zunahme an toten Zellen. Eine Steigerung der Zahl an toten Zellen war ebenfalls bei den NHL-Zelllinien zu sehen. Bei diesen fanden sich nach der Behandlung aber deutlich weniger Zellen mit intakter Zellmorphologie (siehe Tabelle 7).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass IR + STS in allen Zelllinien zu einer vergleichbaren Anzahl an toten Zellen – trotz unterschiedlicher Auswirkung auf die Zellmorphologie – führt.

**Tabelle 7: Auswirkung der IR + STS auf die Zelllinien**

Lymphom-Entität	Zelllinie	Verhältnis lebende Zellen/tote Zellen		Änderung der Zellmorphologie
		Unbehandelt	Bestrahlt	
cHL	L-428	4/1	2/1	keine
	L-1236	3/1	1/1	keine
	KM-H2	3/1	2/1	keine
DLBCL (ABC-Typ)	Ly-3	3/1	1/1	nach 10h zunehmend mehr Zellschrott
	Ly-10	3/1	1/1	nach 10h zunehmend mehr Zellschrott
DLBCL (GCB-Typ)	SU-DHL-4	20/1	3/1	ab 10h deutlich mehr Zellschrott und weniger intakte Zell-Morphologie
B-CLL	EHEB	3/1	2/1	nach 8h zunehmend mehr Zellschrott
	Mec-2	3/1	1/1	nach 10h viel Zellschrott, tote Zellen dominieren das Bild
FL	DOHH-2	12/1	5/1	nach 10h zunehmend mehr Zellschrott
BL	Daudi	6/1	3/1	nach 10h viel Zellschrott, tote Zellen dominieren das Bild
MCL	Granta-519	3/1	1/1	nach 10h zunehmend mehr Zellschrott

**IR (ionizing radiation):** ionisierende Strahlung; **STS:** Staurosporin; **FL:** folliculäres Lymphom; **cHL:** klassisches Hodgkin-Lymphom; **DLBCL:** diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; **ABC:** *activated B-cell-like*; **GCB:** *germinal center B-cell-like*; **B-CLL:** chronische lymphatische B-Zell-Leukämie; **BL:** Burkitt-Lymphom; **MCL:** Mantelzelllymphom

## 3.2 Proteinexpression im P53-Signalweg verschiedener Lymphom-Zelllinien

### 3.2.1 Konstitutive TP53- und P21-Proteinexpression in cHL-Zelllinien mit Vergleich zu verschiedenen B-NHL-Zelllinien

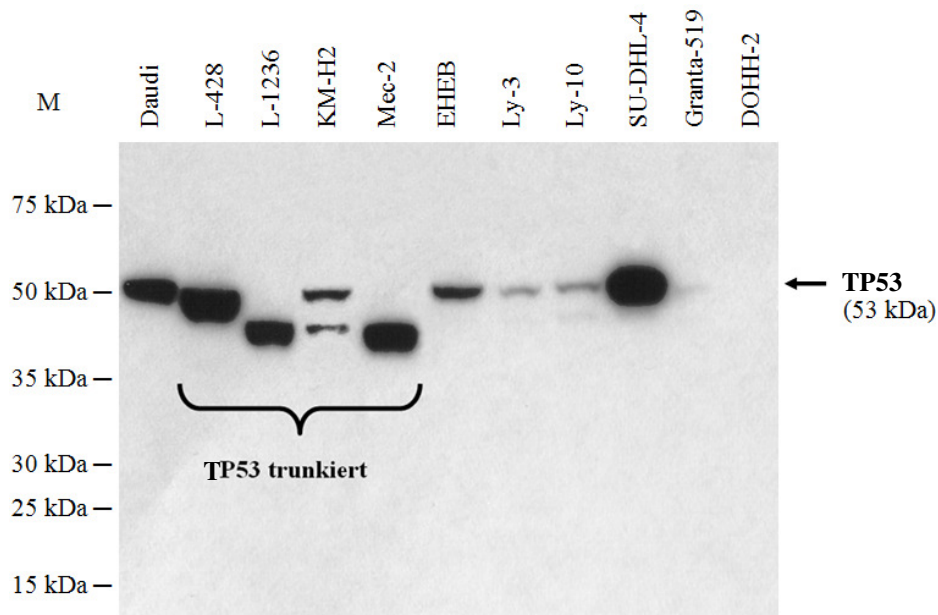
In einer gesunden Zelle, die keiner DNA-Schädigung oder anderen zellulären Stressoren ausgesetzt ist, liegt das TP53-Protein nur in geringen Konzentrationen vor und hat eine kurze Halbwertszeit. Dagegen ist TP53 in vielen malignen Zellen in erhöhter Menge messbar. In dieser Arbeit wurde zuerst mittels Westernblot untersucht, wie sich die TP53-Expression auf Proteinebene in cHL-Zelllinien und verschiedenen NHL-Zelllinien darstellt. Ausgewählt wurden dafür die cHL-Zelllinien L-428, L-1236, KM-H2 sowie zur Gegenüberstellung aus anderen B-Zell-Lymphomentitäten die Zelllinien Daudi (Burkitt-Lymphom), EHEB und Mec-2 (chronische lymphatische Leukämie), SU-DHL-4 (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; Keimzentrums-

[GCB-]Typ), Ly-3 und Ly-10 (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; aktivierter B-Zell-[ABC-]Typ), DOHH-2 (follikuläres Lymphom) und Granta-519 (Mantelzelllymphom) (siehe 1.1.1). Um die Funktionsfähigkeit des TP53-Proteins nachzuweisen, wurde zusätzlich die Expression des P21-Proteins bestimmt, dessen Expression von TP53 induziert wird.

Die Zelllinien wurden unter optimalen Bedingungen ohne jegliche Stressoren kultiviert, so dass keine potenzielle DNA-Schädigung und keine von außen zugeführte TP53-Induktion vorhanden waren. Aus diesen Zellen erfolgte die Herstellung der Proteinlysate (siehe 2.2.3), die dann im Westernblot untersucht wurden.

Die B-NHL-Zelllinien Daudi und SU-DHL-4 zeigten eine starke bzw. sehr starke TP53-Expression, dessen Molekulargewicht die erwartete Größe von 53 kDa aufwies. Keine bzw. eine nur geringe TP53-Expression war in den B-NHL-Zelllinien Ly-3, Ly-10, Granta-519, DOHH-2 und EHEB zu detektieren. Die B-NHL-Zelllinie Mec-2 zeigte ausschließlich eine starke Expression eines TP53-Proteins, mit einer Größe unterhalb des Molekulargewichtes des Wildtyp-TP53-Proteins.

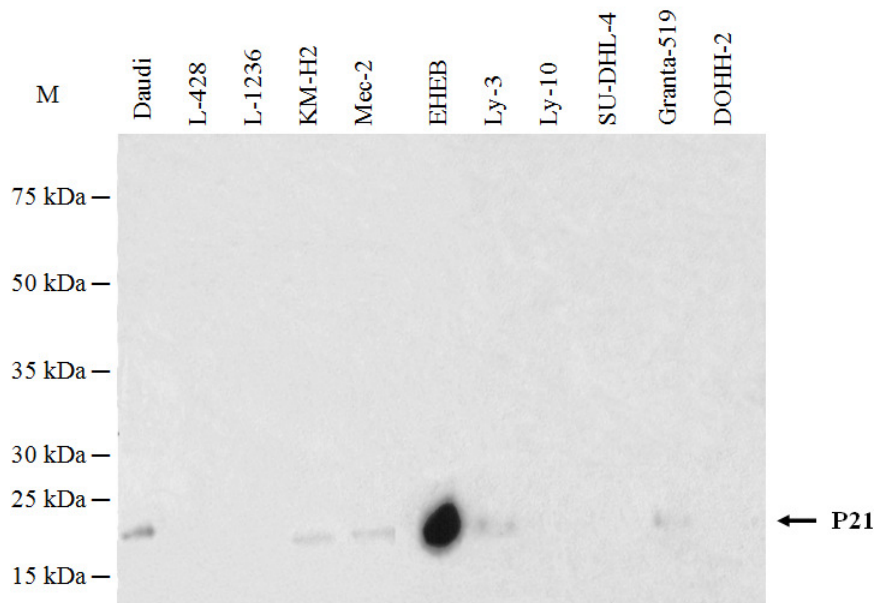
Die cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 wiesen ebenfalls eine deutliche Expression eines TP53-Proteins mit einem Molekulargewicht unterhalb des intakten TP53-Proteins auf. Dies spricht für trunkierte TP53-Proteine. Die trunkierten TP53-Proteine zeigten sowohl innerhalb der cHL-Zelllinien als auch im Vergleich zur MCL-Zelllinie Mec-2 unterschiedliche Molekulargewichte, so dass von unterschiedlichen TP53-Defekten in diesen Zelllinien ausgegangen werden kann. Dagegen zeigte die cHL-Zelllinie KM-H2 ein ähnliches TP53-Proteinexpressionsmuster (geringe Wildtyp-TP53-Expression) wie die DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10. Im Gegensatz zu den anderen cHL-Zelllinien trat ein wesentlich schwächer exprimiertes TP53-Protein-Produkt mit einer Größe von 53 kDa auf und das Signal eines zweiten TP53-Proteins mit einem geringeren Molekulargewicht als 53 kDa und einer geringeren Signalstärke (siehe Abbildung 6). Dies könnte ebenfalls für unterschiedliche *TP53*-Allele sprechen.



### Abbildung 6: TP53-Proteinnachweis in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mittels Westernblot

Westernblot zur Darstellung der TP53-Expression in cHL-Zelllinien (L-428, L-1236, KM-H2) und B-NHL-Zelllinien (Daudi, Mec-2, EHEB, Ly-3, Ly-10, SU-DHL-4, Granta-519, DOHH-2). **M**: Markerproteine in Kilodalton. Die cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 sowie die NHL-Zelllinie Mec-2 weisen eine starke Expression trunkierter TP53-Proteine auf. Bei der cHL-Zelllinie KM-H2 zeigten sich zwei TP53-Produkte.

Die Aktivierung von TP53 führt physiologischerweise zur Induktion von P21. Das bedeutet, dass P21 in einer gesunden, nicht gestressten (TP53-inaktiven) Zelle normalerweise ebenfalls nicht exprimiert wird. Die meisten der untersuchten Zelllinien zeigten im Western Blot keine bzw. nur eine sehr geringe Expression von P21. Zudem bestand keine Korrelation mit der Expression von TP53, d.h. unabhängig davon, ob eine TP53-Expression zu verzeichnen war oder nicht, kam es zu keiner Induktion der P21-Expression. Eine Ausnahme stellte die CLL-Zelllinie EHEB dar. Obwohl in dieser Zelllinie nur eine sehr schwache TP53-Expression vorhanden war, ließ sich eine sehr starke P21-Expression im Westernblot darstellen (siehe Abbildung 7).



### Abbildung 7: P21-Proteinnachweis in Lymphom-Zelllinien im Westernblot

Westernblot zur Darstellung von P21 in cHL-Zelllinien (L-428, L-1236, KM-H2) und B-NHL-Zelllinien (Daudi, Mec-2, EHEB, Ly-3, Ly-10, SU-DHL-4, Granta-519, DOHH-2). M: Markerproteine in Kilodalton. Nur in der CLL-Zelllinie EHEB war ein sehr starkes Signal der P21-Proteinexpression detektierbar.

### 3.2.2 TP53- und P21-Proteinexpression der cHL- und B-NHL-Zelllinien nach Induktion des P53-Signalwegs

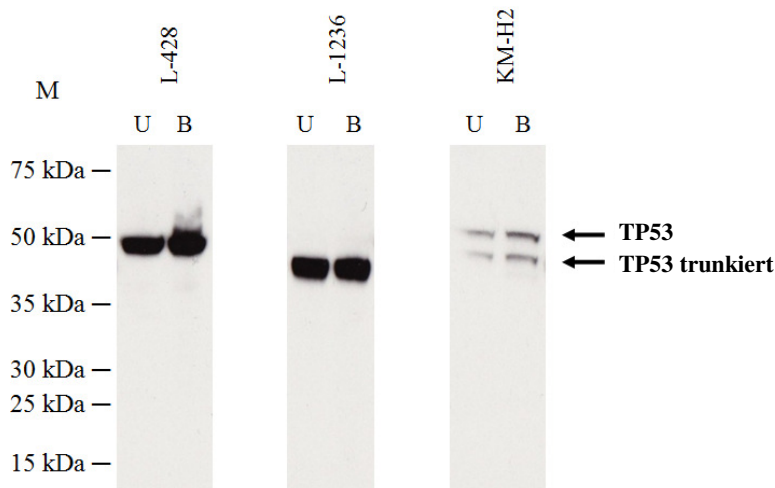
Nach Betrachtung der konstitutiven TP53- und P21-Expression in den verschiedenen Lymphom-Zellen wurde anschließend die Expression beider Moleküle nach Induktion des P53-Signalwegs analysiert. Dazu wurden die elf Zelllinien ionisierender Strahlung ausgesetzt und mit Staurosporin versetzt (siehe 2.2.2). Nach anschließender 10-stündiger Inkubation erfolgte aus diesen Zellen die Herstellung der Proteinlysate (siehe 2.2.3). Durch die DNA-schädigende Wirkung der ionisierenden Strahlen kommt es in intakten Zellen physiologischerweise zur Aktivierung von TP53, wodurch auch die Proteinbiosynthese von P21 induziert wird. Im Westernblot wurden die Proteinlysate der bestrahlten und unbestrahlten Zelllinien auf die Regulation von TP53 und P21 untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch die Aktivierung des P53-Signalwegs in den cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 keine Änderung der TP53-Expression und keine Änderung der P21-Expression hervorgerufen wurden. Sowohl im unbehandelten wie auch im bestrahlten Zustand trat stets eine starke Expression eines trunkierten TP53-Proteins auf, während es zu keiner Induktion von P21 kam (siehe Abbildung 8 und 10) (siehe Tabelle 8). Dies spricht dafür, dass das trunkierte TP53-Protein nicht funktionsfähig ist. Bei der cHL-Zelllinie KM-H2 kam es zu einer geringen Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression.

Ebenfalls keine Änderung durch die Zellbestrahlung hinsichtlich der Expression von TP53 und P21 zeigten die Zelllinien EHEB (CLL) und SU-DHL-4 (DLBCL). Während bei den SU-DHL-4-Zellen sowohl vor als auch nach TP53-Induktion eine deutliche TP53-Expression auftrat, war niemals ein P21-Signal detektierbar. Dagegen zeigten die EHEB-Zellen ein genau umgekehrtes Bild. Sowohl vor als auch nach Anregung des P53-Signalwegs war einerseits ein nur schwaches TP53-Signal, aber andererseits stets eine starke P21-Expression sichtbar. In diesen beiden Zelllinien kann demzufolge ebenfalls kein funktionsfähiges TP53-Protein vorliegen.

Bei den Zelllinien Daudi (BL) und Mec-2 (CLL) kam es durch die Behandlung mit ionisierender Strahlung zu einer geringen Zunahme des P21-Proteins, aber in der TP53-Expression zeigte sich kein Unterschied, so dass auch hier von einer TP53-Fehlfunktion auszugehen ist.

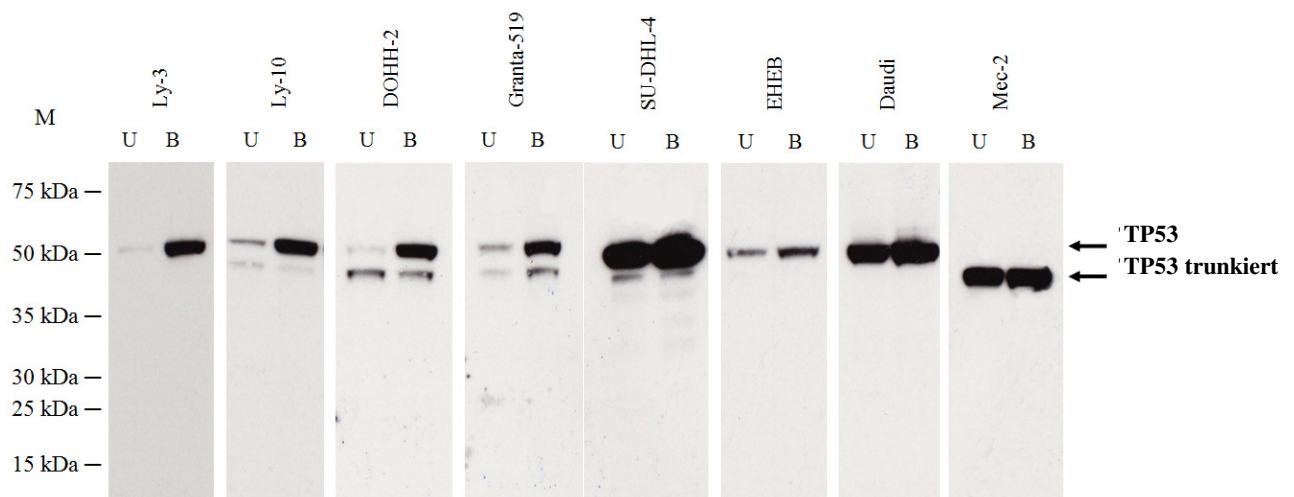
Eine Reaktion durch die TP53-Stimulation wurde in den Zelllinien Ly-3 (DLCL), Ly-10 (DLCL), DOHH-2 (FL) und Granta-519 (MCL) hervorgerufen. In diesen vier Zelllinien war vor der Bestrahlung kein oder ein nur sehr schwaches TP53- und P21-Signal sichtbar. Durch die Bestrahlung kam es zu einer deutlichen Zunahme der Expression des TP53-Proteins mit der entsprechenden Größe von 53 kDa und des P21-Proteins. Diese Reaktion entspricht dem physiologischen Verhalten einer gesunden Zelle und spricht für das Vorliegen eines funktionstüchtigen TP53-Proteins (siehe Abbildung 9 und 11) (siehe Tabelle 8).

Bei den Zelllinien Ly-10, DOHH-2 und Granta-519 zeigten sich teilweise vor der Bestrahlung schwächere Signale eines zweiten TP53-Proteins mit einem geringeren Molekulargewicht als 53 kDa. Diese schwächeren Signale der trunkeierten Proteine verstärkten sich durch die Bestrahlung der Zelllinien nicht bzw. nur sehr wenig. Dies könnte durch das Vorliegen von zwei TP53-Allelen zu erklären sein, von denen nur eins funktional ist.



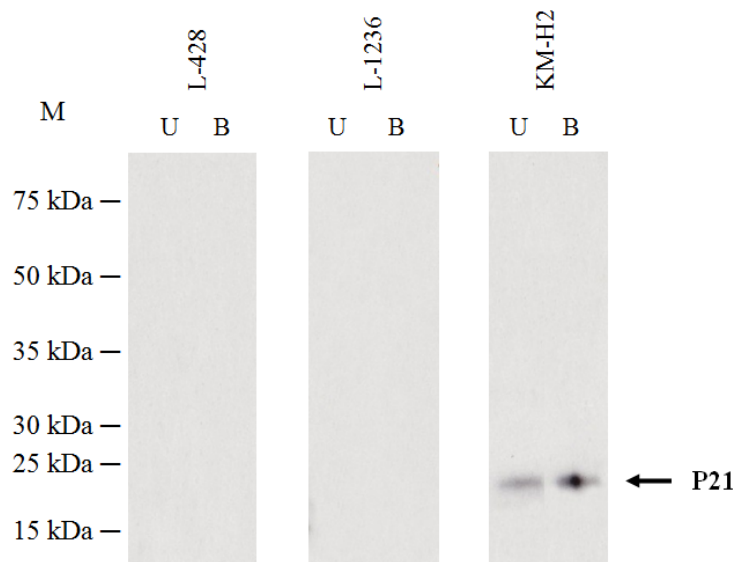
**Abbildung 8: TP53-Proteinnachweis in cHL-Zelllinien im Westernblot vor und nach Induktion des P53-Signalwegs**

Durch die Behandlung mit IR + STS kam es in diesen cHL-Zelllinien zu keiner bzw. nur zu einer sehr geringen Änderung der TP53-Proteinexpression. **M:** Markerproteine in Kilodalton. **U:** unbestrahlt; **B:** bestrahlt mit ionisierender Strahlung (IR) und versetzt mit Staurosporin (STS) zur Induktion von TP53.



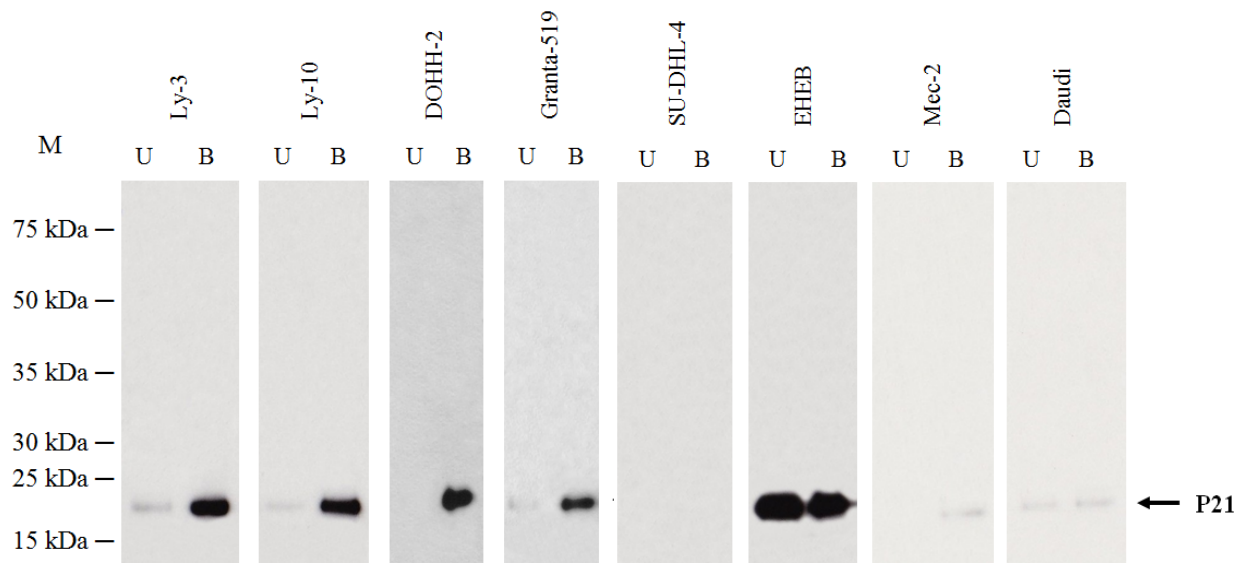
**Abbildung 9: TP53-Proteinnachweis in B-NHL-Zelllinien mittels Westernblot vor und nach Induktion des P53-Signalwegs**

In den Zelllinien Ly-3 (DLBCL), Ly-10 (DLBCL), DOHH-2 (FL) und Granta-519 (MCL) kam es zu einer deutlichen Verstärkung des TP53-Proteinsignals durch die Bestrahlung. Die übrigen Zelllinien zeigten durch die TP53-Stimulation keine Änderung der P53-Proteinexpression. **M:** Markerproteine in Kilodalton. **U:** unbestrahlt; **B:** bestrahlt mit ionisierender Strahlung (IR) und versetzt mit Staurosporin (STS) zur Induktion von TP53.



