

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

MOLEKULARZYTOGENETISCHE ANALYSE CHROMOSOMALER ABERRATIONEN
ALS MÖGLICHE URSACHE DER JAK/STAT-AKTIVIERUNG UND VON
ZENTROSOMENABERRATIONEN IM KLASSISCHEN HODGKIN-LYMPHOM

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

vorgelegt von
JENNIFER OATES
aus Flensburg

Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. Reiner Siebert, Institut für Humangenetik

Koreferent: Prof. Dr. Wolfram Klapper, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 22. August 2013

Für meine Eltern

	Seite
<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	I-III
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	IV-VI
<u>1 EINLEITUNG</u>	1
1.1 Pathologie des Hodgkin-Lymphoms	1
1.2 Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms	2
1.3 Molekulare Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms	2
1.4 Zytogenetische Veränderungen beim Hodgkin-Lymphom	3
1.5 Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade und die Aufgaben der einzelnen Mitglieder	4
1.5.1 JAK/STAT in der Onkogenese	6
1.5.2 <i>JAKs</i> und <i>STATs</i> als Kandidatenonkogene im klassischen Hodgkin-Lymphom	7
1.5.3 Lage der <i>JAK/STAT</i> -Gene	8
1.6 Zentrosomen und chromosomale Instabilität	8
1.6.1 <i>STK15</i> und <i>PLK1</i> und ihre Rolle in der Onkogenese	10
1.7 Fragestellung	11
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	13
2.1 Material	13
2.1.1 Probenmaterial	13
2.1.1.1 Klassische Hodgkin-Lymphome	13
2.1.1.2 Zelllinien	14
2.1.1.3 Tissue Microarrays	15
2.1.1.4 Kontrollen	15
2.1.2 Chemikalien	15
2.1.3 Geräte	16
2.1.4 Lösungen und Puffer	16
2.1.5 BAC- und PAC-Klone	18
2.1.6 Verwendete kommerziell erhältliche Zentromersonden	18
2.1.7 Kits	18
2.2 Methoden	20

2.2.1	Kultivierung von Bakterienklonen	20
2.2.2	DNA-Extraktion	20
2.2.3	DNA-Markierung, Reinigung und Herstellung der Assays	20
2.2.4	Protokoll für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Carnoys-fixierten Zellen aus Lymphknotengewebe	22
2.2.5	Protokoll für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffin-Präparaten	22
2.2.6	Waschprotokoll	23
2.3	Auswertung	24
2.3.1	Auswahl der Sonden und mögliche Signalmuster	24
2.3.2	Nachweisgrenzen für Bruchereignisse, Gewinne und Verluste	25
3	<u>ERGEBNISSE</u>	28
3.1	Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Assays	28
3.2	Kontrollen und Nachweisgrenzen	31
3.3	Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Untersuchungen an klassischen Hodgkin-Lymphomen	33
3.3.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen von klassischen Hodgkin-Lymphomen und Zelllinien für die Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade	35
3.3.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen an klassischen Hodgkin-Lymphomen und Zelllinien für die Zentrosomen-Gene <i>PLK1</i> und <i>STK15</i>	39
3.4	Varianz der Signale innerhalb eines Falles	41
3.5	Weiterführende Untersuchungen zur Eingrenzung von Amplifikationen und Bruchereignissen	42
3.5.1	12p Amplifikation in Fall Nr. 12	42
3.5.2	12q Amplifikation in der Zelllinie L1236	44
3.5.3	17q Bruchereignis in der Zelllinie HDLM-2	45
3.6	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen des <i>JAK2</i> -Gens an Tissue Microarrays	46
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	47

<u>4 DISKUSSION</u>	48
4.1 Technischer Ansatz	48
4.1.1 Methoden	48
4.1.2 Nachweisgrenzen	49
4.1.3 Interpretation der Ergebnisse	51
4.2 Chromosomale Instabilität im klassischen Hodgkin-Lymphom und die Rolle der Zentrosomengene <i>PLK1</i> und <i>STK15</i>	51
4.2.1 Bedeutung der Zentrosomengröße in Hodgkin-Reed- Sternberg-Zellen	52
4.3 Bedeutung von Veränderungen der Gene der JAK/STAT- Signaltransduktionskaskade in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms	52
4.3.1 Segmental Chromosomal Aberrations	54
4.3.2 Alternative Mechanismen, die zur konstitutiven Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade führen könnten	55
4.4 Fazit	56
4.5 Ausblick	57
4.5.1 Folgen der <i>JAK2</i> -Amplifikationen	57
4.5.2 Ursache der chromosomalen Instabilität im klassischen Hodgkin-Lymphom	57
4.5.3 Klinische Bedeutung der Ergebnisse	57
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	59
<u>6 LITERATURVERZEICHNIS</u>	60
<u>7 ANHANG</u>	76
<u>8 DANKSAGUNG</u>	82
<u>9 LEBENSLAUF</u>	83

Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AML	Akute myeloische Leukämie
APRF	Akute Phase Response Faktor
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BAC	Künstliches Bakterienchromosom
BTAK	Breast tumour activated kinase
CD	Cluster of differentiation
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
CIITA	MHC-Klasse-II-Transaktivator-Gen
CIN	Chromosomale Instabilität
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Cot1-DNA	DNA-Fraktion mit einem hohen Anteil hochrepetitiver Sequenzen
DABCO	Diazabicyclooctane
DAPI	Diamidinophenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEAC	Diethylaminocoumarin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyldiaminrichloressigsäure
ET	Essentielle Thrombozythämie
FICTION	Fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
gp130	Glykoprotein 130
HCl	Chlorwasserstoff
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
IL	Interleukin
IL6R	Interleukin-6-Rezeptor

