

**Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Nachweis von Mutationen im Gen des NfkappaB-Inhibitors α in
kultivierten und primären Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von
Martina Meiser
aus Saarbrücken

Gutachter:

1. Prof. Dr. Bernd Dörken
2. Prof. Dr. Lorenz Trümper
3. Prof. Dr. Alfred C. Feller

Datum der Promotion: 23.6.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Zur Geschichte des Hodgkin Lymphoms	4
1.2	Klinische Manifestation und histologisches Bild des Hodgkin Lymphoms	4
1.3	Der Transkriptionsfaktor NfkappaB	6
1.4	Struktur und Funktionen des Proteins NfkappaB	7
1.5	NfkappaB in B-Lymphozyten und Hodgkin-Zellen	12
1.6	Das Inhibitormolekül IkappaBalpha	13
1.7	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Analyse von IkappaBα in Zelllinien	20
2.1.1	Zelllinien	20
2.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	20
2.1.3	Reverse-Transkriptase-PCR	21
2.1.4	Genomische PCR	23
2.1.5	Präparation von Zellproteinen und Western-Blot	23
2.2	Analyse von IkappaBα in Primärmaterial	24
2.2.1	<i>In situ</i>-Hybridisierung	24
2.2.1.1	Herstellung einer Sonde	24
2.2.1.2	Vorbehandlung der Paraffinschnitte	25
2.2.1.3	Hybridisierung	25
2.2.1.4	Autoradiographie	26
2.2.1.5	Exposition und Entwicklung	26
2.2.1.6	Gegenfärbung	27
2.2.1.7	Kontrollen	27
2.2.2	Einzelzellanalyse	27
2.2.2.1	Färbung von Gefrierschnitten	27
2.2.2.2	Isolierung von Einzelzellen	28
2.2.2.3	Einzelzell-PCR	31
3	Ergebnisse	35
3.1	Reverse Transkription der IkappaB α -mRNA in Hodgkin-Zelllinien	35
3.2	Genomische PCR aus Zelllinien-DNA	36
3.3	Western-Blot zum Nachweis des IkappaB α -Translationsproduktes	37
3.4	Nachweis von IkappaB α -RNA in Hodgkin-Gewebe mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	38
3.5	Analyse des IkappaB-Gens in Einzelzellen	41
4	Diskussion	45
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	56
	Anhang	68
	Danksagung	68
	Lebenslauf	69
	Eidesstattliche Erklärung	70

5 Zusammenfassung

Das Hodgkin Lymphom ist eine der häufigsten lymphoproliferativen Erkrankungen in den industrialisierten Ländern. Trotz grosser Erfolge in der Therapie sind die molekularen Zusammenhänge bisher weitgehend ungeklärt.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass sich der Transkriptionsfaktor NfkappaB in den Tumorzellen des Hodgkin Lymphoms, den Hodgkin und Reed- Sternberg (HRS)-Zellen der physiologischen Steuerung entzieht und konstitutiv aktiv ist. Dies führt zu einer Deregulation zahlreicher Gene, die eine wichtige Rolle in der Apoptose, der Zellwachstumskontrolle und der Zelldifferenzierung und –aktivierung innehaben.

Die transkriptionelle Aktivität im Zellkern wird unter anderem durch Bindung an Inhibitoren (IkappB) im Zytoplasma reguliert, wobei dem Inhibitor IkappaB α eine zentrale Rolle zukommt. Die Expression des IkappaB α -Gens wird seinerseits durch NfkappaB in einem Regelkreis gesteuert.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Defekte im IkappaB α - Gen für die konstitutive Aktivität von NfkappaB verantwortlich sind.

In einem ersten Schritt wurde IkappaB α in Zelllinien, die von Hodgkin Lymphomen abstammen, auf Protein-, RNA-, und DNA-Ebene untersucht. In zwei von sieben Zelllinien fanden sich Mutationen, die zu einem trunkierten, nicht zur Inhibition des NfkappaB geeigneten Protein führten. Zur Klärung, ob diese Defekte auch bei primären HRS- Zellen im Gewebe zur konstitutiven Aktivität führen, wurden insgesamt 420 einzeln isolierte HRS- Zellen aus 10 Hodgkin-Fällen mittels einer zweistufigen single copy PCR auf Genmutationen untersucht. Dabei liess sich in einem Fall ein Stoppcodon nachweisen, dass ebenso zu einem trunkierten Protein führt.

In einer in situ- Hybridisierung zum Expressionsnachweis von IkappaB α in 20 Hodgkin-Fällen fanden sich in der grossen Mehrzahl der Fälle eine starke Überexpression des Inhibitormoleküls. Dies zeigt erneut recht eindeutig den Zusammenhang zwischen einer Überexpression des NfkappaB-Proteins und der resultierenden Steigerung der Inhibitorexpression durch zellinterne Regelkreise.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Defekte im IkappaB α -Gen die konstitutive Aktivität von NfkappaB in HRS-Zellen nur zum Teil erklären können. Weitere, bisher nicht identifizierte Faktoren oder Mechanismen müssen in der Mehrzahl der Hodgkin Lymphom Fälle für die unkontrollierte Aktivität von NfkappaB und die daraus

resultierenden Krankheitserscheinungen verantwortlich gemacht werden. Diese zu identifizieren wird die Aufgabe der kommenden Forschung sein.