**Abbildung 10: P21-Proteinexpression der cHL-Zelllinien im Westernblot vor und nach Induktion des P53-Signalwegs**

Nur bei der cHL-Zelllinie KM-H2 kam es zu einer schwachen Zunahme der P21-Proteinexpression durch IR-STS. **M:** Markerproteine in Kilodalton. **U:** unbestrahlt; **B:** bestrahlt mit ionisierender Strahlung (IR) und versetzt mit Staurosporin (STS) zur Induktion von TP53.



**Abbildung 11: P21-Proteinexpression der B-NHL-Zelllinien im Westernblot vor und nach Induktion des P53-Signalwegs**

In den Zelllinien Ly-3 (DLBCL), Ly-10 (DLBCL), DOHH-2 (FL) und Granta-519 (MCL) kam es zu einer deutlichen Signalverstärkung in der P21-Proteindetektion durch die Bestrahlung. Die übrigen Zelllinien zeigten durch die TP53-Stimulation keine Änderung der P21-Proteinexpression. **M:** Markerproteine in Kilodalton. **U:** unbestrahlt; **B:** bestrahlt mit ionisierender Strahlung (IR) und versetzt mit Staurosporin (STS) zur Induktion von TP53.



### **3.2.3 Zusammenfassung der Proteinexpressionsmuster und Auswahl der Zelllinien für Genexpressionsanalysen**

Für die Untersuchungen auf RNA-Ebene wurden aus den bisher betrachteten elf Zelllinien sieben Zelllinien ausgewählt. Diese Auswahl erfolgte anhand der Signale im Westernblot. Wie in der Tabelle 8 dargestellt, lässt sich zusammenfassen, dass die TP53-Stimulierung durch IR + STS in den cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 keine Auswirkung auf die Expression von TP53 und P21 zeigte. Es fand sich sowohl mit als auch ohne Bestrahlung eine starke Expression trinkierter TP53-Proteine bei fehlender P21-Induktion. Bei der cHL-Zelllinie KM-H2 wurde eine geringe Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression hervorgerufen. Dabei wies das TP53-Protein dieser Zelllinie zwei Signale auf: ein Signal entsprechend der Größe von 53 kDa und eines von etwas geringerer Molekülgröße, hinweisend auf zwei verschiedene *TP53*-Allele. Da das Hodgkin-Lymphom im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, wurden die drei cHL-Zelllinien für alle folgenden Untersuchungen weiterhin verwendet.

Zum Vergleich zu den nicht bzw. kaum reaktiven cHL-Zelllinien wurden die nicht reaktiven B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und EHEB ausgewählt. Diese Zelllinien zeigten ebenfalls keine Reaktion auf die Induktion des P53-Signalwegs, wiesen aber ein anderes Muster der Proteinexpression auf als die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Bei der Zelllinie SU-DHL-4 zeigte sich immer eine sehr starke TP53-Expression bei fehlendem P21-Signal, während umgekehrt bei der Zelllinie EHEB stets ein sehr starkes P21-Signal bei nur mäßigem TP53-Signal vorhanden war.

Gegenüberstellend lassen sich die B-NHL-Zelllinien Ly-3, Ly-10, DOHH-2 und Granta-519 zu einer Gruppe zusammenfassen, weil diese Zelllinien auf den Reiz der DNA-Schädigung durch Bestrahlung wie eine gesunde Zelle hinsichtlich der Regulation der Proteinexpression von TP53 und P21 antworten. Deshalb wurden aus dieser Gruppe ebenfalls zwei Zelllinien ausgewählt (Ly-3 und Ly-10). Es wäre möglich, zu dieser Gruppe auch die cHL-Zelllinie KM-H2 zuzuordnen, die ebenfalls eine physiologische Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression zeigt. Diese Zunahme war jedoch nur schwach ausgeprägt, so dass auch hier eine Beeinträchtigung der TP53-Funktion anzunehmen ist. Da in dieser Arbeit der P53-Signalweg im cHL den Schwerpunkt bildet und keine der drei cHL-Zelllinien eine adäquate strahlungsinduzierte TP53- und P21-Proteininduktion aufwies, wurden die cHL-Zelllinien gemeinsam betrachtet und zu einer Gruppe zusammengefasst.

Die B-NHL-Zelllinien Daudi und Mec-2 zeigten jeweils ein wieder anderes Muster der TP53- und P21-Proteinexpression, woraus sich kein zusätzlicher Informationsgewinn ergab und wurden deshalb für weitere Untersuchungen nicht verwendet.

Zusammengefasst wurden aus den B-Zell-Lymphom-Zelllinien in dieser Arbeit folgende Gruppen gebildet:

**1. Gruppe - cHL-Zelllinien:**

-keine oder nur geringe Änderung der TP53- und P21-Proteinexpression durch IR bei permanenter TP53-Proteinexpression (L-428, L-1236, KM-H2)

**2. Gruppe – physiologisch; reaktiv:**

-adäquate Induktion der TP53- und P21-Proteinexpression durch IR (Ly-3, Ly-10, DOHH-2 und Granta-519)

**3. Gruppe – unphysiologisch; nicht reaktiv:**

-keine Änderung der TP53- und P21-Proteinexpression durch IR bei starker TP53- oder P21-Proteinüberexpression (EHEB und SU-DHL-4)

**4. Gruppe –unphysiologisch; unspezifisch, minimal reaktiv:**

-gelegentliche, geringe Änderungen der TP53- und P21-Proteinexpression durch IR bei permanenter TP53-Proteinexpression (Daudi und Mec-2).

**Tabelle 8: TP53- und P21-Proteinexpression in verschiedenen B-Zell-Lymphom-Zelllinien vor und nach der Behandlung mit IR + STS**

Gruppe	Zelllinie	TP53			P21		IR-Wirkung auf den P53-Signalweg
		U	B	trunkiert	U	B	
1) Hodgkin-Lymphom	L-428 (cHL)	+++	+++	ja	-	-	-konstitutive TP53-Überexpression -keine TP53- und P21-Induktion
	L-1236 (cHL)	+++	+++	ja	-	-	
	KM-H2 (cHL)	+ (2 Banden)	++ (2 Banden)	ja & nein	(+)	+	-konstitutive TP53-Proteinexpression -geringe TP53- und P21-Induktion
2) physiologisch, reaktiv	Ly-3 (DLBCL (ABC))	-	++	nein	(+)	++	-TP53-Expression ↑ → P21-Expression ↑
	Ly-10 (DLBCL (ABC))	-	++	nein	(+)	++	
	DOHH-2 (FL)	-	++	nein	-	++	
	Granta-519 (MZL)	-	++	nein	(+)	++	
3) unphysiologisch, nicht reaktiv	EHEB (B-CLL)	+	+	nein	+++	+++	- immer starke P21-Expression bestrahlt wie unbestrahlt
	SU-DHL-4 (DLBCL (GCB))	++++	++++	nein	-	-	nie P21-Expression
4) unphysiologisch, minimal reaktiv	Daudi (BL)	++	+++	nein	+	+	-TP53-Expression bestrahlt und unbestrahlt -teilweise schwache TP53- und P21-Induktion
	Mec-2 (B-CLL)	+++	+++	ja	-	(+)	

**cHL:** klassisches Hodgkin Lymphom; **DLBCL:** diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; **ABC:** *activated B-cell-like*; **GCB:** *germinal center B-cell-like*; **FL:** folliculäres Lymphom; **MCL:** Mantelzell-Lymphom; **CLL:** chronische lymphatische Leukämie; **BL:** Burkitt Lymphom; **U:** unbestrahlt; **B:** bestrahlt mit ionisierender Strahlung (IR) und versetzt mit Staurosporin (STS) zur Induktion von TP53.

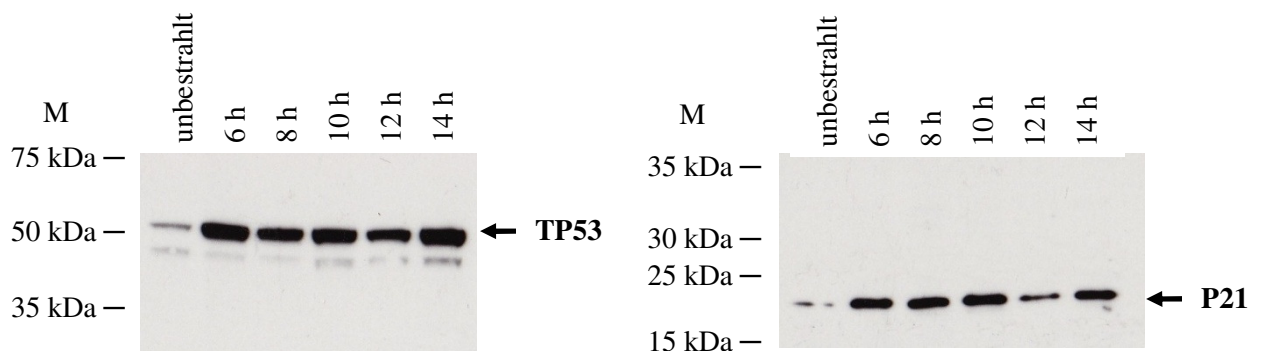
keine Expression: -, sehr schwache Expression: (+), schwache Expression: +, mittlere Expressionsstärke: ++, starke Expression: +++, sehr starke Expression: +++++

### 3.2.4 Bestimmung der Inkubationsdauer nach der Zellbestrahlung

In Anlehnung an Lin et al. (61) wurden die Zelllinien nach der ersten Bestrahlung zunächst für 10 h (Inkubationsdauer) weiter in Zellkultur gehalten. Um zu überprüfen, ob dies auch für die Fragestellung in dieser Arbeit der optimale Zeitpunkt zur Herstellung der Proteinlysate aus den bestrahlten Zelllinien ist, wurden Zeitreihen angelegt. Als optimaler Zeitpunkt wurde dabei der Zustand betrachtet, an dem sich die stärksten Änderungen in der TP53- und P21-Proteindarstellung im Westernblot nach der Zellbestrahlung zeigten. Dazu korrelierend waren auch auf der RNA-Ebene zu diesem Zeitpunkt markante Expressionsänderungen zu erwarten. Für die Zeitreihen wurden die Zellen nach der Zellbestrahlung für jeweils 6, 8, 10, 12 und 14

Stunden inkubiert, dann geerntet und anschließend mittels Westernblot auf die TP53- und P21-Proteinexpression untersucht.

Dieses Experiment wurde zunächst mit den Zelllinien Ly-3 und Ly-10 durchgeführt, da hier die TP53- und P21-Proteinexpression nach 10-stündiger Inkubation der physiologischen Expression einer gesunden Zelle entsprach. Die markantesten Änderungen der TP53- und P21-Bandenstärke im Westernblot zeigten sich dabei für die Proben aus 8- bzw. 10-stündiger Inkubation nach Bestrahlung. Anschließend wurden mit allen sieben ausgewählten Zelllinien Zeitreihen durchgeführt. Im Mittel bestätigte sich, dass für alle Zelllinien eine Inkubationsdauer von 10 h nach der Zellbestrahlung der beste Zeitpunkt für die Probengewinnung ist. Aus diesem Grund sind die RNA-Proben, die 10 h nach der Zellbestrahlung gewonnen wurden, für die folgenden Genexpressions-Experimente weiterverarbeitet worden.



**Abbildung 12: Zeitreihe der TP53- und P21-Proteinexpression nach Bestrahlung am Beispiel der Zelllinie Ly-10**

Westernblot zur Darstellung der TP53- und P21-Proteinexpression im unbestrahlten Zustand der Zelllinie Ly-10 sowie nach 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, und 14 h Inkubation in der Zellkultur nach der Bestrahlung. **M:** Markerproteine in Kilodalton.

### 3.2.5 Qualitäts- und Quantitätskontrolle der Westernblots

Zur Absicherung der Ergebnisse der Proteinnachweise wurden alle Behandlungen der Zellen mindestens zweimal wiederholt mit 3-facher Darstellung jeder Probe im Westernblot.

Zusätzlich wurde geprüft, ob von allen unbehandelten Proben und den entsprechenden bestrahlten Proben jeweils die gleichen Proteinmengen eingesetzt wurden. Dies erfolgte über die Darstellung des Aktin-Proteins auf den gleichen Westernblotmembranen, die für die TP53- und P21-Nachweise verwendet wurden (siehe 2.2.5.6.). Da Aktin in jeder Zelle nahezu gleich stark exprimiert wird, sind beim Einsatz von gleichen Proteinmengen auch die Mengen der Aktin-Proteine gleich und die Aktin-Banden sollten in jeder Spur des Westernblots die gleiche Intensität aufweisen.

Dies war in allen durchgeführten Westernblots der Fall, womit der Einsatz gleicher Proteinmengen bestätigt werden konnte.

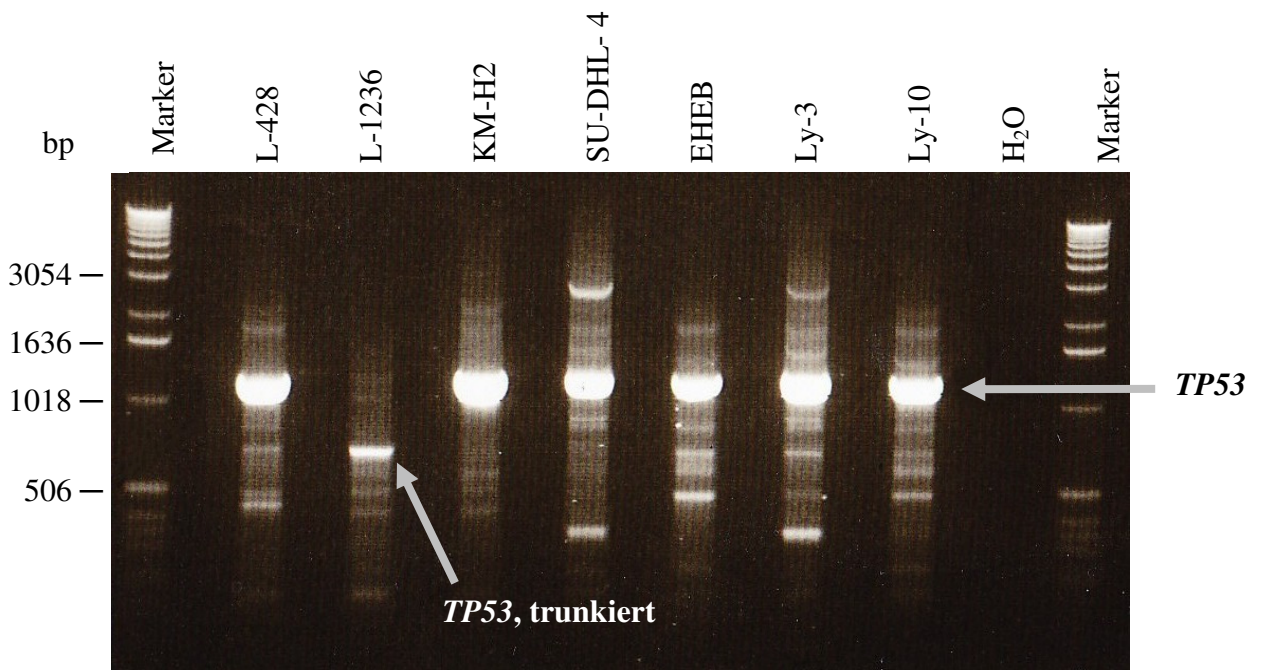
### **3.3 Amplifikation der gesamten kodierenden Region des *TP53*-Gens und seine Darstellung in der RT-PCR**

Nach der Analyse von TP53 auf der Protein-Ebene mittels Westernblots wurde die *TP53*-Expression auf der RNA-Ebene betrachtet. Dazu erfolgte die Amplifikation und Darstellung des *TP53*-Gens in der RT-PCR. Die Primer für die Amplifikation der *TP53*-Sequenz wurden dabei jeweils außerhalb der kodierenden Region des *TP53*-Gens in den untranslatierten RNA-Abschnitt gelegt. Damit konnte das gewonnene PCR-Produkt anschließend für die Sequenz-Analyse der gesamten kodierenden Region des *TP53*-Gens eingesetzt werden. Untersucht wurde das *TP53*-Gen in den sieben Zelllinien, die anhand der Westernblot Ergebnisse (siehe Tabelle 8) für die weitere Analyse auf der RNA-Ebene ausgewählt wurden.

Mit Ausnahme der Zelllinie L-1236 konnte bei allen Zelllinien ein kräftiges *TP53*-PCR-Produkt mit der erwarteten Größe von etwa 1301 bp detektiert werden.

Bei der Zelllinie L-1236 zeigte sich ebenfalls eine *TP53*-Expression aber mit einer deutlich reduzierten *TP53*-RNA-Menge und deutlich geringeren Größe von ungefähr 750 bp. Somit ist L-1236 die einzige Zelllinie, die ein verkürztes *TP53*-Produkt auf der RNA-Ebene zeigte, während im Westernblot alle cHL-Zelllinien ein trunkiertes TP53 in der Proteindarstellung aufwiesen. Zum Aufzeigen eventueller Ursachen der trunkierten *TP53*-RNA und TP53-Proteine wurde das RT-PCR-Produkt mittels Sequenzierung (siehe 3.2.6) auf das Vorhandensein von Mutationen im *TP53*-Gen überprüft.

Bei der *TP53*-RT-PCR entstanden zudem unspezifische PCR-Produkte, die sich als einige schwächere Banden verschiedener Größe zeigten. Deshalb wurde für die *TP53*-Sequenzierung das PCR-Produkt, das die erwartete Größe von etwa 1301 bp aufwies, aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und für die Sequenz-Analyse verwendet.



**Abbildung 13:** RT-PCR zum Nachweis der *TP53*-Transkription in cHL-Zelllinien und verschiedenen NHL-Zelllinien, Agarosegele (1%), Ethidiumbromidfärbung

### 3.4 Mutationsanalyse der kodierenden Sequenz des *TP53*-Gens in cHL- und B-NHL-Zelllinien

Das Ziel der Mutationsanalyse der kodierenden Sequenz des *TP53*-Gens war es, mögliche Ursachen für die Trunkierung der *TP53*-RNA und der *TP53*-Proteine aufzeigen und somit eine Erklärung für fehlende Genexpressionsantworten nach *TP53*-Induktion, d.h. für einen Defekt der *TP53*-Funktion geben zu können. Dazu erfolgte die Sequenzierung (siehe 2.2.13) des *TP53*-Gens der sieben Zelllinien, die bereits in der RT-PCR untersucht wurden.

Da die Sequenzierung der aus dem Gel aufgereinigten *TP53*-PCR-Produkte bei einigen Zelllinien schlecht auswertbare Ergebnisse lieferte, wurden außerdem die Klonierungsprodukte (siehe 2.2.12) der gleichen Zelllinien für die Sequenzierung eingesetzt. Eine Kolonie-PCR (siehe 2.2.14.4) mit den vektorbasierten Primern M-13(-20)FOR und M13-REV bestätigte zuvor, dass die jeweiligen Klonierungsprodukte ein *TP53*-PCR-Produkt der entsprechenden Größe von 1301 bp enthielten, so dass der restliche Ansatz der Kolonie-PCR aufgereinigt und für die Sequenzierung verwendet wurde.

Durch das überlappende Aneinanderlegen der erhaltenen Sequenzen aus den Sequenzierungsansätzen der *forward* Primer und der *reverse* Primer wurde für jede Zelllinie eine *TP53*-Konsensus-Sequenz erstellt, welche mit der in der Datenbank (GenBank;

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorhandenen Referenz-Sequenz (RefSeq) der *TP53*-mRNA des *Homo sapiens* tumor protein TP53 (Accession-Nr. NM\_000546.4) verglichen wurde (siehe 2.2.14). Die Sequenz der *TP53*-mRNA ist 2586 bp lang. Dabei hat die kodierende Sequenz eine Länge von 1181 bp, welche die Basenpaare 198-1379 umfasst (siehe Anhang).

Während für die cHL-Zelllinien mit den erstellten *TP53*-Konsensus-Sequenzen der gesamte kodierende Bereich analysiert werden konnte, ließ sich bei den vier B-NHL-Zelllinien jeweils ein kleiner Abschnitt von ca. 150-300 bp der *TP53*-Sequenz nicht durch die Sequenzierung erfassen.

In allen cHL-Zelllinien fanden sich Abweichungen von der Referenz-Sequenz. Die cHL-Zelllinie L-428 wies eine Deletion von 33 bp im Exon 4, Kodon 111 (ab 531 nt) auf, welche sich in der DNA-Bindungsdomäne des *TP53*-Gens befindet.

Bei der cHL-Zelllinie L-1236 bestand ab nt 1191, also mit Beginn des Exon 10, eine komplette Abweichung der *TP53*-Konsensus-Sequenz von der Referenz-Sequenz (*TP53*-Wildtyp-Sequenz), bei einem außerdem um 28 bp verkürzten Exon 10. Diese Aberration betrifft die Oligomerisierungsdomäne in der Regulatordomäne des *TP53*-Gens und führt zu einer Verkürzung der Sequenz. Beide Aberrationen finden sich bestätigend wieder in den kürzlich in PubMed/Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) veröffentlichten *TP53*-Sequenzen der cHL-Zelllinien L-428 (Accession-Nr.: EF101867) und L-12136 (Accession-Nr. EF101868).

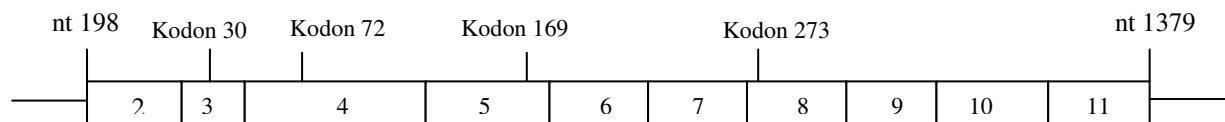
Die aus dem *TP53*-Klonierungsprodukt der cHL-Zelllinie KM-H2 gewonnene *TP53*-Konsensus-Sequenz enthielt eine Punktmutation in Exon 5, Kodon 169, nt 702, lokalisiert in der DNA-Bindungsdomäne. Diese Punktmutation ist beschrieben in der *TP53*-Mutationsdatenbank (<http://www-p53.iarc.fr>) und führt zu einem Aminosäureaustausch von Methionin zu Valin. Die Konsensus-Sequenz des *TP53*-PCR-Produktes der Zelllinie KM-H2 zeigte dagegen keine Abweichung von der Referenz-Sequenz. Die unterschiedlichen Konsensus-Sequenzen für das *TP53*-PCR-Produkt und für das *TP53*-Klonierungsprodukt deuten darauf hin, dass Allel-spezifische Unterschiede bestehen oder in der Zelllinie KM-H2 beide *TP53*-Allele transkribiert werden können.

