

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

MOLEKULARGENETISCHE UND EPIGENETISCHE ANALYSEN
DER rRNA-GENORTE
BEI KLASSISCHEN HODGKIN-LYMPHOMEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von

CHRISTINE MARIA PADBERG
aus Winterberg
Kiel 2009

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Siebert

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Brüggemann

Tag der mündlichen Prüfung:

18. Juni 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

18. Juni 2009

Gez.: Prof. Dr. Stick
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Hodgkin-Lymphom	1
1.1.1. Klinisches Erscheinungsbild, Histologie und Klassifikation	1
1.1.2. Genetische Veränderungen beim Hodgkin-Lymphom	2
1.1.2.1. Chromosomale Instabilität	4
1.1.2.2. JAK / STAT-Signalkaskade	5
1.1.2.3. rRNA-Gene	6
1.2. Fragestellung.....	8
2. Materialien und Methoden.....	10
2.1. Untersuchungsmaterial.....	10
2.1.1. Kontroll-DNA.....	10
2.1.2. Primäre Hodgkin-Lymphome	10
2.1.3. Zelllinien.....	12
2.2. Materialien.....	13
2.2.1. Reagenzien.....	13
2.2.2. Kits.....	13
2.2.3. Puffer und Lösungen.....	14
2.2.4. Geräte und Software.....	16
2.2.5. Plasmid- und BAC-Klone	17
2.2.6. Primer	18
2.3. Methoden	18
2.3.1. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	18
2.3.1.1. DNA-Isolierung	19
2.3.1.2. DNA-Quantifizierung	19
2.3.1.3. Markierung der DNA-Proben.....	20

2.3.1.4. Vorbereitung der DNA-Proben	20
2.3.1.5. Erstellung von Präparaten	21
2.3.1.6. Hybridisierung	22
2.3.1.7. Auswertung und Dokumentation	23
2.3.2. Methylierungsanalyse der rRNA-Gensegmente <i>5-ETS</i> , <i>18S</i> und <i>28S</i>	23
2.3.2.1. Natrium-Bisulfit-Behandlung der DNA	23
2.3.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.3.2.3. Ligation und Klonierung.....	26
2.3.2.4. Sequenzierung	28
2.3.2.5. Auswertung und Dokumentation	29
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Genetische Veränderungen in den rRNA-Genen	32
3.1.1. Interphase FISH mit den Sonden für die rRNA-Gene	32
3.1.1.1. Anzahl der Nukleoli in cHL-Zelllinien	33
3.1.1.2. Anzahl der Nukleoli in HRS-Zellen von primären cHL	34
3.1.1.3. Größe der Nukleoli in cHL-Zelllinien.....	36
3.1.1.4. Größe der Nukleoli in primären cHL	37
3.1.1.5. Korrelation zwischen Anzahl und Größe der Nukleoli	38
3.1.1.6. Fiber-FISH.....	39
3.1.2. FISH-Analysen von rRNA-Genen und <i>JAK2 / PDCD1LG2</i>	40
3.1.2.1. Interphase FISH in cHL-Zelllinien.....	41
3.1.2.2. Interphase FISH in primären cHL	42
3.1.2.3. Fiber-FISH.....	43
3.2. DNA-Methylierungsanalyse der rRNA-Gene	44
3.2.1. Natrium-Bisulfit-Sequenzierung von <i>5-ETS</i>	45
3.2.2. Natrium-Bisulfit-Sequenzierung des rRNA-Gens <i>18S</i>	46
3.2.3. Natrium-Bisulfit-Sequenzierung des rRNA-Gens <i>28S</i>	47
4. Diskussion.....	49
4.1. Methodische Aspekte	49
4.2. Biologie des Hodgkin-Lymphoms	51
4.2.1. Veränderungen der rRNA-Gene in Hodgkin-Lymphomen.....	51

4.2.2. Aberrationen des JAK2 / PDCD1LG2-Genlocus.....	52
4.2.3. Veränderungen der DNA-Methylierung der rRNA-Gene.....	54
4.3. Fazit.....	56
4.4. Ausblick.....	57
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis.....	VI
7. Anhang.....	XIII
7.1. Chromosomale Aberrationen der analysierten Zelllinien (Joos et al., 2003)..	XIII
7.2. Auswertung der FISH-Sonden Probe A und Probe B.....	XV
8. Danksagung.....	XVII
9. Lebenslauf.....	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, eine Purinbase der DNA
ASA	acrocentric chromosome short arm rearrangements (Veränderungen der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen)
C	Cytosin, eine Pyrimidinbase der DNA
C	Celsius
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungscluster)
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
DAPI	4' 6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Dnmt1	DNA-Methyltransferase 1
ETS	externer transkribierter Spacer
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	Guanin, eine Purinbase der DNA
g	Gramm
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS-Zellen	Hodgkin Reed-Sternberg Zellen
IGS	intergenischer Spacer
ITS	interner transkribierter Spacer
Jak	Janus Kinase
k	Kilo
l	Liter
m	milli- (10^{-3})
m	männlich
min	Minute
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NOR	nucleolus organizer region (Organisierungsregion des Nukleolus)
p	pico- (10^{-12})
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

Abkürzungsverzeichnis

rRNA	ribosomale RNA
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S	Sedimentationskonstante
SCA	segmentale chromosomale Aberrationen
sec	Sekunde
sgr	spectrum green (grüner Fluoreszenzfarbstoff)
so	spectrum orange (roter Fluoreszenzfarbstoff)
STAT	signal transducers and activators of transcription (Signalübermittler und Aktivator der Transkription)
T	Thymin, eine Pyrimidinbase der DNA
U	Uracil, eine Base der RNA
V	Volt
w	weiblich
WHO	World Health Organization, (Weltgesundheitsorganisation)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galctosid
μ	mikro- (10^{-6})

1. Einleitung

Maligne Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Systems, die aus den verschiedenen B- und T-Zell-Kompartimenten der primären, sekundären und sekundär besiedelten lymphatischen Organen hervorgehen (Böcker et al., 2004).

Die Einteilung erfolgt in zwei Gruppen:

- Hodgkin-Lymphome (HL) und
- Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).

Die Prävalenz maligner Lymphome liegt in Europa bei ca. 5 – 7 pro 100.000 Einwohnern (Robert Koch Institut, 2008). Dabei stellt das Hodgkin-Lymphom ca. 30 % aller Lymphome (Stein, 2000).

1.1. Hodgkin-Lymphom

1.1.1. Klinisches Erscheinungsbild, Histologie und Klassifikation

Das Hodgkin-Lymphom ist ein B-Zell-Lymphom, das seinen Ausgang vor allem von den zervikalen Lymphknoten nimmt (ca. 70 – 75 %). Im Frühstadium ist das Hodgkin-Lymphom eine lokalisierte Lymphknotenerkrankung, die sich im weiteren Verlauf zu einer granulomatösen Systemerkrankung entwickelt mit zuerst lymphogener, später hämatogener Streuung. Dabei kennzeichnen Lymphknotenschwellungen und begleitende Allgemeinsymptome das klinische Erscheinungsbild (Stein et al., 2000).

Die charakteristischen monoklonalen CD30-positiven B-Lymphozyten, sogenannte Hodgkin Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen, stammen aus den Keimzentren von Lymphknoten. Die einkernigen Hodgkin-Zellen und mehrkernigen Riesenzellen (Sternberg-Reed-Zellen), die nur etwa 0,1 – 1 % der Zellen eines betroffenen Lymphknotens ausmachen, sind in ein begleitendes Inflammationsgewebe von reaktiven Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, sogenannten Bystander-Zellen, eingebettet (Drexler, 1992; Haluska et al., 1994; Küppers et al., 1996).

Die histologische Einteilung erfolgt nach der WHO-Klassifikation (Stein et al., 2000):

Das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) stellt mit ca. 95 % den Großteil der Hodgkin-Lymphome. Es wird in vier Subtypen unterteilt:

- Noduläre Sklerose (ca. 63 %)
- Gemischtzelliger Typ (ca. 27 %)
- Lymphozytenreicher klassischer Typ (ca. 4 %) und
- Lymphozytenarmer Typ (< 1 %).

Das lymphozytenreiche prädominante Hodgkin-Lymphom (LPHL) tritt mit ca. 5 % aller HL seltener auf als das cHL (Stein et al., 2000).

HRS-Zellen zeigen histologisch einen prominenten, vergrößerten, eosinophilen Nukleolus mit hellem Chromatin (Stein et al., 2000). Der Nukleolus bildet das morphologische Korrelat der ribosomalen RNA-(rRNA)-Synthese, da sich hier die Chromosomenregionen, die für die rRNA-Gene kodieren, zusammenlagern (Espada et al., 2007).

1.1.2. Genetische Veränderungen beim Hodgkin-Lymphom

Im Gegensatz zu anderen hämatopoetischen Neoplasien sind typische Translokationen, die zu einer Onkogenfusion oder -aktivierung führen, bei klassischen Hodgkin-Lymphomen weitgehend unbekannt (MacLeod et al., 2000). Charakteristische chromosomale Veränderungen wurden mittels klassischer zytogenetischer Verfahren bislang nicht gefunden (Falzetti et al., 1999; Siebert et al., 2001). Erst Untersuchungen auf molekularzytogenetischer Ebene, wie z. B. mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), gaben Einsicht in wiederkehrende chromosomale Aberrationen.

Mangels einer ausreichenden Anzahl der malignen HRS-Zellen in den betroffenen Lymphknoten scheitern konventionelle Chromosomenanalysen oft und führen entweder zum vollständigen Fehlen von Metaphasen oder zu normalen Karyotypen,

die sich von den nicht-neoplastischen Bystander-Zellen ableiten (Martin-Subero et al., 2003). Sind konventionelle Chromosomenanalysen dennoch erfolgreich, was nur in ca. 10 % der Fall ist, finden sich in den Tumorzell-Metaphasen typischerweise hochgradig veränderte Karyotypen mit Chromosomenzahlen in hyperploidem Bereich. Diese sind durch intraklonale Variabilität gekennzeichnet (Joos et al., 2003) und weisen häufig komplexe strukturelle Veränderungen mit diversen Bruchpunkten auf (Thangavelu und Le Beau, 1989; Atkin, 1998; Falzetti et al., 1999). Wiederkehrend sind vor allem Veränderungen der Regionen 1p, 4q, 6q, 7q, 12q und 14q sowie der Banden 4q35, 6q24 und 14q32 (Cabanillas et al., 1988; Thangavelu und Le Beau, 1989; Schouten et al., 1989; Ladanyi et al., 1991; Tilly et al., 1991; Ankathil et al., 1992; Poppema et al., 1992; Döhner et al., 1992; Schlegelberger et al., 1994; Pedersen et al., 1999). Für die vorliegende Arbeit ist von Bedeutung, dass strukturelle Rearrangements der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen 13, 14 und 15, in denen die rRNA-Gene liegen, häufig bei cHL beschrieben wurden (Falzetti et al., 1999).

Mittels molekularzytogenetischer Untersuchungen an mikrodissoziierten HRS-Zellen konnten wiederkehrende Zugewinne – einschließlich Amplifikationen – in den Chromosomenregionen 2p, 9p und 12q nachgewiesen werden (Joos et al., 2002). Diese Veränderungen betreffen u. a. die Gene *REL/BCL11A* (2p13-16) und *JAK2* (9p24) (Joos et al., 2000 und 2002; Martin-Subero et al., 2002).

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf den oben erwähnten Charakteristika der HRS-Zellen, insbesondere der chromosomalen Instabilität, den Amplifikationen des *JAK2*-Genortes im kurzen Arm von Chromosom 9 und den Veränderungen der rRNA-Gene in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen. Es gibt Hinweise dafür, dass diese drei Charakteristika der Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen interagieren und sich gegenseitig bedingen (MacLeod et al., 2000). Die folgenden Abschnitte beschreiben diese Charakteristika.

1.1.2.1. Chromosomale Instabilität

HRS-Zellen zeigen deutliche chromosomale Instabilität (Weber-Matthiesen et al., 1995; Falzetti et al., 1999; Martin-Subero et al., 2002; Joos et al., 2003). Sie weisen hochgradig veränderte Karyotypen mit einer ausgeprägten Aneuploidie und multiplen strukturellen und numerischen Aberrationen auf (Thangavelu und Le Beau, 1989; Drexler, 1992; Deerberg-Wittram et al., 1996; Atkin, 1998; Falzetti et al., 1999).

Die Ursache dieser chromosomalen Instabilität in HL ist weitgehend unbekannt (Martin-Subero et al., 2003). Prinzipiell gilt, dass epigenetische Veränderungen zu chromosomaler Instabilität führen können: Im Vergleich zu normalen Zellen treten in Tumorzellen oft Hypo- oder Hypermethylierungen der DNA auf. Durch Methylierung an Cytosin-Basen, die in CpG Dinukleotiden lokalisiert sind, werden Genexpression sowie Chromatinstruktur beeinflusst. Diese CpGs treten vereinzelt, in repetitiven Sequenzen sowie gruppiert in sogenannten CpG-Inseln in der Promotorregion von Genen auf (Dunn, 2003). Hypermethylierungen von CpGs führen zu einer Kondensation des Chromatins und damit zur Geninaktivierung; dahingegen führt Hypomethylierung zu Genaktivierung, da die Chromatinstruktur gelockert vorliegt. In Tumorzellen ist die Gesamtzahl der methylierten CpGs erniedrigt. Dies gilt v. a. für repetitive Sequenzen wie z. B. rRNA-Gene (Ehrlich, 2002). Diese Hypomethylierung resultiert über die Auflockerung des Chromatins in einer vermehrten „Zerbrechlichkeit“ der DNA und führt dadurch zu einer Zunahme von chromosomalen Rearrangements sowie chromosomaler Instabilität (Eden et al., 2003; Gaudet et al., 2003).

Eine zweite Erklärung für die chromosomalen Instabilität bei cHL entstammt der Chromosomenanalyse von HL-Zelllinien. Hier findet sich eine Vervielfachung kleinerer translozierter Segmente von ca. 1 – 8 Mb, sogenannte segmentale chromosomale Aberrationen (SCA) (Joos et al., 2003). Durch SCA erfolgt ein Anstieg der Gendosis, da hierbei multiple Kopien eines bestimmten Chromosomensegments in verschiedene Abschnitte des Genoms transloziert oder inseriert sind (Martin-Subero et al., 2003). Bemerkenswerterweise wurden SCAs identifiziert, welche rRNA-Gene und *JAK2* in den Zellkernen enthielten (MacLeod et al., 2000; Joos et al., 2003) (siehe unten).

1.1.2.2. JAK / STAT-Signalkaskade

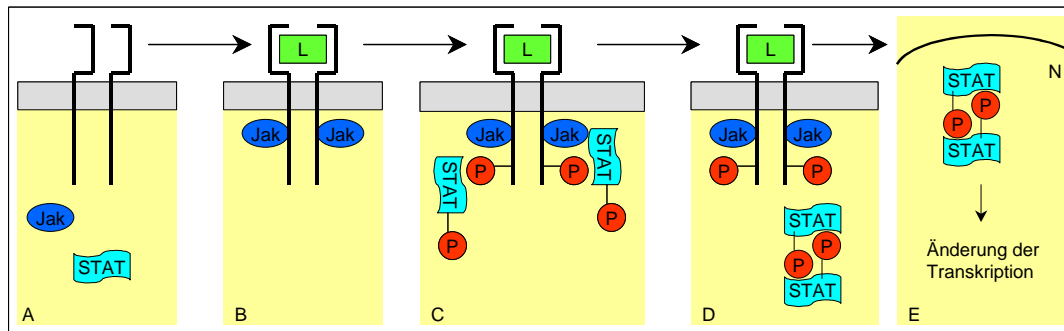
In zytogenetischen Studien an Interphasen von HRS-Zellen zeigten sich in bis zu 33% der Fälle Zugewinne in der für *JAK2* kodierenden Gensequenz in 9p24 (Joos et al., 2000, 2002 und 2003). Die höchste Amplifikationsrate trat dabei in der cHL-Zelllinie HDLM2 auf. Wie schon erwähnt, zeigte sich eine Assoziation zwischen *JAK2* und SCAs. Diejenigen SCAs, die *JAK2* betrafen, fanden sich in drei von vier untersuchten HL-Zelllinien (Joos et al., 2003). Insertionen von rRNA-Sequenzen zwischen einigen SCAs in der cHL-Zelllinie HDLM2 führten zu dem Schluss, dass komplexe chromosomale Rearrangements der rRNA-Loci zur Ausbildung von SCA führen könnten (MacLeod et al., 2000). Die rRNA könnte hierbei als „Transportmittel“ benutzt werden und so bestimmte chromosomale Segmente in unterschiedliche Teile des Genom translozieren (MacLeod et al., 2000); u. a. wurde dieser Mechanismus für *JAK2* angenommen (Martin-Subero et al., 2003). In der Zelllinie HDLM2 und in einem primären HL-Fall zeigten sich dann mittels FISH auch Co-Lokalisationen zwischen rRNA-Sequenzen und den SCAs von 9p bzw. *JAK2* (MacLeod et al., 2000; Martin-Subero et al., 2003). In der HDLM2-Zelllinie fanden sich in drei von vier untersuchten subtelomerischen Mikrosatelliten-Repeats Co-Amplifikationen in 9p2. Diese Amplifikationen lagen in Abschnitten nicht-transkribierter rRNA (MacLeod et al., 2000).

Das Gen *JAK2* kodiert für eine Tyrosinkinase, die zu den sogenannten Janus-Kinasen (Jak) zählt. Zusammen mit den STAT (signal transducers and activators of transcription) Proteinen bilden sie die JAK/STAT-Signalkaskade. Die STAT Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die u. a. durch Zytokinrezeptoren via Jak aktiviert werden (Ihle, 2001). Bindet ein Ligand an einem solchen Zytokinrezeptor, so erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors (siehe Abbildung 1). An ihn können nun Jaks binden, die wiederum spezifische Tyrosinreste des Rezeptors phosphorylieren. Über SH2-Domänen können STATs binden, die nach Phosphorylierung dimerisieren. Die dimerisierten STATs werden in den Zellkern transloziert, wo sie Einfluss auf die Transkription spezifischer Gene nehmen (Levy und Darnell, 2002).

In der Mehrzahl der primären cHL ist STAT3 und STAT6 aktiviert (Kube et al., 2001; Skinnider et al., 2002; Bräuninger et al., 2006). Die andauernde Aktivität von STAT3

unterdrückt die Induktion der Apoptose (Holtick et al., 2005), während die konstitutive Aktivierung von STAT6 zu einer Zunahme der Proliferationsrate der HRS-Zellen führt (Kapp et al., 1999; Skinnider et al., 2001). Möglicherweise tragen die oben erwähnten Amplifikationen in 9p24 sowie die SCAs, die JAK2 betreffen, zu der typisch konstitutiven Aktivierung der JAK/STAT-Signalkaskade in cHL bei.

Abb. 1: Schematische Darstellung der JAK/STAT-Signalkaskade (modifiziert nach Löffler, 2001).



A) Es ist kein Ligand gebunden. B) Die Bindung eines Liganden löst eine Dimerisierung des Zytokinrezeptors aus. Dadurch können die Janus-Kinasen gebunden werden. C) Es erfolgt eine Phosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors, an den sich STATs anlagern können. D) Phosphorylierte STATs bilden einen Dimer und werden in den Zellkern transloziert. E) Phosphorylierte STATs können Änderungen der Transkription spezifischer Gene hervorrufen.

Jak = Janus-Kinase, STAT = signal transducers and activators of transcription, L = Ligand, P = Phosphorylierung, N = Nukleolus.

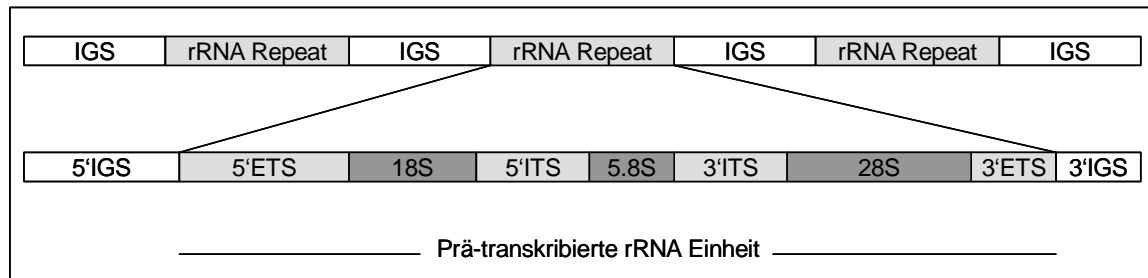
1.1.2.3. rRNA-Gene

Die Funktion der rRNA besteht in der Bildung von Ribosomen, die für die Proteinbiosynthese von essentieller Bedeutung sind. An ihnen wird entsprechend der Basenfolge der DNA eine Aminosäurenkette synthetisiert, die die Primärstruktur des herzustellenden Proteins bildet.

Humane rRNA-Gene sind in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen (Chr. 13, 14, 15, 21 und 22) lokalisiert. Sie bestehen aus hintereinander geschalteten Repeats, die mit mehreren hundert Einheiten in Gruppen zusammengefasst sind, sogenannte nucleolus organizer regions (NORs). Die Basisstruktur von NORs wurde beschrieben als 43-kb Repeat, die die transkribierten Regionen der rRNA-Gene 18S,

5.8S und 28S sowie einen „intergenetischen Spacer“ (IGS) beinhalten (siehe Abbildung 2) (Sylvester et al., 1986; Gonzalez und Sylvester, 1995). Die IGS sind bezüglich ihrer Länge sehr variabel, im Durchschnitt 34.2 ± 5.4 kb, mit individuellen IGS-Einheiten von 9 bis 72 kb (Caburet et al., 2005). Die ca. 8 - 14 kb großen rRNA-Gen-Repeats werden zusätzlich durch einen externen (ETS) und einen internen transkribierten Spacer (ITS) untergliedert, die sich je am 5´ und am 3´ Ende befinden.

Abb. 2: Schematische Darstellung der rRNA-Repeats (modifiziert nach Singer und Berg, 1991).



Oben: Basisstruktur der Anordnung von rRNA-Gen-Repeats und intergenetischen Spacern. Unten: Abfolge der ETS, ITS innerhalb der rRNA-Gene 18S, 5.8S und 28S.