IL6ST	Interleukin-6 signal transducer
JAK	Janus-Kinase
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
LD	Lymphozytenarm
LMP1	Latent membrane protein1
LR	Lymphozytenreich
MBL	Primäres mediastinales B-Zell-Lymphom
MC	Gemischte Zellularität
MPS	myeloproliferatives Syndrom
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHEJ	Non-homologous-end-joining
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	Noduläres lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
NS	Noduläre Sklerose
OMF	Osteomyelofibrose
PAC	Künstliches Chromosom, abgeleitet vom Phagen P1
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDL	Programmed death ligand
PLK	Polo-like-Kinase
PV	Polyzythämia vera
SA	Spectrum aqua
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SG	Spectrum green
SO	Spectrum orange
S-Phase	Synthesephase
(c-)Src	Tyrosinkinase (Name zusammengesetzt aus <u>c</u> ellular und <u>sar</u> coma)
SSC	Standard Saline Citrate
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STK	Serin-Threonin-Kinase

TMA	Tissue Microarray
WHO	World health organization

1 Einleitung

Das Hodgkin-Lymphom (HL) - auch Morbus Hodgkin genannt - ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems. Es wurde nach seinem ersten Beschreiber Thomas Hodgkin benannt (Hodgkin, 1832). Die jährliche Neuerkrankungsrate beträgt 3/100.000. Es hat einen Häufigkeitsgipfel um das 25. Lebensjahr und einen weiteren, kleineren Gipfel um das 60. Lebensjahr. Männer erkranken häufiger als Frauen (Geschlechterverhältnis m:f 10:6) (Diehl und Pfreundschuh, 1997).

Bei Diagnosestellung imponiert das HL zumeist durch eine derbe, schmerzlose Vergrößerung der Lymphknoten. Klinisch wird das HL in vier Stadien eingeteilt (Lister et al., 1989). Therapie und Prognose sind je nach Stadium verschieden. HL sind strahlen- und chemosensibel. Die Mehrzahl der Patienten kann geheilt werden. In frühen Stadien mit günstigen Zusatzkriterien liegt die 10-Jahres-Überlebensrate sogar bei mehr als 90% (Yahalom, 2006).

1.1 Pathologie des Hodgkin-Lymphoms

Charakteristisch für das HL ist die Population großer einkerniger Hodgkin-Zellen (H) und zwei- oder mehrkerniger Reed-Sternberg-Zellen (RS). Diese finden sich meist nur in sehr geringer Zahl (z.T. < 1%) im betroffenen Gewebe (Weiss et al., 1999). Umgeben werden die HRS-Zellen von einem reaktiven Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen, Histiocyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (Küppers, 2002; Staudt, 2000). Typisch für das cHL ist die Bildung einer Vielzahl von Zytokinen, u.a. IL-6 und IL-13, durch die HRS-Zellen (Skinnider et al., 2001). Die Interaktion der Zytokine mit ihren spezifischen Oberflächenrezeptoren führt zur Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die Auswirkungen auf viele Zellfunktionen haben (Skinnider und Mak, 2002).

Mit dem Begriff HL werden zwei verschiedene Erkrankungen bezeichnet: a) das noduläre lymphozyten-prädominante HL (NLPHL), auch als noduläres Paragranulom bekannt, und b) das klassische HL (cHL) (Mani und Jaffe, 2009). Das NLPHL macht 4-5% der HL aus. Diese Arbeit beschäftigt sich nur mit dem cHL, daher wird im Folgenden das NLPHL nicht weiter berücksichtigt. Das cHL wird nach der WHO-Klassifikation wiederum in vier Subtypen unterteilt: noduläre Sklerose (NS), lymphozytenreiche Form (LR), gemischte Zellularität (MC) und lymphozytenarme Form (LD) (Stein et al., 2008). Der häufigste Subtyp des cHL ist die NS, die zusammen mit der MC ~90% der Fälle des cHL ausmacht (Harris, 1999).

1.2 Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms

Die Ätiologie des HL ist derzeit nicht geklärt. Alter, Geschlecht, Rasse und sozioökonomischer Status scheinen bei der Entstehung des HL eine Rolle zu spielen (Nakatsuka und Aozasa, 2006). Schon immer wurde auch eine infektiöse Ursache für das HL diskutiert. Zumindest in einem Teil der Fälle ist ein Zusammenhang mit einer Epstein-Barr Virus (EBV)-Infektion wahrscheinlich (Weinreb et al., 1996).

Einige Studien zeigten das gehäufte Auftreten dieser relativ seltenen Krankheit innerhalb von Familien (Mueller und Grufferman, 1999). Dies deutet auf eine genetische Disposition hin.

Bemerkenswerterweise haben Untersuchungen gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der genetisch determinierten Höhe des Interleukin-6 (IL-6)- Spiegels und dem Erkrankungsrisiko besteht (Cozen et al., 2004). Zudem zeigen Patienten mit erhöhtem IL-6-Spiegel häufiger eine B-Symptomatik und haben eine schlechtere Prognose (Reynolds et al., 2002).

1.3 Molekulare Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

Der zelluläre Ursprung der HRS-Zellen war lange Zeit ungeklärt. Erst durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Analysen einzelner HRS-Zellen konnte ihr lymphoider Ursprung nachgewiesen werden (Küppers et al., 1994). Nur B-Lymphozyten unterlaufen in ihrer Entwicklung im Keimzentrum einer Neuordnung ihrer Immunglobulingene. Jede nichtmaligne B-Zelle besitzt eine einzigartige Sequenz der Immunglobulingene. In allen Fällen des HL wurde jeweils in allen HRS-Zellen dieselbe Neuordnung gefunden (Stein et al., 1999). Dies beweist nicht nur den B-Zell-Ursprung der HRS-Zellen, sondern auch ihre Klonalität, eine Eigenschaft maligner Zellen. Manchmal treten bei einem Patienten ein HL und ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) gleichzeitig oder nacheinander auf. Interessanterweise wurde in einigen dieser Fälle dieselbe Immunglobulin-Umlagerung in den HRS-Zellen sowie in den malignen Zellen des B-NHL entdeckt (Bräuninger et al., 1999; Schmitz et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Erkrankungen aus derselben Vorläuferzelle hervorgegangen sind - ein weiterer Hinweis auf den B-Zell-Ursprung des HL (Küppers, 2002). Nur in seltenen Fällen leitet sich das HL von T-Zellen ab (Küppers et al., 2001).