Alle B-NHL-Zelllinien zeigten in Exon 4, Kodon 72, 412 nt eine Abweichung von der *TP53*-Referenz-Sequenz. Mit der Basenabfolge CGC in Kodon 72 kodierten alle NHL-Zelllinien die Aminosäure Prolin, während die *TP53*-Referenz-Sequenz die Aminosäure Arginin kodiert. Wie aus der *TP53*-Mutationsdatenbank (<http://www-p53.iarc.fr>) hervorgeht, handelt es sich hierbei um keine Punktmutation sondern um einen SNP (single nucleotide polymorphism). Unter SNPs versteht man Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang, die zur physiologischen Varianz des menschlichen Genoms führt.

Für die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 fand sich in der erhaltenen Konsensus-Sequenz zusätzlich zu dem SNP eine Punktmutation im Exon 8, Kodon 273, nt 1014. Diese befindet sich in der DNA-Bindungsdomäne und führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein. Sie ist ebenfalls in der *TP53*-Mutationsdatenbank (<http://www-p53.iarc.fr>) vorhanden.

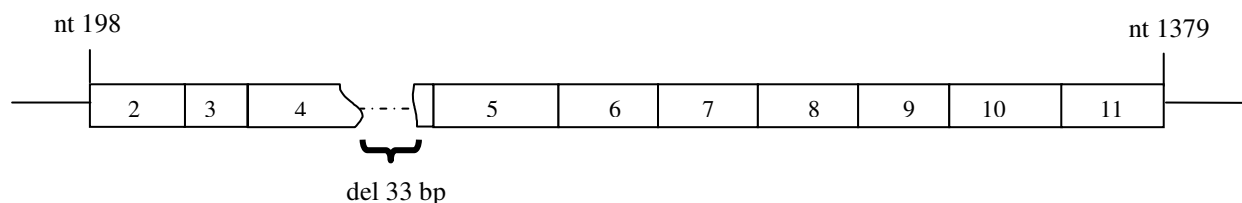
Bei der Sequenzanalyse für die CLL-Zelllinie EHEB fiel im Elektropherogramm, zusätzlich zum SNP in Kodon 72, eine Überlagerung von Adenin durch Guanin im Exon 3, Kodon 30, nt 285 auf. Dies deutet auf eine nicht auf allen Allelen vorhandene Punktmutation hin, die sich in der Transaktivierungsdomäne des *TP53*-Gens befindet. Eine solche Punktmutation in Kodon 30 findet sich in der oben erwähnten *TP53*-Mutationsdatenbank (<http://www-p53.iarc.fr>) nicht wieder, ist aber in einer weiteren *TP53*-Datenbank (<http://p53.free.fr>) aufgelistet und führt zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Aspartat.

Für die DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10 ließen sich im untersuchten Bereich der *TP53*-Sequenz keine Mutationen finden.

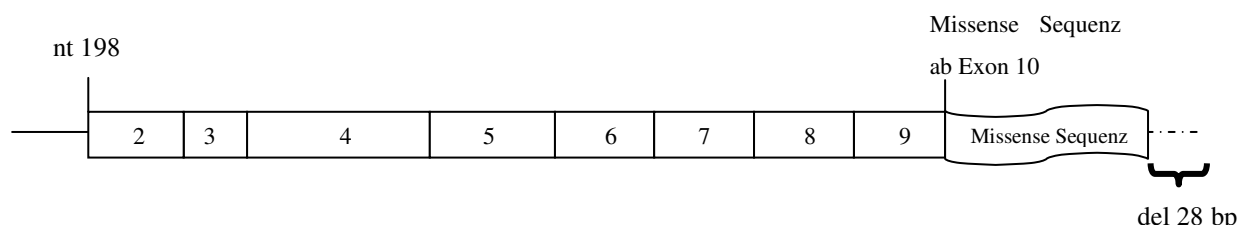


**Abbildung 14a: Schema der kodierenden Region (nt 198-1379 der RefSeq NM\_000546.4) des *TP53*-Gens (Referenz-Sequenz; Wildtyp)**

Die markierten Kodons sind die Lokalisationen, in denen in den untersuchten Zelllinien Punktmutationen oder SNPs im *TP53*-Gen auftraten. Die Nummerierung 2-11 entspricht Exon 2 bis Exon 11.

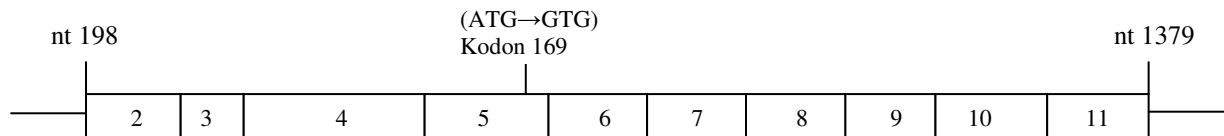


**Abbildung 14b: Schema der kodierenden Region (nt 198-1347) des *TP53*-Gens der cHL-Zelllinie L-428 mit einer Deletion von 33 bp in Exon 4**

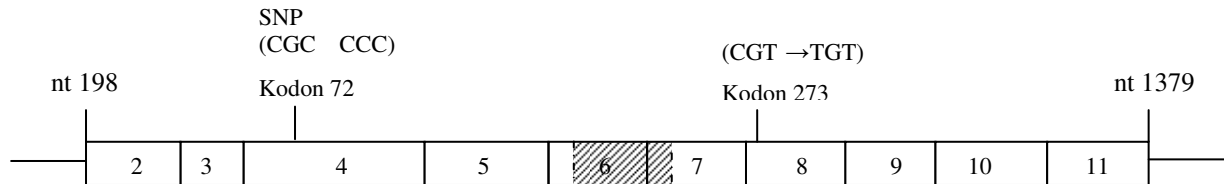


**Abbildung 14c: Schema der kodierenden Region (nt 198-1351) des *TP53*-Gens der cHL-Zelllinie L-1236 mit einem um 28 bp verkürzten Exon 10 bei Missense Sequenz des gesamten Exon 10**

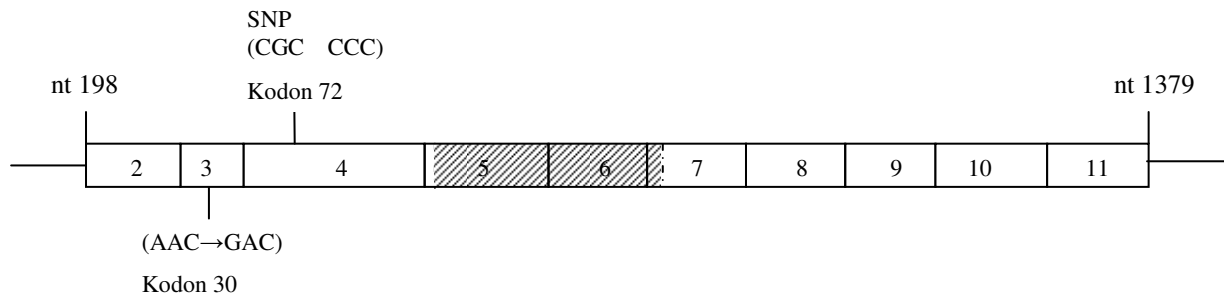




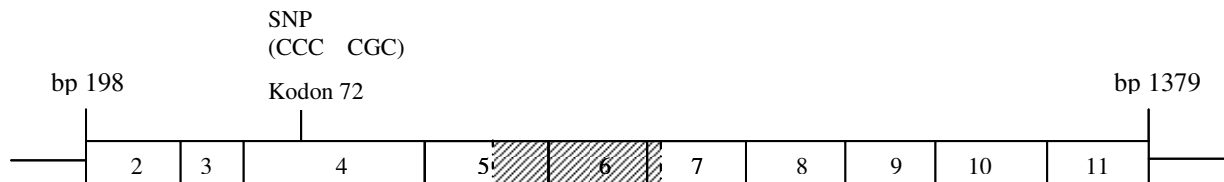
**Abbildung 14d:** Schema der kodierenden Region (nt 198-1379) des *TP53*-Gens der cHL-Zelllinie KM-H2



**Abbildung 14e:** Schema der kodierenden Region (nt 198-1379) des *TP53*-Gens der DLBCL-Zelllinie SU-DHL4 Der schraffierte Bereich der *TP53*-RNA ließ sich durch die Sequenzierung nicht darstellen.



**Abbildung 14f:** Schema der kodierenden Region (nt 198-1379) des *TP53*-Gens der CLL-Zelllinie EHEB Der schraffierte Bereich der *TP53*-RNA ließ sich durch die Sequenzierung nicht darstellen.



**Abbildung 14g:** Schema der kodierenden Region (nt 198-1379) des *TP53*-Gens der DLBCL-Zelllinien Ly-3/Ly-10 Der schraffierte Bereich der *TP53*-RNA ließ sich durch die Sequenzierung nicht darstellen.

Bei den jeweiligen Lymphom-Entitäten bzw. Lymphom-Zelllinien zeigten sich dabei folgende Korrelationen von TP53-Protein- und *TP53*-RNA-Ebene:

Bei der cHL-Zelllinie L-1236 kann aus der fehlenden Übereinstimmung der *TP53*-Sequenz mit der *TP53*-Referenz-Sequenz ab Exon 10 und der Verkürzung um 28 bp das deutlich trunkierte TP53-Protein resultieren.

Ebenso korrelierte die Deletion von 33 bp in der DNA-Bindungsdomäne des *TP53*-Gens der cHL-Zelllinie L-428 mit dem geringfügig trunkierten TP53-Protein.

Die cHL-Zelllinie KM-H2 zeigte ein TP53-Protein von 53 kDa sowie ein weiteres trunkiertes TP53-Protein. Diese Heterogenität bzw. Allel-spezifischen Unterschiede fanden sich wieder in

den unterschiedlichen Sequenzen aus dem Klonierungsprodukt mit einer Punktmutation einerseits und dem PCR-Produkt ohne Mutationen andererseits. Die *TP53*-PCR lieferte allerdings nur ein Produkt der erwarteten Größe von 1301 bp.

Die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 wies eine sehr starke Expression eines *TP53*-Proteins mit erwarteter Größe von 53 kDa auf. Das *TP53*-PCR-Produkt besaß ebenfalls die erwartete Größe. Eine Punktmutation in der DNA-Bindungsdomäne könnte zur Regulationsstörung und der damit verbundenen Überexpression des *TP53*-Proteins führen.

Die CLL-Zelllinie EHEB wies ein schwach exprimiertes *TP53*-Protein von 53 kDa und ein *TP53*-PCR-Produkt ebenfalls in der erwarteten Größe auf. Die Punktmutation in der Transaktivierungsdomäne könnte mit der gestörten *TP53*-Regulation korrelieren.

Die DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10 zeigten sowohl in der Darstellung auf der Protein-Ebene als auch auf der RNA-Ebene *TP53*-Produkte in den jeweils erwarteten Größen. Desweiteren fand sich bei beiden Zelllinien eine physiologische *TP53*-Regulation. Dementsprechend zeigten die *TP53*-Sequenzen der Zelllinien Ly-3 und Ly-10 keine Mutationen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 Deletionen im kodierenden Bereich des *TP53*-Gens und, daraus resultierend, trunkierte *TP53*-Proteine aufweisen. Die Heterogenität bzw. die Unterschiede der *TP53*-Allele der cHL-Zelllinie KM-H2 fanden sich sowohl in der *TP53*-Protein-Darstellung als auch in der *TP53*-Sequenz-Analyse. Die übrigen Zelllinien zeigten bei einer erwarteten *TP53*-Sequenz-Länge von 1181 bp entsprechend *TP53*-Proteine mit dem erwarteten Molekulargewicht von 53 kDa. Bei den NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und EHEB zeigte sich jeweils eine Punktmutation im kodierenden Bereich des *TP53*-Gens, die möglicherweise in Zusammenhang mit einer Fehlregulation des *P53*-Signalwegs stehen könnte.

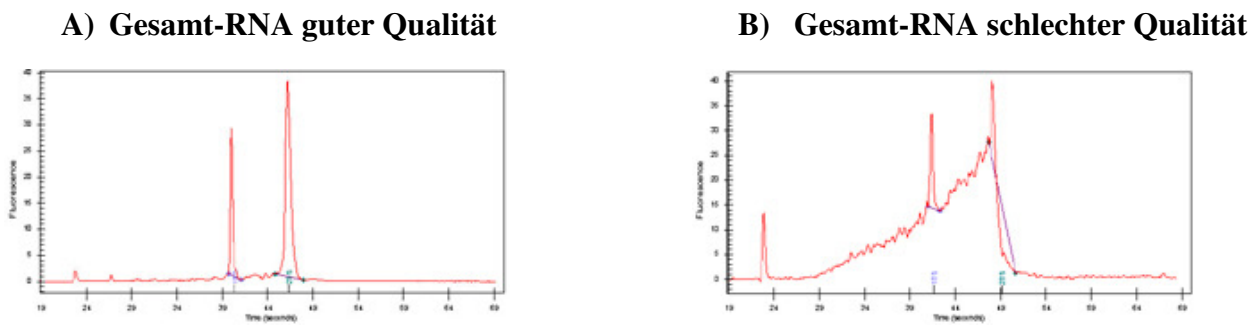
**Tabelle 9: Mutationen der TP53-Konsensus-Sequenzen verschiedener Lymphom-Zelllinien**

Zelllinie	Material	Mutationen (im Vergleich zur RefSeq NM546.4)	SNP	Bemerkung	TP53- Protein- Größe	TP53- PCR- Produkt- Länge
L-428	PCR- Produkt	del 33bp im Exon 4 Kodon 111 (DNA-Bindungsdomäne)	/		trunkiert	1149 bp
L-1236	PCR- Produkt	ab bp 1191 Missense Sequenz (DNA-Regulatordomäne)	/		trunkiert	1153 bp
KM-H2	PCR- Produkt	/	/		53 kDa + trunkiert	1181bp
	Klonie- rungs- produkt	Exon 5 Kodon 169 (ATG→GTG) (DNA-Bindungsdomäne)	/	ATG→GTG: AS Austausch M→V		
SU-DHL-4	Klonie- rungs- produkt	Exon 8 Kodon 273 (CGT →TGT) (DNA-Bindungsdomäne)	Exon 4 Kodon 72 CCC→CGC: AS Austausch P→R	CGT →TGT: AS Austausch R→C	53 kDa	1181bp
EHEB	PCR- Produkt	Exon 3 Kodon 30 (AAC→ GAC) (Transaktivierungsdomäne)	Exon 4 Kodon 72 CCC→CGC: AS Austausch P→R	AAC→ GAC: AS Austausch N→D	53 kDa	1181bp
Ly-3	Klonie- rungs- produkt	keine Mutation im untersuchten Bereich gefunden	Exon 4 Kodon 72 CCC→CGC: AS Austausch P→R	/	53 kDa	1181bp
Ly-10	PCR- Produkt	keine Mutation im untersuchten Bereich gefunden	Exon 4 Kodon 72 CCC→CGC: AS Austausch P→R	/	53 kDa	1181bp

Aufgeführt sind die Lokalisationen der Mutationen und SNP`s in den erstellten Konsensus-Sequenzen der drei cHL- und vier B-NHL-Zelllinien. Die Konsensus-Sequenz wurde abgeglichen gegen die Referenz-Sequenz NM546.4 des Tumorseitens TP53. **SNP**: *single nucleotide polymorphism*; **AS**: Aminosäure; **P**:Prolin; **R**: Arginin; **M**: Methionin; **V**: Valin; **T**: Threonin; **C**: Cystein; **N**: Asparagin; **D**: Aspartat; **Länge des kodierenden Bereiches des TP53-Gens**: 1181 bp; **Molekulargewicht des TP53-Proteins**: 53 kDa

### 3.5 Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA und cRNA für die Genexpressionsanalyse

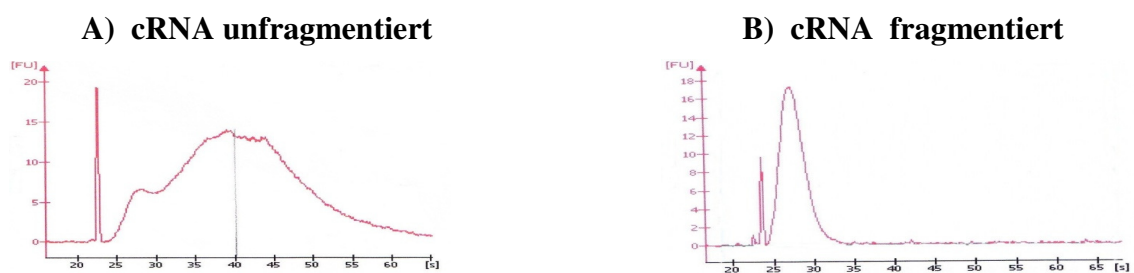
Vor der Aufarbeitung der RNA-Proben für die Affymetrix GeneChip-Hybridisierung wurden diese einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dies erfolgte durch kapillarelektrophoretische Auftrennung eines Aliquots der aus den sieben Zelllinien-Probenpaaren (unbestrahlt vs. bestrahlt) gewonnenen Gesamt-RNA im Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe 2.2.5). Alle Proben der Gesamt-RNA wiesen dabei die erwünschten 18S- und 28S-RNA-Peaks im Elektropherogramm auf, sowie Peak-Flächenratios um den Wert 2 und bestätigten somit ihre hochwertige Qualität. Degradierete RNA zeigt sich in Form von RNA-Abbauprodukten, die sich in zahlreichen unterschiedlich großen Fragmenten (Peaks) widerspiegeln. Dies war bei den hier eingesetzten Proben nicht der Fall, so dass die vorhandenen RNAs alle Qualitätskriterien für die weitere Aufarbeitung erfüllten. Beispielhaft ist in der Abbildung 15 das Bioanalyzer-Profil einer hochwertigen RNA-Probe dem Bioanalyzer-Profil einer degradierten RNA-Probe, wie sie in dieser Arbeit nicht verwendet wurde, gegenübergestellt.



**Abbildung 15: Beispielhafte Gegenüberstellung von qualitativ guter vs. qualitativ schlechter Gesamt-RNA im Agilent Bioanalyser (Kapillarelektrophorese)**

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Elektrophoresezeit. Profil A zeigt eine gute RNA-Qualität, mit deutlich erkennbaren 18S- und 28S-Peaks. Dagegen zeigt Profil B eine deutliche RNA-Degradation, erkennbar an vielen unterschiedlich großen Fragmenten.

Während der Aufarbeitung der isolierten Gesamt-RNA für die GeneChip-Hybridisierung wurde in der *in-vitro*-Transkription (IVT) markierte cRNA gewonnen, welche anschließend fragmentiert wurde (siehe 2.2.16.2). Auch die Qualität der markierten cRNA wurde sowohl vor und nach der Fragmentierung geprüft. Das Bioanalyser-Profil qualitativ hochwertiger cRNA entspricht einer Normalverteilung ähnlichen Kurve, die das erfolgreiche Umschreiben der in den Zellen vorliegenden unterschiedlich großen mRNAs widerspiegelt. Durch die anschließende Fragmentierung werden alle Produkte auf den gleichen Größenbereich eingestellt, um eine gleichmäßige Hybridisierungseffizienz zu erreichen. Das erhaltene Bandenmuster bzw. Bioanalyser-Profil aller Messungen zeigte die erfolgreiche IVT und Fragmentierung. Beispielhaft sind in der folgenden Abbildung das Bioanalyser-Profil einer unfragmentierten und einer fragmentierten cRNA-Probe abgebildet.



**Abbildung 16: Darstellung der cRNA vor und nach der Fragmentierung im Agilent Bioanalyser (Kapillarelektrophorese) am Beispiel der Probe L-1236-unbestrahlt**

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Elektrophoresezeit. Profil A zeigt das typische Bioanalyser-Profil der cRNA nach erfolgreicher IVT, d.h. vor der Fragmentierung, Profil B zeigt das typische Bioanalyser-Profil fragmentierter cRNA.

## **3.6 Expressionsänderung der durch DNA-Schädigung induzierten Gene in verschiedenen Lymphom-Zelllinien**

### **3.6.1 Ziele der Genexpressionsanalyse**

Die GeneChip-Analyse wurde eingesetzt, um detaillierte Informationen über potenzielle Störungen des P53-Signalwegs und der Regulation der Proliferation und der Apoptose in den verschiedenen Lymphom-Zelllinien zu erhalten. Dazu wurden die Zelllinien ionisierender Strahlung ausgesetzt, um mittels der dadurch entstehenden DNA-Schäden die an diesen Prozessen beteiligten Gene zu aktivieren. Dabei wurden die Genexpressionsdaten hinsichtlich folgender Schwerpunkte untersucht:

#### **1.) Erfassung der strahlungsinduzierbaren Gene verschiedener B-Zell-Lymphom-Zelllinien**

Mit der Möglichkeit den Expressionsstatus von 14.500 Transkripten für jede Probe mit einem Array zu betrachten (siehe 2.2.16.1), diente diese Methode einem nahezu transkriptomweiten Screening der Genregulation. Durch den Vergleich der Expressionsdaten der unbestrahlten und der bestrahlten Probe einer Zelllinie wurde für jede untersuchte Zelllinie genomweit beurteilt, welche Gene durch die Bestrahlung eine signifikante Expressionsänderung erfahren.

#### **2.) Assoziation der strahlungsinduzierbaren Gene mit dem P53-Signalweg**

Anschließend galt es zu beurteilen, welche der Gene mit einer strahlungsinduzierten Expressionsänderung mit dem P53-Signalweg assoziiert waren. Dadurch sollten potenzielle Störungen in der *TP53*-Regulation aufgezeigt werden.

#### **3.) Korrelation der Genexpressionsänderung mit der Expressionsänderung der Proteine TP53 und P21**

Zudem wurde geprüft, ob die strahlungsinduzierte Genexpressionsänderung einer Lymphom-Zelllinie auf mRNA-Ebene mit dem Proteinexpressionsverhalten von TP53 und P21 korreliert, d.h. ob sich die Ergebnisse der Westernblots durch die Genexpressionsdaten erklären lassen.

#### **4.) Gemeinsamkeiten der strahlungsinduzierten Genexpressionsänderung**

Schließlich wurde anhand der Genexpressionsdaten untersucht, welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Genregulation nach Anregung der DNA-Reparaturmechanismen zwischen den Zelllinien bestanden. Dementsprechend wurde versucht, die Zelllinien in

Gruppen zusammenzufassen oder wenn möglich, eine Gruppe von Genen zu identifizieren, deren Expressionsverhalten in diesen Gruppen übereinstimmt.