Es wird angenommen, dass die rRNA-Einheiten alternierend angeordnet sind: Auf eine transkribierte Region folgt ein nicht-transkribierter Abschnitt. Meistens besteht eine Telomer-zu-Zentromer Orientierung der Repeats (Henderson et al., 1972; Worton et al., 1988). Bei etwa einem Drittel aller gesunden Personen liegen diese regelmäßigen Einheiten nicht vor, stattdessen bilden sich Palindrom-Strukturen aus, die wahrscheinlich zu funktionsuntüchtigen Pseudogenen führen (Caburet et al., 2005).

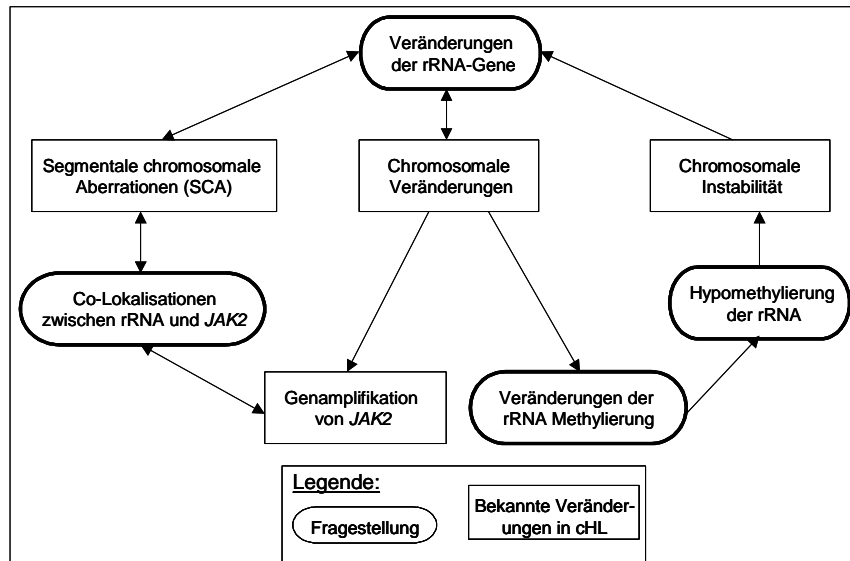
Weiterhin ist ein hoher Grad an genetischer Instabilität zu verzeichnen, der die transkribierten sowie die nicht transkribierten Regionen der rRNA-Gene einbezieht. Dieser ist durch ständige Veränderungen durch Gen-Umbau, Produktion und Elimination von Palindromen gekennzeichnet (Caburet et al., 2005). Dabei sind wahrscheinlich sowohl inter- als auch intrachromosomale Ereignisse involviert (Elder Jr. und Turner, 1995). Bruchpunkte an den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen, sogenannte acrocentric chromosome short arm rearrangements (ASA), stellen bemerkenswerterweise eine der häufigsten chromosomalen Veränderungen

in HL dar (MacLeod et al., 1999; Cabanillas et al., 1988; Koduru et al., 1989 und 1993; Schouten et al., 1989 und 1991; Banks et al., 1991; Ladanyi et al., 1991; Tilly et al., 1991; Poppema et al., 1991; Döhner et al., 1992; Schlegelberger et al., 1994). Da rRNA-Repeats an dieser Stelle die vorherrschenden kodierenden Gensequenzen darstellen (Kaplan et al., 1993; Schmickel, 1987), sind diese durch die ASA am häufigsten betroffen. ASA treten v. a. bei noch unbehandelten HL auf (Tilly et al., 1991), wodurch eher an einen spontanen Ursprung und weniger an eine therapeutische Induktion gedacht werden kann (MacLeod et al., 2000).

1.2. Fragestellung

Wie schon zuvor erwähnt, können die Gründe für die, für HL-typische chromosomale Instabilität vielfältig sein. Eine Übersicht dieser möglichen Ursachen findet sich in Abbildung 3. Histologisch zeigen HRS-Zellen einen prominenten, vergrößerten Nukleolus, wodurch suggeriert wird, dass eine Vermehrung bzw. Veränderung bezüglich der rRNA besteht. Weiterhin fanden sich segmentale chromosomale Aberrationen zwischen rRNA-Genen und dem JAK2-Locus in einer cHL-Zelllinie sowie in einem primären HL-Fall, resultierend in Genamplifikationen und Chromosomenveränderungen (MacLeod et al., 2000; Martin-Subero et al., 2003). Man vermutet, dass eben diese chromosomalen Rearrangements und Genamplifikationen durch Veränderungen von DNA-Repeats, z. B. der rRNA-Gene, entstehen und dadurch zu SCAs führen können.

Abb. 3: Übersicht über die Fragestellung basierend auf bekannten Veränderungen in cHL.



Aberationen der rRNA-Gene können zu chromosomalen Veränderungen führen. Diese können Amplifikationen des *JAK2 / PDCD1LG2*-Genortes bewirken, welche über Co-Lokalisationen und SCAs zwischen *JAK2* und rRNA wiederum zu Rearrangements der rRNA führen. Des Weiteren können chromosomale Veränderungen der DNA-Methylierung, im Sinne von Hypomethylierungen der DNA entstehen. Dies resultiert in einer vermehrten „Zerbrechlichkeit“ der DNA und damit in chromosomaler Instabilität. Dies kann ebenfalls einen Einfluss auf Veränderungen der rRNA-Gene haben. Außerdem wird vermutet, dass diese Aberrationen sich gegenseitig beeinflussen können.

Um Einblicke in die Ursache der chromosomalen Instabilität von HRS-Zellen zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen bearbeitet:

- 1) Treten genetische Veränderung der rRNA-Gene in cHL häufig auf? Gibt es Zusammenhänge zwischen rRNA-Veränderungen und dem Auftreten von chromosomalen Veränderungen? Bestehen regelmäßig nukleäre Co-Lokalisationen zwischen rRNA und *JAK2 / PDCD1LG2* in 9p in HRS-Zellen von cHL?
- 2) Bestehen Veränderungen des DNA-Methylierungsgrades in den rRNA-Genen 18S und 28S sowie in dem externen transkribierten Spacer 5-ETS beim cHL, die zu chromosomaler Instabilität führen können? Wenn ja, treten Hyper- oder Hypomethylierungen auf?

2. Materialien und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Im Folgenden werden Untersuchungs- und Labormaterialien aufgeführt. Standard-Laborchemikalien wurden bezogen von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) und sind hier nicht detailliert aufgeführt. Ebenso werden Standard-LaboraAusstattungen wie Pipetten, Objektträger etc. nicht einzeln aufgelistet.

2.1.1. Kontroll-DNA

Methylierte und unmethylierte Kontroll-DNA für die Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen wurden von Chemicon, Hampshire, England bezogen. Als Kontrolle wurde zusätzlich die aus einer peripheren Blutprobe gewonnene DNA von freiwilligen gesunden Probanden verwendet. Die Extraktion der DNA erfolgte nach Standardmethoden durch Mitarbeiter des Institutes für Humangenetik.

2.1.2. Primäre Hodgkin-Lymphome

Es wurden sechs primäre klassische HL, von denen Restmaterial aus der tumorzytogenetischen Diagnostik im Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel asserviert waren, für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Analysen der rRNA-Gene sowie des *JAK2 / PDCD1LG2*-Genortes ausgewählt. In diesen Fällen fanden sich mittels FISH Amplifikationen von *JAK2 / PDCD1LG2*. Die Studie erfolgte im Rahmen des Projektes B1 des Deutschen Krebshilfeverbundes "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen", für welche eine positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorliegt (D403/05). Die Diagnose der primären cHL wurde von Referenzpathologen des Verbundprojektes gestellt. Die Gewebe wurden im tumorzytogenetischen Labor des Instituts für Humangenetik aufgearbeitet und die entstandenen zytogenetischen Suspensionen wurden in Carnoys Fixativ (Methanol : Eisessig 3 : 1) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert.

Tab. 1: Übersicht über die untersuchten primären cHL.

Diagnose	Alter / Geschlecht	Karyotyp	Mittels FISH nachgewiesene Aberrationen in der Chromosomenregion 9p
Hodgkin Lymphom, Gemischtzelliges cHL	22 w	67~86<4n>,XXX, der(1)t(1;9)(q43~44;q21), der(3)t(2;3)(p13;q26), add(3) (p11), add(3)(q26), dup(4) (q14q21), der(7)t(7;17)(q21;q21), der(10)t(3;10)(p14;q24~25),inc[cp10]	nuc ish 9p24 (JAK2 prox x 7, JAK2 dist x 7)
Hodgkin Lymphom	16 w	46,XX*	nuc ish 9p24 (JAK2 prox x 9, JAK2 dist x 9)
Hodgkin Lymphom	20 w	46,XX*	nuc ish 9p24 (JAK2 prox x 8, JAK2 dist x 8)
Hodgkin Lymphom, Gemischtzelliges cHL	13 w	46,XX*	nuc ish 9p24 (JAK2 prox x 5, JAK2 dist x 5), 9p21(P16 x 3), 9cen(CEP 9 x 2)
Hodgkin Lymphom, Gemischtzelliges cHL	80 w	Keine Metaphasen vorhanden	nuc ish 9p24 (JAK2 prox x 6, JAK2 dist x 6)
Hodgkin Lymphom, Nodulär sklerosierendes cHL	19 m	78~84<4n>, -Y, -Y, -X, i(X)(q10), +2, +2, add(2)(q14)x2, inv(3)(q13q26)x2,+5,+5, add(5)(q23)x2,-6, i(6)(q10), i(8)(q10), -11,+12,+12,+12, add(12)(p13), -13,- 14, i(15)(q10), add(17)(p11), i(17)(p10), +2mar [cp 4].	nuc ish 9p24 (JAK2 prox x 3, JAK2 dist x 3)

* Dieser normale Karyotyp repräsentiert den Karyotyp normaler Bystander-Zellen. Es konnten keine Tumorzell-Metaphasen gewonnen werden. p = kurzer Chromosomenarm; q = langer Chromosomenarm; der = derivatives Chromosom; t = Translokation; add = Addition; dup= Duplikation; inv = Inversion; mar = Markerchromosom; nuc ish = Interphase-FISH; prox = proximal des Genlocus, dist = distal des Genlocus; CEP = Zentromerprobe; x = Anzahl der Signale; cen = Zentromer; w = weiblich; m = männlich.

2.1.3. Zelllinien

Es wurden Hodgkin Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen sowie die DNA der HRS-Zellen von vier klassischen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien untersucht. Sie wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Eine detaillierte Beschreibung der Karyotypen findet sich im Anhang ab Seite XIII. Die DNA-Extraktion der cHL-Zelllinien erfolgte nach Standardmethoden durch Mitarbeiter des Institutes für Humangenetik oder der DSMZ.

Tab. 2: Übersicht über die untersuchten Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 sowie L1236. (DSMZ)

Zelllinie	Diagnose	Herkunft / Jahr der Etablierung	Referenzen
HDLM2	Noduläre Sklerose, Grad IV	Pleuraerguss eines 74jährigen Patienten (1982)	- Drexler et al., 1986. - Drexler et al., 1988. - Drexler et al., 1989. - Drexler 1993. - MacLeod et al., 2000.
KMH2	Gemischtzelliger Typ / Lymphozyten arm, Grad IV bei Rezidiv	Pleuraerguss eines 37jährigen Patienten (1974)	- Kamesaki et al., 1986. - Drexler, 1993.
L428	Noduläre Sklerose, Grad IVB therapie-refraktär, terminal	Pleuraerguss einer 37jährigen Patientin (1978)	- Schaadt et al., 1979. - Schaadt et al., 1980. - Drexler, 1993.
L1236	Gemischtzelliger Typ, Grad IV, therapie-refraktär, terminal, drittes Rezidiv	Peripheres Blut eines 34jährigen Patienten (1994)	- Wolf et al., 1996. - Kanzler et al., 1996. - Joos et al., 2003.

2.2. Materialien

2.2.1. Reagenzien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und deren Hersteller aufgelistet.

Tab. 3: Reagenzien und deren Hersteller

100 bp DNA-Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Carbenicillin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Cot-1 DNA, humane (1 µg / µl)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DAPI-Stammlösung (4´ 6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid)	Serva, Heidelberg, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mM)	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Dextransulfat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
dUTP-Spektrum green (1mM)	Vysis, Downers Groove, USA
dUTP-Spektrum orange (1mM)	Vysis, Downers Groove, USA
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Formamid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
IGEPAL	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg, Deutschland
Pepsin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Photokleber: Rubber cement-Fixogum	Marabu, Tamm, Deutschland
Tryptone Peptone	Becton Dickinson, Sparks, USA
X-Gal (5-Brom-4chlor-3indolyl-β-D-galaktosid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Yeast Extract	Becton Dickinson, Sparks, USA

2.2.2. Kits

Es folgt eine Auflistung der für die FISH und für die Methylierungsanalyse verwendeten Kits.

Tab. 4: Kits und deren Hersteller

Kits für FISH	
Amicon Microcon	Millipore, Billerica, USA
Bio Prime DNA Labeling System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Perfectprep Plasmid Maxi Kit	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kits für Methylierungsanalysen	
ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Accuprime Taq DNA Polymerase Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Amicon Microcon	Millipore, Billerica, USA
DNA-Clean & Concentrator Kit	Zymo Research, Orange, USA
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Goldstar DNA Polymerase Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.2.3. Puffer und Lösungen

Es folgt eine Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Herstellung.

Tab. 5: Puffer und Lösungen

2 %iges Agarose-Gel	4 g Agarose werden in 200 µl 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf Handwärme werden 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und in eine handelsübliche Gelelektrophoresekammer gegossen.
Agar-Platte	10 g LB-Medium und Agar-Agar werden auf 500 ml Aqua dest. aufgefüllt und autoklaviert. Zu 500 ml LB-Medium werden 500 µl Carbenicillin und 1,25 ml X-Gal zugegeben und anschließend in Platten gegossen.
Antifade-Lösung	Zu 90 ml Glycerin werden 10 ml PN-Puffer, der 23 mg / ml DABCO enthält, zugegeben und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.
Carnoy's Fixativ	Methanol und Eisessig werden im Verhältnis 3 : 1 unter vorsichtigem Schütteln gemischt.
Cot-1-DNA-Mastermix	100 µl Cot-1-DNA werden gefällt und in 9 µl Mastermix 50 % gegeben.
DAPI-Lösung	20 µl DAPI-Stammlösung (4' 6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid) werden mit 60 ml 2 x SSC vermischt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Materialien und Methoden

dNTP-Mixture mit dUTP-Spektrum green (10 x)	Je 2,5 µl dATP (10 mM), dCTP (10 mM) und dGTP (10 mM) werden mit 1,25 µl dTTP (10 mM), 1,25 µl dUTP-Spektrum green und 3,75 µl Aqua dest. vermischt.
dNTP-Mixture mit dUTP-Spektrum orange (10 x)	Je 2,5 µl dATP (10 mM), dCTP (10 mM) und dGTP (10 mM) werden mit 1,25 µl dTTP (10 mM), 1,25 µl dUTP-Spektrum orange und 3,75 µl Aqua dest. vermischt.
LB-Medium	10 g Tryptone Peptone, 5 g Yeast Extract und 5 g NaCl werden bei pH 7,4 mit NaOH auf 1 l aufgefüllt und anschließend autoklaviert.
Mastermix 50 %	2,5 ml Formamid (deionisiert), 1,25 ml 40-prozentiges Dextransulfat, 0,5 ml 20 x SSC und 0,25 ml Aqua dest. werden vermischt (pH 7,5) und bei -20 °C eingefroren.
Paraformaldehydlösung	1 g Paraformaldehydpulver werden in 60 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wird die Lösung nach Zugabe von 5 Tropfen 10 N NaOH unter dem Abzug auf 70 °C – 100 °C erhitzt, bis die Flüssigkeit klar ist. Der pH-Wert wird zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt, das Volumen mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.
PBS-Puffer	80 g Natriumchlorid, 10,5 g di-Natriumhydrogenphosphat, 2 g Kaliumchlorid und 2 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in Aqua dest. gelöst und anschließend mit Aqua dest. auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt.
SSC-Lösung (20 x)	3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat werden in 800 ml Aqua dest. gelöst, auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Durch entsprechende Verdünnung mit Aqua dest. der 20 x SSC-Lösung erhält man die 0,1 x SSC-Lösung
TBE-Puffer	10 x Stock Solution: 108 g Tris Base (890 mM), 55 g Borsäure (890 mM) und 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (20 mM) werden in Aqua dest. auf eine Gesamtmenge von einem Liter gelöst.
Verdaulösung	5 mg Pepsin werden in 99 ml Aqua dest. gelöst und anschließend 0,5 ml 2 N HCl hinzugefügt.
Waschlösung 1	2 ml 20 x SSC-Lösung und 300 µl IGEPAL werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
Waschlösung 2	10 ml 20 x SSC-Lösung und 100 µl IGEPAL werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

2.2.4. Geräte und Software

Im Folgenden werden die verwendeten Geräte sowie Software aufgeführt.

Tab. 6: Geräte und Software

Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Filtersätze	AHF Analysentechnik	Tübingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland
Geldokumentation	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kapillar-Sequenzierer	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Klimakammer	Thermotron Klimakammer	Thermotron Industries, Holland, USA
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop Axioskop Zeiss	Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland
	Lichtmikroskop Zeiss	Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
Mixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Inkubator / Laborchüttler	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
	Ika-Labortechnik	IKA, Staufen, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrometer	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Thermocycler	T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Julabo	Seelbach, Deutschland
	Rowa	Heimsheim, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge 22 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Mikro 200	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
	PicoFuge	Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA
	Sorvall Super T 21	GMI, Ramsey, USA
FISH-Dokumentation	ISIS Software	MetaSystems, Altusheim, Deutschland
Messung der DNA-Konzentration	NanoDrop Software (Version 3.2.1.)	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

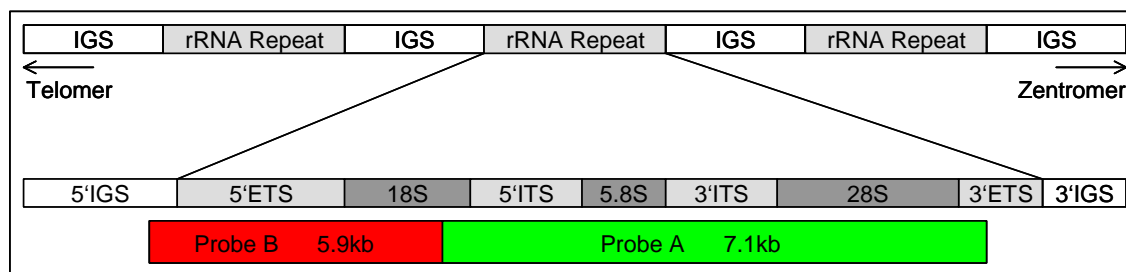
Auswertung und Dokumentation der Methylierungsanalyse	Sequencing Analysis 5.2 Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
	Sequencing Scanner v1.0 Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
	Excel	Microsoft

2.2.5. Plasmid- und BAC-Klone

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurden die Plasmid-Klone Probe A und Probe B freundlicherweise bereitgestellt von Prof. A. Bensimon (Unité de Stabilité des Génomes Institut Pasteur, Paris, Frankreich) (Caburet et al., 2005). Sie überspannen die transkribierte Region der rRNA-kodierenden Einheiten in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen (Chr. 13, 14, 15, 21 und 22) (siehe Abbildung 4). Des Weiteren erfolgten FISH-Analysen mit den BAC-Klonen RP11-635N21 und RP11-574F11, die von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen wurden. Die Sonden RP11-635N21 und RP11-574F11 binden an den JAK2 / PDCD1LG2-Lokus in 9p24.

Die Markierung der FISH-Sonden erfolgte mit dUTP-Spectrum green sowie dUTP-Spectrum orange (Abbott Vysis).

Abb. 4: Übersichtsdarstellung der Lokalisation der verwendeten FISH-Sonden.



Lokalisation der FISH-Sonden Probe A und Probe B innerhalb der rRNA-Repeats auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen.

IGS = Intergenischer Spacer, ETS = externer transkribierter Spacer, ITS = interner transkribierter Spacer, kb = Kilobase.

2.2.6. Primer

Die Primersequenzen für die Methylierungsanalysen der rRNA-Gene *5-ETS*, *18S* und *28S* wurden der Arbeitsgruppe von Dr. M. Esteller aus dem Nationalen Zentrum für Tumorforschung (CNIO, Laboratory of Epigenetics, Madrid, Spanien) zur Verfügung gestellt. Diese sowie die vektorspezifischen Primer wurden von biomers.net GmbH bezogen. Letztere wurden basierend auf der Sequenz des TOPO TA Cloning Vektors bestellt.

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primer für die PCR-Reaktion.

<u>Vorwärts-Primer</u>	<u>Rückwärts-Primer</u>	Annealing Temperatur (C°)	Größe der PCR-Amplifikate (bp)	Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen
Name und Primer-Sequenz sense	Name und Primer-Sequenz antisense			
<u>Bisulfitsequenzierung</u> (Primer für die rRNA-Gene <i>5-ETS</i> , <i>18S</i> und <i>28S</i>)				
BS-ribo-5ets-sense* 5'GGAGAGGTTGGGTTTTYGGATG3'	BS-ribo-5ets-antisense* 5'ACTCCRACCACCCCCCACT3'	62	325	40
BS-18s-sense* 5'GGTTTGTGGYGYGGGGTT3'	BS-18s-antisense* 5'AACTCTAAAATTACCACAATTATCC3'	60	425	40
BS-ribo-28s-sense* 5'GAGTGAATAGGGAAGAGTTTAG3'	BS-ribo-28s-antisense* 5'AAAATTCTTTTCACTTTCCTTAC3'	58	291	40
<u>Vektor</u>				
M13_sense** 5'GAATTGTAATACGACTCACTATAG3'	M13_antisense** 5'TTCACACAGGAAACAGCTATGACC3'	60	191	36

* Primersequenz aus dem Nationalen Zentrum für Tumorforschung (CNIO, Laboratory of Epigenetics, Madrid, Spanien); ** TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

bp = Basenpaare; BS = Bisulfit-Sequenzierung; ribo = ribosomale DNA; A = Adenin; C = Cytosin; G = Guanin; T = Thymin; Y = Pyrimidinbase;

2.3. Methoden

2.3.1. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) bietet die Möglichkeit die klassische Zytogenetik mit molekulargenetischen Techniken zu verbinden. Die FISH basiert auf der Fähigkeit von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden, sich nach dem Prinzip der spezifischen Basenpaarung selektiv an die komplementäre chromosomale DNA-

Sequenz der zu untersuchenden Zelle anzulagern. Eine artifiziell hergestellte DNA-Sequenz wird dazu mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) versehen. Die doppelsträngigen DNA-Sonden sowie die zelluläre DNA werden durch Denaturierung in ihre Einzelstränge aufgespalten. Bei der anschließenden Renaturierung können sich nun die komplementären DNA-Sequenzen der Sonde und der Zelle verbinden. Durch Waschen werden dann überschüssige, ungebundene sowie unspezifisch gebundene Sonden entfernt. Es entsteht ein Fluoreszenzsignal, das nun mittels eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden kann. Aufgrund der Signalmuster lassen sich z. B. Amplifikationen, Deletionen oder Translokationen detektieren.