Obwohl sie zumeist von B-Lymphozyten abstammen, zeigen HRS-Zellen nur wenige biologische Charakteristika dieser Zellen (Staudt, 2000). Sie bilden keine Immunglobuline

und tragen selten typische B-Zell-Marker wie z.B. das CD20-Antigen. Immunphänotypisch exprimieren die Tumor-Zellen des cHL die CD15- und CD30-Antigene und sind meist CD20- und CD45-negativ (Kanzler et al., 1996; von Wasielewski et al., 1997).

Eines der pathophysiologischen Kennzeichen des cHL ist die konstitutive Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden wie dem NF- κ B- und JAK/STAT-Signalweg, die zu Proliferation und Überleben der HRS-Zellen führt (Bargou et al., 1997; Küppers, 2009). Da die Untersuchung chromosomaler Veränderungen, die die JAK/STAT-Gene betreffen, eines der Hauptziele dieser Arbeit war, werden diese Transduktionskaskade und ihre Bedeutung beim cHL in Absatz 1.5 näher beleuchtet.

1.4 Zytogenetische Veränderungen beim Hodgkin-Lymphom

Konventionelle zytogenetische Untersuchungen des HL sind aufgrund der niedrigen Tumor-Zellzahl im Gewebe und der geringen Mitoserate der HRS-Zellen schwierig (Fonatsch et al., 1999). Meist sind HRS-Zellen tri- oder tetraploid. Bis zu 100% der Tumorzellen weisen numerische Chromosomenaberrationen auf (Weber-Matthiesen et al., 1995a). Sie zeigen komplexe und instabile Karyotypen, d.h. sie weisen nicht nur den mehrfachen Chromosomensatz einer normalen Zelle auf, sondern auch sehr komplizierte Chromosomenaberrationen wie Brüche und Translokationen (Schouten et al., 1989; Tilly et al., 1991). Die Instabilität führt zu einer Variabilität der Chromosomenaberrationen in den Metaphasen eines Klons (Weber-Matthiesen, 1995a). Diese Charakteristika erschweren die zytogenetische Beurteilung zusätzlich.

Neuere Methoden wie die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for investigation of neoplasms (FICTION) ermöglichen die zytogenetische Untersuchung an Interphase-Kernen (Siebert und Schlegelberger, 1997). FICTION kann zusätzlich das Auffinden der seltenen Tumorzellen durch Anfärben speziell der CD30-positiven Zellen mittels Antikörper erleichtern (Weber-Matthiesen et al., 1995b). Die Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) erfasst Zugewinne und Verluste von genetischem Material in Zellen. Um einzelne Zellen untersuchen zu können, müssen sie mikrodissiziert werden, d.h. sie werden unter mikroskopischer Sicht aus dem Gewebe gekratzt oder geschossen und untersucht. Durch CGH-Studien an mikrodissizierten HRS-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese häufig Zugewinne genetischen Materials aufweisen. Dies gilt insbesondere für die Chromosomenarme 2p (54%), 9p (24% der Fälle), 12q (37% der Fälle), 16p (24% der Fälle),

17q und 20q (je 20% der Fälle) (Joos et al., 2002; Joos et al., 2003; Chui et al., 2003). Diese Regionen enthalten unter anderem einige der in dieser Arbeit untersuchten Gene. Verlässliche Aussagen über die betroffenen Gene können mit der CGH-Methode aufgrund ihrer niedrigen Auflösung allerdings nicht gemacht werden. Spezifische numerische oder strukturelle chromosomale Veränderungen, welche die maligne Transformation erklären würden, wurden für das cHL noch nicht gefunden (Atkin, 1998; Deerberg-Wittram et al., 1996).

Wie eben erwähnt, gehören Zugewinne der Chromosomenregion 9p zu den häufigsten Aberrationen im cHL. Hier liegt u.a. das Gen der Tyrosin-Kinase JAK2 (9p24). Frühere Arbeiten zeigten, dass HRS-Zellen mit 9p23-24 Amplifikation eine erhöhte Anzahl von Kopien des *JAK2*-Gens aufwiesen (Joos et al., 2000). Die Tyrosin-Kinase JAK2 spielt in der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade eine bedeutende Rolle. Diese Kaskade steuert wichtige Zellfunktionen, deren Fehlregulation eine maligne Transformation zur Folge haben könnte. Interessanterweise konnte eine konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges für das cHL gezeigt werden (Skinnider und Mak, 2002).

In zwei Hodgkin-Zelllinien konnten außerdem Zentrosomenaberrationen nachgewiesen werden, die die chromosomale Instabilität erklären könnten (Pihan et al., 1998). Zwei Kandidatenonkogene (*STK15* und *PLK1*), die die Zentrosomenfunktion steuern, liegen in Chromosomenregionen, die im cHL genetisches Material hinzugewinnen (Zhou et al., 1998; Golsteyn et al., 1994). Ziel dieser Arbeit war es daher, im cHL die Genloci der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade und der Zentrosomengene *STK15* und *PLK1* mittels FISH-Technik auf Veränderungen zu untersuchen.