### **3.6.2 Qualitätsanalyse der Microarrays (GeneChips)**

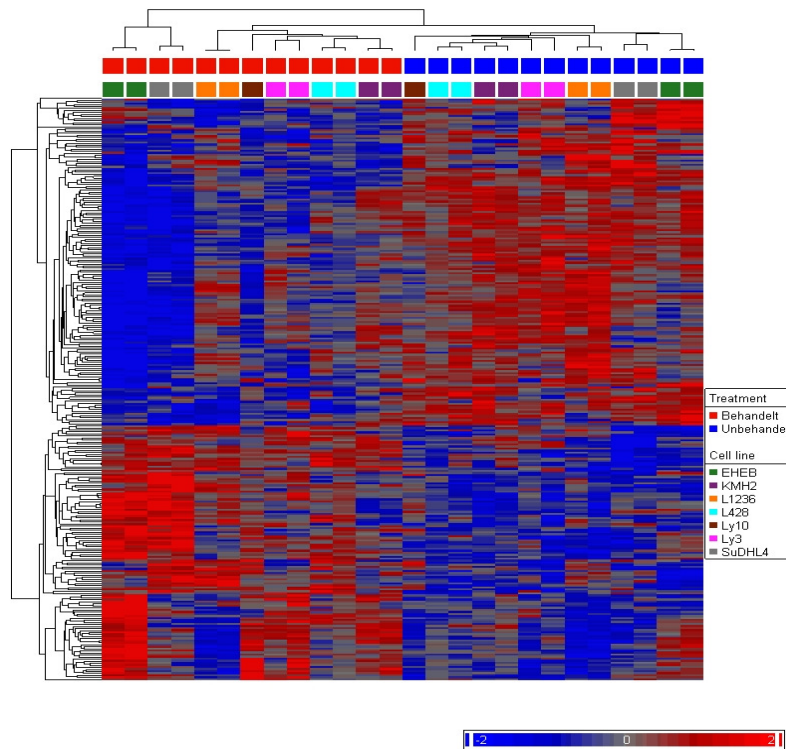
Für die Vergleichbarkeit der Genexpressions-Daten darf der *Scaling Factor* (siehe 2.2.16.6.2) innerhalb einer Versuchserie um nicht mehr als den Faktor 3 unterschiedlich sein. Diese Bedingung wurde stets eingehalten, so dass die Daten aller Gene-Chips untereinander vergleichbar waren.

Ein Parameter zum Prüfen unspezifischer Fluoreszenzen ist das durchschnittliche Hintergrund-Signal (*Average-Background*). Dieses sollte einen Wert zwischen 20-100 aufweisen. Die Werte der durchschnittlichen Hintergrund-Signale aller Arrays lagen zwischen 40 und 60 und befanden sich somit innerhalb der Toleranzgrenzen.

Die Anzahl der als positiv detektierten Transkripte (*Present Calls*, siehe 2.2.16.6.1) belief sich in allen untersuchten Proben auf etwa 50%. Somit erfüllten alle GeneChip-Experimente die erforderlichen Qualitätskriterien, so dass bei guter Datenqualität die Auswertung erfolgen konnte.

### **3.6.3 Auswahl und Funktionszuordnung der strahleninduzierten Gene**

Um generelle, also zelltypunabhängige, Genexpressionsänderungen durch die Bestrahlung zu identifizieren, wurden die differenziell exprimierten Gene zwischen allen bestrahlten und unbestrahlten Zelllinien mittels ANOVA ( $p=0.005$ ; siehe 2.2.16.6.3) bestimmt (Abb. 17).



**Abbildung 17: Darstellung der strahlungsinduzierten Genexpressionsänderungen der Zelllinien EHEB, KMH2, L1236, L428, Ly-10, Ly-3 und SUDHL4**

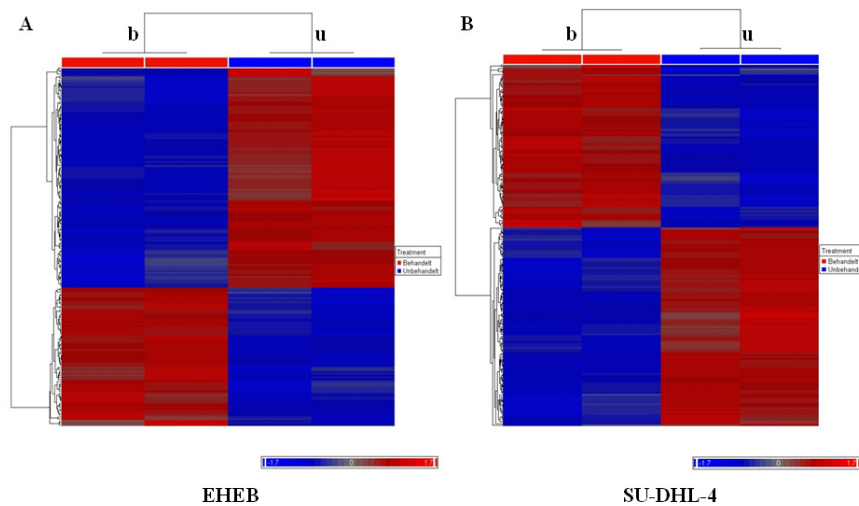
Darstellung der Proben in den Spalten: **links:** Anordnung der bestrahlten Zelllinien; **rechts:** entsprechende Anordnung der unbehandelten Zelllinien; ein Kästchen repräsentiert jeweils ein Gen; Anordnung der Gene in den Zeilen: **blau:** das Gen wird durch die Zellbestrahlung vermindert exprimiert; **rot:** das Gen wird durch Zellbestrahlung vermehrt exprimiert

Dabei wurden 285 Gene identifiziert, die interessanterweise sehr unterschiedlich starke Expressionsänderungen in den einzelnen Zelllinien zeigten. Während die Zelllinien EHEB und SU-DHL4 ausgeprägte Unterschiede im unbestrahlten und bestrahlten Zustand zeigten, wiesen z.B. die Zelllinien L-428 und KM-H2 nur geringe Unterschiede auf.

Um die zelltypspezifischen Unterschiede in der Genexpression durch die Bestrahlung ermitteln zu können, wurden die normalisierten Daten der verschiedenen Experimente verwendet und die Mehrfachmessung der bestrahlten und unbestrahlten Proben derselben Zelllinie jeweils gegenübergestellt (siehe 2.2.16.6.3). Berücksichtigt wurden nur Gene, die einen mindestens zweifachen *Fold Change* (= mindestens zweifache Änderung der Expressionsstärke) aufwiesen.

Dabei erwies sich der durch die Bestrahlung ausgelöste Effekt generell als gering. Die Anzahl der Gene, die durch die verursachte DNA-Schädigung eine mindestens zweifache Zunahme oder Abnahme ihrer Expressionsstärke aufwiesen, lag zwischen 64 (KM-H2) und 262 (Ly-3 + Ly-10). Der stärkste Effekt in der Genregulation trat bei der NHL-Zelllinie SU-DHL-4 auf. Diese Zelllinie wies 128 Gene mit mindestens 2-fachem, davon sogar 60 Gene mit mindestens 3-fachem, 34 Gene mit mindestens 4-fachem, 18 Gene mit mindestens 5-fachem und immer noch

11 Gene mit mindestens 9-fachem *Fold Change* auf. Ebenfalls ein deutliches Ansprechen auf die Bestrahlung zeigte die CLL-Zelllinie EHEB. Hier zeigten sich 107 Gene mit mindestens 2-fachem *Fold Change*. Von diesen Genen wiederum wiesen 36 Gene einen mindestens 3-fachen; davon 18 Gene einen mindestens 4-fachen und davon 8 Gene einen mindestens 5-fachen *Fold Change* auf.



**Abbildung 18: Darstellung der Strahlungs-induzierten Genexpressionsänderungen der Zelllinien EHEB (A) und SU-DHL-4 (B)**

**b:** bestrahlte Proben einer Zelllinie; **u:** unbehandelte Proben; ein Kästchen repräsentiert jeweils ein Gen; **blau:** das Gen wird durch die Zellbestrahlung vermindert exprimiert; **rot:** das Gen wird durch Zellbestrahlung vermehrt exprimiert

Für alle Gene, die eine mindestens 2-fache Änderung ihrer Expressionsstärke aufwiesen, wurde in verschiedenen Online-Datenbanken nach der Genfunktion recherchiert (siehe 2.2.16.6.6). Basierend darauf wurden die Gene anschließend in zwei Gruppen unterteilt. In der einen Gruppe wurden alle Gene zusammengefasst, die an der Regulation von Apoptose und Zellproliferation sowie DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Diese Gruppe wurde im Folgenden einer genaueren Betrachtung unterzogen. Die andere Gruppe bildeten alle übrigen Gene, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde.

Die nachfolgende Tabelle bietet für alle untersuchten Zelllinien einen Überblick über die Anzahl der strahlungsinduzierten oder -reprimierten Gene mit mindestens 2-facher Änderung ihrer Expressionsstärke und die Anzahl der davon an Zellzyklusregulationen, Apoptose und/oder DNA-Reparaturmechanismen beteiligten Gene sowie entsprechend die Anzahl der Gene mit anderer Funktion.



**Tabelle 10: Anzahl der Gene mit mindestens 2-fachem Expressionsunterschied**

Zelllinien	gesamt	beteiligt an Zellzyklus/ DNA-Reparatur/ Apoptose	andere Funktion
<b>L-428</b>	221	50	172
<b>L-1236</b>	225	47	174
<b>KM-H2</b>	64	24	40
<b>SU-DHL-4</b>	128	38	94
<b>EHEB</b>	107	32	75
<b>Ly-3/Ly-10</b> (gemeinsam ausgewertet)	262	92	180

Dargestellt ist für die drei cHL- und die vier verschiedenen B-NHL-Zelllinien die Anzahl der Gene, die durch IR + STS einen mindestens 2-fachen Expressionsunterschied aufwiesen und wie viele dieser Gene an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur oder der Apoptose beteiligt sind.

### **3.6.4 proliferations- und apoptoseassoziierte Gene**

Die auf diese Weise selektierten Gene, die an Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt sind, wurden anschließend weiter eingegrenzt. Entsprechend ihres Eingreifens in Proliferations- und Apoptoseregulationen wurden die Gene der folgenden vier Funktionen ausgewählt:

- 1.) Gene mit proliferationsfördernder Eigenschaft
- 2.) Gene mit antiproliferativer Eigenschaft
- 3.) Gene mit proapoptotischer Eigenschaft
- 4.) Gene mit antiapoptotischer Eigenschaft.

Anschließend wurde beurteilt, ob diese Gene in den vorliegenden Array-Untersuchungen durch die Bestrahlung physiologisch oder pathologisch reguliert waren. Eine physiologische Regulation bedeutet, die im Array detektierte Genantwort entspricht der Genfunktion, die für eine intakte Zelle beschrieben ist. Durch eine DNA-Schädigung werden physiologischerweise antiproliferative Gene induziert, um die Zellproliferation bei geschädigter DNA zu stoppen und die DNA-Reparatur zu veranlassen. Außerdem werden bei starker DNA-Schädigung proapoptotische Gene induziert, die den programmierten Zelltod einleiten, damit sich eine Zelle mit irreparablen DNA-Schaden nicht weiter vermehrt. Entsprechend werden proliferative und antiapoptotische Gene in ihrer Expression vermindert (*down-Regulation*). Demzufolge gilt eine Genregulation als pathologisch, wenn die Expression von proliferativen und antiapoptotischen Genen durch die Strahlung induziert wird.

Die Gene mit pro-/antiproliferativer bzw. pro-/antiapoptotischer Eigenschaft wurden daraufhin aufgrund ihrer Regulationsweise in zwei Gruppen eingeteilt:

**Gengruppe 1:**

Positive Regulation von Zellzyklusarrest-, DNA-Reparatur- und Apoptosegenen bzw. negative Regulation von proliferationsfördernden und apoptosehemmenden Genen

(antiproliferative und proapoptotische Gene↑; proliferative und antiapoptotische Gene↓)

⊕ Genregulation entspricht der physiologischerweise zu erwartenden Regulierung, die für eine gesunde Zelle beschrieben ist

**Gengruppe 2:**

Negative Regulation von Zellzyklusarrest-, DNA-Reparatur- und Apoptosegenen bzw. positive Regulation von proliferationsfördernden und apoptosehemmenden Genen

(proliferative und antiapoptotische Gene↑; antiproliferative und proapoptotische Gene↓)

⊖ Genregulation entspricht **nicht** der physiologischerweise zu erwartenden Regulierung, die für eine gesunde Zelle beschrieben ist

Anhand dieser Einteilung erfolgte die Bewertung der Genexpressionsdaten hinsichtlich physiologischer und pathologischer Genregulationen des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose und die daraus resultierenden Hinweise auf Pathomechanismen der verschiedenen Lymphomentitäten, insbesondere des klassischen Hodgkin-Lymphoms. Außerdem wurde für diese Gene ihre Assoziation zum *TP53*-Gen, als zentraler Regulator von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose, intensiv untersucht. Weiterhin wurde das Verhalten der beiden Gengruppen in den eingesetzten sieben Zelllinien auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Regulation ihrer Genexpression analysiert.

### ***3.6.5 proliferations- und apoptoseassoziierte Gene mit strahlungsinduzierter Expressionsänderung in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mit physiologischer TP53- und P21-Proteinexpression***

Die Zelllinien Ly-3 und Ly-10 zeigten durch die Bestrahlung eine physiologische Induktion der TP53- und P21-Proteinexpression. Beide Zelllinien entstammen der gleichen Lymphomentität (DLBCL vom ABC-Typ) und zeigten dementsprechend sehr ähnliche Genregulationsmuster. Daher wurden beide Zelllinien zusammengefasst ausgewertet. Dabei fiel auf, dass in diesen beiden Zelllinien von allen untersuchten Zelllinien die größte Anzahl zellzyklus- und apoptoseassoziiierter Gene der Gengruppe 1 (siehe 3.6.4) durch die Bestrahlung beeinflusst wurde. Ein großer Teil der strahlungsinduzierten Gene waren ATM- und ATR-induzierbare

Gene. Viele der stimulierten oder reprimierten Gene waren *TP53*-Zielgene und einige *P21*-Zielgene. Das deutet auf einen intakten ATM/ATR-P53-P21-Signalweg in dieser Lymphomentität hin. Zu den 22 strahlungsinduzierten *TP53*-Zielgenen gehörten u.a. die Zellzyklusarrestgene *P21*, *GADD45A* und *SESTRIN 1*, die proapoptotischen *TP53*-Zielgene *DRAM*, *TP53I3*, *BAX*, *DDIT4*, *FAS* und *KILLER/DR5* sowie das *TP53*-induzierbare DNA-Reparaturgen *DDB2*. Außerdem wurden das *TP53*-aktivierende Gen *PCAF*, das Tumorsuppressorgen und NFκB-Inhibitor *A20* sowie drei weitere *TP53*-unabhängige Zellzyklusarrest- und acht *TP53*-unabhängige, proapoptotische Gene z.B. *CASPASE 1* und *TNFSF9* induziert.

Durch die Zellbestrahlung in ihrer Expression vermindert zeigten sich 25 proliferationsfördernde Gene unter anderem *E2F5*, *CDC20*, *AURORA KINASE A* und *B*, die *TP53*-Inhibitoren *MYC* und *PBK* sowie die proliferationsfördernden *P21*-Zielgene *CYCLIN B1* und *B2*. Zudem wurde das apoptosehemmende Gen *SURVIVIN* und der antiapoptotische *TP53*-Inhibitor *PTTG1* in seiner Expression verringert.

Diese zellzyklus- und apoptoseassoziierten Gene sowie *TP53*-Zielgene, die entscheidend an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind, wiesen eine physiologische Genregulation auf. Das deutet darauf hin, dass keine Störung in der *TP53*-assoziierten Regulation des Zellzyklus und der Apoptose vorlag und korreliert mit der strahlungsinduzierten Zunahme der *TP53*- und *P21*-Proteinexpression in diesen Zelllinien.

Hinsichtlich der pathologischen Genregulierung zeigten die DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10 einige Gemeinsamkeiten zu den verschiedenen cHL-Zelllinien. Zu den übrigen Zelllinien bestanden keine Ähnlichkeiten in der Genregulierung. Neben der physiologischen Regulation einer großen Anzahl zellzyklus- und apoptoseassoziiierter Gene, *TP53*-Targetgene und einiger *P21*-Targetgene zeigten sich Fehlregulationen anderer an Zellzyklus und Apoptose beteiligten Gene. Dazu zählten die Induktion der proliferationsfördernden Gene *ID2/ID2B* und *JUN* (wie bei der cHL-Zelllinie L-428), *TNFSF4* (wie bei der cHL-Zelllinie KM-H2), des von p21 inhibierbaren Gens *Cyclin E2*, und die down-Regulierung des proliferationshemmenden Gens *CDKN3*. Weiterhin kam es zur pathologischen Induktion der die Apoptose hemmenden Gene *AMIGO2*, *CD44*, *FLIP* und, wie bei der cHL-Zelllinie KM-H2, des unmittelbaren *TP53*-Gegenspielers *MDM2* sowie zur einer pathologischen Expressionsverminderung der die Apoptose induzierenden Gene *BNIP3* (wie bei der cHL-Zelllinie KM-H2), *PRKCA* (wie bei der cHL-Zelllinie L-428) und *STK17B*.

Somit scheint einerseits der *ATM-P53-P21*-Signalweg in diesen beiden Zelllinien intakt, doch andererseits zeigten sich einige zellzyklus- und apoptoseassoziierten Gene fehlreguliert. Diese sind

möglicherweise in die Pathogenese oder eventuelle Therapieresistenz involviert. Besonders interessant ist dabei die Induktion des Onkogens *JUN*, des *TP53*-Gegenspielers *MDM2*, des Apoptoseinhibitors *FLIP*, des proliferationsfördernden *Cyclin E2* und die Expressionsverminderung des BCL-2-Familienmitglieds und Tumorsuppressorgens *BNIP3*, da diese entscheidenden Einfluss auf die Regulation von Proliferation und Apoptose haben.

### **3.6.6 proliferations- und apoptoseassoziierte Gene mit strahlungsinduzierter Expressionsänderung in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mit unphysiologischer TP53- und P21-Proteinexpression**

Unphysiologische TP53- und P21-Protein-Expressionsmuster ohne adäquate Induktion durch Bestrahlung zeigten die cHL-Zelllinien und die B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4 und EHEB.

Auf der Ebene der Regulation zellzyklus- und apoptoseassoziiierter Gene fanden sich zwischen den cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 Gemeinsamkeiten. Die cHL-Zelllinie KMH2 und die untersuchten B-NHL-Zelllinien wiesen dagegen andere Muster der Genregulation auf.

Insgesamt wurden 13 Gene gefunden, die in den beiden cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 auf die gleiche Weise reguliert waren. Von diesen 13 Genen sind sechs Gene der Gruppe 1, der physiologisch regulierten Gene, zuzuordnen. Diese sechs Gene umfassen u.a. die Induktion der proapoptotischen, TP53-unabhängigen Gene *RHOB* und *PHLDA1* sowie die *down*-Regulation des antiapoptotischen, TP53-inhibierenden Gens *SKP2*.

Bei einzelner Betrachtung der cHL-Zelllinien zeigte die Zelllinie L-1236 zudem die physiologische Induktion fünf weiterer proapoptotischer, TP53-unabhängiger Gene (z.B. *TNFRSF9* und *PSENFEN*). Außerdem wurden drei Zellzyklusarrest veranlassende Gene stimuliert, die ebenfalls einer physiologischen Regulation entsprachen. TP53-Targetgene wurden bei dieser Zelllinie nicht induziert.

Neben der physiologischen Induktion von verschiedenen proapoptotischen Genen kam es andererseits zur pathologischen Induktion von apoptosehemmenden Genen wie *BCL2A1*, *BCL2L1* (wie bei der cHL-Zelllinie KMH2 und der DLBCL-Zelllinie SUDHL-4), *MCL1* und *ARHGDI1* sowie zur unphysiologischen *down*-Regulation der proapoptischen Gene *MX1*, *RBM25*, *TIA1*, *PHLPP* und *STAT1*. Auch das DNA-Reparaturgen *BRCA2* lag in seiner Expression vermindert vor. Fehlregulierte zellzyklusassoziierte Gene waren in dieser Zelllinie die *down*-regulierten, proliferationshemmenden Gene *IFIT3*, *IFIT2*, *SMPD3* und *SMAD1* sowie

die heraufregulierten, proliferationsfördernden Gene *KLF6*, *FZR 1* und das von P21 inhibierbare Gen *Cyclin D2*.

Der Gengruppe 1 entsprechend wurden auch bei der Zelllinie L-428 sechs weitere proapoptotische Gene physiologischerweise stimuliert. Dazu zählten z.B. das TP53-unabhängige *KROX-20* aber auch die proapoptotischen TP53-Targetgene *DUSP2* und *DDIT4* sowie das TP53-induzierende *GADD34*. Zudem zeigten die TP53-induzierenden Zellzyklusarrestgene *CDKN2AIP* und *ETS2* sowie weitere acht TP53-unabhängige Zellzyklusarrestgene und ein DNA-Reparaturgen eine physiologische Expressionszunahme.

Hinsichtlich der pathologisch regulierten Gene wies die Zelllinie L-428 auch vier gemeinsam fehlregulierte Gene mit den DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10 auf. Einer pathologischen Induktion unterlagen bei dieser Zelllinie die proliferationsfördernden Gene *ID2* und *JUN* (wie bei Ly3, Ly-10), *KLF6* und der TP53-Inhibitor *JUND* (wie bei L-1236) sowie *RGS2*, *CDC37L1*, *CyclinL1*, *IER2* und *MYB*. Zudem waren die apoptosehemmenden Gene *BCL2A1* (wie bei L-1236) und *TRAF1* heraufreguliert. Außerdem erfolgte bei dieser Zelllinie eine *down*-Regulation der proliferationshemmenden Gene *IFIT3* (wie bei L-1236) und *MTUS1* sowie der apoptoseinduzierenden Gene *PRKCA* und *AK2* (wie bei Ly-3, Ly-10) und *MXI* (wie bei L-1236). Die cHL-Zelllinie KM-H2 zeigte die geringste Reaktion auf die Zellbestrahlung. Nur 64 Gene wiesen eine mindestens 2-fache Änderung ihrer Expressionsstärke auf. Gemeinsamkeiten hinsichtlich der physiologischen, strahlungsinduzierten Genregulation besaß die cHL-Zelllinie KM-H2 vor allem mit den DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10. Beide Lymphomentitäten wiesen 11 gleichartig regulierte Gene auf, die in den Zellzyklus oder die Apoptose eingreifen. Zu diesen zählt die physiologische Induktion von TP53-Targetgenen, die den Zellzyklusarrest vermitteln, wie *WIP1*, *SESTRIN 1* und *BTG2*, die die Apoptose einleiten, wie *BAX* und *TNFRSF10B*, das TP53-induzierte DNA-Reparaturgen *DDB2* sowie die durch TP53 verminderte Genexpression der Gene *Cyclin E2* (über TP53-P21 inhibiert) und *CA9*.

Im Gegensatz dazu waren bei der Zelllinie KM-H2 nur wenige Gene pathologisch reguliert. In dieser Hinsicht fanden sich ebenfalls Gemeinsamkeiten zu den DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10. Neben der unphysiologischen Induktion des proliferationsfördernden Gens *STAT4* zeigte sich in allen drei Zelllinien eine pathologische Induktion des proliferativ wirkenden Gens *TNFSF4*, des unmittelbaren TP53-Gegenspielers *MDM2* sowie die pathologische Expressionsverminderung des apoptoseinduzierenden BCL-2-Familienmitglieds und Tumorsuppressorgens *BNIP3*. Außerdem kam es bei der Zelllinie KM-H2, wie auch bei der cHL-Zelllinie L-1236 und der DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4, zu einer unphysiologischen Induktion des apoptosehemmenden Gens *BCL2L1*.