2.3.1.1. DNA-Isolierung

Die DNA-Sonden Probe A und Probe B sowie RP11-574F11 und RP11-635N21 wurden mit Hilfe des Eppendorf Perfectprep Plasmid Maxi Kit nach dem Protokoll des Herstellers präpariert.

Hierzu wurden 24 Stunden vor der DNA-Isolierung je 100 µl der plasmidhaltigen *Escherichia coli* Kultur mit je 250 ml flüssigem LB-Medium und 25 µl Chloramphenicol angesetzt und über Nacht bei 37 °C und kräftigem Schütteln im Laborschüttler inkubiert.

2.3.1.2. DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop ND-1000. Der NanoDrop ist ein Spektrophotometer mit dem die Absorption von DNA, RNA, Proteinen sowie die optische Dichte von Kulturansätzen gemessen werden kann. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die optische Dichte von DNA-Lösungen bestimmt. Hierzu wurden 2 µl der zu messenden DNA-Probe auf die untere Messapparatur pipettiert und der Gerätearm heruntergeklappt. Mit Hilfe der NanoDrop Software (Version 3.2.1.) wurde die spektrophotometrische Messung durchgeführt, die gemessenen Werte konnten direkt eingesehen werden. Mit einem Zellstoff wurden DNA-Lösungsreste abgewischt.

2.3.1.3. Markierung der DNA-Proben

Die Markierung der Klone Probe A, Probe B und RP11-635N21, RP11-574F11 erfolgte mit Hilfe des Bio Prime DNA Labeling Systems (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Zur direkten Markierung wurde 1 µl DNA in 24 µl Aqua dest. gelöst. Nach Zugabe von 20 µl 2,5x Random Primer wurde das Reaktionsgemisch kurz mittels PicoFuge an zentrifugiert und für fünf Minuten bei 100 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 10 x dNTP-Mixture mit der jeweiligen Farbe (spectrum green bzw. spectrum orange) und 1 µl Klenow-Fragment untergemischt, kurz mittels PicoFuge an zentrifugiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden je 5 µl Stop-Puffer hinzugeben und das Reaktionsgemisch anschließend auf die Microcon-Filter pipettiert. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 17.000 rpm und Raumtemperatur wurde der Filter herausgenommen und der Überstand in dem Microcon-Röhrchen ausgegossen. Nun wurden 300 µl Aqua dest. auf den Filter pipettiert und bei 17.000 rpm weitere 10 Minuten zentrifugiert; dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt.

Um die markierten DNA-Proben von dem Microcon-Filter zu entfernen, wurden 50 µl Aqua dest. auf den Filter gegeben. Dieser wurde nun umgedreht auf ein zweites Microcon-Röhrchen gesetzt. Nach 3 minütigem Zentrifugieren bei 5000 rpm wurde das Filtrat wieder zurück in die Eppendorf-Röhrchen gegeben.

2.3.1.4. Vorbereitung der DNA-Proben

10 µl der markierten DNA wurden mit 5 µl COT-1-DNA (1 µg / µl) vermischt und 2,5 µl 3 M NaAC und das 2,5fache der Gesamtmenge an absolutem Ethanol (hier 68,75 µl) hinzugeben. Nach 30 minütigem Zentrifugieren des Reaktionsgemisches bei 17.000 rpm mit der Biofuge 22 R wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die markierte DNA lichtgeschützt getrocknet. Anschließend wurde 10 µl Mastermix 50 % hinzugegeben und das Gemisch für 30 Minuten auf dem Thermomixer bei 37°C und 400 rpm im Dunkeln inkubiert. Die markierte DNA-Sonde wurde lichtgeschützt und tiefgekühlt gelagert.

2.3.1.5. Erstellung von Präparaten

2.3.1.5.1. Konventionelle Auftropfpräparate

Die Zellen der Hodgkin-Zelllinien sowie die primären HL wurden in Carnoys Fixativ (Methanol / Eisessig 3 : 1) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Auftropfen der Zellsuspension erfolgte in einer Thermotron-Klimakammer auf handelsübliche Objektträger. Hierzu wurden mit einer Pipette aus größtmöglicher Höhe einzelne Tropfen auf einen umschriebenen Bereich des Objektträgers getropft und diese anschließend getrocknet.

Unter dem Lichtmikroskop erfolgte eine Kontrolle der Zellmorphologie sowie der Zelldichte; geeignete Areale für die Hybridisierungsreaktion wurden mit einem Diamantschreiber auf der Rückseite der Objektträger markiert.

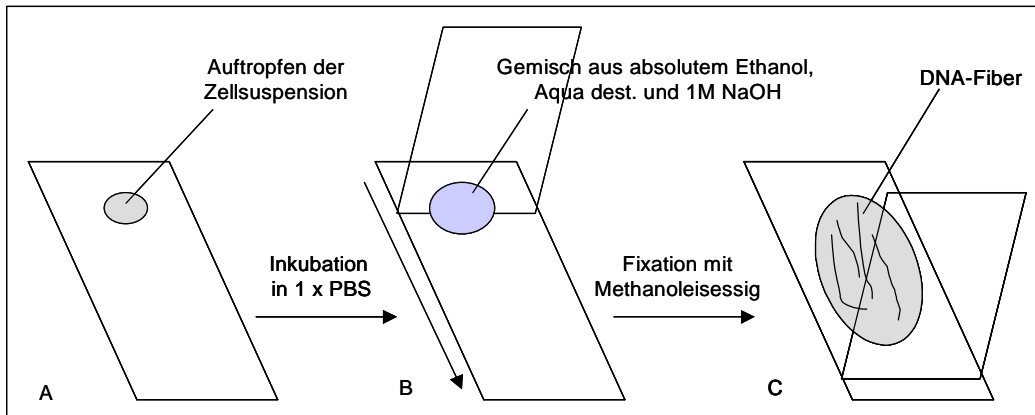
Die Objektträger wurden nun in einer Küvette mit Pepsinlösung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Nach Fixierung in Paraformaldehydlösung für 2 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut mit Aqua dest. gewaschen. Nach jeweils 2 minütigem dehydrieren der Proben in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 % und absoluter Ethanol) wurden die Objektträger luftgetrocknet.

2.3.1.5.2. Fiber-FISH Präparate

Fiber-FISH ermöglicht zum Einen eine Darstellung der strukturellen Abfolge von z. B. repetitiven DNA-Sequenzen. Zum Anderen kann die Länge einer DNA-Probe beurteilt sowie eine Kartierung von FISH-Sonden in Relation zu einander erstellt werden.

Um DNA-Fiber zu erlangen, erfolgt ein „Ziehen“ der DNA. Dazu wurde die Zellsuspension der cHL-Zelllinien auf den äußeren Rand eines Objektträgers aufgetropft und dieser dann für 15 Sekunden in 1 x PBS gelegt. Anschließend wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ eines Gemisches aus 3 ml absolutem Ethanol, 7 ml Aqua dest. und $0,5\text{ ml } 1\text{ M NaOH}$ über den senkrecht stehenden Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas darüber gestrichen (siehe Abbildung 5). Zur Fixation wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ Methanoleisessig über den Objektträger getropft und dieser für 24 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die DNA-Fiber, ebenso wie für FISH, mit Fluoreszenz-Sonden hybridisiert.

Abb. 5: Darstellung der Fiber-FISH-Technik.



A) Auftropfen der Zellsuspension auf den Objektträger. B) Nach Inkubation in 1 x PBS erfolgt die Zugabe des Ethanol-Gemisches und das Streichen des Deckglases über den Objektträger. C) Nach Fixation mit Methanoleisessig können die DNA-Fiber mikroskopiert bzw. mit FISH-Sonden hybridisiert werden.

Fiber-FISH erfolgte an den Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 sowie L1236 zur Untersuchung der Anordnung und inneren Struktur der rRNA-Repeats mit der FISH-Sonde Probe A (Spectrum green) und Probe B (Spectrum orange). Um die Co-Lokalisation zwischen *JAK2 / PDCD1LG2* und den rRNA-Genen zu analysieren, wurden Fiber-FISH-Präparate der Zelllinie HDLM2 mit der Sonde Probe A (sgr) / RP11-574F11 (so) hergestellt.

2.3.1.6. Hybridisierung

Zur Hybridisierung der zu untersuchenden zellulären DNA mit der FISH-Sonde wurden 1,3 µl DNA-Sonden-Mastermix auf ein markiertes Areal des Objektträgers mit geeigneten Zellen pipettiert und mit einem Deckgläschen und Photokleber (Fixogum) abgedichtet. Zur Denaturierung wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer für 7 Minuten in ein 75 °C heißes Wasserbad gegeben und im Anschluss über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Um überschüssige und nicht gebundene Sonden zu entfernen wurden die Präparate am nächsten Tag gewaschen. Hierzu wurden zuerst das Deckgläschen sowie das Fixogum entfernt, anschließend wurden die Proben für 2 Minuten in Waschlösung I bei 71 °C in einem Wasserbad inkubiert und eine weitere Minute in Lösung II bei

Raumtemperatur belassen. Nach kurzem Spülen in 2 x SSC, 5 minütigem Gegenfärben in DAPI-Lösung und weiterem kurzen Spülen in 2 x SSC wurden die Objektträger mit Antifade-Lösung und einem Deckgläschen bedeckt, im Anschluss wurden die Proben lichtgeschützt gelagert.

2.3.1.7. Auswertung und Dokumentation

Die fluoreszierenden Hybridisierungssignale wurden mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop (Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland) und geeigneten Filtern (Zeiss, Oberkochen bzw. Göttingen, Deutschland sowie AHF Analysetechnik Tübingen, Deutschland) ausgewertet und mittels der ISIS-Software der Firma MetaSystems (Altusheim, Deutschland) dokumentiert.

Die Auswertung der FISH-Präparate mit der FISH-Sonde Probe A (sgr) / Probe B (so) erfolgte im Vergleich zu nicht-neoplastischen Zellen: Als „klein“ wurde das Signal einer normalen Zelle definiert. „Mittel-große“ Signale waren um den Faktor zwei bis drei größer, „große“ Signale um den Faktor vier bis sechs.

Die Auswertung der FISH-Präparate mit den Sonden Probe B (sgr) / RP11-635N21 (so) und Probe B (sgr) / RP11-574F11 (so) erfolgte nach den Mustern, die in Abb. 15 bzw. 16 dargestellt sind.

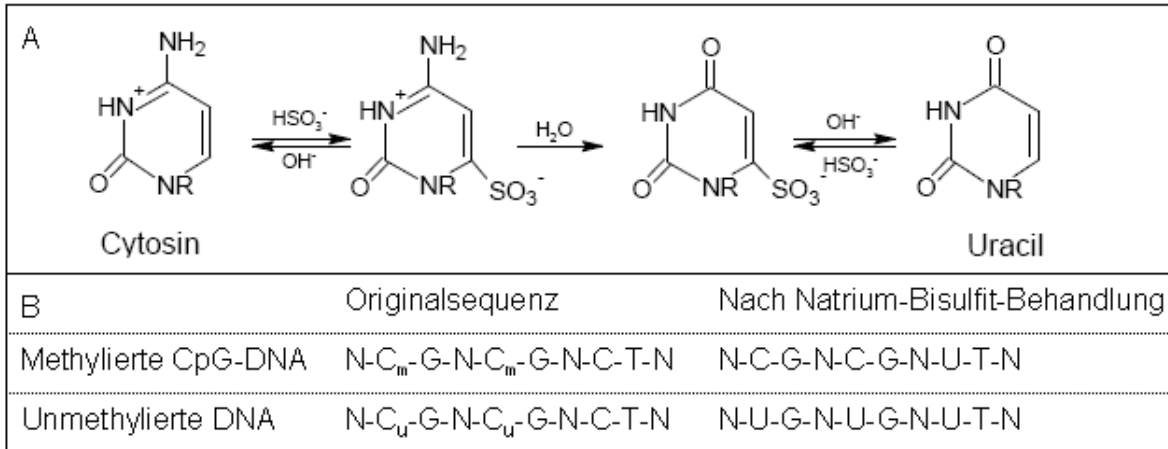
2.3.2. Methylierungsanalyse der rRNA-Gensegmente 5-ETS, 18S und 28S

Der Methylierungsgrad der rRNA-Gensegmente 5-ETS, 18S und 28S wurden in den cHL-Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 sowie L1236 untersucht. Um diese Methylierungsanalysen überhaupt möglich zu machen, ist eine Differenzierung zwischen methylierten und unmethylierten Cytosin-Basen nötig. Deshalb wurde die DNA zuerst mit Natrium-Bisulfit behandelt.

2.3.2.1. Natrium-Bisulfit-Behandlung der DNA

Die Natrium-Bisulfit-Behandlung ermöglicht eine Beurteilung des Methylierungsstatus der DNA. Durch Inkubation der DNA mit Natrium-Bisulfit erfolgt eine Konvertierung der unmethylierten Cytosin Reste nach Uracil, während methylierte Cytosin Reste unverändert bleiben (siehe Abbildung 6).

Abb. 6: Schematische Darstellung der Natrium-Bisulfit-Behandlung (modifiziert nach Richter, 2007)



A) Darstellung der Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil. B) Beispiel einer Basenabfolge einer methylierten bzw. unmethylierten DNA-Sequenz vor bzw. nach Natrium-Bisulfit-Behandlung. Man beachte, dass Cytosin-Basen, die sich nicht in einem CpG-Dinukleotide befinden, denen also keine Guanin-Base folgt, ebenfalls konvertiert werden.

R = Desoxyribose; C = Cytosin; G = Guanin; U = Uracil; N (in B) = beliebige Anzahl von beliebigen Nukleotiden; m = methyliert; u = unmethyliert.

Die Zelllinien HDLM2, KMH2, L428, L1238 sowie, als Referenz, universell methylierte DNA, universell unmethylierte DNA und normale / unbehandelte DNA aus peripherem Blut wurden mit dem Qiagen EpiTect Bisulfite Kit nach Anleitung des Herstellers behandelt. Hierzu wurden 1 µg – 2 µg DNA mit 85 µl Bisulfit-Mix und 35 µl DNA-Protektionspuffer vermischt. Anschließend erfolgte die Bisulfit-DNA-Konversion im Thermocycler mit folgendem Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 min	99 °C
Inkubation	25 min	60 °C
Denaturierung	5 min	99 °C
Inkubation	85 min	60 °C
Denaturierung	5 min	99 °C
Inkubation	175 min	60 °C
Pause	unendlich	20 °C

Im Anschluss an die Inkubation wurde die konvertierte DNA mit dem BL Puffer des EpiTect Kits behandelt, um eine Bindung der konvertierten Einzelstrang-DNA an die Membran der EpiTect Säulen zu ermöglichen. Zur Entfernung des restlichen Natrium-Bisulfits und zur Desulfonierung wurde die DNA mit je 500 µl Waschpuffer (BW) respektive 500 µl Desulfonierungspuffer (BD) mit Hilfe des EpiTect-Säulensystems gewaschen. Zur Elution wurden 20 µl Aqua dest. auf die EpiTect-Säulen gegeben und diese bei 12.000 rpm für eine Minute zentrifugiert.

2.3.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion können spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Durch Denaturierung wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge zerlegt, an die sich nach raschem Abkühlen komplementäre Oligonukleotide anlagern können. Die beiden Einzelstränge werden mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase, die sich an die spezifischen Primer bindet, zu je zwei Doppelsträngen komplementiert. Mit den nun vorhandenen Doppelsträngen kann dieser Reaktionszyklus mehrfach wiederholt werden, um die gewünschte DNA-Sequenz exponentiell zu amplifizieren.

PCR an der mit Natrium-Bisulfit behandelten DNA

Die PCR an der mit Natrium-Bisulfit behandelten DNA erfolgte mit den Primern 5-ETS, 18S sowie 28S und dem Accuprime Taq DNA Polymerase Kit.

Pro 25 µl PCR-Ansatz wurden pipettiert:

2,5 µl	Puffer II
0,5 µl	Accu Taq Polymerase (10 U/ml) (68 °C)
je 5,0 µl	Primer (2 µM)
1 µl	DNA der HL-Zelllinien
11 µl	Aqua dest.

Die PCR erfolgte in 40 Zyklen im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

95 °C	7 min	} 40 Zyklen
95 °C	30 sec	
Annealing Temperatur	30 sec	
68 °C	30 sec	
68 °C	10 min	
4 °C	unendlich.	

Annealing Temperatur der Primer: 5-ETS: 62 °C; 18S: 60 °C ; 28S: 58 °C.

Zur Kontrolle erfolgte im Anschluss eine Gelelektrophorese mittels eines 2 %igen Agarose-Gels. Dazu wurden 4 g Agarose auf 200 ml mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt, in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf Handwärme abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid wurde das Gel zum Erstarren in handelsübliche Gelelektrophoresekammern gegossen. Zu 10 µl des PCR-Produktes wurden 3,5 µl Ladepuffer gegeben, vermischt und anschließend in die Kammern des Gels pipettiert. Es wurde ein 100 bp-Längenstandard verwendet. Die Auftrennung wurde bei einer Spannung von 10 V / cm Gel für ca. 45 min durchgeführt. Dies ist möglich da, die negativ geladene DNA von der Kathode zur Anode wandert. Die Gel-Dokumentation erfolgte mit Hilfe des BioDoc Analyzer von Biometra.

2.3.2.3. Ligation und Klonierung

Bei der Ligation wird das frische PCR-Produkt und damit die spezifische DNA-Sequenz in einen Vektor eingebracht. An das 3'Ende des PCR-Produkt wird durch die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin-Molekül angefügt. Dieses kann sich wiederum mit dem am 3'Ende überstehenden Desoxythymidin-Rest des TOPO TA Cloning Vektors verbinden. Dieser Vektor wird dann in kompetente Bakterienstämme (*Escherischia coli*, *E. coli*) transformiert. Die Ligation des PCR-Produktes erfolgte, wie oben erwähnt, mit dem Invitrogen TOPO TA Cloning Kit nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde nach Anleitung der TOPO Vektor in One Shot *E. coli* eingebracht und 100 µl der Bakterien auf eine Agar-Platte gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden jeweils zehn Klone pro Zelllinie und Primer, die den TOPO Vektor enthielten, von der Agar-Platte mittels einer Pipettenspitze selektiert. Sie wurden sowohl auf eine Master-Platte (Agar-Platte) aufgetragen als auch in ein PCR-Tube gegeben, in dem der vorgefertigte PCR-Ansatz (s.u.) enthalten war.

Kolonie-PCR der selektierten Klone

Um die Insertion der Fragmente zu überprüfen und um eine ausreichende Anzahl von DNA-Fragmenten zu bekommen, wurde erneut eine PCR durchgeführt. Hierzu wurden die Primer 461 (sense) und 462 (antisense) (je 60 °C) sowie das Goldstar DNA Polymerase Kit verwendet.

Insgesamt wurden 25 µl pro PCR-Ansatz pipettiert:

2,5 µl	10 x Puffer
0,2 µl	Goldstar Polymerase (4 U/µl) (60 °C)
je 1 µl	Primer (20 pmol/µl)
4 µl	25mM MgCl
1 µl	dNTP Mix (5 nmol/µl)
14,3 µl	Aqua dest.
1 µl	DNA (entspricht Bakterien-Klone, s.o.)

Die PCR erfolgte in 36 Zyklen im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

95 °C	5 min	} 36 Zyklen
95 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	
4 °C	unendlich.	

Zur Kontrolle der PCR-Amplifikate erfolgte im Anschluss eine Gelelektrophorese (s.o.).

Aufreinigen des PCR-Produktes zur Sequenzierung

Eine Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgt, um störende Restmoleküle der PCR zu entfernen (z. B. Polymerase, Primer, überschüssige Nukleotide). Dies erfolgte mit dem DNA-Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) nach Anleitung des Herstellers.

2.3.2.4. Sequenzierung

Um im Anschluss an die Aufreinigung beide DNA-Stränge separat sequenzieren zu können, erfolgte eine Sequenz-PCR mit dem ABI Prism BigDye Terminator Ready Reaction Kit. Hierzu wurden je zwei Ansätze pro DNA-Probe mit je einem Primer für den Originalstrang sowie einen Primer für den komplementären Strang pipettiert:

- 1 µl BigDye Terminator
- 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt der Kolonie-PCR
- 2 µl Primer (20 pmol/µl) (2 Ansätze pro Probe)
- 2 µl 10 x Puffer
- 14 µl Aqua dest.

Die Sequenz-PCR erfolgte in 25 Zyklen im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

96 °C	2 min	} 25 Zyklen
96 °C	10 sec	
50 °C	5 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	unendlich.	

Aufreinigen des Sequenzansatzes

Um störende Restmoleküle der Sequenz-PCR zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung mit dem Microcon Kit:

In ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen wurde die gesamte Menge der DNA-Probe (PCR-Produkt) sowie 250 µl Aqua dest. auf eine Säule gegeben und für 10 Minuten

bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, erneut 250 µl Aqua dest. hinzugegeben und weitere 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 25 µl Aqua dest. auf die Säulen pipettiert und diese umgedreht auf ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen gestellt und für 5 Minuten bei 7.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in ein Sequenziertube pipettiert und mittels ABI PRISM 310 Genetic Analyzer sequenziert. Die Laufzeit betrug 18 Minuten, die Injektionszeit 10 Minuten.