1.5 Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade und die Aufgaben der einzelnen

Mitglieder

Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) überführen ein Signal von der Zelloberfläche zum Kern und sind Teil von Gen-Regulationsprozessen. Die STATs haben Einfluss auf wichtige Zellfunktionen wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Entwicklung und Überleben (Jove, 2000). Es fällt auf, dass dies Funktionen sind, die bei der malignen Transformation von Zellen eine wichtige Rolle spielen (Bowman et al., 2000). Über diese Mechanismen sind Veränderungen in der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade an der malignen Entartung von Zellen beteiligt.

Viele Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren nutzen STATs. Einige Tyrosinkinase wie auch die Mitglieder der Janus-Kinasen (JAK)- Familie induzieren den STAT-

Signaltransduktionsweg (Jove, 2000). Die STAT-Familie zählt sieben identifizierte Proteine (STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6) (Bromberg und Darnell, 2000).

Die Signaltransduktionskaskade beginnt mit der Bindung eines Liganden an den Oberflächenrezeptor, der dadurch aktiviert wird. Rezeptoren ohne eigene Tyrosinkinase-Aktivität rekrutieren Mitglieder der JAK-Familie (Bowman et al., 2000). Diese besteht aus vier Mitgliedern (TYK2, JAK1, JAK2 und JAK3) (Reddy et al., 2000). Die JAKs befinden sich in inaktivem Zustand im Zytoplasma. Sie binden an den Rezeptor und phosphorylieren sich selbst (Ihle et al., 1995). Die so aktivierten Tyrosinkinasen phosphorylieren nun einen Tyrosinrest am zytoplasmatischen Ende des Rezeptors, an den sich inaktive STAT-Monomere binden. Die Tyrosinkinasen phosphorylieren jetzt die STAT-Monomere (Darnell, 1997). Diese dimerisieren daraufhin. Die aktivierten Homo- oder Heterodimere wandern in den Zellkern, binden an bestimmte Stellen der DNA und aktivieren die Transskription (Schindler und Darnell, 1995) (s. Abbildung 1).

Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, wie die Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, benötigen keine zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, sie phosphorylieren die STATs direkt (Ihle, 1996). Weiterhin gibt es noch zytoplasmatische Tyrosinkinasen, z.B. Src und Abl, die die STATs auch rezeptorunabhängig phosphorylieren können (Kazansky et al., 1999).

STAT1 hemmt in aktiviertem Zustand das Zellwachstum und fördert die Apoptose (Levy und Gilliland, 2000). STAT3, ursprünglich „Akute Phase Response Faktor“ (APRF) genannt, ist wichtig für die Transduktion von Signalen, die durch IL-6 generiert werden (Wegenka et al. 1993). IL-6 bindet an seinen Rezeptor und bewirkt über STAT3 eine veränderte Gen-Expression. Interessanterweise ist die IL-6/STAT3-Signaltransduktionskaskade mitverantwortlich für B-Zellwachstum und -differenzierung und könnte so zur Entstehung von lymphoplasmazellulären Neoplasien beitragen (Hirano et al., 2000).

Der IL-6-Rezeptor besteht aus einer IL-6-spezifischen Rezeptorkette (IL6R) und der IL-6 signal transducer-Kette (IL6ST/gp130), die sich IL-6 mit mehreren anderen Zytokinen teilt. Die Bindung von IL-6 an den IL6R löst die Assoziation von IL6R und IL6ST aus (Kishimoto et al., 1995). JAKs phosphorylieren das intrazytoplasmatische Ende von IL6ST, woran sich wiederum STATs binden (Heinrich et al., 1998).

STAT5A und STAT5B werden u.a. durch IL-2, IL-5, Erythropoietin und Prolaktin aktiviert. Sie spielen eine Rolle bei der antigen-induzierten Rekrutierung eosinophiler Granulozyten, bei der Bildung von T-Zellen und haben Einfluss auf Wachstum und Überleben von

Vorläufern der roten Zellreihe (Lin und Leonard, 2000; Kagami et al., 2000; Smithgall et al., 2000).

Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der STAT-Familie reagieren STAT2, STAT4 und STAT6 nur auf wenige extrazelluläre Stimuli (Skinnider et al., 2002). STAT4 und STAT6 vermitteln spezifisch Signale vom IL-4-, IL-12- und IL-13-Rezeptor und beeinflussen so Proliferation, Differenzierung und Funktion von Lymphozyten (Wurster et al., 2000).