Als Gemeinsamkeit aller drei cHL-Zelllinien wurde das antiproliferative, proapoptotische DNA-Reparaturgen UNG (Uracil-DNA-Glykosylase) pathologisch in seiner Expression vermindert.

Auffällig war, dass bei dem Versuch, durch die Zellbestrahlung TP53-Targetgene zu induzieren, in allen cHL-Zelllinien Gene verstärkt exprimiert wurden, die in den HRS-Zellen bereits konstitutiv überexprimiert vorliegen und zur Deregulation verschiedener Signalwege beitragen. Bei der Zelllinie L-428 war dies die noch weiter verstärkte Induktion der Gene *ATF3* und *ID2*. Das *ATF3*-Gen ist ein stressinduziertes Gen und das *ID2*-Gen wirkt proliferationsfördernd. Bei den Zelllinien L-428 und L-1236 betraf dies die strahlungsinduzierte vermehrte Induktion des proliferationsfördernden Gens *API* bzw. seiner Bestandteile *JUN*, *JUND* und *JUNB* gemeinsam. Auch *API* liegt in HRS-Zellen überexprimiert vor (4) (9). Weiterhin fiel in der Zelllinie L-1236 eine strahlungsbedingte *down*-Regulierung des *NFκB*-Inhibitors *A20* auf. Dies kann man als Bestätigung werten, dass die bereits bekannten deregulierten Signalwege in die Apoptose-Unterdrückung in HRS-Zellen involviert sind.

Erwähnenswert ist zudem - wenn auch das Interesse der Arbeit in der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und P53-Signalweg liegt - dass in allen drei cHL-Zelllinien zum großen Teil immunmodulatorische Gene durch die Bestrahlung reguliert wurden, wie Interleukine, Interferone, Chemokine und T-Zell-regulatorische Gene.

Die Unterschiede der Genexpressionsergebnisse zwischen den drei cHL-Zelllinien spiegeln die Heterogenität der Erkrankung wider. Die Gemeinsamkeiten in der Regulation strahlungsinduzierter und -reprimierter Gene zwischen den Zelllinien L-1236 und L-428 zeigen sich auch in den Ergebnissen der TP53- und P21-Proteinexpression und der *TP53*-Sequenzanalyse. Beide Zelllinien weisen Defektmutationen im *TP53*-Gen auf und bei beiden Zelllinien lassen eine fehlende TP53-Proteinzunahme sowie eine ausbleibende P21-Proteinexpression auf einen TP53-Funktionsverlust schließen. Damit übereinstimmend zeigen beide Zelllinien eine fehlende bzw. eine nur vereinzelte Induktion von *TP53*-Targetgenen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proteinexpression und der *TP53*-Sequenzanalyse zeigte die cHL-Zelllinie KM-H2 auch in der Genexpressions-Regulierung weniger Gemeinsamkeiten mit den beiden anderen cHL-Zelllinien als mit den beiden DLBCL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10. Die cHL-Zelllinie KM-H2, bei der ein *TP53*-Wildtyp nachgewiesen wurde, zeigte eine physiologische Induktion antiproliferativer und proapoptotischer Gene, unter denen sich einige *TP53*-Targetgene befanden sowie die Expressionsverminderung proliferationsfördernder Gene. Diese zwar physiologische, aber insgesamt schwach ausgeprägte, strahlungsinduzierte Änderung der Genexpression findet sich in der Proteinexpression wieder.

Auch dort zeigte sich eine physiologische, aber nur geringe Reaktion auf die Zellbestrahlung mit einer schwachen Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression, die jedoch deutlich geringer ausfiel als bei den Zelllinien Ly-3 und Ly-10.

Die Fehlregulation diverser Gene der Zelllinien L-428 und L-1236, bei denen ein mutiertes *TP53*-Gen vorliegt, weist insgesamt auf eine stärker gestörte Zellzyklus- und Apoptoseregulation hin als bei der Zelllinie KM-H2 mit einem *TP53*-Wildtyp, bei der nur wenige Gene pathologisch reguliert waren. Dennoch kam es bei allen cHL-Zelllinien gemeinsam zur Induktion der entscheidend zur Apoptoseinhibition betragenden Gene *BCL2L1* (L-1236, KM-H2) und *BCL2A1* (L-1236, L-428) sowie zur Expressionsverminderung des apoptoseinduzierenden Tumorsuppressorgens *BNIP3* (KM-H2). Die Fehlregulierung dieser drei BCL-2-Familienmitglieder weist auf eine mögliche Störung in der BCL-2 Familie hin, die zu einem Apoptosedefekt führen kann. Im Gegensatz zur cHL-Zelllinie KM-H2 zeigten die cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 außerdem eine strahlungsinduzierte Stimulation von Zyklinen (Zyclin D2 (L-1236); Zyclin L1 (L-428)), welche wichtige Proliferations-fördernde Gene sind und über TP53-P21 bei DNA-Schädigung gehemmt werden. Korrelierend mit der fehlenden Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression und dem Nachweis von *TP53*-Mutationen ist dies ein weiterer Hinweis für die gestörte TP53-Funktion in diesen Zelllinien.

Die CLL-Zelllinie EHEB und die DLBCL-Zelllinie SU-DHL4, welche neben den cHL-Zelllinien ebenfalls eine unphysiologische TP53- und P21-Proteinexpression ohne adäquate Induktion durch Bestrahlung zeigten, wiesen als Gemeinsamkeit zehn gleichartig regulierte Gene auf. Zu den übrigen Zelllinien zeigten diese beiden Zelllinien keine Gemeinsamkeiten in der Genexpression. Von diesen zehn gemeinsam regulierten Genen unterlag die Hälfte der Gene einer physiologischen Regulierung. Zu diesen gehörten die Expressionsverminderung der proliferationsfördernden Gene *WDR77*, *NOLC1*, *CSE1L* und *DKC1*. Die andere Hälfte der Gene war pathologisch reguliert. Zu diesen zählten die *down*-Regulierung der proapoptotischen, *TP53*-induzierenden Gene *EEF1E1* und *GNL3*, des DNA-Reparaturgens *SFPQ* sowie die Induktion des Apoptose-Inhibitors *BIRC2* (*cIAP1*).

Bei der Zelllinie EHEB wurden sieben weitere proliferationsfördernde Gene physiologischerweise in ihrer Expression vermindert wie *CDC25A*, *CDC6* und *IGF1* sowie das antiapoptotische Gen *TXNDC5*. Jedoch wurden bei dieser Zelllinie kein einziges proapoptotisches Gen, keine TP53-Targetgene und nur zwei Zellzyklusarrest vermittelnde Gene (*CDKN1C* und *GAS2L1*) induziert.

Zudem zeigte die CLL-Zelllinie EHEB eine pathologische Induktion der proliferationsfördernden Gene *REL*, *TYMP* und *PGF* sowie eine unphysiologische *down*-Regulierung der

proapoptotischen Gene *PDCD11* und *PTRH2* sowie der DNA-Reparaturgene *XRCC5* und *DTL*. Obwohl bei der Zelllinie EHEB im Vergleich zu allen untersuchten Zelllinien der zweitstärkste Unterschied in der Genexpression durch die Zellbestrahlung herbeigeführt wurde, waren unter diesen regulierten Genen nur wenige und hauptsächlich unspezifische zellzyklus- und apoptose-assoziierte Gene. Zudem wurde kein einziges TP53-Targetgen induziert und TP53-stimulierende Gene wurden herunter reguliert. Daraus lässt sich schließen, dass der P53-Signalweg stark gestört ist und massive Einschränkungen in der Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest vorliegen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der Proteinexpression, welche eine pathologische, konstitutive P21-Überexpression und eine fehlende strahlungsinduzierte Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression zeigten.

Bei der DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 wurden physiologischerweise neun Gene induziert, die nach DNA-Schädigung den Zellzyklusarrest vermittelten, als bei der CLL-Zelllinie EHEB, darunter auch die zwei TP53-Zielgene *DUSP2* und *GADD45A*. Zudem kam es zu einer 11-fachen Expressionszunahme des proapoptotischen TP53-Zielgens *LITAF*.

Zwar wurden bei der Zelllinie SU-DHL-4 einige proliferationshemmende Gene mehr induziert als bei der Zelllinie EHEB und auch vereinzelt TP53-Targetgene, jedoch weit weniger als bei den Zelllinien Ly-3 und Ly-10 (DLBCL vom ABC-Typ), bei denen der P53-Signalweg intakt scheint. Die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 (GCB-Typ) wies zusätzlich zu den mit der Zelllinie EHEB gemeinsam fehlregulierten Genen eine pathologische Induktion folgender proliferationsfördernder Gene auf: *CD69*, welches mit über 50-facher Expressionszunahme das am stärksten induzierte Gen war sowie *IL2RA*, *TACCI*, *CD40* und *RHOG*. Zudem fiel eine pathologische Induktion der apoptosehemmenden Gene *BCL2L1* (wie bei L-1236, KM-H2), *BIRC3*, *PIK3CA* und *NFKB1* auf. Wie die CLL-Zelllinie EHEB zeigte die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien kaum Gemeinsamkeiten. Auch zu den anderen DLBCL-Zelllinien (Ly-3 und Ly-10) fanden sich insgesamt nur drei gleich regulierte Gene, die in den Zellzyklus und die Apoptose eingreifen. Die starke Induktion von proliferationsfördernden Genen sowie von entscheidenden Apoptosehemmern steht der Induktion von Zellzyklusarrest vermittelnden Genen und von nur zwei proapoptotischen Genen entgegen. Dadurch scheint die Einleitung des Zellzyklusarrests und der Apoptose gestört. Möglicherweise trägt bei dieser Zelllinie der scheinbar beeinträchtigte P53-Signalweg mit insgesamt nur drei strahlungsinduzierten TP53-Targetgenen und fehlender P21-Induktion bei konstitutiver TP53-Proteinüberexpression dazu bei.



In den folgenden Tabellen sind zunächst alle physiologisch regulierten, strahlungsinduzierten Gene der untersuchten Zelllinien zusammengefasst. Anschließend sind alle pathologisch regulierten Gene mit jeweils einer kurzen Funktionsbeschreibung aufgeführt.

**Tabelle 11: strahlungsinduzierte, physiologisch regulierte, zellzyklus-, DNA-Reparatur- und apoptoseassoziierte Gene**

	<b>Physiologisch regulierte Gene (Gengruppe 1)</b>				
<b>Zelllinie</b>	<b>proliferations-hemmend↑</b>	<b>proliferations-fördernd↓</b>	<b>apoptose-induzierend↑</b>	<b>apoptose-hemmend↓</b>	<b>DNA-Reparatur↑</b>
<b>Ly-3/Ly-10</b>	P21, GADD45A, SESN1, WIP1, ZMAT3, TRIAP1, IGFBP4, TOB1, BTG2, PCAF	AURKB, NOLC1, PA2G4, KIF23, CEP55, PBK, E2F5, UBE2C, DLGAP5, TPX2, CDCA3, VEGFA, AURKA, TNFRSF17, CENPF, KIF14, CENPE, TCL1A, NEK2, ZyklinB2, ASPM, MYC, CDC20, PLK1 ZyklinB1	DRAM, TP53I3, BAX, DDIT4, FAS, PLSCR1, KILLER/DR5, PLAGL1, LRDD, Caspase1, HIST1H2BD, TNFSF9, PYCARD, SOS2, RPS27L, GCH1, PIG10	PTTG1, SURVIVIN	DDB2, XPC
<b>L-428</b>	EGR2, DUSP1, TXNIP, BTG1, CDKN2AIP, RHOH, SPRED2, ETS2, LIN37, DDIT3, TSC22D3	CSF1, HERC5, SPC25	PHLDA1, RHOB, PPP1R15A, STK17B, DUSP2, SOS2, DDIT4, ING3	SKP2	SFPQ, CEBPG
<b>L-1236</b>	GPR132, GAS7, HSF1, TSC22D3, NEDD9	NEDD9	PRKCE, RHOB, SOS2, STK17B, SPTAN1, PHLDA1, TNFRSF9, PSENNEN, DAPK3	SKP2, PIK3R1, CITED2	
<b>KM-H2</b>	WIP1, SESN1, BTG2, GNG4	CSF2, S100A4, CSR2, Zyklin E2, CA9, CXCL10	BAX, KILLER/DR5		DDB2
<b>EHEB</b>	CDKN1C	WDR77, NOP2, FBXO5, CDC25A, CDC6, IGF1, CSE1L, NOLC1, DKC1		TXNDC5	
<b>SU-DHL-4</b>	DUSP2, DUSP22, GADD45A, ZEB1, RASSF1, DNAJB2, DUSP8	WDR77, ODC1, BCAT1, NOLC1, CSE1L, DKC1	LITAF, RIPK2		UBE2A, MCPH1

Aufgelistet sind für die drei cHL-Zelllinien und die vier B-NHL-Zelllinien die Gene, die mit dem Zellzyklus, der DNA-Reparatur oder der Apoptose assoziiert sind, eine mindestens 2-fache Änderung ihrer Expressionsstärke aufwiesen und einer physiologischen Regulation (Gengruppe 1) unterlagen.

↑: Zunahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung;

↓: Abnahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung;

**Tabelle 12: Gene mit pathologischer Änderung der Expression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Bestrahlung von Zelllinien**

Zelllinie	Fehl-regulierte Gene	Fold-Change	Physiologische Funktion des Gens		Gleichartige Gen-regulation in Zelllinie
<b>L-428</b>	MTUS1 ↓	-2,0	proliferations-hemmend	TSG; ERK2-Hemmung	
	IFIT3 ↓	-2,2		Interferonwirkung	L-1236
	RGS2 ↑	3,5	proliferations-fördernd	GTPase; G0/G1-Übergang	
	ID2 ↑	2,9		B-Zell-Differenzierung	Ly-3, Ly-10
	JUN ↑	2,8		Mitglied des AP-1-Komplexes reguliert Zellzyklusproteine: stimuliert Zyklin D1: G S; hemmt TP53, P21, p19ARF, p16	Ly-3, Ly-10
	JUND ↑	2,1		Mitglied des AP-1-Komplexes; hemmt TP53	L-1236
	JUNB ↑	2,1		Mitglied des AP-1-Komplexes; stimuliert Zyklin D1: G S	
	CDC37L1 ↑	2,6		Zellzyklus-stimulierend	
	KLF6 ↑	4,1		B-Zellwachstum	L-1236
	Zyklin L1 ↑	2,0		Zellzyklus-stimulierend; wird durch P21 gehemmt	
	IER2 ↑	3,5		Proto-Onkogen; wird durch Wachstumsfaktoren induziert	
	MYB ↑	2,9		Lymphozyten-Entwicklung	
	PRKCA ↓	-2,1	apoptose-induzierend	hemmt die MAPK-Aktivität	Ly-3, Ly-10
	MX1 ↓	-2,2		GTPase	L-1236
	AK2 ↓	-2,3		Komplexbildung mit FADD & Caspase-10	Ly-3, Ly-10
	BCL2A1 ↑	2,7	apoptose-hemmend	blockt Caspaseaktivität; hemmt die TP53-induzierte Apoptose	L-1236
	TRAF1 ↑	2,4		hemmt TNF-Signalweg; aktiviert NFκB und JNK; rekrutiert die Apoptose-Suppressoren BIRC2 & BIRC3	
	UNG ↓	-2,0	DNA-Reparatur	induziert ZZ-Arrest & Apoptose	L-1236, KM-H2
		SMPD3 ↓	-2,1	proliferations-hemmend	bildet ZZ-Arrest- & Apoptose-vermittelnde Ceramide
SMAD1 ↓		-2,2	TGFβ-Signalweg		
IFIT3 ↓		-3,1	Interferon-Wirkung		L-428
IFIT2 ↓		-2,1	Interferon-Wirkung		
Zyklin D2 ↑		2,1	proliferations-fördernd	fördert G1 S-Übergang; wirkt zusammen mit CDK4/CDK6	
FZR1 ↑		2,2		aktiviert APC-Komplex	
KLF6 ↑		3,0		B-Zellwachstum	L-428
JUND ↑		2,5		Mitglied des AP-1-Komplexes; hemmt TP53	L-428
RBM25 ↓	-2,0	apoptose-induzierend	stimuliert die proapoptische BCL2L1 Isoform S		

<b>L-1236</b>	TIA1 ↓	-2,1		FAS-Regulierung; DNA-Fragmentierung	
	PHLPP ↓	-2,6		inaktiviert AKT	
	STAT1 ↓	-2,6		Caspase-Aktivierung	
	MX1 ↓	-2,9		GTPase	L-428
	BCL2A1 ↑	4,0	apoptose-hemmend	blockt Caspaseaktivität; hemmt die TP53-induzierte Apoptose	L-428
	BCL2L1 ↑	3,1		blockt Caspaseaktivität	KM-H2, SU-DHL-4
	MCL1 ↑	2,8		antiapoptotisches BCL-2-Familienmitglied	
	ARHGDI1 ↑	2,5		Austausch von RHO-Proteinen	
	UNG ↓	-2,2	DNA-Reparatur	induziert ZZ-Arrest & Apoptose	L-428, KM-H2
BRCA2 ↓	2,4		Doppelstrang-Reparatur		
<b>KM-H2</b>	DLEU2 ↓	-2,4	proliferations-hemmend	TSG; häufige Deletion in CLL	
	STAT4 ↑	2,7	proliferations-fördernd	IL-12-Signalweg	
	MDM2 ↑	2,2		bindet und inaktiviert TP53	Ly-3, Ly-10
	TNFSF4 ↑	2,0		stimuliert T-Zell-Proliferation	Ly-3, Ly-10
	BNIP3 ↓	-2,4	apoptose-induzierend	unterdrückt antiapoptotisches BCL-2-Protein	Ly-3, Ly-10
	BCL2L1 ↑	2,1	apoptose-hemmend	blockt Caspaseaktivität	L-1236, SU-DHL-4
	UNG ↓	-2,2	DNA-Reparatur	induziert ZZ-Arrest & Apoptose	L-1236, L-428
<b>Ly-3/ Ly-10</b>	CDKN3 ↓	-2,4	proliferations-hemmend	CDK2-assoziierte Phosphatase	
	ID2 ↑	3,4	proliferations-fördernd	B-Zell-Differenzierung	L-428
	TNFSF4 ↑	2,6		stimuliert T-Zell-Proliferation	KM-H2
	JUN ↑	2,4		Mitglied des AP-1-Komplex reguliert Zellzyklusproteine: stimuliert Zyklin D1: G <sub>1</sub> S; hemmt TP53, P21, P19ARF, P16	L-428
	Zyclin E2 ↑	2,17		fördert G <sub>1</sub> S-Übergang; wirkt zusammen mit CDK2; wird von P21 gehemmt	
	EPS8 ↑	2,2		RAS- & EGF-Signaltransduktion	
	BNIP3 ↓	-2,0	apoptose-induzierend	unterdrückt antiapoptotisches BCL-2-Protein	KM-H2
	MGC29506 ↓	-2,0		interagiert mit Caspase-2 und -9	
	PRKCA ↓	-2,1		hemmt die MAPK-Aktivität	L-428
	STK17B ↓	-2,3		Serine/Threonine-Kinase	
	AMIGO2 ↑	2,6	apoptose-hemmend	Tumorgenese von Adenokarzinomen	
	CD44 ↑	2,1		Positive Regulierung von ERK1 und ERK2; Hämatopoese	
	FLIP ↑	2,1		Caspase-8-Inhibitor; hemmt TNFRSF6-vermittelte Apoptose	
	MDM2 ↑	2,0		bindet und inaktiviert TP53	KM-H2

<b>EHEB</b>	GMNN ↓	-2,1	proliferations- hemmend	hemmt ZZ & DNA-Replikation	
	REL ↑	3,1	proliferations- fördernd	Mitglied der NFκB-Familie	
	TYMP ↑	2,1		Wachstumsfaktor; Purinmetabolismus	
	PGF ↑	2,0		Wachstumsfaktor	
	PDCD11 ↓	-2,0	apoptose- induzierend	induziert FASL	
	EEF1E1 ↓	-2,4		aktiviert TP53 durch Interaktion mit ATM/ATR	SU-DHL-4
	PTRH2 ↓	-2,5		Caspasen-unabhängige Apoptose	
	GNL3 ↓	-3,0		TP53-abhängige Apoptose	SU-DHL-4
	BIRC2 ↑	2,0	apoptose- hemmend	interagiert mit TRAF1 und TRAF2	SU-DHL-4
	XRCC5 ↓	-2,0	DNA-Reparatur	DNA-Reparatur-Enzym	
	SFPQ ↓	-2,7		Doppelstrangbruch-Reparatur; NHEJ; kooperiert mit Ku70/G22P1- Ku80/XRCC5	SU-DHL-4
	DTL ↓	-4,4		DNA-Reparatur-Enzym	
<b>SU- DHL-4</b>	LZTS1 ↓	-2,7	proliferations- hemmend	Tumorsuppressor	
	CD69 ↑	52,9	proliferations- fördernd	stimuliert Lymphozyten-Proliferation	
	IL2RA ↑	9,1		B- und T-Lymphozyten- Proliferation & Differenzierung	
	TACC1 ↑	5,2		Spindelapparatdynamik- Zellteilung, Wachstum, Differenzierung	
	CD40 ↑	3,7		B-Lymphozyten-Proliferation	
	RHOG ↑	2,7		GTPase;Zytoskelettorganisation	
	EEF1E1 ↓	-2,0		apoptose- induzierend	aktiviert TP53 durch Interaktion mit ATM/ATR
	GNL3 ↓	-2,2	TP53-abhängige Apoptose		EHEB
	BIRC3 ↑	6,8	apoptose- hemmend	TRAF1- & TRAF2-Interaktion	
	PIK3CA ↑	5,0		mitogene Signaltransduktion über PKC, PI-abhängige Kinasen, MAPK	
	BCL2L1 ↑	3,4		blockt Caspaseaktivität	L-1236, KM-H2
	BIRC2 ↑	3,1		TRAF1- & TRAF2-Interaktion	EHEB
	NFKB1 ↑	2,6		Bestandteil des NFκB-Komplexes	
	SFPQ ↓	-2,7	DNA-Reparatur	Doppelstrangbruch-Reparatur; NHEJ; kooperiert mit Ku70/G22P1- Ku80/XRCC5	EHEB

Aufgelistet sind für die drei cHL-Zelllinien und die vier B-NHL-Zelllinien die Gene, die mit dem Zellzyklus, der DNA-Reparatur oder der Apoptose assoziiert sind, eine mindestens 2-fache Änderung ihrer Expressionsstärke aufwiesen und einer pathologischen Regulation (Gengruppe 2) unterlagen. ↑: Zunahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung; ↓: Abnahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung; ZZ-Zellzyklus; TSG: Tumorsuppressorgen