Prinzip der DNA-Sequenzierung

Die hier verwendete DNA-Sequenzierung beruht auf einer üblichen Modifikation der „Kettenabbruch-Methode“ nach Sanger et al. (1977).

Hierbei werden zu dem Reaktionsansatz die zur Synthese des Doppelstranges notwendigen Nukleotide als Desoxyribonukleosid-Triphosphate dGTP, dATP, dTTP und dCTP hinzugegeben. Zusätzlich enthält das Reaktionsgefäß eine geringe Menge an fluoreszenz-markiertem Didesoxyribonucleosid-Triphosphat: ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP, wobei jedes der vier ddNTPs mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert ist. Wird nun anstelle eines normalen Nukleotides zufällig ein Didesoxyribonucleosid-Triphosphat eingebaut, so wird ein Kettenabbruch induziert, da die DNA-Polymerase an dieser Stelle keine weiteren Nukleotide anlagern kann. Anschließend erfolgt eine Elektrophorese, bei der die Kettenabbruch-Produkte nach ihrer Größe aufgetrennt werden - je kürzer die Fragmente, desto weiter wandern sie. Somit können DNA-Fragmente, die sich in der Länge nur eines Nukleotides unterscheiden, aufgelöst werden. Um die Banden der unterschiedlich langen DNA-Stränge zu identifizieren, werden nach Beendigung der Auftrennung mittels Lasertechnik die fluoreszenz-markierten Nukleotide (dGTP - schwarz, dATP - grün, dTTP - rot und dCTP - blau) an ihren Positionen abgelesen.

2.3.2.5. Auswertung und Dokumentation

Die Methylierungssequenzen wurden mit Hilfe der Sequencing Scanner v1.0 Software sowie der Sequencing Analysis 5.2 Software der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) dokumentiert. Anschließend wurden die Sequenzen

ausgedruckt und manuell ausgewertet: Dazu erfolgte eine Unterteilung der mit Natrium-Bisulfit behandelten CpG-Dinukleotide in

- C = Cytosin entspricht ursprünglich methylierten CpG-Dinukleotiden (da keine Konvertierung erfolgt ist),
- T = Thymin entspricht ursprünglich unmethylierten CpG- Dinukleotiden (da eine Konvertierung erfolgt ist),
- mutiert (an der Position fand sich ursprünglich eine Cytosin-Base, die nun durch eine Purinbase ersetzt wurde) und
- nicht auswertbar (die Sequenz war vorzeitig abgebrochen oder nicht sicher lesbar).

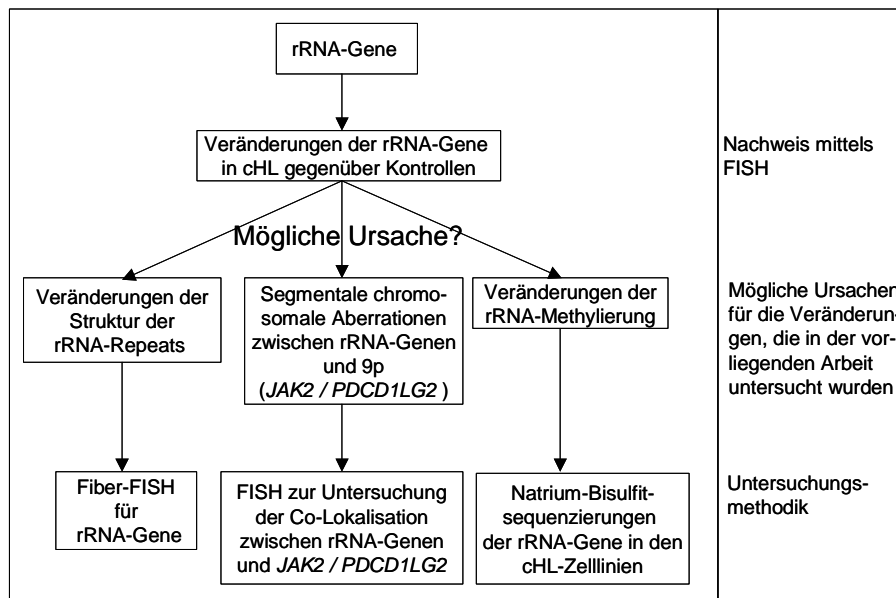
Im Anschluss wurden alle CpG-Dinukleotide eines Klons separat nach Originalstrang und komplementären DNA-Strang in ein Farbschema (methyliert – schwarz, unmethyliert – weiß, nicht auswertbar – grau sowie mutiert – rot) übertragen und gegeneinander (sense – antisense) aufgetragen um Vorwärts- und Rückwärtssequenz miteinander zu vergleichen. Hierzu diente das Microsoft-Programm Excel. Als Positiv-Kontrolle diente die Konvertierung der nicht in CpG-Dinukleotiden liegenden Cytosin-Basen zu Thymin-Basen.

3. Ergebnisse

Aufgrund der chromosomalen Instabilität der Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen und den segmentalen chromosomalen Aberrationen (SCAs) unter Beteiligung von rRNA-Genen und *JAK2 / PDCD1LG2*, die sich unter anderem in der Zelllinie HDLM2 fanden (MacLeod et al., 2000; Martin-Subero et al., 2003), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die chromosomale Instabilität u. a. durch Aberrationen der rRNA-Gene bedingt ist (siehe Abbildung 7). Daraus leitete sich folgende Fragestellungen ab:

- 1) Treten Veränderung der rRNA-Gene in cHL gehäuft auf? Gibt es Zusammenhänge zwischen rRNA-Aberrationen und dem Auftreten von chromosomalen Veränderungen? Co-Lokalisieren rRNA-Gene und der *JAK2 / PDCD1LG2*-Genort im Zellkern von HRS-Zellen?
- 2) Bestehen Veränderungen des DNA-Methylierungsgrades der rRNA-Gene 18S und 28S sowie des externen transkribierten Spacers 5-ETS bei cHL, die zu chromosomaler Instabilität führen können? Wenn ja, treten Hyper- oder Hypomethylierungen auf?

Abb. 7: Übersicht über die Struktur dieser Arbeit: Auflistung möglicher Ursachen der chromosomalen Instabilität und der diesbezüglichen Untersuchungen.



3.1. Genetische Veränderungen in den rRNA-Genen

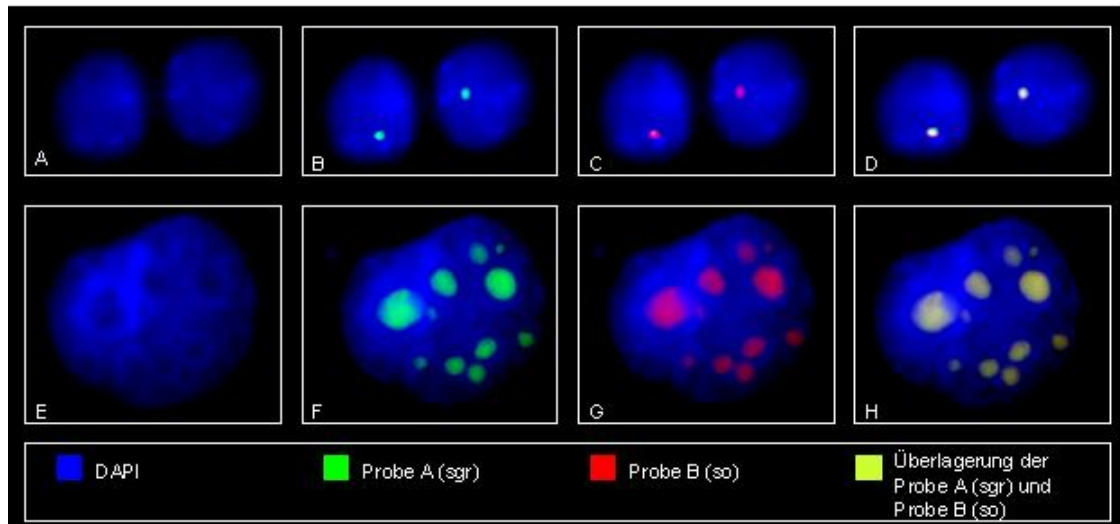
Zuerst erfolgte mittels FISH die Quantifizierung der rRNA-Gene in den HRS-Zellen im Vergleich zu den normalen Bystander-Zellen. Anschließend wurden die rRNA-Repeats der HRS-Zellen mittels Fiber-FISH auf strukturelle Veränderungen untersucht. Zur Analyse der Co-Lokalisationen zwischen *JAK2 / PDCD1LG2* und rRNA-Genen erfolgten ebenfalls FISH-Analysen der HRS-Zellen.

3.1.1. Interphase FISH mit den Sonden für die rRNA-Gene

Um Veränderungen der rRNA-Gene zu analysieren, wurden vier cHL-Zelllinien mittels FISH und Fiber-FISH sowie acht primäre HL mittels FISH mit den Plasmid-Klonen Probe A und Probe B untersucht (siehe Abbildung 8). Diese Sonden überspannen die transkribierte Region der rRNA-kodierenden Einheiten in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen. Dabei flankiert Probe A den externen transkribierten Spacer *5-ETS* sowie das Gen *18S* und Probe B die rRNA-Gene *5.8S* und *28S* sowie die beiden internen transkribierten Spacer *5-ITS* und *3-ITS* (siehe auch Abbildung 4). Die HRS-Zellen wurden auf Anzahl, Größe und Konstellation der FISH-Signale untersucht.

Eine Einteilung der Signale erfolgte in klein, mittel-groß und groß. Als „klein“ wurde dabei das Signal von normalen Zellen definiert. „Mittelgroße“ Signale waren um den Faktor zwei bis drei größer, „große“ Signale um den Faktor vier bis sechs. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse findet sich im Anhang, ab Seite XV.

Abb. 8: Vergleich der Signal-Muster von normalen Zellen und HRS-Zellen mit der FISH-Sonde Probe A / Probe B.



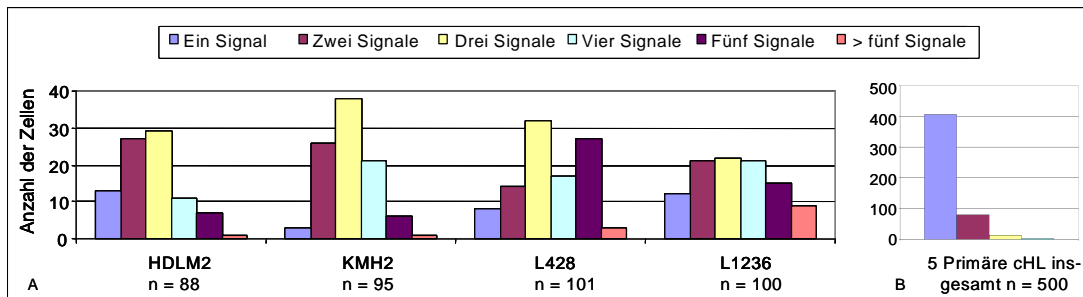
A)-D): A) DAPI-Färbung einer normalen Zelle. B)-D) Interphase-Nukleus derselben Zelle mit normaler Signalkonstellation der Sonden Probe A (grün), Probe B (rot) und Überlagerung beider Sonden für die rRNA-Gene (D).

E)-H): E) DAPI-Färbung einer Hodgkin Reed-Sternberg Zelle der cHL-Zelllinie L1236. Sichtbar ist die geringere blaue Intensität der Nukleoli der HRS-Zelle. F)-H) Dieselbe HRS-Zelle mit der FISH-Sonde Probe A (grün), Probe B (rot) und Überlagerung aller Fluoreszenzsignale (H) zeigt eine deutliche Vergrößerung sowie eine höhere Anzahl an Nukleoli gegenüber gesunden Zellen.

3.1.1.1. Anzahl der Nukleoli in cHL-Zelllinien

Es wurden die HRS-Zellen der cHL-Zelllinien HDLM2 (n=88 Zellkerne), KMH2 (n=95 Zellkerne), L428 (n=101 Zellkerne) und L1236 (n=100 Zellkerne) untersucht. Die Signale für die Probe A und Probe B waren immer co-lokalisiert. Es fand sich mindestens ein Signal für jede Sonde pro ausgewerteter HRS-Zelle, in der Mehrzahl der Zellen fanden sich zwischen zwei und fünf, gelegentlich auch mehr als fünf Signale. In den Zellen waren im Einzelnen vorhanden: ein Nukleolus (n=36), zwei (n=88), drei (n=121), vier (n=70), fünf (n=55) und größer fünf Nukleoli (n=14) (siehe Abbildung 9A). Als Kontrollen wurden 500 Bystander-Zellen der primären cHL ausgewertet (siehe Abbildungen 9B und 10B). Hier fanden sich in über 400 Zellen nur ein Signal für die rRNA-Gene. Mehr Signale fanden sich nur selten. Auch hier waren die Signale für die Probe A und Probe B immer co-lokalisiert.

Abb. 9: Auswertung der Anzahl der Nukleoli in cHL-Zelllinien bzw. Anzahl der Nukleoli in den Bystander-Zellen in den primären cHL.



A) Darstellung der Anzahl der Nukleoli in den Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236. Am häufigsten zeigten sich drei Fluoreszenz-Signale in den HRS-Zellen (Mittelwert 3,16). B) In den insgesamt 500 ausgewerteten normalen Bystander-Zellen fand sich meist nur ein Signal, selten zwei und nur gelegentlich drei oder mehrere Signale.

Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen. n = Anzahl der ausgewerteten Zellkerne.

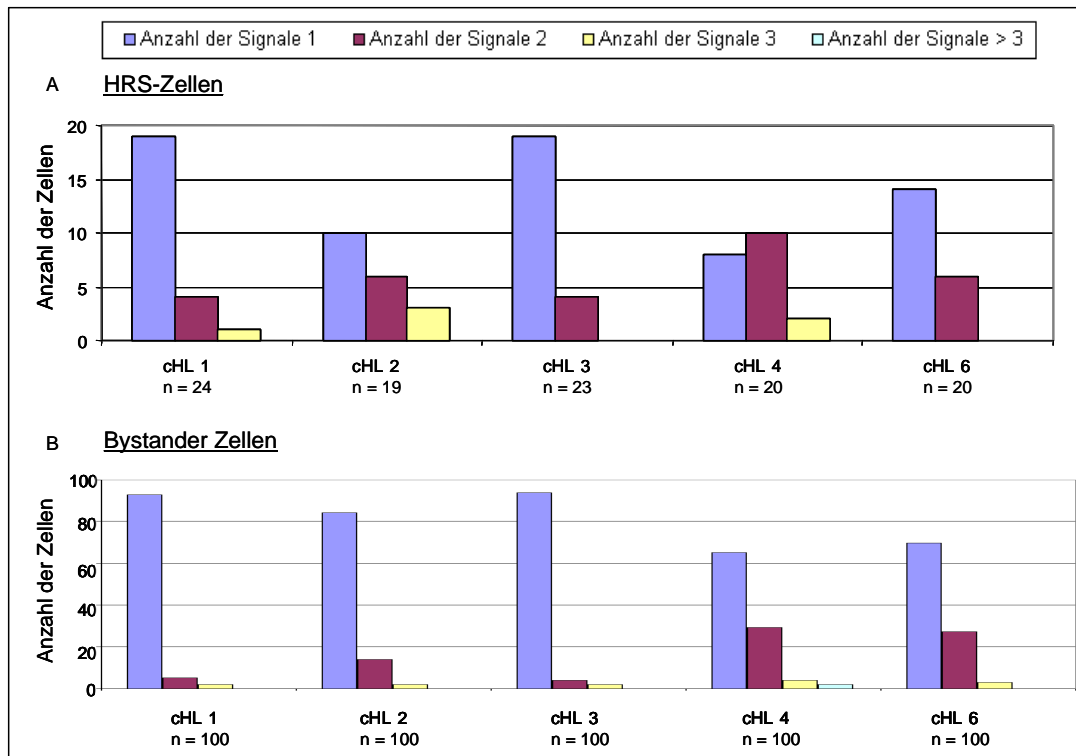
Insgesamt ließ sich mittels FISH für die rRNA-Gene in den HRS-Zellen der vier cHL-Zelllinien signifikant mehr Nukleoli als in den Kontrollen nachweisen (Mittelwert Zelllinien: 3,16 Nukleoli pro Zelle, Mittelwert Kontrollzellen: 1,22 Nukleoli pro Zelle, $p < 0,001$).

3.1.1.2. Anzahl der Nukleoli in HRS-Zellen von primären cHL

In den primären cHL wurden die HRS-Zellen aufgrund ihrer Zellkerngröße im Vergleich zu den kleineren umgebenen Lymphozyten selektiert. Fünf der acht untersuchten cHL wiesen auswertbare HRS-Zellen auf. In den anderen drei Fällen fanden sich entweder keine HRS-Zellen oder die Hybridisierungsqualität der Präparate war ungenügend.

Die Anzahl der Signale der rRNA-Sonden pro ausgewerteter Zelle variierte zwischen einem und drei. Dabei waren die Signale für Probe A und Probe B immer colokalisiert. Die Einteilung erfolgte wie oben beschrieben. In den insgesamt 106 HRS-Zellen der primären cHL zeigten sich meist ein Nukleolus (n=70), seltener zwei (n=30) und nur vereinzelt drei Nukleoli (n=6) (siehe Abbildung 10A). Als Kontrolle dienten auch hier die normalen Bystander-Zellen der primären cHL. Auch hier fand sich überwiegend nur ein Signal pro Zelle, in den Fällen 4 und 6 fanden sich zusätzlich auch relativ häufig zwei Signale (siehe Abbildung 10B).

Abb. 10: Auswertung der Anzahl der Signale in primären cHL bzw. Darstellung der Anzahl der Signale der normalen Bystander-Zellen in primären cHL.



A) Darstellung der Anzahl der Signale in den HRS-Zellen der fünf cHL. In den HRS-Zellen von cHL 1, cHL 2 und cHL 6 waren vorwiegend nur ein Signal für die rRNA-Gene vorhanden. Hingegen fand sich in den HRS-Zellen von cHL 2 und cHL 4 ein heterogeneres Verteilungsmuster.

B) Darstellung der Anzahl der Signale in den Bystander-Zellen der primären cHL. Es wird deutlich, dass sich in der Regel nur ein Signal pro Zelle fand. Eine höhere Anzahl an Signalen zeigte sich nur selten. Des Weiteren zeigte sich, dass die Anzahl der Signale in den HRS-Zellen und denen der normalen Bystander-Zellen korrelierten.

Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen. n = Anzahl der ausgewerteten Zellkerne.

Insgesamt waren in den HRS-Zellen der primären cHL weniger Nukleoli pro Zelle als in den HRS-Zellen der Zelllinien vorhanden. Der Mittelwert in den HRS-Zellen der primären cHL lag mit 1,4 Nukleoli pro Zelle höher als der der Kontrollzellen mit 1,22 Nukleoli pro Zelle ($p = 0,245$). Diese Differenz war aber nicht signifikant, auch wenn sich in Einzelfällen (cHL 2 und cHL 4) deutliche Unterschiede zeigten.

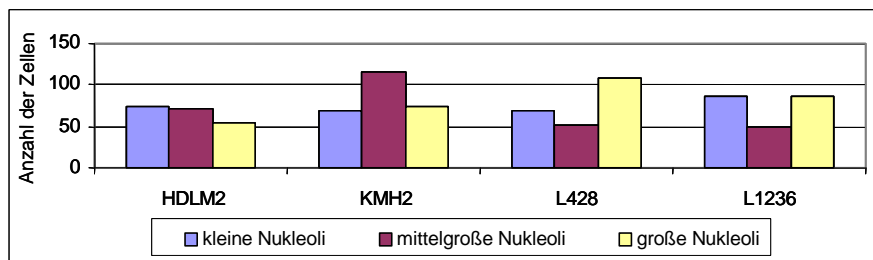
3.1.1.3. Größe der Nukleoli in cHL-Zelllinien

Die cHL-Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236 wurden ebenfalls hinsichtlich Größe der FISH-Signale für die rRNA-Gene untersucht. Als Referenz wurde die Größe der Nukleoli der Bystander-Zellen der primären cHL herangezogen. In diesen waren ausschließlich kleine Signale für die rRNA-Gene vorhanden. In den HRS-Zellen der Zelllinien fanden sich am häufigsten große Nukleoli, allerdings war die Verteilung zwischen den Zelllinien recht homogen (siehe Abbildung 11): Von den insgesamt 384 HRS-Zellen zeigten n=299 kleine, n=287 mittelgroße und n=324 große Signale. Im Einzelnen waren das in den Zelllinien:

- HDLM2: In insgesamt 88 Zellen fanden sich 36,9 % kleine, 35,9 % mittelgroße und 27,3 % große Signale.
- KMH2: In insgesamt 95 Zellen waren 26,7 % kleine, 44,6 % mittelgroße und 28,7 % große Signale vorhanden.
- L428: In insgesamt 101 Zellen zeigten sich 30,4 % kleine, 22,2 % mittelgroße und 47,4 % große Signale.
- L1236: In insgesamt 100 Zellen waren 38,8 % kleine, 22,3 % mittelgroße und 38,8 % große Signale vorhanden.

Der Mittelwert für kleine Signale in den vier cHL-Zelllinien lag bei 33,2 %, für mittelgroße Signale bei 31,25 % und für große Signale bei 35,55 %. Im Gegensatz dazu fanden sich zu 100 % kleine Signale in den Bystander-Zellen der primären cHL. Somit konnte eine deutliche Größenzunahmen der Signale für die rRNA-Gene in den HRS-Zellen der Zelllinien gegenüber den Kontrollen verzeichnet werden.

Abb. 11: Auswertung der Größe der FISH-Signale in cHL-Zelllinien.



Darstellung der kleinen, mittelgroßen und großen Signale in den vier HL-Zelllinien. In den HRS-Zellen zeigten sich am häufigsten große FISH-Signale wobei die Verteilung recht homogen war. Kleine und mittelgroße Signale waren etwas seltener in den HRS-Zellen vorhanden.