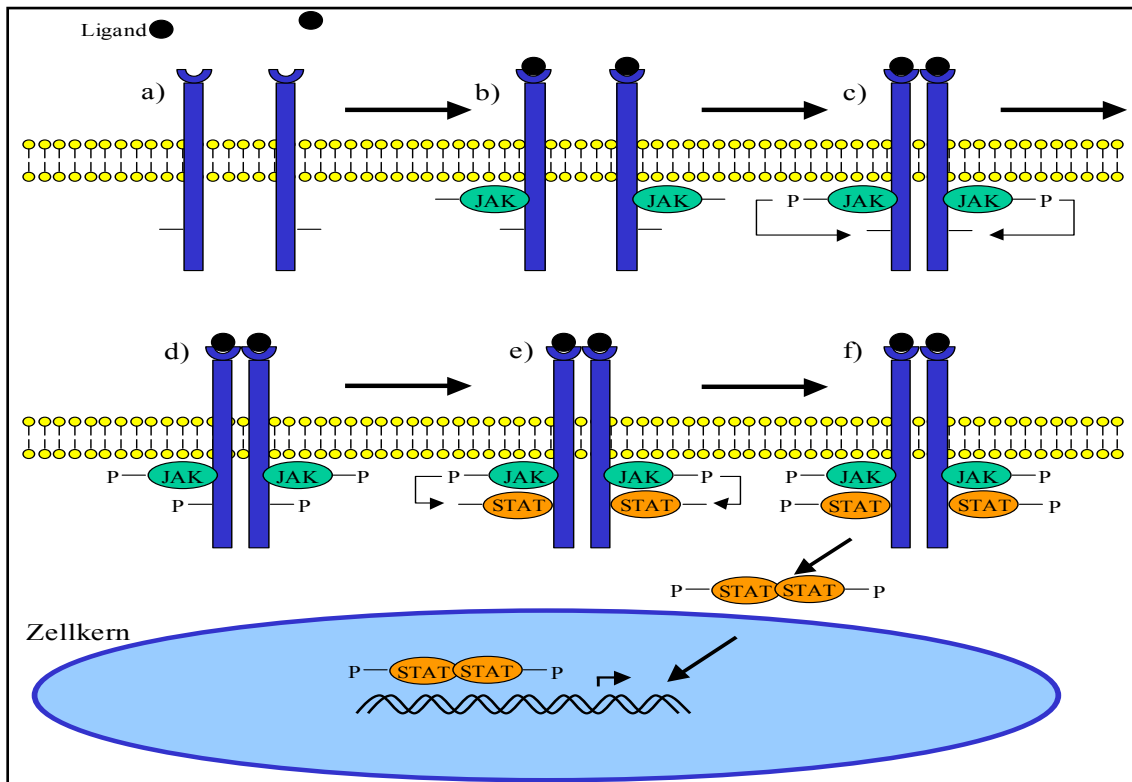


Abbildung 1: Schematische Darstellung der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade (modifiziert nach Reddy et al., 2000)

- a) Die Bindung spezifischer Liganden an Zytokin- oder Wachstumsfaktorrezeptoren ohne intrinsische Tyrosinkinaseaktivität führt zu einer Konformitätsänderung der Rezeptoren
- b) Dies ermöglicht die Bindung der JAKs
- c) Aktivierung der Rezeptor-assoziierten JAKs durch Selbstphosphorylierung
- d) Phosphorylierung von Tyrosinresten am zyttoplasmatischen Ende des Rezeptors durch aktivierte JAKs
- e) Bindung von inaktiven STAT-Monomeren an die phosphorylierten Tyrosinreste
- f) Phosphorylierung der STATs durch JAKs. Dimerisieren der aktivierten STATs und Wanderung in den Zellkern

1.5.1 JAK/STAT in der Onkogenese

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Aktivierung von STAT-Proteinen eine Rolle in der Onkogenese spielt. Die Aktivierung der STATs erfolgt durch onkogene Tyrosin-Kinasen z.B. der JAK-Familie, der Src-Familie oder der Abl-Familie (Bowman et al., 2000).

Außerdem führen bestimmte Onkoproteine zur konstitutiven STAT-Aktivierung. In der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) konnte z.B. gezeigt werden, dass eine chromosomale Translokation t(9;12)(p24;p13) zur Bildung des TEL-JAK2-Fusionsproteins führt, welches konstitutive Kinaseaktivität zeigt (Lacronique et al., 1997). Dieses Fusionsprotein verursacht daraufhin die konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 (Ho et al., 1999). Weitere Onkoproteine, die eine konstitutive STAT-Aktivierung bedingen, sind u.a. das Genprodukt des Philadelphia-Chromosoms BCR/ABL (Lin et al., 2000) und vABL, das über eine Bindung an JAKs auf die Signalkaskade Einfluss nimmt (Danial und Rothman, 2000). Im myeloproliferativen Syndrom (MPS) wurde eine *JAK2*-Punktmutation (JAK2V617F) entdeckt, die zu einer konstitutiven Aktivierung der JAK2-Tyrosinkinase führt (Levine et al. 2005).

Die Aktivierung spezifischer JAKs und STATs konnte in verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen inklusive Lymphomen und Leukämien gezeigt werden (Lin et al., 2000; Coffey et al., 2000). So konnte die konstitutive Aktivierung von STAT1 und STAT5 in der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der chronisch myeloischen Leukämie (CML) mit aktivierter BCL/ABL-Tyrosinkinase nachgewiesen werden (Chai et al., 1997; Frank und Varticovski 1996; Ilaria und Van Etten, 1996). Im multiplen Myelom kommt es durch IL-6 zur konstitutiven Aktivierung von STAT3 (Catlett-Falcone et al, 1999). Weitere maligne Tumore, die eine konstitutive Aktivierung von STAT-Proteinen aufweisen, sind u.a. Plattenepithelkarzinome des Kopf/Hals-Bereiches, das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom und das Ovarialkarzinom (Bowman et al., 2000; Song und Grandis, 2000; Levy und Gilliland, 2000).

1.5.2 *JAKs* und *STATs* als Kandidatenonkogene im klassischen Hodgkin-Lymphom

Wie bereits ausgeführt, ist die konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade eines der pathophysiologischen Kennzeichen des cHL. In 5 von 7 Hodgkin-Zelllinien ließen sich hohe Konzentrationen von aktiviertem STAT3 nachweisen (Kube et al., 2001). Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 fand sich außerdem in 87% der cHL-Primärfälle, STAT5 dagegen war zwar in 3 von 5 Hodgkin-Zelllinien, aber nur in 26% der Primärfälle konstitutiv aktiviert (Skinnider et al., 2002).

Ein weiteres Charakteristikum von HRS-Zellen ist die Produktion von IL-6 sowie die Expression von IL6R und IL6ST, was somit einen autokrinen Mechanismus nahelegt (Jücker et al., 1991; Herbst et al., 1997).