Die beiden folgenden tabellarischen Darstellungen zeigen eine Zusammenfassung der strahlungsinduzierten Genexpressionsänderungen der cHL-Zelllinien und der NHL-Zelllinien.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der Expressionsänderungen zellzyklus- und apoptose-assoziiierter Gene nach strahlungsinduzierter TP53-Stimulierung in cHL-Zelllinien**

Zelllinie	Regulation der zellzyklus- und apoptoseassoziierten Gene nach TP53-Stimulierung durch Zellbestrahlung			
	Gemeinsamkeit zur Zelllinie	physiologisch <> pathologisch	Zusammenfassung	
<b>L-428</b>	L-1236 (13 Gene gleich reguliert, davon 6 physiologisch)	25 <> 15	- nur vereinzelt TP53-Targetgene ↑ - Zellzyklusarrest-Gene ↑ - apoptoseinduzierende Gene ↑ - viele proliferationsfördernde Gene ↑ Onkogene <i>JUND</i> (TP53-Inhibitor), <i>IER2</i> , <i>MYB</i> , <i>KLF6</i> ↑ P21-inhibierbares <i>Zyclin L1</i> ↑	- Induktion von in HRS-Zellen konstitutiv überexprimierten Genen  - apoptose-hemmende BCL-2-Familienmitglieder ↑ <i>BCL2L1</i> ↑ TP53-Inhibitor <i>BCL2A1</i> ↑
<b>L-1236</b>	L-428 (13 Gene gleich reguliert, davon 6 physiologisch)	17 <> 18	- fehlende Induktion von TP53-Targetgenen - apoptoseinduzierende Gene ↑ - apoptosehemmende Gene ↑ - proliferationsfördernde Gene ↑ Onkogene <i>JUND</i> (TP53-Inhibitor) und <i>KLF6</i> ↑ - P21-inhibierbares <i>Zyclin D2</i> ↑	- Gemeinsamkeiten in der pathologischen Genregulation zu den DLCBL-Zelllinien Ly-3 und Ly-10
<b>KM-H2</b>	Ly-3/Ly-10 (11 Gene gleich reguliert, davon 7 physiologisch)	13 <> 7	- Zellzyklus-Arrest-Gene ↑ - apoptoseinduzierende Gene ↑ - proliferationsfördernde Gene ↓ - TP53-Targetgene ↑ - aber insgesamt geringe Änderung der Expressionsstärke bei nur wenigen Genen - MDM2 ↑ - apoptoseinduzierendes Tumorsuppressorgen BNIP3 ↓	

Zusammenfassung der strahlungsinduzierten Regulation von Zellzyklus- und Apoptosegenen, der dabei auftretenden Gemeinsamkeiten zu anderen Zelllinien und des Verhältnisses zwischen physiologisch und pathologisch regulierten Genen in cHL-Zelllinien. ↑: Zunahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung; ↓: Abnahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung

**Tabelle 14: Zusammenfassung der Expressionsänderungen Zellzyklus- und Apoptose-assoziiierter Gene nach strahlungsinduzierter TP53-Stimulierung in B-NHL-Zelllinien**

Zelllinie	Regulation der zellzyklus- und apoptoseassoziierten Gene nach TP53-Stimulierung durch Zellbestrahlung		
	Gemeinsamkeit zur Zelllinie	physiologisch <> pathologisch	Zusammenfassung
<b>Ly-3/ Ly-10</b>	KM-H2 (physiologisch regulierte Gene) KM-H2, L-428, L-1236 (pathologisch regulierte Gene)	57 <> 14	- größter Anteil physiologisch regulierter Zellzyklus- und Apoptosegene von allen untersuchten Zelllinien - viele ATM-Targetgene↑ - viele TP53-Targetgene↑ intakter ATM-TP53-P21-Signalweg - pathologische Induktion des Apoptoseinhibitors <i>FLIP</i> - pathologische Induktion des Onkogens <i>JUN</i> und des <i>TP53</i> - Gegenspielers <i>MDM2</i> , des von P21 inhibierbaren <i>Zyklin E2</i> - pathologische Expressionsverminderung des BCL-2-Familienmitglieds und Tumorsuppressorgens <i>BNIP3</i> .
<b>SU-DHL4</b>	EHEB	20 <> 14	- stärkster strahlungsinduzierter Effekt in der Genexpressionsänderung - starke Induktion von proliferationsfördernden Genen 50-fache Expressionszunahme des CD69-Gens - Induktion potenter Apoptoseinhibitoren ( <i>BCL2L1</i> ↑, <i>BIRC2</i> ↑, <i>BIRC3</i> ↑, <i>NFκB</i> ↑, <i>PIK3CA</i> ↑) - nur vereinzelte Induktion von TP53-Targetgenen - fehlende P21-Induktion defekter P53-Signalweg
<b>EHEB</b>	SU-DHL-4	15 <> 12	- trotz starker strahlungsinduzierter Genexpressionsänderung nur geringe Regulation von Zellzyklus- und Apoptosegenen - nur vereinzelte Induktion von Zellzyklusarrest-Genen - fehlende Induktion von apoptoseinduzierenden Genen - fehlende Induktion von TP53-Targetgenen defekter P53-Signalweg

Zusammenfassung der strahlungsinduzierten Regulation von Zellzyklus- und Apoptosegenen, der dabei auftretenden Gemeinsamkeiten zu anderen Zelllinien und des Verhältnisses zwischen physiologisch und pathologisch regulierten Genen in NHL-Zelllinien. ↑: Zunahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung; ↓: Abnahme der Genexpression nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung

## 4 Diskussion

DNA-Schädigungen, z.B. durch Strahlung oder Chemikalien verursacht, können zu unkontrolliertem Wachstum der betroffenen Zelle und damit zur Tumorentstehung führen. Um dies zu vermeiden, gibt es zelleigene DNA-Reparaturmechanismen, wie den P53-Signalweg. Das *TP53*-Gen wird durch DNA-Schädigung aktiviert und initiiert den Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur oder die Apoptose. Dadurch werden Fehler in der DNA, die ein unkontrolliertes Wachstum auslösen, nicht auf die nächste Zellgeneration weitergegeben. *TP53* wird daher auch als Tumorsuppressorgen bezeichnet.

In einer Vielzahl der Tumorarten liegt ein gestörter P53-Signalweg vor. Als Ursache finden sich in 50% der malignen Tumoren Mutationen im *TP53*-Gen selbst (33) (48). Dabei handelt es sich hauptsächlich um Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne, bevorzugt in den Exonen 5-9, die zur Überexpression eines funktionslosen TP53-Proteins mit einer verlängerten Halbwertszeit führen (34) (37) (39). Die Tumore, in denen *TP53* selbst nicht mutiert vorliegt, weisen fast immer Mutationen oder Fehlregulierungen von *TP53*-Zielgenen oder *TP53*-Interaktionsgenen auf, wodurch ebenfalls Störungen im P53-Signalweg hervorgerufen werden (35).

Die Hodgkin- und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) stammen von reifen Keimzentrums-B-Zellen ab (4) (9) (13) (14) (15) (16). Reife B-Zellen produzieren Immunglobuline (IG) und exprimieren sie als B-Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Ein typisches Merkmal von HRS-Zellen ist jedoch eine fehlende IG-Expression/B-Zell-Rezeptor-Expression (17) (18) (19). Diese würde normalerweise zur Apoptose der Keimzentrums-B-Zelle führen, da zum Überleben das Signal eines funktionalen B-Zell-Rezeptor/IG notwendig ist. Doch dies ist in den HRS-Zellen nicht der Fall und weist auf eine Blockierung der Apoptose hin. Dieser Defekt stellt wahrscheinlich das Schlüsselmoment in der Pathogenese des cHL dar. Zudem besitzen HRS-Zellen eine bizarre Zellform, sind oft mehrkernig (Reed-Sternberg-Zellen) und haben einen abnormen Karyotyp. Da Zellfusionen als Ursache hierfür ausgeschlossen wurden (10), scheinen massive Störungen in der Mitosephase des Zellzyklus der HRS-Zellen vorzuliegen. Für Mitosestörungen spricht ebenfalls eine hohe Expression von Proliferationsmarkern (z.B. Ki-67), ohne dass HRS-Zellen zu einer großen Zellzahl akkumulieren (12). Zentraler Regulator sowohl der Apoptose als auch des Zellzyklus (Mitose) ist das Tumorsuppressorprotein TP53, das in den HRS-Zellen regelmäßig überexprimiert wird. Die Apoptose-Blockade, die Zellzyklusstörungen und die Überexpression des TP53-Proteins in HRS-Zellen lassen einen defekten P53-Signalweg vermuten.

Um Defekte im P53-Signalweg aufzudecken, wurden in der vorliegenden Arbeit der Mutationsstatus der gesamten kodierenden Region des *TP53*-Gens und die Funktionalität des TP53-Proteins an cHL-Zelllinien untersucht. Außerdem wurden der P53-Signalweg sowie Signalwege der Zellproliferation, der DNA-Reparatur und der Apoptose genomweit auf Störungen analysiert, um weitere Pathomechanismen der gestörten Mitosen sowie der blockierten Apoptose zu entschlüsseln. Untersucht wurden cHL-Zelllinien und vergleichend verschiedene B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-(B-NHL) Zelllinien.

#### 4.1 Mutationsstatus des *TP53*-Gens in B-Zell-Lymphomen

Eine Überexpression des TP53-Proteins, wie sie in cHL/B-NHL-Lymphomen beobachtet wird, weist in der Regel auf *TP53*-Genmutationen hin. Bisherige Untersuchungen zeigten aber nur eine niedrige Inzidenz von *TP53*-Mutationen in HRS-Zellen auf und konnten daher diese Annahme nicht bestätigen (9) (20) (21) (22) (56) (57) (58) (59) (60). Allerdings wurden in HRS-Zellen dazu nur die *hot spot* Regionen (Exons 5-9) auf *TP53*-Mutationen untersucht. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit geprüft, ob außerhalb der *hot spot* Regionen Mutationen im *TP53*-Gen vorliegen, die bisher nicht beschrieben wurden. Diese Untersuchungen wurden an den drei cHL-Zelllinien L-428, L-1236 und KM-H2 sowie vergleichend an den B-NHL-Zelllinien SU-DHL-4, Ly-3, Ly-10 (diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)) und der Zelllinie EHEB (chronische lymphatische Leukämie (CLL)) durchgeführt.

Dabei zeigten alle drei untersuchten cHL-Zelllinien Veränderungen des *TP53*-Gens. Die cHL-Zelllinie L-428 wies eine Deletion von 33 bp im Exon 4 auf. Diese Deletion führt zum Verlust der AS 112 bis 122, die Bestandteile eines essenziellen Loops (AS 112-124) sind, der sich in der DNA-Bindungsdomäne des TP53-Proteins befindet. Dieser Loop stellt den Kontakt zwischen dem TP53-Protein und der großen Furche der genomischen DNA des *TP53*-Zielgens her (75). Es ist daher anzunehmen, dass die Deletion dazu führt, dass das TP53-Protein nicht mehr an seine Zielgene binden kann und damit nicht mehr fähig ist, diese zu regulieren.

Die cHL-Zelllinie L-1236 lieferte ein stark verkürztes *TP53*-PCR-Produkt. Die Sequenzanalyse zeigte ab Beginn des Exons 10 eine komplette Abweichung der *TP53*-Sequenz von der *TP53*-Wildtyp-Sequenz mit einem Verlust von 28 bp. Die Aberration betrifft die Oligomerisierungsdomäne in der Regulatordomäne des *TP53*-Gens (essenzielle Bereiche des C-Terminus) und führt, wie in der Zelllinie L-428, zu einer Funktionsstörung des TP53-Proteins.

Die Sequenzierung des *TP53*-Gens der cHL-Zelllinie KM-H2 zeigte ein heterozygoten Auftreten einer Wt-*TP53*-Sequenz und einer *TP53*-Sequenz mit einer Punktmutation im Exon 5,



Kodon 169, 702 nt. Die Punktmutation ist in der IARC TP53 Datenbank (<http://www-p53.iarc.fr>) beschrieben. Sie führt zu einem Aminosäureaustausch von Methionin zu Valin, der in der DNA-Bindungsdomäne lokalisiert ist und somit ebenfalls die Funktion des resultierenden TP53-Proteins beeinträchtigen kann. Das gleichzeitige Auftreten des Wt-TP53 könnte diese Störung aber möglicherweise kompensieren.

Die Ergebnisse der Sequenzierung der cHL-Zelllinien stehen in Übereinstimmung mit denen von *Feuerborn et al.* (76). Dort wurden diese drei cHL-Zelllinien ebenfalls auf TP53-Veränderungen untersucht. Auch dort fanden sich die Deletion von 33 bp im Exon 4 der Zelllinie L-428 sowie der nahezu komplette Verlust von Exon 10 und 11 der Zelllinie L-1236. Als einzige Abweichung wurde für die Zelllinie KM-H2 mittels Sequenzierung nur der Wt-TP53 detektiert. Da dort nur das TP53-PCR-Produkt analysiert wurde, während in dieser Arbeit sowohl das TP53-PCR-Produkt als auch das TP53-Klonierungsprodukt sequenziert wurden, erklärt sich, dass dort im Gegensatz zu dieser Arbeit für die Zelllinie KM-H2 keine Allel-spezifischen Unterschiede gefunden werden konnten.

Zusammenfassend findet sich bei zwei von drei cHL-Zelllinien ein Verlust des Wt-TP53-Gens mit massiven genetischen Veränderungen. Diese Veränderungen in den Zelllinien L-428 und L-1236 befinden sich beide außerhalb der *hot spots* in Regionen des TP53-Gens, die sonst nur selten von Mutationen betroffen sind (77). In der dritten Zelllinie (KM-H2) zeigte sich eine parallele Expression des Wt-TP53 und einer TP53-Variante mit einem Aminosäureaustausch in der DNA-Bindungsdomäne. Insgesamt machen diese Veränderungen eine Beeinträchtigung bzw. einen Verlust der TP53-Funktion im cHL sehr wahrscheinlich. Somit könnten TP53-Veränderungen auch im cHL, im Gegensatz zur bisherigen Annahme (20) (22) (56) (57) (58) (59) (60), eine wichtige Rolle spielen. Außerdem zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen, dass Mutationsanalysen des TP53-Gens in HRS-Zellen nicht auf die *hot spots* beschränkt sein sollten, sondern die gesamte kodierende Region umfassen sollten. Auf diese Weise können TP53-Veränderungen im cHL aufgedeckt werden, die zu einem defekten P53-Signalweg führen und dadurch zu einer blockierten Apoptose beitragen können.

Bei allen B-NHL-Zelllinien (EHEB (CLL), SU-DHL-4, Ly-3 und Ly-10 (DLBCL)) fand sich im Exon 4, Kodon 72, 412 nt ein SNP (single nucleotide polymorphism), der zu einem Aminosäureaustausch von Arginin (Arg) zu Prolin (Pro) führt. Dieser SNP ist aufgeführt in der IARC TP53 Datenbank (<http://www-p53.iarc.fr>). Die von Kodon 72 kodierte Aminosäure (Prolin oder Arginin) liegt in einer prolinreichen Domäne des TP53-Proteins, die wichtig für die Vermittlung der Apoptose ist. Beide Varianten des TP53-Proteins haben unterschiedlichen Einfluss auf die Apoptose. Das TP53-Kodon72-Arg bewirkt eine effizientere Apoptoseinduktion,

bessere Ansprechraten auf Chemotherapien und ein längeres Überleben als das *TP53*-Kodon72-Pro. Im Zusammenhang mit weiteren Mutationen im *TP53*-Gen zeigt die Kodon72-Arg-Isoform allerdings ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie und ein kürzeres Überleben (78). Der *TP53*-SNP72, d.h. die Kodon72-Pro-Isoform, tritt in ca. 23% der kaukasischen Bevölkerung auf und ist mit verschiedenen Tumorentitäten assoziiert, wie z.B. dem hepatozellulären Karzinom, dem Kolonkarzinom, den nasopharyngealen Karzinomen und den Melanomen (79) (80). Untersuchungen von DLBCL-Patienten ergaben im Gegensatz zu vielen anderen Tumoren jedoch keine Korrelation des *TP53*-SNP72 zu klinischen Parametern der Erkrankung (81). Für die CLL ist bisher kein Einfluss des *TP53*-SNP72 auf die Pathogenese der CLL beschrieben, ist aber im Hinblick auf die Assoziation mit anderen Tumoren denkbar.

Zusätzlich zum *TP53*-SNP72 wies die CLL-Zelllinie EHEB im Exon 3, Kodon 30, nt 285 im Sequenzchromatogramm eine Überlagerung von Adenin durch die Base Guanin auf. Dies deutet auf eine nicht auf allen Allelen vorhandene Punktmutation hin, die sich in der Transaktivierungsdomäne des *TP53*-Gens befindet. *TP53*-Mutationen spielen bei der CLL eine wichtige Rolle. Das *TP53*-Gen ist auf dem Chromosom 17p13 lokalisiert und dieser Abschnitt ist in CLL-Patienten häufig deletiert (5-7% der frühen CLL-Stadien und 25-40% der fortgeschrittenen und refraktären Stadien). Meist finden sich in diesen Fällen zusätzlich *TP53*-Mutationen im noch vorhandenen Allel, wodurch belegt werden konnte, dass die entscheidende Läsion die Veränderung im *TP53*-Gen ist und nicht andere auf Chromosom 17p lokalisierte Gene betrifft. Dabei sind *TP53*-Mutationen hauptsächlich in der DNA-Bindungsdomäne lokalisiert. 17p-Deletionen und *TP53*-Mutationen sind prädiktive Marker für Chemotherapieversagen bei CLL-Patienten. Auch CLL-Patienten mit *TP53*-Mutation ohne 17p-Deletion zeigen einen ähnlich schlechten klinischen Verlauf. Zudem korrelieren 17p-Deletion und *TP53*-Mutationen mit einer signifikanten Steigerung genomischer Aberrationen (82). Da die Punktmutation in der Transaktivierungsdomäne des *TP53*-Gens der Zelllinie EHEB nicht auf beiden Allelen vorhanden ist, macht sie eine Beeinträchtigung der *TP53*-Funktion in dieser Zelllinie jedoch eher unwahrscheinlich.

Die diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) lassen sich anhand des Genexpressionsprofils u.a. in den *activated B-cell-like* (ABC)- und den *germinal center B-cell-like* (GCB)-Subtyp unterteilen. Der GCB-Typ stammt von normalen Keimzentrumzellen ab (das Genexpressionsprofil weist Ähnlichkeiten mit dem normaler Keimzentrum-B-Zellen auf), während der ABC-Typ von aktivierten B-Zellen abstammt (83) (84). Der GCB-Typ weist einen günstigeren klinischen Verlauf mit besseren Überlebensraten auf als der ABC-Typ (5-JÜR: GCB vs ABC: 60% vs 35%) (85). Mutationen im *TP53*-Gen finden sich insgesamt in 21-22% der

DLBCL-Patienten (86). Innerhalb der molekularen Subgruppen wurde kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit von *TP53*-Mutationen gefunden (87). Für die DLBCL-Zelllinien vom ABC-Typ (Ly-3, Ly-10) konnten in dieser Arbeit keine weiteren Mutationen im *TP53*-Gen nachgewiesen werden.

Die DLBCL-Zelllinie von GCB-Typ (SU-DHL-4) wies, zusätzlich zum *TP53*-SNP72, eine Punktmutation im Exon 8, Kodon 273, 1014 nt auf. Diese ist ebenfalls in der IARC *TP53* Datenbank beschrieben. Sie befindet sich in der DNA-Bindungsdomäne und führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein, wodurch eine Beeinträchtigung der *TP53*-Funktion in dieser Zelllinie wahrscheinlich wird. Dazu passen auch Untersuchungen an Fällen von primären DLBCL, die zeigen, dass Mutationen in diesem Bereich des *TP53*-Gens mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert sind (88). *Zainuddin et al.* und *Young et al.* beschreiben, dass das Auftreten von *TP53*-Mutationen im GCB-Typ mit einem signifikant reduzierten Überleben assoziiert war (81) (88). Dies galt insbesondere für Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne, wie die *missense* Mutation von Kodon 273, die in der Zelllinie SU-DHL-4 auftritt. Dies macht eine Beeinträchtigung der Funktion des *TP53*-Proteins in der Zelllinie sehr wahrscheinlich. Patienten mit Mutationen außerhalb der DNA-Bindungsdomänen hatten ähnliche Überlebenszeiten wie DLBCL-Patienten mit einem *Wt-TP53*. Dagegen besaßen *TP53*-Mutationen in der ABC-Gruppe keinen prognostischen Wert. Als Ursache wird vermutet, dass ein mutiertes *TP53* den anti-apoptotischen Effekt von NFκB aktivieren kann. Da NFκB im ABC-Typ konstitutiv aktiviert vorliegt, haben *TP53*-Mutationen hier keinen Effekt (81). Somit scheinen *TP53*-Veränderungen in der Pathogenese des DLBCL vom GCB-Typ, nicht aber vom ABC-Typ, eine Rolle zu spielen.

## 4.2 Funktionalität des *TP53*-Proteins in B-Zell-Lymphomen

In intakten und ungestressten Zellen liegen das *TP53*-Protein und auch seine Bindungspartner nur in geringen Mengen vor. Einer der wichtigsten *TP53*-Bindungspartner ist das P21-Protein. P21 führt zum Zellzyklusarrest und ermöglicht die DNA-Reparatur, wodurch ein Weitergeben von DNA-Schäden auf die nächste Zellgeneration verhindert wird. Treten DNA-Schädigungen auf, führt dies bei intakter *TP53*-Funktion zu einer Aktivierung und Zunahme sowohl des *TP53*- als auch des P21-Proteins. Somit kann die Expression des P21-Proteins als Marker der *TP53*-Funktion dienen. Um die Funktionsfähigkeit des *TP53*-Proteins zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Zelllinien ionisierender Strahlung ausgesetzt und dadurch DNA-

Schäden verursacht, die zur TP53- und P21-Induktion führen sollten. Die Expression der beiden Proteine wurde mittels Westernblot in unbestrahlten und bestrahlten Zelllinien bestimmt.

Die cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 wiesen bereits im unbestrahlten Zustand jeweils eine starke Expression eines TP53-Proteins mit einem Molekulargewicht unterhalb des intakten TP53-Proteins auf. Diese trunkierten TP53-Proteinformen erklären sich aus den gefundenen Aberrationen im *TP53*-Gen. In der cHL-Zelllinie KM-H2 trat ein schwaches TP53-Protein-Signal mit dem erwarteten Molekulargewicht von 53 kDa auf, sowie ein zusätzliches Signal eines zweiten TP53-Proteins mit einem geringeren Molekulargewicht. Die Ursache für das zusätzliche trunkierte TP53-Protein ist jedoch nicht durch Veränderungen im *TP53*-Gen (Punktmutation im Kodon 169, 702 nt) zu erklären.