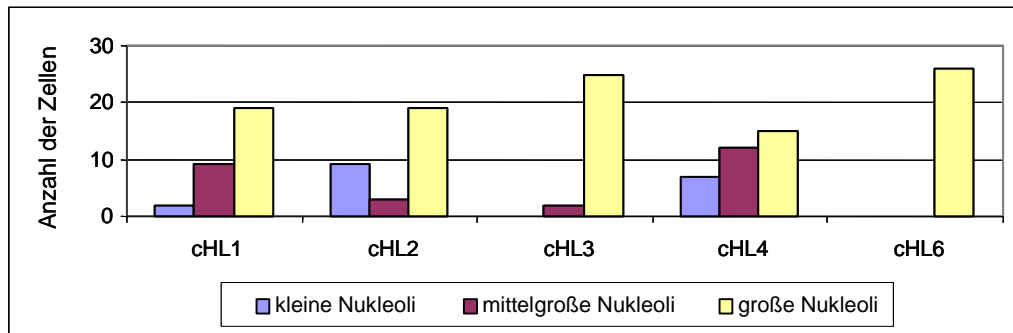
3.1.1.4. Größe der Nukleoli in primären cHL

Ebenso wie in den cHL-Zelllinien fanden sich auch in den primären cHL meist große FISH-Signale für die rRNA-Gene (siehe auch Abbildung 12). Die Größenanalyse der FISH-Signale von den insgesamt 106 untersuchten HRS-Zellen ergab, dass in der Mehrzahl große Nukleoli vorherrschten (n=104), kleine (n=18) und mittelgroße (n=26) Nukleoli waren hingegen seltener vorhanden. (Man beachte, dass ggf. mehr als ein Nukleolus pro Zelle vorhanden war.) Im Einzelnen waren das in den Zelllinien:

- cHL 1: 6,7 % kleine, 30 % mittelgroße und 63,3 % große Nukleoli.
- cHL 2: 29,0 % kleine, 9,7 % mittelgroße und 61,3 % große Nukleoli.
- cHL 3: 0 % kleine, 7,4 % mittelgroße und 92,6 % große Nukleoli.
- cHL 4: 20,6 % kleine, 35,3 % mittelgroße und 44,1 % große Nukleoli.
- cHL 6: 0 % kleine, 0 % mittelgroße und 100 % große Nukleoli.

Der durchschnittliche Anteil der kleinen Signale in den fünf primären cHL lag bei 11,26 %, für mittelgroße Signale bei 16,48 % und für große Signale bei 72,26 %. Hier zeigt sich eine stärkere Größenzunahme der Nukleoli als in den HRS-Zellen der cHL-Zelllinien.

Abb. 12: Auswertung der Größe der FISH-Signale in primären cHL.



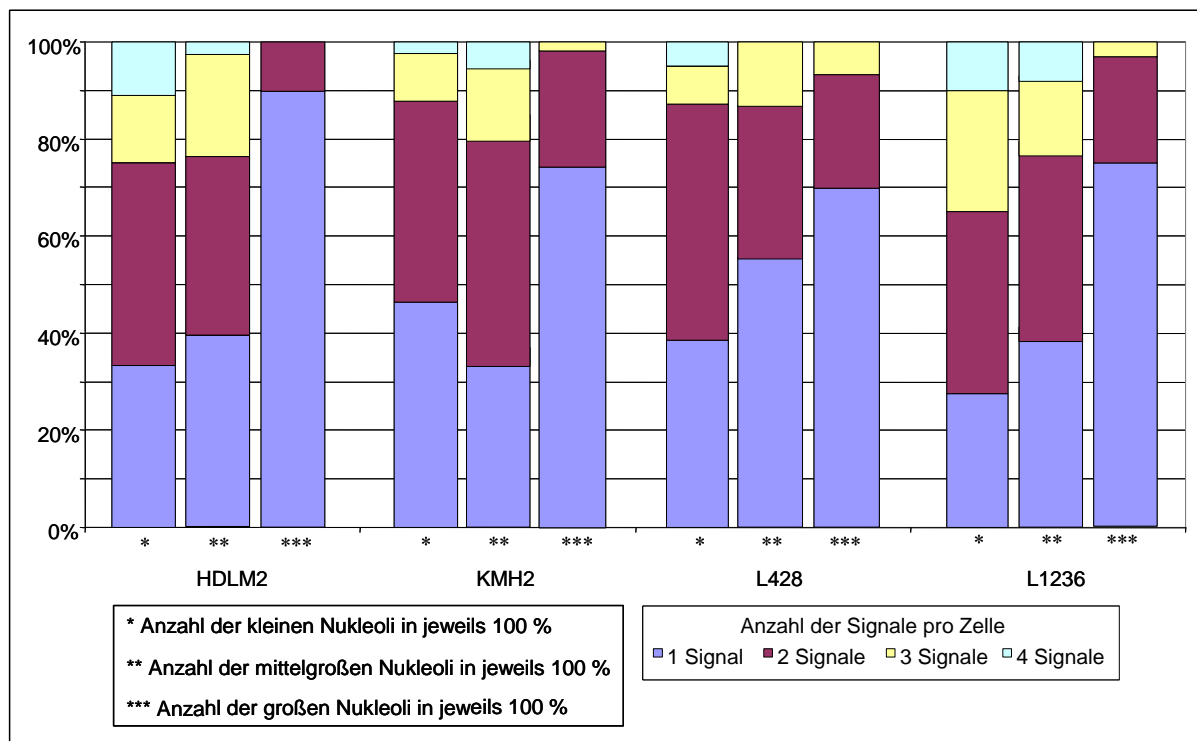
Darstellung der kleinen, mittelgroßen und großen Nukleoli in den fünf primären cHL. Es fanden sich v. a. große Signale in den HRS-Zellen, kleine und mittelgroße Signale waren selten.

In den HRS-Zellen der primären cHL zeigte sich ein deutliches Überwiegen der großen Nukleoli. Dies wird vor allem in den Fällen cHL3 und cHL6 deutlich, da hier nahezu ausnahmslos respektive ausschließlich große Nukleoli vorhanden waren.

3.1.1.5. Korrelation zwischen Anzahl und Größe der Nukleoli

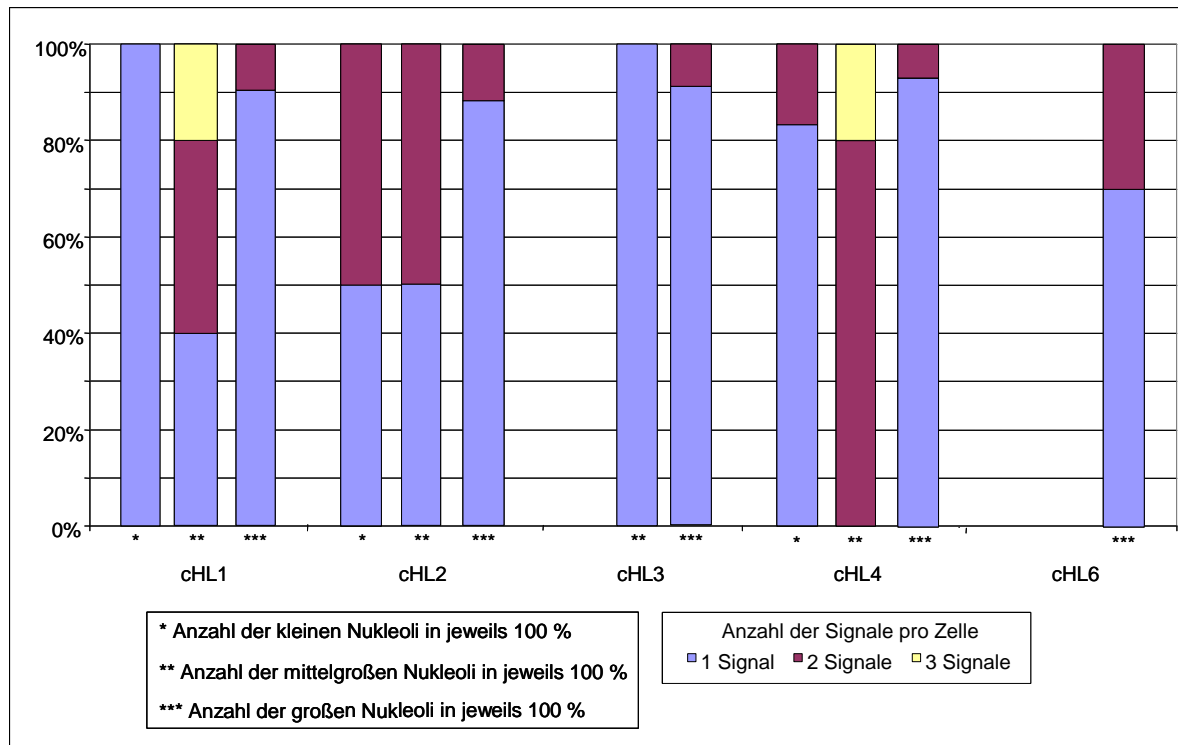
Die Größenverteilung der Signale in den HRS-Zellen der Zelllinien war homogen. In den HRS-Zellen der primären cHL hingegen kamen vor allem großen Signale vor. Allerdings zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Nukleoli: je mehr Nukleoli in einer Zelle vorhanden waren, desto kleiner waren die FISH-Signale (siehe Abbildung 13 und 14). Darüber hinaus waren Probe A und Probe B immer co-lokalisiert und somit keine Bruchereignisse in den rRNA-Loci nachweisbar.

Abb. 13: Darstellung der Korrelation zwischen Größe und Anzahl der FISH-Signale pro HRS-Zelle der Zelllinien.



Darstellung der Relation zwischen Größe und Anzahl der FISH-Signale in den Zelllinien. Es zeigt sich, dass eine inverse Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Nukleoli besteht. Je größer die Nukleoli pro Zelle waren, desto weniger Signale fanden sich.

Abb. 14: Darstellung der Korrelation zwischen Größe und Anzahl der FISH-Signale pro HRS-Zelle in den primären cHL.



Darstellung der Relation zwischen Größe und Anzahl der FISH-Signale in den primären cHL. Aufgrund der geringen Zahlen von HRS-Zellen ist die inverse Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Nucleoli hier nicht sehr deutlich. Aber auch hier zeigte sich, dass je größer die Nucleoli pro Zelle waren, desto weniger Signale waren vorhanden.

Im Vergleich zu Zellen, in denen vorwiegend kleine Nucleoli auftraten, zeigte sich eine deutliche Abnahme der Anzahl der Nucleoli in Zellen, in denen große Nucleoli vorherrschten. Dies wird vor allem in den cHL-Zelllinien deutlich: So kamen drei Signale pro Zelle mit großen Nucleoli nur selten, vier Signale pro Zelle nie vor.

3.1.1.6. Fiber-FISH

Eine denkbare Ursache für die chromosomalen Veränderungen in HRS-Zellen sind Aberrationen der rRNA-Repeats. Deshalb wurden, um die genaue Abfolge der rRNA-Repeats zu untersuchen, Fiber-FISH-Präparate mit der FISH-Sonde Probe A (sgr) / Probe B (so) von vier cHL-Zelllinien (HDLM2, KMH2, L428 und L1236) erstellt.

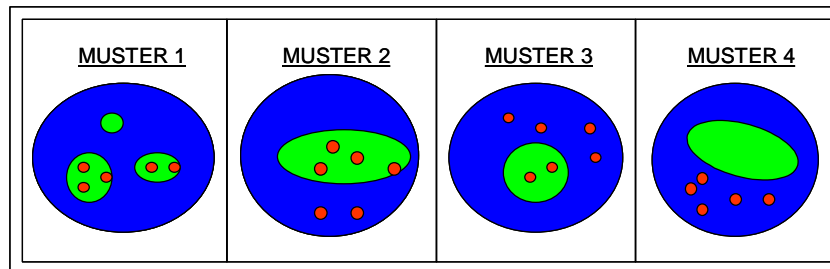
Allerdings erbrachten die Versuche keine sicher auswertbaren Befunde hinsichtlich der Anordnung der rRNA-Repeats.

3.1.2. FISH-Analysen von rRNA-Genen und *JAK2 / PDCD1LG2*

Als mögliche Ursache für die segmentalen chromosomalen Aberrationen (SCAs) zwischen rRNA-Genen und der Chromosomenregion 9p24 (*JAK2 / PDCD1LG2*) wurde die chromosomale Instabilität diskutiert (siehe auch Abschnitt 1.1.2.1. und 1.1.2.2.). Dabei könnte die rRNA als „Transportmittel“ fungieren, so dass Gene – wie z. B. *JAK2 / PDCD1LG2* in unterschiedliche Abschnitte des Genoms transloziert oder inseriert werden (Martin-Subero et al., 2003). In HRS-Zellen fanden sich SCAs v. a. in Metaphase Chromosomen, die ihren Ursprung aus bis zu sechs unterschiedlichen Chromosomen nehmen (Joos et al., 2003). Die oben beschriebenen SCAs fanden sich in der Zelllinie HDLM2 sowie in einem primären cHL-Fall (MacLeod et al., 2000; Martin-Subero et al., 2003). Die Zelllinie HDLM2 wurde deshalb als Positiv-Kontrolle verwendet.

Um mögliche Co-Lokalisation von rRNA-Genen und *JAK2* auch in weiteren cHL zu untersuchen, wurden FISH-Analysen mit dem Plasmid-Klon Probe A und den BAC-Klonen RP11-635N21 respektive RP11-574F11 (für den *JAK2 / PDCD1LG2*-Locus in 9p24) durchgeführt. Die FISH-Signale wurden in vier Muster eingeteilt (siehe Abbildungen 15 und 16).

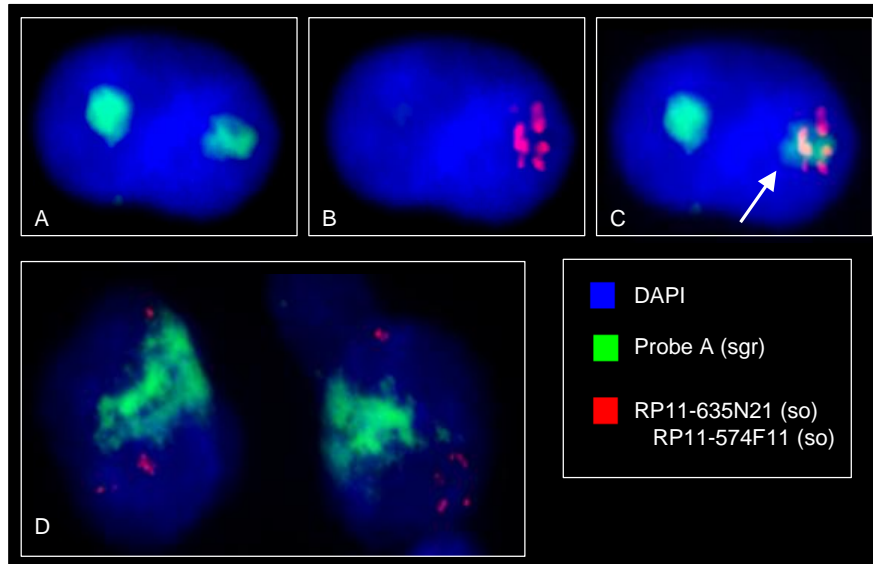
Abb. 15: Darstellung der Muster 1 bis 4 zur Einteilung der Co-Lokalisationen von rRNA-Genen (grün) und *JAK2* (rot).



In Muster 1 war der stärkste Co-Lokalisierungsgrad zu verzeichnen – alle FISH-Signale für *JAK2 / PDCD1LG2* befanden sich innerhalb der Signale der Sonden für

die rRNA-Gene. In Muster 2 bestanden überwiegend – etwa zu 70 % – Co-Lokalisationen, Muster 3 wurde definiert als geringe – ca. 30 % – Co-Lokalisation zwischen rRNA-Genen und *JAK2*. Muster 4 zeigte keine Co-Lokalisation – alle Signale für *JAK2* / *PDCD1LG2* lagen außerhalb der rRNA-Signale.

Abb. 16: FISH-Darstellung der Sonde Probe A / RP11-635N21 zur Analyse der Co-Lokalisationen.

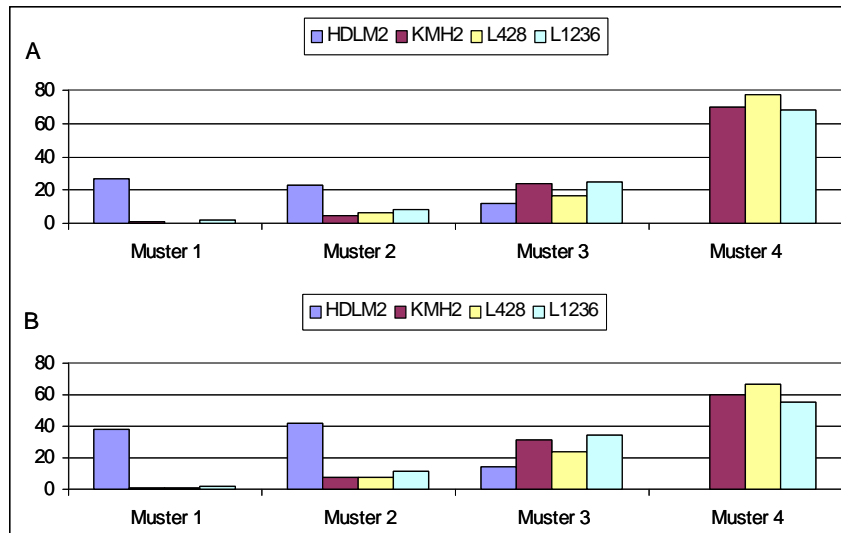


A)-C) Beispiel einer Co-Lokalisation zwischen rRNA-Genen (grün) und *JAK2* / *PDCD1LG2* (rot) (Muster 1, weißer Pfeil) in der cHL-Zelllinie HDLM2. D) HRS-Zellen des Patienten Nr. 4 in der keine Co-Lokalisation zwischen den rRNA-Repeats und *JAK2* / *PDCD1LG2* auftrat (Muster 4).

3.1.2.1. Interphase FISH in cHL-Zelllinien

Es wurden HRS-Zellen der Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236 auf eine mögliche Co-Lokalisation zwischen rRNA-Genen und *JAK2* / *PDCD1LG2* mit den FISH-Sonden Probe A / RP11-635N21 respektive Probe A / RP11-574F11 untersucht. In der als Positiv-Kontrolle verwendeten Zelllinie HDLM2 zeigte sich eine starke Co-Lokalisation: von 156 untersuchten HRS-Zellen fanden sich in etwa 83 % Muster 1 (n=65) und 2 (n=65). Nur ca. 17 % der HRS-Zellen erfüllten das Kriterium für Muster 3 (n=26). In den übrigen Zelllinien fanden sich im Gegensatz hierzu nur limitiert Co-Lokalisationen zwischen den beiden Genorten: so zeigte sich Muster 3 in 155 Zellen und Muster 4 in 397 Zellen. Demzufolge konnten SCAs zwischen den hier untersuchten Genloci nicht nachgewiesen werden.

Abb. 17: Auswertung der cHL-Zelllinien.



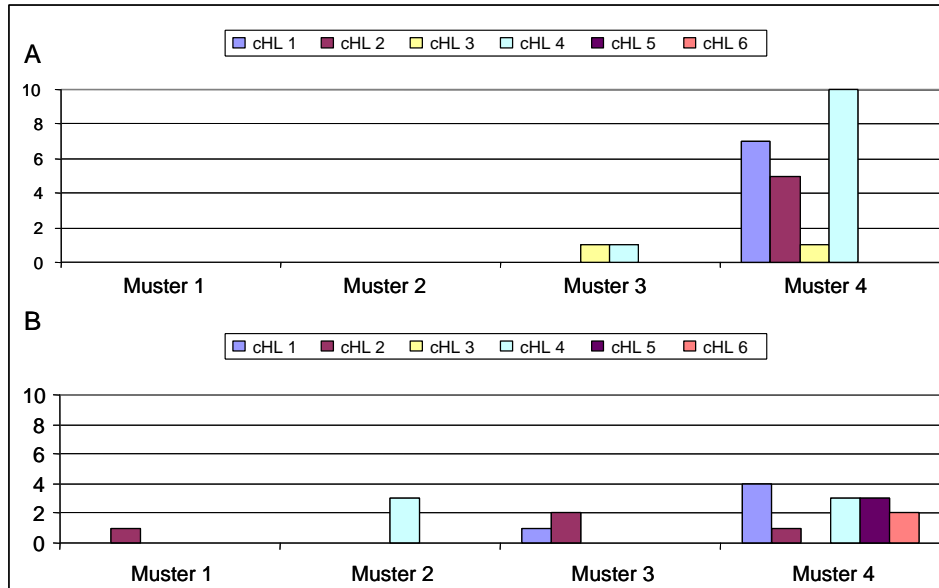
A) Auswertung der Co-Lokalisation von rRNA-Genen und JAK2 / PDCD1LG2 an den cHL-Zelllinien mit den FISH-Sonden Probe A (sgr) und RP11-635N21 (so). B) Auswertung der Co-Lokalisation von rRNA und JAK2 / PDCD1LG2 an den cHL-Zelllinien mit den FISH-Sonden Probe A (sgr) und RP11-574F11 (so). Muster 1 bis 4 siehe auch Abb. 15.

3.1.2.2. Interphase FISH in primären cHL

Es wurden weiterhin FISH-Analysen von sechs primären HL mit den beiden oben beschriebenen FISH-Sonden durchgeführt. Diese Fälle wurden ausgewählt, da bereits Amplifikationen mittels FISH im Genort *JAK2 / PDCD1LG2* nachgewiesen wurden.

Überwiegend fand sich in den untersuchten HRS-Zellen keine Co-Lokalisation zwischen *JAK2 / PDCD1LG2* und rRNA-Genen: mit dem Muster 1 war 1 Zelle vorhanden, das Kriterium für Muster 2 erfüllten 3 Zellen, Muster 3 und Muster 4 zeigte sich in 5 respektive 35 Zellen. Daher gibt es ebenfalls keinen Hinweis auf segmentale chromosomale Aberrationen zwischen den rRNA-Genen und *JAK2 / PDCD1LG2* in den hier analysierten primären cHL.

Abb. 18: Auswertung der primären cHL.