Eine zum Teil durch autokrine IL-13-Produktion bedingte konstitutive Phosphorylierung von STAT6 konnte in allen 5 untersuchten HRS-Zelllinien sowie in 78% der primären cHL-Fälle (95% bei NS) gezeigt werden (Skinnider et al., 2002; Skinnider und Mak, 2002).

Diese Zusammenhänge legten die Untersuchung dieser Kandidaten auf genetischer Ebene nahe.

1.5.3 Lage der *JAK/STAT*-Gene

Die Gene, die für die Mitglieder der o.g. Signaltransduktionskaskade kodieren, liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Das Gen für IL6ST liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 5 in der Region 5q11 (Rodriguez et al., 1995). Das *JAK2*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (9p24) (Joos et al., 2003). Die Gene *STAT2* und *STAT6* sind in der Chromosomenregion 12q13 eng benachbart, und ebenso dicht beieinander liegen die Gene *STAT3*, *STAT5A* und *STAT5B* auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21) (Ambrosio et al., 2002).

Es fällt auf, dass alle diese Chromosomenregionen zu jenen gehören, die in CGH-Studien von cHL Imbalancen aufweisen (Joos et al., 2002; Joos et al., 2003; Chui et al., 2003).

Dies und der Umstand, dass die entsprechenden Gene Zellfunktionen steuern, die in malignen Zellen gestört sind, bzw. deren Störung eine maligne Entartung ermöglicht, lassen die Gene der *JAK/STAT*-Signaltransduktionskaskade als ideale Kandidatenonkogene für die Entstehung des cHL erscheinen.

Da Amplifikationen des *JAK2*-Gens und die konstitutive Aktivierung von STATs im cHL bereits nachgewiesen wurden, liegt ein Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung umso näher.

1.6 Zentrosomen und chromosomale Instabilität

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich die HRS-Zellen durch außergewöhnlich komplexe und instabile Karyotypen aus (Deerberg-Wittram et al., 1996). Deswegen könnte ein weiterer

pathogenetischer Mechanismus der Entstehung des cHL eine gestörte Chromosomensegregation sein.

Als Organisationszentrum der Mikrotubuli spielen Zentrosomen u.a. für die Bildung der Mitosespindel eine wichtige Rolle. Die meisten eukaryoten Zellen besitzen Zentrosomen (Merdes and Cleveland, 1997).

Sie setzen sich aus einem Zentriolenpaar und dem perizentriolären Körper zusammen. Zentriolen bestehen aus neun mikrotubulären Triplets. Vom perizentriolären Körper geht die Bildung von Mikrotubuli aus. Vor der Zellteilung verdoppeln sich die Zentriolen, sodass zwei Zentrosomen entstehen. In der Prometaphase der Mitose wandern die Zentrosomen zu den entgegengesetzten Polen der Zelle. Zwischen ihnen bildet sich die Mitosespindel aus. Die Kinetochormikrotubuli setzen am Kinetochor (Zentromer) der Chromosomen an. Während der Anaphase werden die Tochterchromosomen von den Mikrotubuli zu den Zellpolen auseinander gezogen. So wird das in der S-Phase identisch reduplizierte genetische Material gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. (Absatz aus: Junqueira und Carneiro, 1996).

Jede Tochterzelle erhält eines der Zentrosomen (Nigg, 2002).

Bereits 1914 stellte T. Boveri die Hypothese auf, dass maligne Entartung durch aberrante Replikation und Aktivität von Zentrosomen zustande kommen könnte (Boveri, 1914). Die Ausbildung von zusätzlichen Mitosespindeln könnte zu Zugewinnen oder Verlusten von Chromosomen führen. Auch die abweichende äußere Form der Krebszellen könnte so erklärt werden. Diese Vermutung geriet lange Zeit in Vergessenheit. Die Tatsache, dass fast alle soliden Tumoren des Menschen aneuploid sind und dass Zentrosomenaberrationen in malignen Zellen häufig vorkommen, führten zu einer Wiederaufnahme dieses Gedankens (Brinkley und Goepfert, 1998).

Viele Tumorzellen besitzen überzählige Zentrosomen. Ein Zusammenhang zwischen fehlerhafter Chromosomentrennung und dem Vorhandensein multipolarer Mitosespindeln konnte unter anderem bereits im Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (Sato et al., 2001). Unkontrollierte Zentrosomenduplikation führt zu chromosomaler Instabilität, die in beinahe jedem malignen Tumor des Menschen nachweisbar ist. So konnte für Brustkrebs eine positive Korrelation zwischen Zentrosomengröße, Zentrosomenzahl und der Aneuploidie nachgewiesen werden (Lingle et al., 2002). Pihan et al. zeigten für das Prostatakarzinom einen Zusammenhang zwischen Zentrosomenanomalien und chromosomaler Instabilität (Pihan et al., 2001).

Mögliche Ursachen für die außergewöhnliche Chromosomeninstabilität und die numerischen Aberrationen in Hodgkin-Zellen können Defekte der für die Chromosomensegregation bei der Zellteilung entscheidenden Zentrosomen sein. Bisher wurden nur wenige Untersuchungen über Zentrosomen im cHL durchgeführt. Hervorzuheben ist, dass die zwei einzigen bisher analysierten Hodgkin-Zelllinien beide Zentrosomenunregelmäßigkeiten aufwiesen (Pihan et al., 1998). Dies und die ungewöhnlich komplexen Karyotypen der HRS-Zellen lassen auf einen Zusammenhang zwischen Zentrosomenaberrationen und maligner Transformation schließen.