Diese Muster der TP53-Proteinexpression stehen in Einklang mit den Ergebnissen der Literatur, wo ebenfalls für die cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 trunkierte TP53-Proteine bei Mutationen des *TP53*-Gens beschrieben sind. In der cHL-Zelllinie KM-H2, für die ein *Wt-TP53*-Gen angegeben wird, zeigt sich auch dort ein zusätzliches Signal einer trunkierten TP53-Proteinisoform (76).

Alle drei untersuchten cHL-Zelllinien zeigten im unbestrahlten Zustand keine bzw. nur eine sehr geringe P21-Proteinexpression. Der Versuch durch Bestrahlung den P53-Signalweg zu aktivieren, erbrachte in den cHL-Zelllinien L-428 und L-1236 keine Änderung der TP53-Expression und auch keine Induktion der P21-Expression. Dies zeigt, dass die trunkierten TP53-Proteine in beiden Zelllinien nicht funktionsfähig sind und stimmt mit publizierten funktionellen Studien der beiden Zelllinien überein (76). Bei der cHL-Zelllinie KM-H2 kam es nur zu einer sehr geringen Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression, trotz Vorliegens eines TP53-Proteins von normaler Größe. Dies spricht ebenfalls für eine Beeinträchtigung der TP53-Funktion. Möglicherweise ist die TP53-Funktionsstörung in dieser Zelllinie mit der gefundenen Punktmutation in Kodon 169, 702 nt assoziiert. Eventuell wirkt sich die zweite trunkierte TP53-Proteinisoform negativ auf den P53-Signalweg aus.

Insgesamt weisen zwei der drei untersuchten cHL-Zelllinien (L-428, L-1236) Aberrationen im *TP53*-Gen und dazu passend trunkierte TP53-Proteine auf. Die dritte cHL-Zelllinie (KM-H2) zeigt ein paralleles Auftreten des *Wt-TP53* neben einer Variante mit einer Punktmutation im *TP53*-Gen und auf Proteinebene neben einem TP53-Protein normaler Größe ein zusätzliches trunkiertes TP53-Protein. Hier sind sowohl die Ursache der zweiten trunkierten TP53-Proteinisoform als auch sein Einfluss auf den P53-Signalweg nicht klar. Keine der drei untersuchten cHL-Zelllinien zeigte eine adäquate P21-Induktion. Dies deutet auf eine schwere oder komplette TP53-Funktionsstörung im cHL hin.

In den Zelllinien des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) vom ABC-Typ (Ly-3, Ly-10), des folliculären Lymphoms (FL) (DOHH-2) und des Mantelzell-Lymphoms (MCL) (Granta-519) waren vor der Bestrahlung keine oder nur sehr schwache TP53- und P21-Signale im Westernblot sichtbar. Durch die Bestrahlung kam es zu einer deutlichen Zunahme der TP53- und der P21-Proteinexpression. Dies zeigt, dass in dieser Zellliniengruppe ein TP53-Protein mit einer intakten Funktion vorliegt. Dies findet sich auch in den dazu publizierten Daten wieder. Diese zeigen, dass im FL *TP53*-Mutationen nur selten auftreten. Genexpressionsstudien weisen auf einen intakten P53-Signalweg im FL hin (89). Auch die Behandlung von FL-Patienten mit ionisierender Strahlung führt zu einer regelrechten Induktion von *TP53*-Targetgenen (90). Für die FL-Zelllinie DOHH-2 ist ein *Wt-TP53* beschrieben (91). *TP53*-Mutationen sind erst dann mit dem FL assoziiert, wenn es bei einigen FL zu einer Transformation in ein aggressives NHL kommt (92).

Für MCL-Patienten wurden *TP53*-Defekte berichtet und sind ein Marker für eine schlechte Prognose (93) (94). Doch der größte Teil des MCL-Patienten trägt einen *Wt-TP53* und ein funktionales *TP53*-Gen. Für das MCL wurden andere Defekte des P53-Signalwegs als *TP53*-Mutationen beschrieben. Die meisten liegen *upstream* von *TP53* wie MDM2-Überexpression, inaktivierte p14ARF- oder ATM-Gene. Der Signalweg *downstream* von *TP53* bewahrt meist seine Integrität. Für die MCL-Zelllinie Granta-519 ist ein *Wt-TP53* beschrieben sowie ein ATM-Defekt und eine homozygote Deletion des INK4a/ARF-Lokus (95).

Für den ABC-Typ des DLBCL (Ly-3, LY-10) ergaben die durchgeführten Analysen dieser Arbeit ein *Wt-TP53*-Gen und ebenfalls ein TP53-Protein mit adäquater P21-Induktion. Somit kann an dieser Stelle des P53-Signalwegs, eine Störung für diese vier Zelllinien ausgeschlossen werden.

Unphysiologische TP53- und P21-Proteinexpressionen zeigten die DLBCL-Zelllinie vom GCB-Typ (SU-DHL-4) mit einer konstitutiven TP53-Proteinüberexpression ohne P21-Proteinexpression und die CLL-Zelllinie (EHEB) mit einer konstitutiven P21-Proteinüberexpression. Beide Zelllinien zeigten keine Änderung der TP53- und P21-Proteinexpression durch die Bestrahlung.

Dies bestätigt, dass die Mutation in der DNA-Bindungsdomäne der GCB-DLBCL-Zelllinie zu einem Verlust der Transaktivierungsfähigkeit von TP53 führt und dass Mutationen des *TP53*-Gens und Störungen der TP53-Proteinfunktion eine Rolle bei DLBCL-Patienten vom GCB-Typ zu spielen scheinen (siehe 4.1).

Die Ursache der fehlenden TP53- und konstitutiven P21-Überexpression mit fehlender Reaktivität auf die Bestrahlung der CLL-Zelllinie EHEB ist unklar. Im *TP53*-Gen wurden keine Veränderungen gefunden, die dies erklären.

### **4.3 Analyse der Funktionalität des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose in B-Zell-Lymphomen auf genomweiter Ebene**

Um Defekte im P53-Signalweg, der DNA-Reparatur und in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose zu identifizieren, die nicht auf Mutationen im *TP53*-Gen oder auf Funktionalitätsstörungen in TP53-Protein basieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit genomweite Expressionsanalysen mittels Microarray durchgeführt. Ziel war es, Gene zu finden, die in diese Prozesse eingreifen und bei denen es nach *TP53*-Aktivierung mittels ionisierender Strahlung zu einer Expressionsänderung kommt. Besonderes Augenmerk galt dabei den mehr als 100 bekannten *TP53*-Zielgenen. Anschließend wurde beurteilt, ob diese Gene regelrecht- oder fehlreguliert sind und möglicherweise zur Pathogenese des cHL beitragen. Auch diese Untersuchungen wurden an cHL-Zelllinien und vergleichend an verschiedenen B-Zell-NHL-Zelllinien (DLBCL und CLL) durchgeführt.

#### **4.3.1 Genregulation des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose in B-Zell-Lymphomzelllinien mit gestörter TP53-Proteinfunktion**

##### **4.3.1.1 cHL-Zelllinien**

Der Vergleich der unbestrahlten mit bestrahlten cHL-Zelllinien zeigte umfassende Fehlregulationen von Zellzyklus und Apoptose. Die cHL-Zelllinie L-428 zeigte zwar nach Bestrahlung die Induktion einiger Zellzyklusarrest- und Apoptosegene, aber auch vieler proliferationsfördernder Gene. Die cHL-Zelllinie L-1236 wies neben der Induktion einiger proapoptotischer Gene pathologischerweise auch eine Expressionszunahme vieler Apoptosehemmender und proliferationsfördernder Gene auf. Vor allem zeigte die cHL-Zelllinie L-1236 eine fehlende und die cHL-Zelllinie L-428 nur eine vereinzelte Induktion von *TP53*-Zielgenen. Dies erklärt sich aus den Mutationen im *TP53*-Gen, die in beiden Zelllinien nachgewiesen wurden. Die Aberrationen des *TP53*-Gens nehmen in der Zelllinie L-1236 ein stärkeres Ausmaß an als in der Zelllinie L-428. Damit korrelierend fanden sich Unterschiede in der Genregulierung

und eine massivere Störung von Zellzyklus- und Apoptose-Signalwegen in der Zelllinie L-1236. Zudem kam es in beiden Zelllinien zu einer strahlungsinduzierten Expressionszunahme der *TP53*-Inhibitoren *BCL2A1* (hemmt die Apoptose) und *JUN-D* (fördert die Proliferation), welche zu einer weiteren Beeinträchtigung des P53-Signalwegs führt.

In beiden Zelllinien trat eine strahlungsinduzierte Stimulation von proliferationsfördernden Zyklinen (Zyclin D2; Zyclin L1) auf, die normalerweise über den P53-P21-Signalweg bei DNA-Schädigung gehemmt werden. Die aberrante Expression dieser Gene spiegelt die fehlende Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression nach strahlungsinduzierter *TP53*-Stimulation wider. Somit zeigte auch die Genexpressionsanalyse, dass in den cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 ein gestörter P53-Signalweg mit einem funktionslosen TP53-Protein vorliegt.

Für die cHL-Zelllinie L428 lässt sich dieser Defekt aufgrund der strahlungsinduzierten Hochregulation der *TP53*-aktivierenden Gene *GADD34*, *CDKN2AIP* und *ETS2* weiter eingrenzen. Die Expressionszunahme dieser Gene weist auf einen intakten P53-Signalweg *upstream* von *TP53* und eine Störung von *TP53* selbst bzw. dem P53-Signalweg *downstream* von *TP53* hin.

Untersuchungen der cHL-Zelllinie L-1236 einer anderen Arbeitsgruppe haben ergeben, dass das aberrante TP53-Protein zwar nicht mehr fähig ist, P21 zu induzieren, aber noch eine geringe transkriptionelle Aktivität besitzt (76). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, reicht diese jedoch nicht aus, um die Expression der Zielgene signifikant zu erhöhen.

Bei der cHL-Zelllinie KM-H2, bei der parallel ein Wt-*TP53* und ein *TP53*-Gen mit einer Punktmutation vorliegen, konnte in den bestrahlten Zellen eine schwache Induktion einzelner *TP53*-Zielgene nachgewiesen werden. Nur wenige Zellzyklus- und Apoptosegene wurden fehlreguliert. Jedoch zeigte sich die Zelllinie KM-H2 insgesamt als strahlenrefraktär mit nur sehr schwachen strahlungsinduzierten Expressionsänderungen einer geringen Anzahl von Genen. Dies korreliert ebenfalls mit den Ergebnissen der Proteinexpression. Auch hier zeigte sich nach Aktivierung des P53-Signalwegs durch Zellbestrahlung nur eine schwach ausgeprägte TP53- und P21-Proteinzunahme. Damit scheint auch in dieser Zelllinie der P53-Signalweg nicht intakt zu sein. Möglicherweise ist die TP53-Funktionsstörung mit der identifizierten Punktmutation im Kodon 169, 702 nt assoziiert. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Ursache des gestörten P53-Signalwegs allein in der Punktmutation des *TP53*-Gens liegt. Diese betrifft die DNA-Bindungsdomäne des TP53-Proteins, so dass ein TP53-Funktionsverlust, d.h. keine Induktion von TP53-Zielgenen, zu erwarten wäre. Zudem liegt in dieser Zelllinie parallel auch ein unmutiertes *TP53*-Allel vor, welches eine TP53-Funktionsstörung kompensieren könnte.

Daher ist eine abgeschwächte Regulierung der *TP53*-Targetgene bzw. der Zellzyklus- und Apoptosegene in der cHL-Zelllinie KM-H2 wahrscheinlich auf Fehlregulationen anderer Gene des P53-Signalwegs zurückzuführen wie auf die verstärkte Induktion der Gene *MDM2* und *NFκB*. Beide liegen in HRS-Zellen konstitutiv überexprimiert vor und wurden durch die Zellbestrahlung in ihrer Expression noch verstärkt. Sie sind Gegenspieler von TP53 und hemmen TP53 in der Regulation seiner Zielgene.

Insgesamt weisen die cHL-Zelllinien L-428 und L-1236, bei denen ein mutiertes *TP53*-Gen vorliegt, auch auf der Genexpressionsebene ausgeprägtere Störungen der Zellzyklus- und Apoptoseregulationen auf als die Zelllinie KM-H2, bei der auch ein TP53-Wildtyp exprimiert wird. Auch auf genregulatorischer Ebene führte die Zellbestrahlung in keiner der cHL-Zelllinien zu einer adäquaten TP53- und P21-Zunahme. Ebenso fand sich keine physiologische Regulation von TP53-Zielgenen. Somit liegt in keiner cHL-Zelllinie ein intakter P53-Signalweg vor.

Allen cHL-Zelllinien gemeinsam fand sich eine strahlungsinduzierte Fehlregulierung von BCL-2-Familienmitgliedern. Durch die Zellbestrahlung kam es zum einen zu einer Induktion von Apoptosegegenspielern wie *BCL2L1* (L-1236, KM-H2) und *BCL2A1* (L-1236, L-428), welche der Induktion von Apoptosegenen massiv entgegenwirken. Zum anderen kam es zur Expressionsverminderung des apoptoseinduzierenden Tumorsuppressorgens *BNIP3* (KM-H2), wodurch entscheidende Apoptosegene nicht stimuliert wurden. Die BCL-2-Familie regelt entscheidend den mitochondrialen Weg der Apoptose und wird durch TP53 reguliert. TP53 induziert die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie und hemmt das antiapoptotische BCL-2 (siehe 1.2.3). Diese Fehlregulationen bestärken die gestörte TP53-Funktion und weisen auf eine TP53-assoziierte Störung in der BCL-2 Familie hin, die möglicherweise zu einem Apoptosedefekt führen kann und zur Pathogenese des cHL beiträgt.

Weiterhin war auffällig, dass in allen cHL-Zelllinien durch die Zellbestrahlung solche Gene verstärkt exprimiert wurden, die in den HRS-Zellen bereits konstitutiv überexprimiert vorliegen und zur Deregulation verschiedener Signalwege beitragen. Bei der Zelllinie L-428 waren das z.B. die im cHL überexprimiert vorliegenden Gene *ATF3* und *ID2*, die durch die DNA-Schädigung verstärkt induziert wurden. Das *ATF3*-Gen ist ein stressinduziertes Gen und hat antiproliferative, aber auch antiapoptotische Eigenschaften. Es wird angenommen, dass die konstitutive *ATF3*-Überexpression zu Apoptose-Unterdrückung der HRS-Zellen beiträgt (96). Das *ID2*-Gen unterdrückt in HRS-Zellen die Ausbildung typischer B-Zell-Merkmale und wird von AP1 reguliert (97). Den Zelllinien L428 und L-1236 war die strahlungsinduzierte Induktion des Gens *API*-Gens bzw. seiner Bestandteile *JUN*, *JUND* und *JUNB* gemeinsam. Auch das AP1-Protein liegt in HRS-Zellen überexprimiert vor (4) (9).



AP1 besitzt proliferationsfördernde und antiapoptotische Eigenschaften. Es reguliert TP53 und P21 sowie diverse andere Zellzyklusproteine wie Zyklin D1, P19ARF und P16 und bewirkt ein Fortschreiten von der G- in die S-Phase des Zellzyklus. AP1 und sein Bestandteil JUND antagonisieren die Wirkung von TP53 (98). AP1 wird von NF $\kappa$ B reguliert (99). NF $\kappa$ B liegt in HRS-Zellen ebenso überexprimiert vor und kooperiert mit AP1 bei der Stimulation von *ZYKLIN D2* und dem Protoonkogen *MET*, die in HRS-Zellen ebenfalls konstitutiv überexprimiert vorliegen (99). In den cHL-Zelllinien L-1236 und KMH2 wurde das Gen *NFKB2*, welches Bestandteil des NF $\kappa$ B-Komplexes ist, durch die Zellbestrahlung weiter stimuliert. Die konstitutive NF $\kappa$ B-Aktivierung in HRS-Zellen reguliert die Expression vieler antiapoptotischer Faktoren und trägt zur Apoptoseunterdrückung entscheidend bei (100) (101). Proliferation und Überleben der HRS-Zellen sind somit abhängig von der NF $\kappa$ B-Aktivierung. NF $\kappa$ B wird negativ reguliert durch *A20* (102). Es wurde gezeigt, dass *A20* im cHL eine Tumorsuppressorfunktion besitzt (102). Die *A20*-Genexpression wurde in der Zelllinie L-1236 durch die Bestrahlung herunterreguliert und in den Zelllinien L428 und KM-H2, korrelierend mit der beschriebenen Mutation im *A20*-Gen der Zelllinie KM-H2, nicht reguliert (9). Somit scheint *A20* in seiner Funktion als Tumorsuppressor in cHL-Zelllinien beeinträchtigt zu sein und kann über die fehlende NF $\kappa$ B-Antagonisierung zur verstärkten NF $\kappa$ B-Induktion und damit zur Apoptosehemmung in TP53-intakten HRS-Zellen beitragen.

Insgesamt zeigte sich, dass die in HRS-Zellen unphysiologisch konstitutiv überexprimiert vorliegenden Gene *ATF3*, *ID2*, *AP1* und *NFKB* durch die Bestrahlung in ihrer Expression weiter verstärkt werden. Die assoziierten, bereits bekannten deregulierten Signalwege werden dadurch weiter aktiviert und tragen zur Apoptoseunterdrückung in HRS-Zellen bei.

Weiterhin wurden in allen drei cHL-Zelllinien durch die Bestrahlung viele immunmodulatorische Gene reguliert, wie Interleukine, Interferone, Chemokine und T-Zell-regulatorische Gene. Es lässt vermuten, dass dies einen Versuch der HRS-Zellen darstellt, mit den nicht-malignen Immunzellen zu kommunizieren, in die sie im Gewebeverband (*in vivo*) eingebettet wären. Daher lässt sich für das histologische Bild des cHL annehmen, dass eine Bestrahlung von cHL-Gewebe zu einer Wechselwirkung zwischen den HRS-Zellen und den sie umgebenden Immunzellen (*Microenvironment*) führt. Das *Microenvironment* trägt zur Lebensfähigkeit der HRS-Zellen bei (4). Die starke strahleninduzierte Regulation von immunmodulatorischen Genen in HRS-Zellen deutet hiermit auch einen Einfluss des *Microenvironments* auf die Strahlenempfindlichkeit der HRS-Zellen an. Es ist möglich, dass die umgebenden Immunzellen zur strahlungsinduzierten Apoptose beitragen, aber es ist ebenso

denkbar, dass sie diese in fortgeschrittenen oder refraktären cHL-Patienten hemmen kann. Dies bleibt zu untersuchen.

#### 4.3.1.2 *CLL-Zelllinie*

Obwohl bei der Zelllinie EHEB ein starker Unterschied in der Genexpression durch die Zellbestrahlung herbeigeführt wurde, waren unter den regulierten Genen nur wenige *TP53*-unabhängige Zellzyklus- und Apoptose-assoziierte Gene. Es wurden kein einziges *TP53*-Zielgen, kein proapoptotisches Gen und nur zwei Zellzyklus-Arrest vermittelnde Gene induziert. *TP53*-stimulierende Gene wurden (*EEF1E1* und *GNL3*) herunterreguliert.

Somit liegt bei der CLL-Zelllinie EHEB ebenfalls ein defekter P53-Signalweg (bereits *upstream* von *TP53*) mit einer massiven Störung der Regulation von Zellzyklus und Apoptose vor. Der gestörte P53-Signalweg zeigte sich ebenfalls auf der Proteinebene mit einer pathologischen konstitutiven P21-Überexpression und einer fehlenden strahlungsinduzierten Zunahme der *TP53*- und P21-Proteinexpression. Eine Erklärung für die konstitutive P21-Überexpression liefern die Genexpressionsergebnisse nicht. Es konnten keine einzelnen, spezifischen Gene bestimmt werden, deren Fehlregulation zur Herleitung von Pathomechanismen dienen könnte.

#### 4.3.1.3 *DLBCL vom GCB-Typ*

Die DLBCL-Zelllinie vom GCB-Typ (SU-DHL-4) zeigte eine starke strahlungsinduzierte Genexpressionsänderung. Dies korreliert mit den Beobachtungen zur strahlungsinduzierten Änderung der Zellmorphologie. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien zeigte die SU-DHL-4 die stärkste Abnahme von lebenden Zellen und eine massive Zunahme von Zelldebris durch das Absterben von Zellen. Obwohl diese Zelllinie sehr strahlensensibel ist, lag doch eine deutliche Störung in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose vor. Die Bestrahlung führte zwar zur Induktion einiger proliferationshemmender Gene, jedoch gleichzeitig auch zu einer starken Induktion von proliferationsfördernden Genen, wie der 50-fachen Expressionszunahme des *CD69*-Gens. Das *CD69*-Gen kodiert das CD69-Protein, welches ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche ist und als signalübertragender Rezeptor funktioniert. CD69 fördert insbesondere die Lymphozytenproliferation (103). Ein Defekt in der Apoptose zeigt sich anhand der pathologischen Induktion der apoptosehemmenden Gene *BCL2L1*, *BIRC3*, *PIK3CA* und *NFKB1*. *TP53*-Zielgene wurden nur vereinzelt aktiviert und eine *P21*-Induktion wurde nicht beobachtet. Dies korreliert mit der fehlenden Expressionszunahme des P21-Proteins bei konstitutiver *TP53*-

Proteinüberexpression und zeigt, dass bei dieser DLBCL-Zelllinie ein defekter P53-Signalweg mit einem funktionslosen TP53-Protein vorliegt.

### **4.3.2 Genregulation des P53-Signalwegs, des Zellzyklus und der Apoptose in B-Zell-Lymphom-Zelllinien mit intakter TP53-Funktion**

#### **4.3.2.1 DLBCL-Zelllinien vom ABC-Typ**

Ein großer Teil der strahlungsinduzierten Gene in den DLBCL-Zelllinien (Ly-3, Ly-10) vom ABC-Typ waren ATM- und ATR-induzierbare Gene sowie diverse antiproliferativ und proapoptotisch wirkende *TP53*-Zielgene (einschließlich P21). Auch das *TP53*-aktivierende Gen *PCAF* zeigte eine Zunahme der Expressionsstärke. Somit scheint der ATM-P53-P21-Signalweg in diesen beiden Zelllinien sowohl *upstream* von *TP53* als auch *downstream* bis zu den unmittelbaren *TP53*-Zielgenen intakt zu sein. Dies korreliert mit der strahlungsinduzierten Zunahme der TP53- und P21-Proteinexpression in diesen Zelllinien. *TP53*-unabhängig wurden ebenfalls diverse proliferationsfördernde Zellzyklusgene und einige apoptosehemmende Gene herunterreguliert. Im Gegensatz zu den cHL-Zelllinien zeigte sich in den DLBCL-Zelllinien vom ABC-Typ eine Induktion des Tumorsuppressors und NFκB-Inhibitors *A20*.