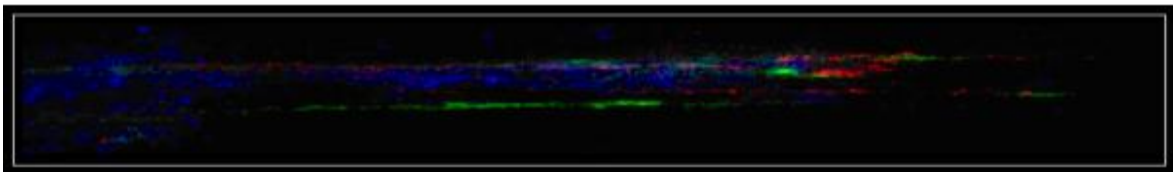


A) Auswertung der Co-Lokalisation von rRNA-Genen und JAK2 / PDCD1LG2 an primären cHL mit den FISH-Sonden Probe A (sgr) und RP11-635N21 (so). B) Auswertung der Co-Lokalisation von rRNA und JAK2 / PDCD1LG2 an primären cHL mit den FISH-Sonden Probe A (sgr) und RP11-574F11 (so). Muster 1 bis 4 siehe auch Abb. 15.

3.1.2.3. Fiber-FISH

Um genauere Einblicke in die Co-Lokalisation zwischen rRNA-Repeats und JAK2 / PDCD1LG2 in der Zelllinie HDLM2 zu erlangen, wurden Fiber-FISH-Präparate mit der FISH-Sonde Probe A (sgr) / RP11-574F11 (so) angefertigt. Allerdings ergaben die Versuche keine sicher auswertbaren Befunde hinsichtlich der Anordnung der Co-Lokalisationen zwischen diesen beiden Genorten (siehe auch Abbildung 19).

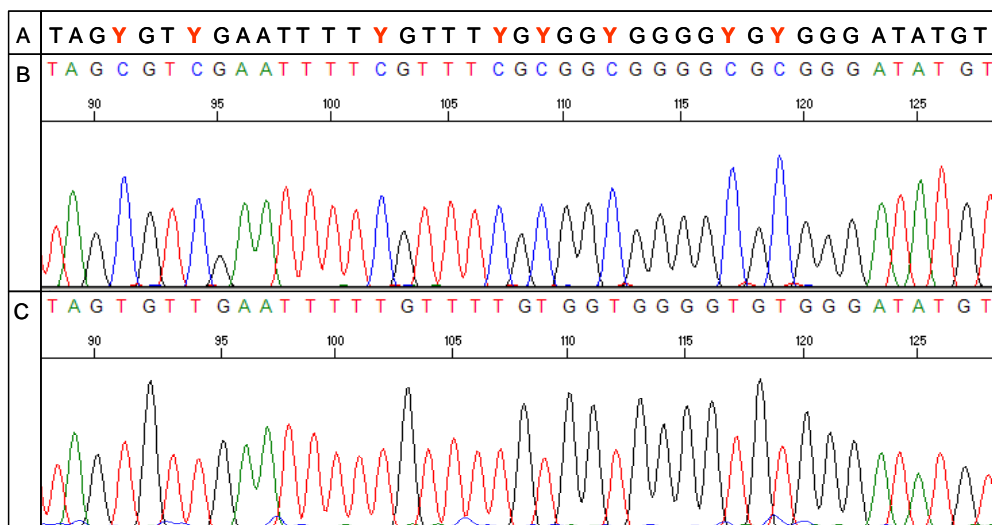
Abb. 19: Fiber-FISH der Zelllinie HDLM2 mit der FISH-Sonde Probe A (sgr) / RP11-574F11 (so).



3.2. DNA-Methylierungsanalyse der rRNA-Gene

Veränderungen der DNA-Methylierung in den rRNA-Genen 18S und 28S sowie in dem externen transkribierten Spacer 5'ETS könnten ein weiterer Grund für die chromosomale Instabilität darstellen, da z. B. Hypomethylierungen zu einer vermehrten „Zerbrechlichkeit“ der DNA und dadurch zu einer Zunahme von chromosomalen Rearrangements führen (Eden et al., 2003; Gaudet et al., 2003). Da chromosomale Instabilität ein zytogenetisches Charakteristikum der HRS-Zellen ist, wurden in der vorliegenden Studie Methylierungsanalysen der oben genannten Genloci von den cHL-Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 sowie L1236 durchgeführt. Hierzu erfolgten Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen der rRNA-Loci der cHL-Zelllinien. Pro Zelllinie und Primer wurden jeweils zehn Klone sequenziert. Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen, wobei zwischen methylierten, unmethylierten und mutierten CpG-Dinukleotiden unterschieden wurde.

Abb. 20: Basensequenz und Elektropherogramm einer Natrium-Bisulfit-Sequenzierung.



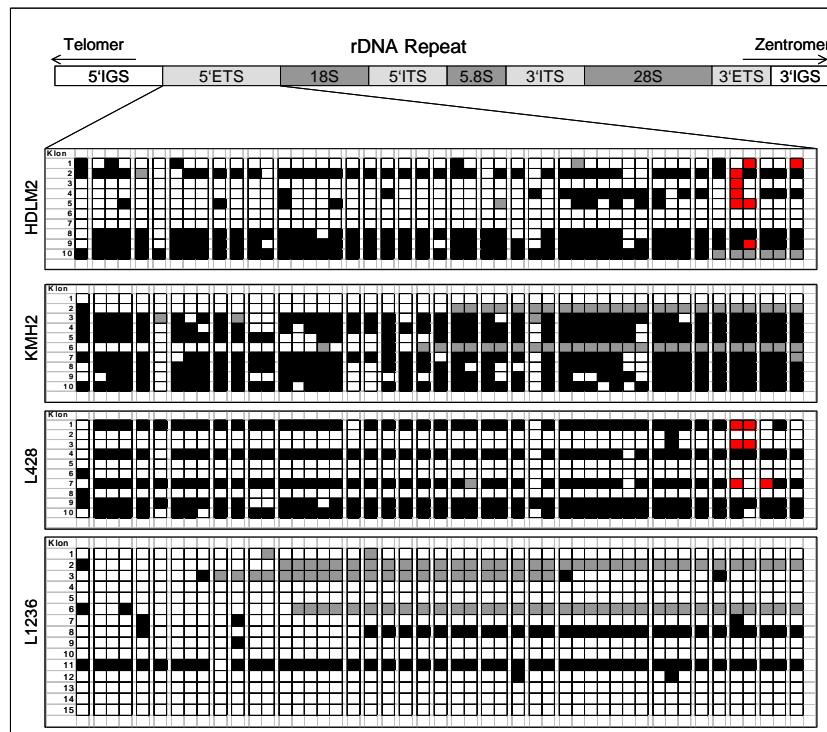
A) Original Basensequenz eines DNA-Fragments des rRNA-Gens 28S. Cytosin-Basen der CpG-Dinukleotide, die nach der Natrium-Bisulfit-Behandlung entweder methyliert oder unmethyliert vorliegen, sind mit „Y“ (Pyrimidinbase) gekennzeichnet. B) Elektropherogramm des rRNA-Gens 28S der Zelllinie L428 (Klon 3) als Beispiel eines vollständig methylierten Klons. C) Beispiel eines gänzlich unmethylierten Klons der Zelllinie L1236 (Klon 3).

3.2.1. Natrium-Bisulfit-Sequenzierung von 5-ETS

Im externen transkribierten Spacer 5-ETS wurden insgesamt 48 CpG-Dinukleotide analysiert. Es wurden zehn Klone der Zelllinien HDLM2, KMH2 und L428 sowie 15 Klone der Zelllinie L1236 sequenziert und untersucht (siehe Abbildung 21). Als methyliert wurde ein Klon bezeichnet, der über 90 % methylierte CpG-Dinukleotide aufwies. Unmethylierte Klone waren maximal bis zu 10 % methyliert.

In der Zelllinie HDLM2 waren vier Klone unmethyliert, einer methyliert und fünf weitere lagen im mittleren Bereich. In der Zelllinie KMH2 waren drei Klone unmethyliert und die restlichen sieben waren etwas stärker (bis 29 %) methyliert. Vier Klone waren in der Zelllinie L428 methyliert, sechs unmethyliert. Die deutlichste Hypomethylierung trat in der Zelllinie L1236 auf. Dreizehn sequenzierte Klone waren unmethyliert, ein Klon methyliert und ein weiterer war zu 63 % methyliert.

Abb. 21: Darstellung analysierten und mit Natrium-Bisulfit behandelten CpG-Dinukleotide des externen transkribierten Spacers 5-ETS in den Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236.



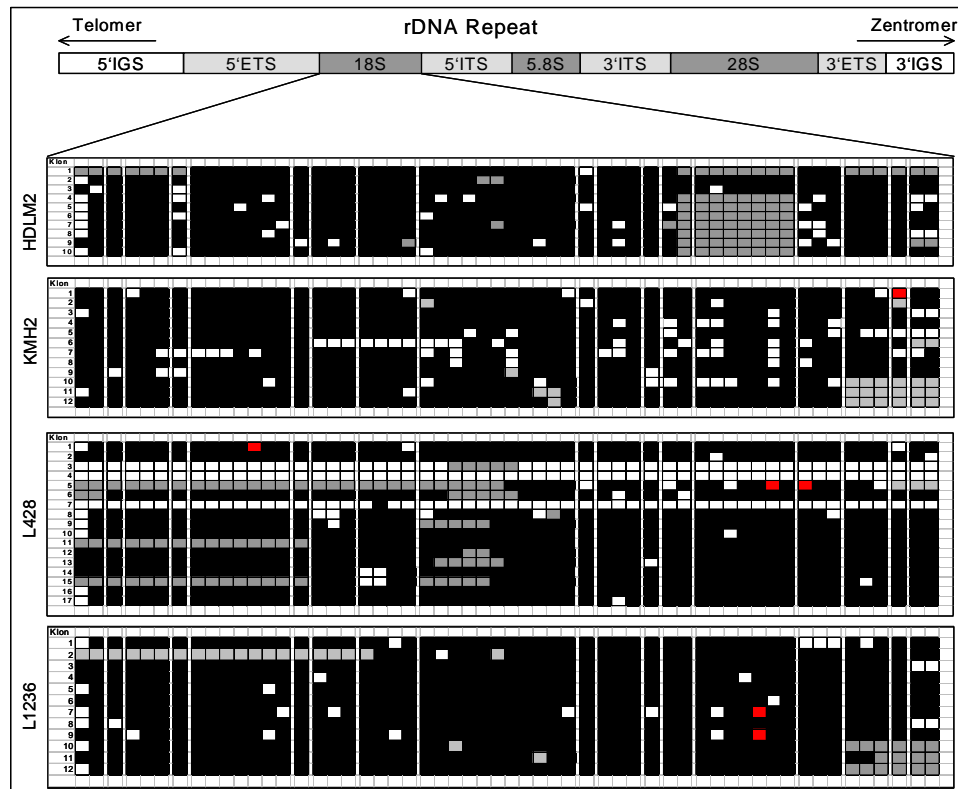
Es wurden jeweils mindestens zehn Klone sequenziert und nach folgendem Schema kodiert: Methylierte CpG-Dinukleotide sind in schwarz, unmethylierte CpGs in weiß, nicht analysierbare CpG-inseln in grau und Mutationen in rot markiert.

3.2.2. Natrium-Bisulfit-Sequenzierung des rRNA-Gens 18S

Die Natrium-Bisulfit Sequenzierung des rRNA-Gens 18S zeigte eine nahezu vollständige Methylierung in allen vier Zelllinien. Insgesamt wurden 56 CpG-Dinukleotide analysiert. Es wurden zehn Klone der Zelllinie HDLM2, jeweils zwölf Klone der Zelllinien KMH2 und L1236 sowie 17 Klone der Zelllinie L428 sequenziert (siehe Abbildung 22).

Sieben Klone der Zelllinie HDLM2 waren vollständig, drei weitere bis zu 89 % methyliert. In der Zelllinie KMH2 waren ebenfalls sieben Klone vollständig methyliert. Die restlichen fünf Klone zeigten einen Methylierungsgrad zwischen 70 und 89 %. Drei der 17 Klone der Zelllinie L428 waren unmethyliert, die übrigen 14 waren vollständig methyliert. In der Zelllinie L1236 fanden sich elf methylierte Klone und ein weiterer fast komplett methylierter Klon (89 %).

Abb. 22: Analyse der Natrium-Bisulfit behandelten CpG-Dinukleotide des rRNA-Gens 18S in den Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236.



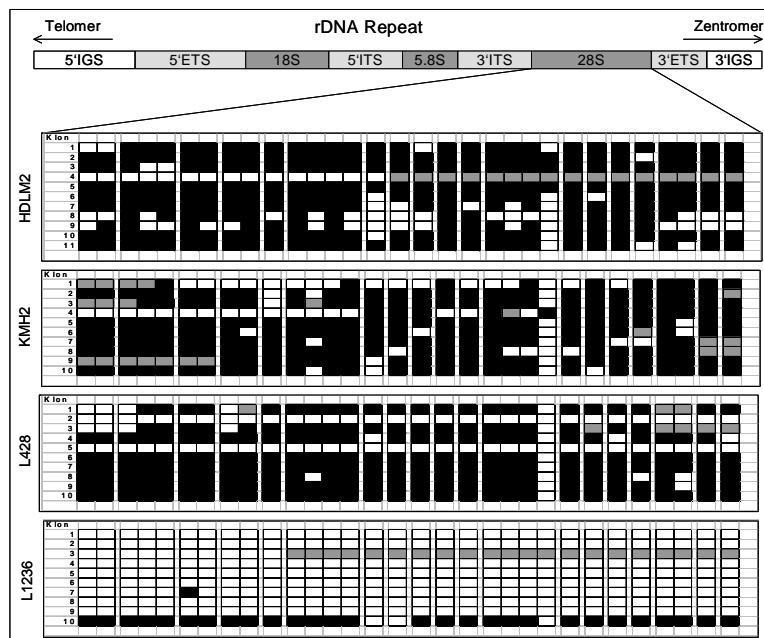
Jeweils mindestens zehn Klone wurden sequenziert. Methylierte CpG-Dinukleotide sind in schwarz, unmethylierte CpGs in weiß, nicht analysierbare CpG-inseln in grau und Mutationen in rot markiert.

3.2.3. Natrium-Bisulfit-Sequenzierung des rRNA-Gens 28S

In dem rRNA-Gen 28S wurden 31 CpG-Dinukleotide untersucht. Es wurden elf Klone der Zelllinie HDLM2 und jeweils zehn Klone der Zelllinien KMH2, L428 und L1236 sequenziert (siehe Abbildung 23).

Sieben der elf HDLM2-Klone waren methyliert. Der Methylierungsgrad der übrigen vier Klone lag zwischen 48 und 87 %. Vier Klone der Zelllinie KMH2 waren vollständig methyliert, alle weiteren lagen im Bereich zwischen 45 und 87 %. In der Zelllinie L428 fanden sich zwei unmethylierte, vier methylierte und vier nahezu vollständig methylierte (87 %) Klone. Die Zelllinie L1236 war bis auf einen methylierten Klon komplett unmethyliert.

Abb. 23: Darstellung der analysierten CpG-Dinukleotide der mit Natrium-Bisulfit behandelten Klone des rRNA-Gens 28S in den Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236.



Auch hier wurden mindestens jeweils zehn Klone sequenziert. Methylierte CpG-Dinukleotide sind in schwarz, unmethylierte CpGs in weiß, nicht analysierbare CpG-inseln in grau und Mutationen in rot markiert.

In den zwei analysierten rRNA-Genen 18S und 28S sowie in dem externen transkribierten Spacer 5-ETS zeigte sich ein heterogenes Methylierungsmuster. Der externe transkribierte Spacer zeigte eine mäßige Methylierung bis hin zu einer starken

Hypomethylierung in der cHL-Zelllinie L1236, während das rRNA-Gen 18S in allen Zelllinien nahezu vollständig methyliert war. Das rRNA-Gen 28S war ebenfalls stark methyliert, Ausnahme bildete wiederum die Zelllinie L1236. In den untersuchten Zelllinien zeigte sich vor allem eine starke Korrelation zwischen 5-ETS und 28S.

Im Gegensatz zu den hier dargestellten analysierten Sequenzen zeigten Kontrollen einer normalen Population einen Methylierungsgrad der rRNA-Gene 18S und 28S zwischen 20 und 50 % (siehe Abbildung 24; unpublizierte Daten von Javierre und Ballestar, CNIO, Madrid, Spanien).

4. Diskussion

Chromosomale Instabilität, Karyotypen in hyperploiden Rängen sowie multiple strukturelle und numerische Aberrationen sind zytogenetische Charakteristika der HRS-Zellen in cHL (Weber-Matthiesen et al., 1995; Falzetti et al., 1999; Martin-Subero et al., 2002; Thangavelu und Le Beau, 1989; Drexler, 1992; Deerberg-Wittram et al., 1996; Atkin, 1998; Falzetti et al., 1999). Histologisch sichtbare Veränderungen des rRNA-Syntheseortes - des Nukleolus, Co-Lokalisationen zwischen rRNA-Genen und *JAK2 / PDCD1LG2* sowie Änderungen des Methylierungsgrades innerhalb der rRNA-Gene lassen auf Veränderungen im Bereich der ribosomalen RNA-Repeats schließen (MacLeod et al., 2000; Martin-Subero et al., 2003). Basierend auf diesen Daten wurden die rRNA-Loci in der vorliegenden Studie analysiert, um einen Einblick in numerische, strukturelle und epigenetische Aberrationen zu erlangen.

4.1. Methodische Aspekte

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zyto- sowie molekulargenetische Untersuchungsmethoden angewendet:

Um die zytogenetischen Veränderungen der HRS-Zellen zu analysieren, wurde die **Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)** genutzt. Durch das Prinzip der spezifischen Basenpaarung können hierbei bestimmte Gensequenzen mit komplementären fluoreszierenden DNA-Sonden sichtbar gemacht werden. Mittels Interphase-FISH können z. B. Translokationen oder Amplifikationen an bestimmten Loci in Interphasen identifiziert werden. Vorteil dieser Methode ist es, dass keine Metaphasen benötigt werden und sie, im Vergleich zu klassischer Zytogenetik, eine hohe Auflösung und Sensitivität besitzt. Nachteil ist der begrenzte Umfang der Untersuchung: Es können lediglich gezielt bekannte Chromosomenregionen mittels DNA-Sonde hybridisiert und untersucht werden, unbekannte Aberrationen hingegen können nicht detektiert werden. In dieser Arbeit konnte mittels FISH in allen untersuchten Fällen, d.h. vier cHL-Zelllinien und fünf primären cHL-Fällen, eine Vermehrung der rRNA nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten durch diese Methode Co-Lokalisationen zwischen rRNA-Genen und dem *JAK2 / PDCD1LG2*-Genort in 9p24 in den

hier untersuchten Zelllinien und primären cHL nahezu ausgeschlossen werden. Diese konnten zuvor in der cHL-Zelllinie HDLM2 nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung und genaueren Darstellung der inneren Struktur der rRNA-Repeat-Abfolge wurden Fiber-FISH-Analysen durchgeführt. Die DNA-Fiber werden mit Hilfe eines Deckglases und einem Gemisch aus absolutem Ethanol, Aqua dest. und NaOH erzeugt und können anschließend mit einer FISH-Sonde hybridisiert werden. Caburet et al. (2005) z. B. konnten mittels dieser Methode detaillierte Untersuchungen der rRNA-Repeats in Werner-Syndrom-Zelllinien durchführen. In der vorliegenden Arbeit wurden diverse Fiber-FISH-Präparate erstellt. Allerdings erbrachten sie nicht die gewünschten Ergebnisse. Ursächlich könnten dafür z. B. zu hohe DNA-Konzentrationen sein, die zu einem Überlappen der Fiber führen. Dafür spricht, dass die rRNA-Repeats in HRS-Zellen gegenüber normalen Zellen vermehrt sind. In den Werner-Syndrom-Zelllinien hingegen fanden sich zwar strukturelle Aberrationen der rRNA-Repeats, jedoch zeigten sich, im Gegensatz zu den HRS-Zellen im cHL, keine numerischen Veränderungen. Ein weiterer Grund dafür, dass die Fiber-FISH-Analysen nicht auswertbar waren, könnte in der Durchführung liegen: durch zu viel bzw. zu wenig Druck oder zu schnelles bzw. zu langsames Ziehen mit dem Deckglas können ungeeignete DNA-Fiber entstehen. Durch Variieren der Methode wurde versucht diesen Fehler zu umgehen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die fragilen, vermehrten rRNA-Repeats hierbei „beschädigt“ wurden.

Darüber hinaus wurden 158 Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen zur Analyse des Methylierungsgrades der rRNA-Gene durchgeführt. Hierbei wird die DNA der zu untersuchenden Zelle mit Natrium-Bisulfit behandelt, wodurch unmethylierte Cytosin-Reste zu Uracil konvertiert werden, während methylierte Cytosin-Basen unverändert bleiben. Anschließend erfolgt eine PCR mit den gewünschten Primern sowie eine Klonierung dieser PCR-Produkte. Klone mit der richtigen Insertion des DNA-Fragments wurden selektiert und es erfolgte eine Kolonie-PCR, deren Produkt nach einigen Aufreinigungsschritten sequenziert wird. Kritischster Schritt bei dieser Methode ist die Konvertierung von unmethylierten Cytosin-Basen, da hierbei ggf. die Konvertierungen nur partiell erfolgen und damit falsche Ergebnisse erzielt werden können. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten trat das

bereits in anderen Studien beschriebene Phänomen auf, dass durch die Natrium-Bisulfitbehandlung lange Bereiche mit aufeinander folgenden Thymin- respektive Adeninnukleotiden entstehen (Li und Dahiya, 2002). Hierdurch wird oft ein Strangabbruch induziert, da die DNA-Polymerase nicht oder nur sehr schwierig über eine so lange Strecke von Nukleotid-Wiederholungen synthetisieren kann. Gegebenenfalls konnte dann nur eine Primersequenz – sense oder antisense – ausgewertet werden. Mittels dieser Methode konnte der Methylierungsgrad der drei untersuchten rRNA-Gensegmente 18S, 28S sowie 5-ETS in den vier cHL-Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236 ermittelt werden. Es wurden für jedes der rRNA-Gensegmente mindestens zehn Klone sequenziert, so dass man im Vergleich zu Kontrollgruppen eine eindeutige Hypermethylierung, mit Ausnahme der Zelllinie L1236, feststellen konnte.