1.6.1 *STK15* und *PLK1* und ihre Rolle in der Onkogenese

Eine Reihe von Genen und Genprodukten u.a. *PLK1* und *STK15* beeinflussen die Zentrosomenfunktion maßgeblich. Bemerkenswert ist, dass diese beiden Gene in Chromosomenbereichen liegen, die im cHL häufig chromosomale Zugewinne zeigen (16p und 20q) (Joos et al., 2002; Joos et al., 2003; Chui et al., 2003). Eine Überexpression ihrer Proteine könnte zu Störungen der Zentrosomenfunktion führen und so zur Pathogenese des HL beitragen.

Polo ist eine Serin-Threonin-Kinase (STK), die bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eine wichtige Rolle in der Mitose spielt. Wirbeltierzellen besitzen drei Polo-like-Kinasen (PLK), die einen sehr ähnlichen Aufbau wie die Polo zeigen: PLK1 (PLK), PLK2 (Snk) und PLK3 (Fnk/Prk) (Glover et al., 1998).

PLK1 ist an der Regulierung der Zentrosomenfunktion beteiligt. Der genaue molekulare Mechanismus ist noch unklar. Eine Inhibition der Enzymaktivität führte jedoch zu der Ausbildung einer monopolaren Mitosespindel, die von verdoppelten, aber nicht getrennten Zentrosomen ausging (Dai et al., 2002). PLK1 reguliert also wahrscheinlich nicht die Verdopplung, sondern die Reifung der Zentrosomen. Außerdem ist sie an der Aktivierung weiterer Kinasen beteiligt, die wiederum Einfluss auf den Zellzyklus haben.

Interessant ist, dass eine Überexpression des *PLK1*-Gens Zentrosomenamplifikationen zu verursachen scheint (Meraldi et al., 2002). Über fehlerhafte Zellteilung und Chromosomenverteilung könnte dies zu Aneuploidie und schließlich zu maligner Entartung führen.

STK15 – auch BTAK (breast tumour activated kinase) oder Aurora-A genannt – ist eine Mitose-assoziierte Kinase (Nigg, 2001). Sie ist beteiligt an der Duplikation, Separation und

Reifung der Zentrosomen. Außerdem spielt das Enzym eine Rolle bei der Bildung und Stabilisierung der Mitosespindel (Dutertre et al., 2002). Diese Funktionen erfüllt STK15 u.a. durch Rekrutierung anderer für die Funktion des Zentrosoms wichtiger Proteine.

In vielen Tumoren, wie z.B. dem Kolonkarzinom, ist das *STK15*-Gen amplifiziert und das Genprodukt überexprimiert (Katayama et al., 2001; Bischoff et al., 1998) und führt so, wie z.B. bei Brustkrebs beschrieben, zu Zentrosomenaberrationen (Zhou et al., 1998; Meraldi et al., 2002). Für das Harnblasenkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen *STK15*-Amplifikation mit Überexpression der entsprechenden Kinase und der Aneuploidie sowie der Aggressivität des Tumors nachgewiesen werden (Sen et al., 2002). Eine *STK15*-Überexpression könnte also über Zentrosomenvermehrung und Aneuploidie eine Transformation und maligne Entartung der Zelle verursachen.

Das Gen *STK15* befindet sich in der Chromosomenregion 20q13 (Zhou et al., 1998), das Gen *PLK1* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p12) (Golsteyn et al., 1994). Wie oben bereits beschrieben, konnten im cHL in beiden Bereichen überdurchschnittlich häufig Chromosomenimbalance nachgewiesen werden.

Eine deregulierte Expression der Gene *STK15* und/oder *PLK1* mit nachfolgender Zentrosomenstörung könnten im cHL die Aneuploidie und die Chromosomeninstabilitäten erklären.

1.7 Fragestellung

Das cHL ist ein malignes Keimzentrums-B-Zell-Lymphom, über dessen Entstehungsmechanismen bisher nur wenig bekannt ist.

Ein wichtiges, im cHL häufig beobachtetes Phänomen ist die konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade. Jedes der an der Kaskade beteiligten Proteine wird von Genen kodiert, die in den Regionen lokalisiert sind, die im cHL häufig genetisches Material hinzugewinnen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Lage der an der JAK/STAT-Signaltransduktion beteiligten Gene

Gen	Lokalisation
<i>IL6ST</i>	5q11
<i>JAK2</i>	9p24
<i>STAT2/6</i>	12q13
<i>STAT3/5</i>	17q21

Ein weiteres Charakteristikum der cHL sind die hochkomplexen und instabilen Karyotypen der HRS-Zellen. Chromosomensegregation und Zellmorphologie werden von den Zentrosomen mitbestimmt. Zwei Gene (*PLK1* und *STK15*), die unter anderem für die Zentrosomenfunktion verantwortlich sind, liegen wiederum in Chromosomenbereichen, die im cHL gehäuft Imbalancen aufweisen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Lage der Gene *PLK1* und *STK15*

Gen	Lokalisation
<i>PLK1</i>	16p12
<i>STK15</i>	20q13

Basierend auf diesen Beobachtungen war es Ziel dieser Arbeit, mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) Alterationen der oben genannten Gene im cHL zu erfassen und folgende Fragen zu beantworten:

- Ist die Aktivierung des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges in HRS-Zellen des cHL durch chromosomale Veränderungen der Genorte bedingt, welche für die Komponenten dieser Signalkaskade kodieren?
- Gibt es wiederkehrende Aberrationen der Genloci *STK15* und *PLK1*, welche die Zentrosomenaberrationen im cHL bzw. die chromosomale Instabilität der HRS-Zellen bedingen könnten?

Da für die zu untersuchenden Genloci keine kommerziellen Sonden zur Verfügung stehen, mussten als Voraussetzung für die Bearbeitung dieser Fragestellung zunächst geeignete FISH-Assays etabliert werden.