Der Großteil der Zellzyklus- und Apoptosegene zeigte somit auf die Bestrahlung eine physiologische Regulation. Dennoch trat vereinzelt eine Fehlregulation einiger Gene auf. Dazu zählte z.B. die pathologische Induktion des Apoptose-Inhibitors *FLIP* und die pathologische Expressionsverminderung des apoptoseinduzierenden Gens *BNIP3*. *BNIP3* ist ein proapoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie (siehe 4.3.1.1). *FLIP* ist ein Inhibitor der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor-1- und CD95-vermittelten Apoptose und hemmt die Caspase-8 (104). Da diese beiden fehlregulierten Gene entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Apoptose besitzen, bestehen möglicherweise Störungen in der Regulation der Apoptose *downstream* oder außerhalb des P53-Signalwegs, die zur Pathogenese dieser Lymphom-Entität beitragen.

Die DLBCL-Zelllinien vom ABC-Typ (Ly-3, Ly-10) zeigten auch auf genregulatorischer Ebene zu der DLBCL-Zelllinie vom GCB-Typ (SU-DHL-4) keine nennenswerten Gemeinsamkeiten. Damit bestätigt diese Arbeit, dass der GCB- und der ABC-Typ des DLBCL hinsichtlich der Genexpression zwei unterschiedliche Lymphomentitäten sind, denn auch durch die Bestrahlung weisen beide Subtypen völlig verschiedene Genexpressionsprofile auf (83)(84).

## 5 Zusammenfassung

Eine Blockierung der Apoptose, eine Fehlregulation des Zellzyklus mit gestörten Mitosen und eine Überexpression des TP53-Proteins in den Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) lassen einen defekten P53-Signalweg vermuten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Defekte im P53-Signalweg der HRS-Zellen aufzudecken. Dazu wurden cHL-Zelllinien und vergleichend verschiedene B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (B-NHL) untersucht. In diesen erfolgte eine Mutationsanalyse der gesamten kodierenden Region des *TP53*-Gens. Weiterhin wurde die Funktionalität des TP53-Proteins überprüft. Dafür wurden die Zelllinien ionisierender Strahlung ausgesetzt. Die Strahlung verursacht DNA-Schäden, die unter physiologischen Bedingungen zur Induktion des P53-Signalwegs und damit zu einer Aktivierung und Zunahme des TP53-Proteins führen. Aktiviertes TP53-Protein mit intakter Funktion bewirkt eine Expressionsänderung der *TP53*-Zielgene wie z.B. die Induktion von P21. Somit dient das P21-Protein als Marker der TP53-Funktion. Mittels Westernblot wurde die Proteinexpression von TP53 und P21 vor und nach der Bestrahlung der Zelllinien bestimmt. Um weitere Pathomechanismen zu identifizieren, die nicht auf Mutationen im *TP53*-Gen oder auf Funktionsstörungen des TP53-Proteins selbst basieren, wurden genomweite RNA-Expressionsanalysen (GeneChip) durchgeführt.

Diese Arbeit zeigt, dass TP53 in verschiedenen Lymphomentitäten nicht funktional ist und dadurch zur Pathogenese dieser Erkrankungen beitragen kann. Insbesondere beim cHL finden sich bisher unbekannte *TP53*-Mutationen in Genregionen, die außerhalb der bekannten Mutations-*hotspots* liegen. Die Aberrationen im *TP53*-Gen der untersuchten cHL-Zelllinien führen zu trunkierten und in ihrer Funktion gestörten TP53-Proteinen. Die strahlungsinduzierte Aktivierung des P53-Signalwegs zeigte daher in keiner cHL-Zelllinie eine adäquate Expressionszunahme des TP53- und des P21-Proteins. Als Folge der gestörten TP53-Funktion finden sich eine mangelnde Induktion von TP53-Zielgenen und deregulierte TP53-assoziierte Apoptose- und Zellzyklus-Signalwege. Dies zeigte sich z.B. in der Genexpressionszunahme von proliferationsfördernden Zyklinen (*Zyklin D2*; *Zyklin L1*) und in der Deregulation der apoptose-regulierenden BCL-2-Familienmitglieder. Zudem fanden sich Fehlregulationen von Genen, wie die Expressionszunahme der *TP53*-Inhibitoren *BCL2A1* und *JUN-D*, die sich zusätzlich zu den TP53-Defekten negativ auf die Regulation des *TP53*-Gens/TP53-Proteins auswirken können. Aufgrund dieser Ergebnisse ist von einer schweren bzw. kompletten TP53-Störung mit Beeinträchtigung von Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose beim cHL auszugehen. Diese

Beobachtungen passen sehr gut zu den Befunden beim cHL, die eine massive Störung der DNA-Reparaturmechanismen dieser Erkrankung postulieren.

Die Untersuchungen der Zelllinien vom diffusen großzelligen B-NHL (DLBCL) ergaben für den molekularen ABC-Typ (Ly-3; Ly-10) das Vorliegen eines funktionsfähigen TP53-Proteins bei intaktem P53-Signalweg. Dagegen wies die DLBCL-Zelllinie vom GCB-Typ (SU-DHL-4) einen defekten P53-Signalweg mit einer Mutation des *TP53*-Gens in der DNA-Bindungsdomäne und einem funktionslosen TP53-Protein auf. Dies deutet darauf hin, dass Mutationen des *TP53*-Gens und Störungen der TP53-Proteinfunktion eine Rolle beim DLBCL vom GCB-Typ spielen können.

In der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)-Zelllinie EHEB liegt ebenfalls ein defekter P53-Signalweg mit massiven Störungen in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose vor. Durch die strahlungsbedingte TP53-Aktivierung wurde kein einziges *TP53*-Zielgen, kein proapoptotisches Gen und nur zwei Zellzyklusarrest vermittelnde Gene induziert. Im *TP53*-Gen wurden keine Veränderungen gefunden, die dies erklären.

Insgesamt finden sich zwischen den cHL- und den B-NHL-Zelllinien weder in der Mutationsanalyse des *TP53*-Gens Gemeinsamkeiten, noch zeigen sich in der Regulation des durch Zellbestrahlung aktivierten P53-Signalwegs Ähnlichkeiten zwischen den beiden Lymphomentitäten.

## 6 Abkürzungsverzeichnung

ABC	<i>activated B-cell-like DLBCL</i> , DLBCL vom aktivierten B-Zell-Typ
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
BL	<i>burkitt lymphoma</i> , Burkitt Lymphom
Bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserum-Albumin
B-Zelle	B-Lymphozyt
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cHL	klassisches (classical) Hodgkin-Lymphom
CLL	<i>chronic lymphatic leukemia</i> , chronische lymphatische Leukämie
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
FL	<i>follicular lymphoma</i> , Follikuläres Lymphom
GCB	<i>germinal center B-cell-type DLBCL</i> , DLBCL vom Keimzentrumstyp
Ig	Immunglobulin
IgV	Immunglobulin-variable Region
IR	ionisierende Strahlung
kDa	Kilodalton
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i> , Mantelzell-Lymphom
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nt	<i>nucleotide</i> , Nukleotid
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
Rb-Gen	Retinoblastom-Gen
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
STS	Staurosporin
TF	Transkriptionsfaktor
T-Zelle	T-Lymphozyt
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
WHO	World Health Organisation, Welt Gesundheits Organisation
Wt	Wildtyp

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Dreyling M.** Maligne Lymphome - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2008.
2. **Hiddemann W, Dreyling M, Stein H.** *Lymphome - Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien.* Germany : Georg Thieme Verlag, 2005.
3. **Swerdlow S, Campo E, Harris NL et al.** *WHO Classification of tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon : IARC, 2008.
4. **Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R.** Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 2009, 4, S. 151-74.
5. **Hodgkin T.** On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med.Chir.Soc.Tr.* 1832, 17, S. 68.
6. **Küppers R., Hansmann ML.** The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005, 37(3), S. 511-7.
7. **Reed, D.** On the pathological changes in Hodgkin's disease with special references to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hospital Reports.* 1902, 10, S. 133-193.
8. **Sternberg, C.** Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde.* 19, S. 21-90.
9. **Küppers R.** The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer.* 2009, 9(1), S. 15-27.
10. **Küppers R, Bräuninger A, Müschen M, Distler V, Hansmann ML, Rajewsky K.** Evidence that Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin disease do not represent cell fusions. *Blood.* 2001, 1;97(3), S. 818-21.
11. **Drexler HG, Gignac SM, Hoffbrand AV, Minowada J.** Formation of multinucleated cells in a Hodgkin's-disease-derived cell line. *Int. J. Cancer.* 1989, 43, S. 1083-90.
12. **Tzankov A, Zimpfer A, Went P et al.** Aberrant expression of cell cycle regulators in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol.* 2005, 18(1), S. 90-6.
13. **Küppers R, Rajewsky K, Zhao M et al.** Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91, S. 10962-10966.
14. **Rennè C, Hansmann ML, Bräuninger A.** Rezeptor-Tyrosinkinasen in Hodgkin-Lymphomen als mögliche Angriffspunkte neuer Therapieoptionen. *Der Pathologe.* 2009, S. 1-8.

15. **Marafioti T, Hummel M, Foss HD et al.** Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. 2000, 95, S. 1443-1450.
16. **Kueppers R, Sousa AB, Baur AS et al.** Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol.Med.* 2001, 7, S. 285-292.
17. **Weiss LM, StricklerJG, Hu E, Warnke RA, Sklar J.** Immunoglobulin gene rearrangements in Hodgkin's disease. *Weiss,L.M., Strickler,J.G., Hu,E., Warnke,R.A., and Sklar,J.* 1986, 17, S. 1009-1014.
18. **Herbst H, Tippelmann G, Anagnostopoulos I et al.** Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma: dissociation between phenotype and genotype. *Leuk.Res.* 1989, 13, S. 103-116.
19. **Ruprai AK, Pringle JH, Angel CA, Kind CN, Lauder I.** Localization of immunoglobulin light chain mRNA expression in Hodgkin's disease by in situ hybridization. *J.Pathol.* 1991, 164, S. 37-40.
20. **Küpper M, Joos S, von Bonin F, Daus H, Pfreundschuh M, Lichter P, Trümper L.** MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. *Br J Haematol.* 2001, 112(3), S. 768-75.
21. **Maggio EM, Stekelenburg E, Van Den Berg A, Poppema S.** TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer.* 2001, 94, S. 60-66.
22. **Montesinos-Rongen M, Roers A, Küppers R, Rajewsky K, Hansmann ML.** Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood.* 1999, 1;94(5), S. 1755-60.
23. **Giefing M, Arnemann J, Martin-Subero JI et al.** Identification of candidate tumour suppressor gene loci for Hodgkin and Reed-Sternberg cells by characterisation of homozygous deletions in classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol.* 2008, 142(6), S. 916-24.
24. **Martín-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A et al.** Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2006, 1;66(21), S. 10332-8.
25. **Re D, Zander T, Diehl V, Wolf J.** Genetic instability in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002, 13 Suppl 1, S. 19-22.



26. **Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S et al.** Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. *Haematologica*. 2008, 93(9), S. 1318-26.
27. **Richards S, Watanabe C, Santos L, Craxton A, Clark EA.** Regulation of B-cell entry into the cell cycle. *Immunol Rev*. 2008, 224, S. 183-200.
28. **Daniel P.** Zellzyklus und Apoptose. [Buchverf.] D. Ganten und K. Ruckpaul. *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003, S. 130-183.
29. Zellzyklus-regulierte Genexpression. <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1999/0401/html/5Einleitung.html>. [Online]
30. **Malumbres M, Barbacid M.** Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009, 9(3), S. 153-66.
31. **Branzei D, Foiani M.** Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008, 9(4), S. 297-308.
32. **Hakem R.** DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J*. 2008, 27(4), S. 589-605.
33. **Helton ES, Chen X.** p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem*. 2007, 1;100(4), S. 883-96.
34. **Levine AJ.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997, 7;88(3), S. 323-31.
35. **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.** Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, 408, S. 307-310.
36. **Liebermann DA, Hoffman B, Vesely D.** p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines. *Cell Cycle*. 2007, 15;6(2), S. 166-70.
37. **Millau JF, Bastien N, Drouin R.** P53 transcriptional activities: a general overview and some thoughts. *Mutat Res*. 2009, 681(2-3), S. 118-33.
38. **Iannolo G, Conticello C, Memeo L, De Maria R.** Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007, 66(1), S. 42-51.
39. **Zambetti GP, Xing WL.** *The P53 Tumor Suppressor Pathway and Cancer (Protein Reviews)*. s.l. : Springer Science+Business Media, Inc. 2005., 2005.
40. **Cotter TG.** Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009, 9(7), S. 501-7.
41. **Vousden KH.** Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 14;1602(1), S. 47-59.

42. **Vousden KH, Lane DP.** p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, 8(4), S. 275-83.
43. **Woods DB, Vousden KH.** Regulation of p53 function. *Experimental Cell Research.* 2001, 264, S. 56-66.
44. **Vousden KH, Ryan KM.** p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2009, 9(10), S. 691-700.
45. **Okorokov AL, Orlova EV.** Structural Biology of the p53 Tumor Suppressor. *Current Opinion in Structural Biology.* 2009, 19, S. 197–202.
46. **Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH.** Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol.* 2001, 13(3), S. 332-7.
47. **Vaseva AV, Moll UM.** The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1787(5), S. 414-20.
48. **Green DR, Kroemer G.** Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature.* 2009, 30;458(7242), S. 1127-30.
49. **Vousden KH.** p53: death star. *Cell.* 2000, 22;103(5), S. 691-4.
50. **Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008, 9(5), S. 402-12.
51. **Aylon Y, Oren M.** Living with p53, dying of p53. *Cell.* 2007, 24;130(4), S. 597-600.
52. **Gupta RK, Norton AJ, Lister TA et al.** p53 protein expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Leukemia.* 1993, 7 Suppl 2, S. 31-33.
53. **Gupta RK, Norton AJ, Thompson IW et al.** p53 expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Br.J.Cancer.* 1992, 66, S. 649-652.
54. **Niedobitek G, Rowlands DC, Young LS et al.** Overexpression of p53 in Hodgkin's disease: lack of correlation with Epstein-Barr virus infection. *J.Pathol.* 1993, 169, S. 207-212.
55. **Piris MA, Villuendas R, Martinez JC et al.** p53 expression in non-Hodgkin's lymphomas: a marker of p53 inactivation? *Leuk.Lymphoma.* 1995, 17, S. 35-42.
56. **Kawamata N, Miller C, Levy V, Shintaku IP, Koeffler HP, Said JW.** mdm-2 oncogene expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Diagn.Mol.Pathol.* 1996, 5, S. 33-38.
57. **Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A et al.** The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood.* 1994, 84, S. 3158-3165.
58. **Chen WG, Chen YY, Kamel OW et al.** p53 mutations in Hodgkin's disease. *Lab Invest.* 1996, 75(4), S. 519-27.
59. **Elenitoba-Johnson KS, Medeiros LJ, Khorsand J, King TC.** P53 expression in Reed-Sternberg cells does not correlate with gene mutations in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol.* 1996, 106(6), S. 728-38.

60. **Trümper LH, Brady G, Bagg A et al.** Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood*. 1993, 81(11), S. 3097-115.
61. **Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR.** Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgVH mutation. *Blood*. 15. Aug 2002, 100(4), S. 1404-1409.
62. **Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T.** p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood*. Aug 2001, 98(3), S. 814-22.
63. **Wang XQ, Stanbridge EJ, Lao X, Cai Q, Fan ST, Redpath JL.** p53-dependent Chk1 phosphorylation is required for maintenance of prolonged G2 Arrest. *Radiat Res*. 2007, Radiat Res. 2007 Dec;168(6):706-15, S. 706-15.
64. **Levesque AA, Fanous AA, Poh A, Eastman A.** Defective p53 signaling in p53 wild-type tumors attenuates p21waf1 induction and cyclin B repression rendering them sensitive to Chk1 inhibitors that abrogate DNA damage-induced S and G2 arrest. *Mol Cancer Ther*. Feb 2008, 7(2), S. 252-62.
65. **Zaugg K, Rocha S, Resch H et al.** Differential p53-dependent mechanism of radiosensitization in vitro and in vivo by the protein kinase C-specific inhibitor PKC412. *Cancer Res*. 15. Jan 2001, 61(2), S. 732-8.
66. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem*. 1976, 72, S. 248-254.
67. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227, S. 680-685.
68. **Kaufmann SH.** The erasable Western blot. *Anal.Biochem*. 1987, 161, S. 89-95.
69. —. Erasure of Western blots after autoradiographic or chemiluminescent detection. *Immunochemical Protocols*. 1998, S. 223-235.
70. **Sanger F.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*. 1977, 1992, 24, S. 104-108.
71. **Affymetrix.** About the company. [www.affymetrix.com/corporate/history/index.affx](http://www.affymetrix.com/corporate/history/index.affx), 2005. [Online]
72. **Lipshut RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ.** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet*. 1999, 21, S. 20-24.
73. **Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE.** Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*. Nov 2000, 29(5), S. 1042-6, 1048-55.

74. **Affymetrix**. GeneChip® Expression Analysis, Data Analysis Fundamentals, Part No. 701190 Rev. 4. *www.affymetrix.com*. [Online]
75. **Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD et al**. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994, 15;265(5170), S. 346-55.
76. **Feuerborn A, Moritz C, von Bonin F et al**. Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma*. 2006, 47, S. 1932–40.
77. **Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL et al**. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum. Mutat*. 2002, 19(2), S. 149-64.
78. **Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL**. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2008, 7(12), S. 979-87.
79. <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/snps/snpdetail>. *p53 KnowledgeBase* . [Online]
80. **Bittenbring J, Parisot F, Wabo A et al**. MDM2 gene SNP309 T/G and p53 gene SNP72 G/C do not influence diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma onset or survival in central European Caucasians. *BMC Cancer*. Apr 2008, 23;8:116.
81. **Zainuddin N, Berglund M, Wanders A et al**. TP53 mutations predict for poor survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma of germinal center subtype. *Leuk. Res*. 2009, 33(1), S. 60-6.
82. **Zenz T, Benner A, Döhner H, Stilgenbauer S**. Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistant in cancer- The role of the p53 pathway. *Cell Cycle*. 2008, 7:24, S. 3810-3814.
83. **Staudt LM, Dave S**. The Biology of Human Lymphoid Malignancies Revealed by Gene Expression Profiling. *Immunology*. 2005, 87, S. 163-208.
84. **Lenz G, Wright GW, Emre NC et al**. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105(36), S. 13520-5.
85. **Hunt KE, Kaaren KR**. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008, 132, S. 118–124.
86. **Cillessen SA, Meijer CJ, Notoya M et al**. Molecular targeted therapies for diffuse large B-cell lymphoma based on apoptosis profiles. *J Pathol*. 2010, 220, S. 509–520.
87. **KH. Young, DD. Weisenburger, BJ. Dave, L. Smith, W. Sanger, J. Iqbal, E. Campo, J. Delabie, RD. Gascoyne, G. Ott, L. Rimsza, HK. Müller-Hermelink, ES. Jaffe, A. Rosenwald, LM. Staudt, WC. Chan, TC. Greiner**. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAIL receptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007, 110, S. 4396-4405.

88. **Young KH, Leroy K, Møller MB et al.** Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood*. 2008., 112(8), S. 3088-98.
89. **Knoops L., de Jong D.** The role of the p53 pathway in the treatment of follicular lymphoma. *Cell Cycle*. 2008, 7:4, S. 436-439.
90. **Knoops L, Haas R, de Kemp S, Majoor D, Broeks A, Eldering E, de Boer JP, Verheij M, van Ostrom C, de Vries A, van't Veer L, de Jong D.** In vivo p53 response and immune reaction underlie highly effective low-dose radiotherapy in follicular lymphoma. *Blood*. 2007, 110(4), S. 1116-22.
91. **Weinkauff M, Christopeit M, Hiddemann W, Dreyling M.** Proteome- and microarray-based expression analysis of lymphoma cell lines identifies a p53-centered cluster of differentially expressed proteins in mantle cell and follicular lymphoma. *Electrophoresis*. 2007, 28(23), S. 4416-26.
92. **Ott G, Rosenwald A.** Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *Haematologica*. 2008, 93(12), S. 1773-6.
93. **Pileri SA, Falini B.** Mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2009, 94(11), S. 1488-92.
94. **Stefancikova L, Moulis M, Fabian P et al.** Loss of the p53 tumor suppressor activity is associated with negative prognosis of mantle cell lymphoma. *Int J Oncol*. 2010, 36(3), S. 699-706.
95. **Drakos E, Atsaves V, Li J et al.** Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2009, 23(4), S. 784-90.
96. **Janz M, Hummel M, Truss M et al.** Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2006, Bd. 15, 107(6), S. 2536-9.
97. **Mathas S, Janz M, Hummel F et al.** Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*. 2006, 7(2), S. 207-15.
98. **Shaulian E, Karin M.** AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002, 4(5), S. 131-6.
99. **Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I et al.** Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J*. 2002, 1;21(15), S. 4104-13.

100. **Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D et al.** Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, S. 2961–2969.
101. **Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I et al.** Nuclear factor  $\kappa$ B-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J. Exp. Med.* 2002, 196, S. 605–617.
102. **Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V et al.** TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med.* 2009, Bd. 11, 206(5), S. 981-9 .
103. **Cambiaggi C, Scupoli MT, Cestari T et al.** Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics.* 1992, 36, S. 117-120.
104. [www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/603599](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/603599). [Online]

## 8 Danksagung

Danken möchte ich zunächst Prof. Dr. Harald Stein für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Unterstützung und Gesprächsbereitschaft, die er mir stets entgegengebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Hummel. Er hat mich als mein Betreuer in jeder Hinsicht engagiert unterstützt und mich die Grundlagen und Feinheiten des wissenschaftlichen Arbeits und Schreibens gelehrt. Bei allen auftretenden Schwierigkeiten war er immer ansprechbar und hat mir durch konstruktive Vorschläge, besonders auch in der Phase des Zusammenschreibens, sehr weitergeholfen.

Besondere Dankesworte möchte ich an Dr. Dido Lenze richten, die mir von Beginn an, sowohl beim Erlernen und Durchführen aller verwendeten Labortechniken, bei der Auswertung der Ergebnisse als auch beim Schreiben der Arbeit stets zur Seite gestanden hat und beim Lösen aller auftretenden Probleme jederzeit für mich da war.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für das offene und freundschaftliche Arbeitsklima, welches maßgeblich zu meiner Motivation bei dieser Arbeit beigetragen hat. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich besonders bei Dr. Ulrike Treichel, Edda von der Wall und Dr. Anke Ehlers neben der fachlichen auch für die mentale Unterstützung.

Im privaten Bereich danke ich meinem Freund Titus Berndt, dessen Unterstützung im familiären Bereich mir die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert hat, und meinem Sohn Tiberius Petereit, meinen Eltern Hannelore und Hans-Joachim Petereit und insbesondere meiner Schwester Sylvia Petereit sowie meiner Freundin Anke Aßmann für ihre liebevolle und konstante Motivation in allen Phasen.

## 9 Erklärung

„Ich, Claudia Petereit, geboren am 19.12.1977 in Staßfurt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: TP53-abhängige DNA-Reparatur- und Regulationsmechanismen im klassischen Hodgkin-Lymphom und B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 18.11.2011