4.2. Biologie des Hodgkin-Lymphoms

4.2.1. Veränderungen der rRNA-Gene in Hodgkin-Lymphomen

Der Nukleolus ist das Resultat aus einer Zusammenlagerung der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, welche die in nucleolus organizer regions (NORs) angeordneten rRNA-Gene tragen. In HRS-Zellen zeigte sich histologisch eine Vergrößerung sowie eine Vermehrung der Nukleoli. Diese Beobachtung lässt auf Zugewinne innerhalb der rRNA-Gene schließen, die hier mittels der FISH-Sonde Probe A / Probe B in vier HL-Zelllinien (HDLM2, KMH2, L428, L1236) sowie in fünf primären HL nachgewiesen werden konnten. Die beiden Sonden überspannen dabei die gesamte Länge der rRNA-kodierenden Regionen (siehe auch 3.1.1.). Gegenüber gesunden Zellen fanden sich innerhalb der HRS-Zellen zum Teil multiple - in der Regel zwischen einem und sechs - Nukleoli mit deutlicher Vergrößerung der Signale der FISH-Sonde, wobei die Fluoreszenz-Signale für Probe A und Probe B immer colokalisiert waren.

Zugewinne der rRNA-Repeats können z. B. durch fehlerhafte Aneinanderlagerung der homologen Chromatiden während der Zellteilung entstehen. Legen sich die repetitiven rRNA-Sequenzen beim Crossing-over versetzt aneinander, so kann daraus ein Ungleichgewicht der Verteilungen der Repeats zwischen den jeweiligen homologen Chromosomen resultieren. Zusätzlich können Aberrationen des Zentrosoms, die vermutlich mit chromosomaler Instabilität einhergehen (Pihan et al., 1998; Nigg, 2002; Krämer et al., 2002), eine Fehlverteilung der Chromosomen begünstigen. Durch die essentielle Rolle des Zentrosoms bei der Organisation der Mitose sowie der Bildung des Zytoskeletts und Spindelapparates könnten Veränderungen in diesem Bereich zu mono- oder multipolaren Spindelapparaten führen, die wiederum in einer veränderten Chromosomenverteilung resultieren. In HRS-Zellen beobachteten Martin-Subero et al. (2003), dass die Tumorzellen mit nur einem Zentrosom mononukleär, die mit multiplen Zentrosomen multinukleär waren. Der Vergleich des medianen Zentrosomen-Areals zwischen den HRS-Zellen und den Bystander-Zellen des umgebenen Infiltrats zeigte ein ca. dreimal größeres Zentrosomen-Areal seitens der Tumorzellen. Allerdings war, in Korrelation mit der Größe des Nukleus, die Größe des Zentrosomen-Areals nicht signifikant erhöht.

Nuclear Organizer Regions (NORs) sind meist in einer Telomer-zu-Zentromer Orientierung, in der transkribierte Regionen und nicht transkribierte Abschnitte alternierend auftreten, angeordnet (Henderson et al., 1972; Worton et al., 1988). Teilweise liegt diese regelmäßige Anordnung nicht vor und es bilden sich Palindromstrukturen aus, die zu funktionsuntüchtigen Pseudogenen führen können. Um die genaue Abfolge der rRNA-Repeats in cHL zu untersuchen, wurden Fiber-FISH-Präparate der vier cHL-Zelllinien angefertigt und mit der FISH-Sonde Probe A / Probe B hybridisiert. Mittels Fiber-FISH konnten jedoch keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden (siehe oben).

4.2.2. Aberrationen des JAK2 / PDCD1LG2-Genlocus

In HRS-Zellen finden sich Chromosomen, die ihren Ursprung aus bis zu sechs unterschiedlichen Chromosomen nehmen, wobei in ca. der Hälfte dieser Chromosomen segmentale chromosomale Aberrationen (SCAs) auftreten (Joos et al., 2003).

MacLeod und Mitarbeiter (2000) suggerierten, dass u. a. chromosomale Rearrangements der rRNA-Loci zur Ausbildung von SCAs führen können. In FISH-Analysen von zwei cHL-Fällen fanden sich SCAs zwischen rRNA-Genen und dem JAK2-Locus in 9p24, die in Genamplifikationen und Chromosomenveränderungen resultieren (MacLeod et al., 2000; Martin-Subero et al., 2003). Um diese Veränderungen auch in weiteren cHL zu untersuchen, wurden hier die HL-Zelllinien KMH2, L428 und L1236 sowie sechs primäre cHL mit den FISH-Sonden Probe A / RP11-635N21 und Probe A / RP11-574F11 analysiert. Die Zelllinie HDLM2 wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Dementsprechend fanden sich, wie schon von Martin-Subero et al. (2003) beschrieben, überwiegend Co-Lokalisationen zwischen rRNA-Genen und *JAK2 / PDCD1LG2*. In den übrigen cHL-Zelllinien KMH2, L428 und L1236 sowie in den primären cHL hingegen waren, mit Ausnahme nur weniger Zellen, keine Co-Lokalisationen vorhanden.

In der vorliegenden Studie wurde der Schwerpunkt der Analyse auf SCAs, die sowohl rRNA-Sequenzen als auch *JAK2 / PDCD1LG2* betrafen, gelegt. Da sich, außer in der Zelllinie HDLM2, nur limitiert Co-Lokalisationen zwischen diesen DNA-Sequenzen fanden, ist zu vermuten, dass SCAs die rRNA-Repeats und *JAK2 / PDCD1LG2* betreffen, keinen relevanten Anteil an den Veränderungen der rRNA-Gene in HRS-Zellen haben. Allerdings können auch SCAs weitere Genloci betreffen. So zeigten sich mittels Interphase-FISH in den cHL-Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236 als beteiligte Sequenzen und mutmaßliche Onkogene z. B. *FGFR3/MMSET*, *MYC* und *CyclinD2* (Joos et al. 2003) sowie *REL/BCL11A* (Martin-Subero et al., 2003). Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit, dass weitere repetitive DNA-Sequenzen wie z. B. Histongene, tRNA-Gene sowie Satelliten-DNA zur Ausbildung von SCAs führen können.

Virale Infektionen, die anschließend zur Integration von viralem genetischen Material in zelluläre Chromosomen führen, können strukturelle und numerische chromosomale Instabilität hervorrufen, wie z. B. segmentale chromosomale Aberrationen. Dabei können entweder zufällige oder spezifische Chromosomenaberrationen entstehen (Lavia et al., 2003; Fortunato und Spector, 2003). Zusätzlich können auch Genloci

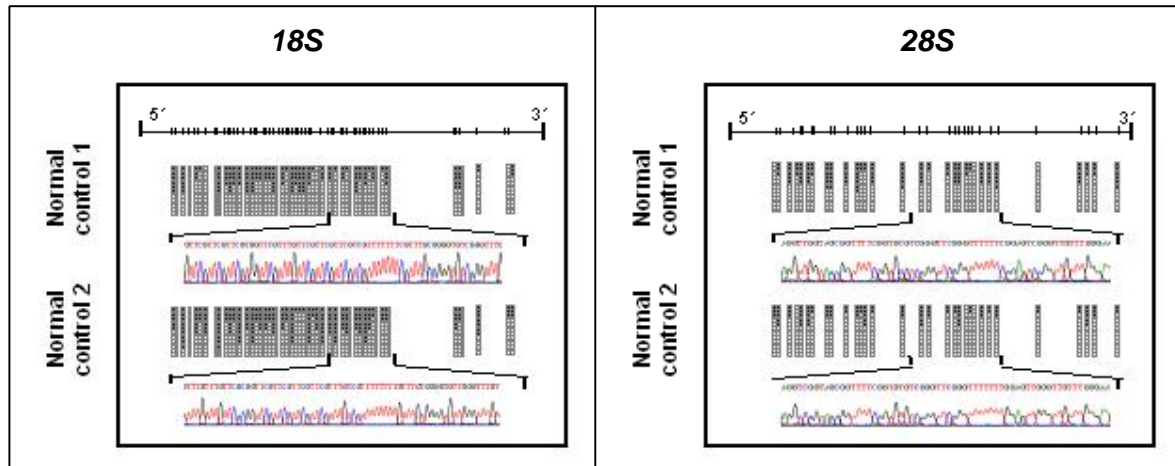
von Tumorsuppressorgenen sowie von Protoonkogenen von Aberrationen betroffen sein. In diversen Studien konnten diese Mechanismen für verschiedene Viren, z. B. Herpes-simplex Virus, Zytomegalievirus, humanes Papillomavirus, Adenovirus sowie Epstein-Barr Virus nachgewiesen werden (Steffensen et al., 1976; Luleci et al., 1980; Peat et al., 1986; AbuBakar et al., 1988; Scinicariello et al., 1994; Gaidano et al., 1997; Moore und Chang, 2003; Pan et al., 2004; Kamranvar et al., 2007).

4.2.3. Veränderungen der DNA-Methylierung der rRNA-Gene

Epigenetische Veränderungen der DNA sind in diversen Tumorerkrankungen bekannt (Santoro et al., 2005; Ehrlich, 2002). Als Entstehungsmechanismus werden chromosomale Instabilität als Folge von DNA-Hypomethylierungen diskutiert (Ehrlich, 2002; Eden et al., 2003). Zusätzlich kann eine gesteigerte Transkription aus verringerter CpG-Methylierung resultieren. So zeigte sich z. B. in hepatozellulären Karzinomzellen eine inverse Korrelation zwischen vermehrter Transkription der rRNA-Gene und dem Gehalt an methylierten CpG-Dinukleotiden in der rRNA-Promotorregion (Ghoshal et al., 2004). Um Veränderungen der DNA-Methylierung der rRNA-Gene in cHL zu untersuchen, wurden in dieser Studie Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen von jeweils zehn Klonen der vier cHL-Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236 an den Genorten für den externen transkribierten Spacer *5-ETS* sowie den rRNA-Genen *18S* und *28S* durchgeführt. Der externe transkribierte Spacer *5-ETS* zeigte den geringsten Grad an Methylierungen der CpG-Dinukleotide auf, wobei die Zelllinie L1236 am stärksten demethyliert war. Das rRNA-Gen *18S* wies in allen Zelllinien ein fast vollständiges Methylierungsmuster auf. Innerhalb des rRNA-Gens *28S* fand sich ebenso eine starke Hypermethylierung, mit Ausnahme der Zelllinie L1236.

Im Gegensatz zu den, in den Abbildungen 21 bis 23, dargestellten analysierten Sequenzen zeigten Kontrollen einer normalen Population einen Methylierungsgrad der rRNA-Gene *18S* und *28S* zwischen 20 und 50 % (siehe Abbildung 24, unpublizierte Daten von Javierre und Ballestar, CNIO, Madrid, Spanien).

Abb. 24: Darstellung der Kontrollgruppe 1 und 2 in den rRNA-Genen 18S und 28S.



Freundlicherweise bereitgestellt von Javierre und Ballestar (CNIO, Madrid, Spanien, unpublizierte Daten). In beiden Genen zeigt sich ein heterogenes Methylierungsmuster mit einem geringen Methylierungsgrad von ca. 20 – 50 %.

Espada et al. (2007) zeigten, dass gegenüber Wildtypzellen, die zu ca. 33,3 % methyliert waren, DNA-Methyltransferase 1-(Dnmt1)-Knockout-Zellen eine signifikante Hypomethylierung der rRNA-Repeats aufwiesen. Das Enzym Dnmt1 ist primär verantwortlich für die Aufrechterhaltung des DNA-Methylierungsmusters in somatischen Zellen (Jaenisch und Bird, 2003; Espada et al., 2004). Ein Mangel an Dnmt1 führte zu einer strukturelle Desorganisation des Nukleolus in humanen Karzinomzellen. Dabei waren, gegenüber Wildtyp-Zellen die rRNA-Gen-Cluster über den ganzen Nucleus zerstreut. Diese Veränderungen waren darüber hinaus mit einem spezifischen Verlust von CpG-Methylierungen der rRNA-Gene assoziiert (Espada et al., 2007) und können über diesen Mechanismus zu chromosomaler Instabilität wie z. B. DNA-Brüchen, segmentalen chromosomalen Aberrationen sowie Genamplifikationen führen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, den zwischen 20 und 50 % methylierten Kontrollen (siehe Abbildung 24) und unseren Erwartungen fanden sich in den hier untersuchten cHL-Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie L1236, vorwiegend Hypermethylierungen der rRNA-Gene. Darüber hinaus besteht aber die Möglichkeit, dass weitere epigenetische Mechanismen, wie z. B. Histon-Modifikationen, Grund für die vorherrschende chromosomale Instabilität sind.

4.3. Fazit

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit:

- eine deutliche Vergrößerung der Fluoreszenz-Signale der Nukleoli der HRS-Zellen im Gegensatz zu den Nukleoli der umgebenen Bystander-Zellen gefunden.
- In den primären cHL vor allem große Nukleoli nachgewiesen, während die Verteilung in den HRS-Zellen der Zelllinien relativ homogen war. Pro Zelle lagen meist ein oder zwei Signale vor.
- Eine inverse Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Nukleoli aufgezeigt: Je mehr Nukleoli in einer Zelle vorhanden waren, desto kleiner waren die Fluoreszenz-Signale.
- Gezeigt, dass Probe A und Probe B immer co-lokalisiert waren, so dass keine Bruchereignisse in den rRNA-Loci nachweisbar waren.
- Segmentale chromosomale Aberrationen und damit Co-Lokalisationen zwischen rRNA und dem Genloci für *JAK2/PDCD1LG2* in 9p24, mit Ausnahme der als Positiv-Kontrolle dienenden Zelllinie HDLM2, nur limitierte nachgewiesen. Es waren also keine Translokationen detektierbar.
- In den zwei analysierten rRNA-Genen *18S* und *28S* sowie dem externen transkribierten Spacer *5-ETS* ein sehr heterogenes Methylierungsmuster gefunden. Zwischen *5-ETS* und *28S* bestand darüber hinaus eine Korrelation des Methylierungsgrades. Die Zelllinie L1236 wies hierbei deutliche Hypermethylierungen der DNA auf. Im Vergleich zu Kontrollen, die zwischen 20 und 50 % methyliert waren, bestand in den rRNA-Genen der Zelllinien eine stärkere Methylierung - zwischen 45 und 100 %.

4.4. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf eine Vermehrung der rRNA sowie Hypermethylierungen der rRNA-Gene in den untersuchten Fällen schließen.

Diese Ergebnisse sollten in weiteren Patientenkollektiven und Zelllinien verifiziert werden, um mehr über die Bedeutung der Vermehrung der rRNA in HRS-Zellen herauszufinden.

In Zukunft könnten weitere Analysen der rRNA im Bezug auf die pathogenetische Rolle innerhalb des Hodgkin-Lymphoms durchgeführt werden. Mögliche Ansatzpunkte wären dabei die Bestimmung der Aktivität der rRNA sowie die Interaktion der stark vermehrten rRNA innerhalb des Zellkomplexes.

Des Weiteren könnten Analysen der Dnmt1 und Histon-Modifikationen zu einem besseren Verständnis führen und gegebenenfalls Aufschluss über weitere epigenetische Veränderungen in cHL und die damit verbundenen Auswirkungen auf chromosomale Instabilität im klassischen Hodgkin-Lymphom geben.

Es bleibt zu hoffen, dass die hier identifizierten Veränderungen der rRNA-Gene neue Ansätze für die Diagnostik und Therapie des Hodgkin-Lymphoms liefern.

5. Zusammenfassung

Zytogenetisches Charakteristikum der Hodgkin Reed-Sternberg-Zellen beim klassischen Hodgkin-Lymphom ist die chromosomale Instabilität, die eine Vielzahl an Chromosomenveränderungen verursacht. Als mögliche Ursache dieser chromosomalen Instabilität kommen Aberrationen der rRNA-Repeats in Betracht.

Die Ziele dieser Arbeit waren: die Quantifizierung der rRNA, die Detektion von möglichen Co-Lokalisationen zwischen den rRNA-Genen und dem JAK2 / PDCD1LG2-Genort, die Bestimmung des Methylierungsgrades der rRNA-Gene 18S, 28S und des externen transkribierten Spacers 5-ETS sowie deren Auswirkungen auf die chromosomale Instabilität bei cHL.

In der vorliegenden Arbeit wurden FISH-Analysen mit Sonden für die rRNA-Gene durchgeführt. Zur Detektion von in Voruntersuchungen beschriebenen segmentalen chromosomalen Aberrationen (SCAs) wurden die FISH-Sonden für die rRNA-Gene mit solchen für den JAK2 / PDCD1LG2-Genort in 9p24 hybridisiert. Die FISH-Analysen erfolgten jeweils an vier cHL-Zelllinien und fünf primären cHL-Fällen. Zusätzlich zu den Interphase-FISH-Analysen erfolgten Fiber-FISH-Analysen an den Zelllinien. Anschließend wurde der Methylierungsgrad der rRNA-Gensegmente 5-ETS, 18S und 28S in vier cHL-Zelllinien mittels Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen bestimmt.

In den FISH-Analysen der rRNA zeigte sich eine deutliche Vergrößerung und eine signifikante Vermehrung der Fluoreszenz-Signale für die rRNA-Gene in den HRS-Zellen im Vergleich zu den umgebenden Bystander-Zellen. Darüber hinaus fand sich in den HRS-Zellen, durch FISH-Analysen für die rRNA-Gene detektiert, eine inverse Korrelation zwischen Größe und Anzahl der Nukleoli. Je mehr Nukleoli in einer Zelle vorhanden waren, desto kleiner waren diese. Bruchereignisse in den rRNA-Loci konnten mittels FISH nicht nachgewiesen werden.

Mit Ausnahme der als Positiv-Kontrolle dienenden Zelllinie HDLM2 fanden sich keine Co-Lokalisationen der rRNA-Gene mit dem Genort *JAK2 / PDCD1LG2*.

Die Natrium-Bisulfit-Sequenzierungen ergaben in allen drei untersuchten Gensegmenten ein sehr heterogenes Methylierungsmuster, wobei die Zelllinie L1236 deutliche Hypomethylierungen der DNA aufwies. Im Vergleich zu Kontrollen, die zwischen 20 und 50 % methyliert waren, bestand in den rRNA-Genen der anderen

Zelllinien eine stärkere Methylierung - zwischen 45 und 100 %. Weiterhin bestand eine Korrelation des Methylierungsgrades in *5-ETS* und *28S*.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit mittels Interphase-FISH eine Vermehrung der rRNA-Genorte in den HRS-Zellen in cHL aufzeigen. SCAs konnten nicht zwischen rRNA und *JAK2 / PDCD1LG2* nachgewiesen werden. Es fanden sich unterschiedliche Methylierungsmuster der rRNA-Gene, durch die die chromosomale Instabilität nicht zu erklären ist.

6. Literaturverzeichnis

AbuBakar S., Au W.W., Legator M.S. & Albrecht T. (1988). Induction of chromosome aberrations and mitotic arrest by cytomegalovirus in human cells. *Exp Mol Mutag*, 12: 409–420.

Ankathil R., Vijayakumar T., Pillai G.R. & Nair M.K. (1992). Chromosomes in Hodgkin's disease-analysis of involved lymph nodes. *Neoplasma*, 39: 245-248.

Atkin N.B. (1998). Cytogenetics of Hodgkin's disease. *Cytogenet Cell Genet*, 80: 23-27.

Banks R.E., Gledhill S., Ross F.M., Krajewski A., Dewar A.E. & Weir-Thompson E.M. (1991). Karyotypic abnormalities and immunoglobulin rearrangements in Hodgkin's disease. *Cancer Genet Cytogenet*, 51: 103-111.

Böcker W., Denk H., Heitz P.U. (2004), Pathologie, 3. Auflage, Urban und Fischer München.

Bräuninger A., Schmitz R., Bechtel D., Renne C., Hansmann M.L. & Küppers R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, 118: 1853-1861.

Cabanillas F., Pathak S., Trujillo J., Grant G., Cork A., Hagemester F.B., Velasquez W.S., McLaughlin P., Redman J., Katz R., Butler J.J. & Freireich E.J. (1988). Cytogenetic features of Hodgkin's disease suggest possible origin from lymphocyte. *Blood*, 71: 1615-1617.

Caburet S., Conti C., Schurra C., Lebofsky R., Edelstein S.J. & Bensimon A. (2005). Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Research*, 15: 1079-1085.

Deerberg-Wittram J., Weber-Matthiesen K. & Schlegelberger B. (1996). Cytogenetic and molecular cytogenetics in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*, 7 (Suppl 4): 49-53.

Döhner H., Bloomfield C.D., Frizzera G., Frestedt J. & Arthur D.C. (1992). Recurring chromosome aberration in Hodgkin's disease. *Genes Chromosomes Cancer*, 5: 392-398.

Drexler H.G. (1992). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma*, 8: 283-313.

Drexler H.G. (1993). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* 9: 1-25.

Drexler H.G., Gaedicke G., Lok M.S., Diehl V. & Minowada J. (1986). Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res* 10: 487- 500.

Drexler H.G., Gignac S.M., Hoffbrand A.V. & Minowada J. (1989). Formation of multinucleated cells in a Hodgkin's-disease-derived cell line. *Int J Cancer* 43: 1083-1814.

Drexler H.G., Leber B.F., Norton J., Yaxley J., Tatsumi E., Hoffbrand A.V. & Minowada J. (1988). Genotypes and immunophenotypes of Hodgkin's disease-derived cell lines. *Leukemia* 2: 371-376.

- Dunn B.K. (2003). Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci*, 983: 28-42.
- Eden A., Gaudet F., Waghmare A. & Jaenisch R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 300: 455.
- Ehrlich M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21: 5400-5413.
- Elder Jr. J.F. & Turner B.J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quart Rev Biol*, 70: 297-320.
- Espada J., Ballestar E., Fraga M.F., Villar-Garea A., Juarranz A., Stockert J. C., Robertson K.D., Fuks F. & Esteller M. (2004). Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem*, 279: 37175-37184.
- Espada J., Ballestar E., Santoro R., Fraga M.F., Villar-Garea A., Németh A., Lopez-Serra L., Ropero S., Aranda A., Orozco H., Moreno V., Juarranz A., Stockert J. C., Längst G., Grummt I., Bickmore W. & Esteller M. (2007). Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells. *Nucl Acid Research*, Vol. 35, No. 7: 2191-2198.
- Falzetti D., Crescenzi B., Matteuci C., Falini B., Martelli M.F., Van Den Berghe H. & Mecucci C. (1999). Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. *Haematologica*, 84: 298-305.
- Fortunato E.A. & Spector D.H. (2003). Viral induction of site-specific chromosome damage. *Rev Med Virol*, 13:21–37.
- Gaidano G., Pastore C., Gloghini A., Capello D., Tirelli U., Saglio G. & Carbone A. (1997). Microsatellite instability in KSHV/HHV-8 positive body-cavity-based lymphoma. *Hum Pathol*, 28: 748–750.
- Gaudet F., Hodgson J.G., Eden A., Jackson-Grusby L., Dausman J., Gray J.W., Leonhardt H. & Jaenisch R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300: 489-492.
- Ghoshal K., Majumder S., Datta J., Motiwala T., Bai S., Sharma S.M., Frankel W. & Jacob S.T. (2004). Role of human ribosomal RNA (rRNA) promoter methylation and of methyl-CpG-binding protein MBD2 in the suppression of rRNA gene expression. *J Biol Chem*, 279: 6783-6793.
- Gonzalez I.L. & Sylvester J.E. (1995). Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: Analysis of the intergenic spacer. *Genomics*, 27: 320-328.
- Haluska F.G., Brufsky A.M. & Canellos G.P. (1994). The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. *Blood*, 84: 1005-1019.
- Henderson A.S., Warburton D. & Atwood K.C. (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci*, 69: 3394-3398.

Holtick U., Vockerodt M., Pinkert D., Schoof N., Stürzenhofecker B., Kussebi N., Lauber K., Wesselborg S., Löffler D., Horn F., Trümper L. & Kube D. (2005) STAT3 is essential for Hodgkin's lymphoma cell proliferation and is a target of tyrphostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia*, 19: 936-944.

Ihle J.N. (2001). The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 211-217.

Jaenisch R. & Bird A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 (Suppl): 245-254.

Joos S., Granzow M., Holtgreve-Grez H., Siebert R., Harder L., Martin-Subero J.I., Wolf J., Adamowicz M., Barth T.F., Lichter P. & Jauch A. (2003). Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including *REL* and *JAK2*. *Int J Cancer*, 103: 489-495.

Joos S., Küpper M., Ohl S., von Bonin F., Mechttersheimer G., Bentz M., Marynen P., Moller P., Pfreundschuh M., Trumper L. & Lichter P. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene *JAK2* in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res*, 60: 549-552.

Joos S., Menz C.K., Wrobel G., Siebert R., Gesk S., Ohl S., Mechttersheimer G., Trümper L., Möller P., Lichter P. & Barth T.F. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*, 99: 1381-1387.

Kamesaki H., Fukuhara S., Tatsumi E., Uchino H., Yamabe H., Miwa H., Shirakawa S., Hatanaka M. & Honjo T. (1986). Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* 68: 285-292.

Kamranvar S.A., Gruhne B., Szeles A. & Masucci M.G. (2007). Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. *Oncogene*, 35: 5115-5123.

Kanzler H., Hansmann M.L., Kapp U., Wolf J., Diehl V., Rajewsky K. & Küppers R. (1996). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood* 87: 3429-3436

Kaplan F.S., Murray J., Sylvester J., Gonzalez I.L., O'Connor P., Doering J.L., Muenke M., Emanuel B.S. & Zaslloff M.A. (1993). The topographic organization of repetitive DNA in the human nucleolus. *Genomics*, 15: 123-132.

Kapp U., Yeh W.C., Patterson B., Elia A.J., Kagi D., Ho A., Hessel A., Tipword M., Williams A., Mirtsos C., Itie A., Moyle M. & Mak T.W. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*, 189: 1939-1946.

Koduru P.R.K., Offit K., Fillipa D.A., Lieberman P.H. & Jhanwar S.C. (1989). Cytogenetic and molecular genetic analysis of abnormal cells in Hodgkin's disease. *Cancer Genet Cytogenet*, 43: 109-118.

- Koduru P.R.K., Susin M., Schulman P., Catell D., Goh J.C., Karp L. & Broome J.D. (1993). Phenotypic and genotypic characterization of Hodgkin's disease. *Am J Hematol*, 44: 117-124.
- Krämer A., Neben K. & Ho A.D. (2002). Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia*, 16: 767-775.
- Kube D., Holtick U., Vockerodt M., Ahmadi T., Haier B., Behrmann I., Heinrich P.C., Diehl V. & Tesch H. (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin's cell lines. *Blood*, 98: 762-770.
- Küppers R., Kanzler H., Hansmann M.L. & Rajewsky K. (1996). Single cell analysis of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Ann Oncol*, 7 Suppl 4, 27-30.
- Ladanyi M., Parsa N.Z., Offit K., Wachtel M.S., Fillipa D.A. & Jhanwar S.C. (1991). Clonal cytogenetic abnormalities in Hodgkin's disease. *Cancer Genet Cytogenet*, 3: 294-299.
- Lavia P., Mileo A.M., Giordano A. & Paggi M.G. (2003). Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene*, 22: 6508-6516.
- Levy D.E. & Darnell J.E. Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 651-662.
- Li, L.C. & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18: 1427-1431.
- Löffler G. (2001), Basiswissen Biochemie, 4. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Luleci G., Sakizli M. & Gunalp A. (1980). Selective chromosome damage caused by human cytomegalovirus. *Acta Virol*, 24:341-345.
- MacLeod R.A., Spitzer D., Bar-Am I., Sylvester J.E., Kaufmann M., Wernich A. & Drexler H.G. (2000). Karyotypic dissection of Hodgkin's disease cell lines reveals ectopic subtelomeres and ribosomal DNA at sites of multiple jumping translocations and genomic amplification. *Leukemia*, 14: 1803-1814
- MacLeod R.A.F., Dirks W.G., Matsuo Y., Kaufmann M., Milch H. & Drexler H.G. (1999). Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines. *Int J Cancer*, 83: 555-563.
- Martin-Subero J.I., Gesk S., Harder L., Sonoki T., Tucker P.W., Schlegelberger B., Grote W., Novo F.J., Calasanz M.J., Hansmann M.L., Dyer M.J. & Siebert R. (2002). Recurrent involvement of *REL* and *BCL 11A* loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99: 1474-1477.
- Martin-Subero J.I., Knippschild U., Harder L., Barth T.F.E., Riemke J., Grohmann S., Gesk S., Höppner J., Möller P., Parwaresch R.M. & Siebert R. (2003). Segmental chromosomal aberrations and centrosome amplifications: pathogenetic mechanisms in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma? *Leukemia*, 17: 2214-2219.
- Moore P.S. & Chang Y. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin? *Annu Rev Microbiol*, 57: 609-639.

- Nigg E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*, 2: 815-825.
- Pan H., Zhou F. & Gao S.J. (2004). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of chromosome instability in primary human endothelial cells. *Cancer Res*, 64: 4064-4068.
- Peat D.S. & Stanley M.A. (1986). Chromosome damage induced by herpes simplex virus type 1 in early infection. *J Gen Virol*, 67: 2273-2277.
- Pedersen R.K., Sorensen A.G., Pedersen N.T., Schmidt K.G. & Kerndrup G.B. (1999). Chromosome aberrations in adult Hodgkin disease in a Danish population-based study. *Cancer Genet Cytogenet*, 110: 128-132.
- Pihan G.A., Purohit A., Wallace J., Knecht H., Woda B., Quesenberry P. & Doxsey S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*, 58: 3974-3985.
- Poppema S., Kaleta J. & Hepperle B. (1992). Chromosomal abnormalities in patients with Hodgkin's disease: evidence for frequent involvement of the 14q chromosomal region but infrequent *bcl-2* gene rearrangement in Reed-Sternberg cells. *J Natl Cancer Inst*, 84: 1789-1793.
- Poppema S., Kaleta J. & Hepperle B. (1991). Clonal chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Genes Chromosomes Cancer*, 3: 294-299.
- Richter J. (2007). Differentielle DNA-Methylierung bei Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe. Diplomarbeit, Greifswald.
- Robert Koch Institut (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage: 90-94.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*, 24: 104-108.
- Santoro R. (2005). The silence of ribosomal RNA genes. *CMLS, Cell Mol Life Sci*, 62: 2067-2079.
- Schaadt M., Diehl V., Stein H., Fonatsch C. & Kirchner H.H. (1980). Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 26: 723-731.
- Schaadt M., Fonatsch C., Kirchner H.H. & Diehl V. (1979). Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut* 38: 185-190.
- Schlegelberger B., Weber-Matthiesen K., Himmler A., Bartels H., Sonnen R., Kuse R., Feller A.C. & Grote W. (1994). Cytogenetic findings and results of combined immunohotyping and karyotyping in Hodgkin's disease. *Leukemia*, 8: 72-80.
- Schmickel R.D. (1987). The molecular organization of the human ribosomal gene. *Chrom Today*, 9: 242-251.

- Schouten H.C., Sanger W.G. & Armitage J.O. (1991). Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*, 5: 93-100.
- Schouten H.C., Sanger W.G., Duggan M., Weisenburger D.D., MacLennan K.A. & Armitage J.O. (1989). Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Blood*, 73: 2149-2154.
- Scinicariello F., Dolan M.J., Nedelcu I., Tyring S.K. & Hilliard J.K. (1994). Occurrence of human papillomavirus and *p53* gene mutations in Kaposi's sarcoma. *Virology*, 203: 153-157.
- Siebert R., Rosenwald A., Staudt L.M. & Morris S.W. (2001). Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*, 13: 316-324.
- Singer M. & Berg P. (1991) Genes and genomes: A Changing Perspective. Mill Valley: University Science Books.
- Skinnider B.F., Elia A.J., Gascoyne R.D., Patterson B., Trümper L., Kapp U. & Mak T.W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 99: 618-626.
- Skinnider B.F., Elia A.J., Gascoyne R.D., Trümper L., von Bonin F., Kapp U. Patterson B., Snow B.E. & Mak T.W. (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 97: 250-255.
- Steffensen D.M., Szabo P. & McDougall J.K. (1976). Adenovirus 12 uncoiler region of human chromosome 1 in relation to the 5s rRNA genes. *Exp Cell Res*, 100: 436-439.
- Stein H. (2000). Classification of tumours, Pathology and genetics, Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *World Health Organization*: Kap. 8, 239; Oxford University Press, Oxford.
- Stein H., Delson G., Pileri S., Said J., Mann R., Poppema S., Jaffe E.S. & Swerdlow S.H. (2000). Classification of tumours, Pathology and genetics, Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *World Health Organization*: Kap. 8, 244-253; Oxford University Press, Oxford.
- Sylvester J.E., Whiteman D.A., Podolsky R., Pozsgay J.M., Respass J. & Schmickel R.D. (1986). The human ribosomal RNA genes: Structure and organization of the complete repeating unit. *Hum Genet*, 73: 193-198.
- Thangavelu M. & Le Beau M.M. (1989). Chromosome abnormalities in Hodgkin's disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 3: 221-236.
- Tilly H., Bastard C., Delastre T., Duval C., Bizet M., Lenormand B., Dauce J.-P., Monconduit M. & Piguet H. (1991). Cytogenetic studies in untreated Hodgkin's disease. *Blood*, 77: 1298-1304.
- Weber-Matthiesen K., Deerberg J., Poetsch M., Grote W. & Schlegelberger B. (1995). Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyses cases of Hodgkin's disease. *Blood*, 86: 1464-1468.

Wolf J., Kapp U., Bohlen H., Kornacker M., Schoch C., Stahl B., Mucke S., von Kalle C., Fonatsch C., Schaefer H.E., Hansmann M.L. & Diehl V. (1996). Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 87: 3418-3428.

Worton R.G., Sutherland J., Sylvester J.E., Willard H.F., Bodrug S., Dube I., Duff C., Kean V., Ray P.N. & Schmickel R.D. (1988). Human ribosomal *RNA* genes: Orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science*, 272: 258-262.

7. Anhang

7.1. Chromosomale Aberrationen der analysierten Zelllinien (Joos et al., 2003)

Tab. 8: Karyotypen der analysierten Zelllinien HDLM2, KMH2, L428 und L1236.

<u>HDLM-H2</u> (6 Mitosen, 350 Banden)	
-dic(1;?)(p34;?) [5]	-add(4)(q28) [4]
-dic(1?)(p34;?)trp(1)(p21.1p21.3) [2]	-der(7)t(3;7)(q24;p14) [6]
-der(1)ins(1;?)(p13;?)add(1)(q21) [4]	-der(8)t(2;8)(p12~13;q24) [4]
-add(1)(q24) [6]	-der(9)hsr(9)(p13) [5]
-der(2)t(2;?13)(p14;q14~21)	-der(12)t(2;?;12)(p12;?;q24) [6]
t(2;12)(q14;q21)t(12;19)(q24q13) [6]	-der(13)t(11;?;13)(q13;?;p11) [6]
-add(3)(q13) [4]	-add(14)(q32) [3]
-der(3)t(3;9)(q26;q21) [3]	5~6mar
-der(3)t(3;5)(q26;q23) [1]	
<u>KMH2</u> (4 Mitosen, ca. 250 Banden)	
-der(1)add(1)(p36)add(1)(q12) [3]	-add(11)(q12) [2]
-der(1)add(1)(p13)del(1)(q2?3q32) [3]	-der(11)del(11)(q11~12)t(11;12)(q14;q21) [4]
-der(1)t(1;?;7)(p11;?;q11)del(7)(q32q34) [4]	-?der(12)del(12)(p12)add(12)(q14) [2]
-der(1;?)(p10;?) [4]	-der(13)t(13;21)(q21;q21) [4]
-del(1)(q22) [4]	-der(15)t(15;18)(q24;q21) [4]
-der(2)(?::3q26->3q13::?->?::2p13~14->2q33::?) [3]	-der(16)del(16)(p12p13)add(16)(q21) [3]
-der(2)t(2;15)(p1?3;q2?1) [4]	-add(16)(q12) [4]
-ider(2)(q10)add(2)(q33) [4]	-del(17)(p12) [4]
-add(2)(q24) [4]	-add(17)(q12) [3]
-der(3)del(3)(q12q22)t(3;8)(q26;q23) [3]	-der(18)t(5;18)(q11~12;q22) [2]
-der(4)del(4)(p15p16)t(2;4)(p11;q13)dup(2)(p?) [4]	-der(19)t(5;19)(q11~12;p13) [2]
-der(4)t(4;12)(q26;q21) [2]	-add(20)(q13) [2]
-der(5)t(3;5)(p13~14;q34) [4]	-add(22)(q21~22) [3]
-ins(7;?)(q31;?) [2]	-ider(X)(q10)add(X)(q21~22) [3]
-?der(10)t(1;10)(p11;p11) [2]	+5mar
-der(10)t(10;16)(p13;p11) [1]	
-der(10)add(10)(p1?3)del(10)(q24q25) [1]	

Anhang

<u>L 428</u> (8 Mitosen, 450 Banden)	
-dup(1)(p21p31) [8] -add(1)(q11) [2] -trc(1;?;16)(p11;?:q24) [8] -i(2)(q10) [8] -der(2)t(2;8)(p22;q21) [8] -der(3)t(3;15)(p25;q11) [8] -del(4)(q22q28) [7] -add(4)(q12) [7] -add(5)(p15) [5] -add(5)(q12) [1] -add(6)(q24) [4] -del(7)(p15) [4] -dup(7)(q21q32) [8]	-add(8)(p23) [2] -kein Chromosom 9 [8] -del(11)(q14) [4] -der(12)del(12)(p13)t(7;12)(q22;q13) [8] -der(12)t(1;12)(p31;q14) [2] -der(13)t(12;13)(q24;q21) [8] -der(14)t(14;17)(q32;q24) [5] -der(14)t(9;14)(q22;q32) [8] -add(17)(p11) [4] -der(17;21)(q10;q10) [5] -add(18)(q21) [5] -der(19)t(11;19)(q22;p13) [3] +mar
<u>L1236</u> (6 Mitosen, 350 Banden)	
-der(1)t(1;14)(p33~34;q21) [6] -der(1)t(1;8)(p21;q23) [5] -der(2)dup(2)(p15p23)t(2;2)(p23;q32) [6] -i(3)(p10) [5] -i(3)(q10) [5] -del(4)(q22) [3] -add(5)(p15) [1] -der(6)t(6;?22)(q14;q11) [6] -der(6)t(1;6)(p23;q21)dup(1)(q?) [6] -der(7)t(7;7)(p21;q11) [6] -der(7)t(7;17)(p21~22;q22) [6] -del(7)(q11) [1]	-del(8)(p11) [6] -add(8)(q24) [4] -add(9)(p11) [1] -der(9)t(2;9)(?:q34) [4] -add(11)(q13) [1] -der(14)t(1;14)(p32;q21) [6] -der(16)t(7;16)(q11;q24)add(7)(q21) [2] -del(17)(p11) [2] -2 x imar [6] +mar

p = kurzer Chromosomenarm; q = langer Chromosomenarm; dic = Dicentrisch; trp = Triplication;
der = derivatives Chromosom; ins = Insertion; add = Addition; t = Translokation; hsr = homogeneously
stainin region; mar = Markerchromosom; del = Deletion; ider = Isodervatives Chromosom;
dup = Duplikation; trc = Tricentrisch; i = Isochromosom; imar = Isomarkerchromosom.

7.2. Auswertung der FISH-Sonden Probe A und Probe B

Tab. 9: Detaillierte Auflistung der FISH-Ergebnisse in den Zelllinien.

Anzahl der co- lokalisierten Signale	Größe der Signale			Anzahl der Zellen pro Signalkonstellation und Zelllinie			
	Klein	Mittel	Groß	HDLM2	KMH2	L428	L1236
1	0	0	1	13	3	8	12
2	0	0	2	5	6	3	5
2	0	2	0	5	7		4
2	0	1	1	9	9	5	6
2	1	0	1	8	4	6	6
3	0	0	3		1	5	2
3	0	3	0	6	7	3	1
3	3	0	0	4			2
3	0	2	1	3	7	7	3
3	2	0	1	7	6	7	7
3	2	1	0	5			
3	0	1	2		3	5	2
3	1	1	1	1	4	4	1
3	1	0	2		3	1	4
3	1	2	0	3	7		
4	0	4	0	1	3		2
4	4	0	0	4	1		1
4	0	3	1	2	2	2	3
4	3	0	1	1	4	3	8
4	2	0	2		1	4	4
4	2	2	0	3	6	1	2
4	2	1	1		3	3	1
4	1	1	2		1	4	
5	4	0	1			2	3
5	2	2	1		1	4	1
5	Unterschiedliche Signalgrößen			7	5	21	11
6	Unterschiedliche Signalgrößen			1	1	3	9

Anhang

Tab. 10: Detaillierte Auflistung der FISH-Ergebnisse.

Anzahl der co-lo- kalisierten Signale	Größe der Signale			Anzahl der Zellen pro Signalkonstellation und Patient					Anzahl der Zellen pro Signal insgesamt
				Primäre cHL 1-6					
	Klein	Mittel	Groß	cHL 1	cHL 2	cHL 3	cHL 4	cHL 6	
1	0	0	1	19	10	19	8	14	70
2	0	0	2		2	2	1	6	11
2	0	2	0	2	1		4		7
2	1	0	1		2		4		6
2	1	1	0	2	1		1		4
2	0	1	1			2			2
3	2	0	1		3		1		4
3	0	3	0	1			1		2

8. Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank aussprechen:

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Reiner Siebert danken, der es mir ermöglicht hat diese Doktorarbeit am Institut für Human-genetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, durchzuführen. Seine hervorragende Betreuung, fortwährende Unterstützung und konstruktive Kritik haben maßgeblich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich vor allem Frau Claudia Becher und Frau Dorit Schuster, aber auch allen anderen medizinisch-technischen Assistenten für die Einführung in die Labormethoden und ihre große Hilfsbereitschaft während der gesamten experimentellen Arbeiten im Labor danken.

Dr. rer. nat. Jose Ignacio Martin-Subero, Dr. med. Stefan Gesk, Dr. med. Lana Harder sowie Diplom Biologin Julia Richter, MSc Stefanie Bug und Annika Basner danke ich für die stets offenen Ohren, die Hilfsbereitschaft und unentbehrlichen Tipps bei der experimentellen sowie der theoretischen Durchführung dieser Arbeit.

Vor allem aber gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Bruder die mich stets unterstützt haben und mir dies alles ermöglicht haben.

9. Lebenslauf

Christine Maria Padberg

Angaben zur Person

Geburtsdatum: 09.04.1982
Geburtsort: Winterberg
Adresse: Alte Königsstraße 1
59955 Winterberg
Telefon: 0176 – 61563026
E-Mail: christine.padberg@web.de
Familienstand: Ledig

Studium

04 / 2002 – 12 / 2008 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Physikum im Herbst 2004.
Staatsexamen Herbst 2008.

08 / 2007 – 07 / 2008 Praktisches Jahr
1. Terial: Chirurgie (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spanien).
2. Terial: Pädiatrie / Humangenetik (Christian-Albrechts Universität Kiel)
3. Terial: Innere Medizin (Neumünster)

10 / 2001 – 04 / 2002 Medizinstudium an der Universität zu Köln
Vorklinisches Studium.

06 / 2001 Allgemeine Hochschulreife am Geschwister Scholl Gymnasiums der Stadt Winterberg (20.06.2001).

Berufserfahrung und Praktika

02 / 2007 – 03 / 2007 Famulatur Augenheilkunde (Augenklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

07 / 2006 – 08 / 2006 Famulatur Augenheilkunde (Augenklinik der Westfälischen Wilhelms Universität Münster).

03 / 2006 – 04 / 2006 Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe (Städtischen Maria-Hilf Krankenhaus in Brilon).

08 / 2005 – 09 / 2005 Famulatur Humangenetik (Institut für Humangenetik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

02 / 2005 – 03 / 2005 Famulatur Innere Medizin (St. Franziskus-Hospital in Winterberg).

08 / 2001 – 09 / 2001 Krankenpflegepraktikum (Elisabeth-Klinik in Bigge).