2 Material und Methoden**2.1 Material**

In diesem Abschnitt werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien beschrieben. In Laboratorien allgemein gebräuchliche Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder anderen Anbietern bezogen und sind ebenso wie allgemein gebräuchliche Laborgerätschaften, wie z.B. Pipetten und Glaswaren, nicht gesondert aufgeführt.

2.1.1 Probenmaterial**2.1.1.1 Klassische Hodgkin-Lymphome**

In dieser Arbeit wurde aufgearbeitetes, in Carnoys-Fixativ asserviertes Lymphknotengewebe von 36 Patienten untersucht. Bei allen Patienten war die pathologische Diagnose eines klassischen Hodgkin-Lymphoms gestellt worden. In allen Fällen handelte es sich um Restmaterial aus der tumorgenetischen Routine-Diagnostik des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel, welches den Patienten nach entsprechender Aufklärung und mit ihrem Einverständnis für die Untersuchung entnommen wurde

Diese Studie wurde im Rahmen des Verbundprojektes der Deutschen Krebshilfe „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ durchgeführt, für das ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorlag.

Aufgrund der oft sehr geringen Zahl an HRS-Zellen waren von diesen 36 Fällen nur 21 für die Untersuchungen auswertbar.

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die auswertbaren Fälle (Tabelle 3).

Tabelle 3: Charakteristika der ausgewerteten cHL-Fälle

Fall-Nr.	Alter	Geschlecht
1	49	M
2	19	M
3	23	W
4	22	M
5	15	M
6	22	W
7	20	W
8	16	W
9	13	W
10	20	M
11	14	W
12	32	M
13	15	W
14	63	M
15	18	M
16	15	W
17	19	M
18	17	W
19	19	W
20	36	M
21	66	M

2.1.1.2 Zelllinien

Für die Analysen standen zudem die vier klassischen cHL-Zelllinien HDLM-2, L428, L1236 und KM-H2 zur Verfügung.

Die Zelllinien wurden von Dr. J. Wolf (Köln), Prof. Dr. M. Dyer (Leicester, UK) und Dr. R. Küppers (Köln) zur Verfügung gestellt. Beschrieben wurden die Zelllinien u.a. in „The Leukemia-Lymphoma cell-Line facts Book“ (Drexler, 2001).

Detaillierte zytogenetische Analysen dieser Zelllinien wurden von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Joos et al., 2003).

2.1.1.3 Tissue Microarrays (TMA)

Weiterhin wurde in Paraffin fixiertes Gewebe von insgesamt 33 cHL-Fällen untersucht. Diese Fälle wurden freundlicherweise als Tissue Microarrays (TMA) von Dr. Teresa Marafioti (University of Oxford) zur Verfügung gestellt. Durch die TMA-Technik war es möglich, alle 33 Fälle auf nur zwei Objektträgern unterzubringen. Zum Teil befanden sich auf den beiden zur Verfügung stehenden Objektträgern mehrere Gewebeteile eines Falls. Die Microarrays wurden nur mit dem *JAK2*-FISH-Assay analysiert.

2.1.1.4 Kontrollen

Für die Kontroll-Untersuchungen wurden fixierte Zellen aus peripherem Blut freiwilliger Probanden mit normalem Karyotyp verwendet.

2.1.2 Chemikalien

Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland)

Chloramphenicol (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Cot1-DNA, human (1mg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

DABCO (Sigma, Steinheim, Deutschland)

DAPI (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Deionisiertes Formamid (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dextransulfat (Sigma, Steinheim, Deutschland)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

dUTP DEAC (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA)

dUTP spectrum green (1mM) (Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland)

dUTP spectrum orange (1mM) (Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland)

EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fixogum-Kleber (Marabu, Tamm, Deutschland)

Glaswolle (Sigma, Steinheim, Deutschland)

Glycerol 87% (Merck, Darmstadt, Deutschland)

HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Hefeextrakt (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Igepal CA-630 (Sigma, Steinheim, Deutschland)
Kanamycin (Sigma, Steinheim, Deutschland)
Karbenicillin (Sigma, Steinheim, Deutschland)
Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaAc (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Na₃Citrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaCl (Sigma, Steinheim, Deutschland)
NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Pepsin (Sigma, Steinheim, Deutschland)
Rotihistol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland)
Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Trypton-Pepton (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

2.1.3 Geräte

Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Feinwaage MC1 620P (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Filtersätze (AHF, Tübingen, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskope: Axioskop und Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Kamera und ISIS-Software (Metasystems, Altusheim, Deutschland)
Fotometer: Ultrospec III (Pharmacia, Erlangen, Deutschland)
Inkubator für Zellkulturen (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland)
Schnellkochtopf Clipso 6 Liter (Tefal, Offenbach am Main, Deutschland)
Wasserbad (Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland)
Zentrifugen: Sorvall SuperT21 (Sorvall von Kendro, Hanau, Deutschland)
Biofuge 22R (Heraeus, Hanau, Deutschland)

2.1.4 Lösungen und Puffer

In Tabelle 4 sind die in der Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Ansatz
Antifade	230 mg DABCO; 800 µl Aqua dest.; 200 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0; 9 ml Glycerol
Carnoy's-Fixierlösung für Zellen	Methanol/Eisessig im Verhältnis 3:1
DAPI-Gebrauchslösung	6 µl DAPI Konzentrat (0,2 mg/ml DAPI in H ₂ O) 60 ml 2 x SSC
dNTP-Lösung	2,5 µl dATP (10mM); 2,5 µl dCTP (10mM); 2,5 µl dGTP (10mM); 1,25 µl dTTP (10mM); 12,5 µl dUTP-X ¹ (1mM); 3,75 µl ddH ₂ O
EDTA-Puffer (0,5 M)	186,1 g EDTA; 700 ml Aqua dest. mit NaOH auf pH 8,0 einstellen mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
LB-Medium	10 g Trypton-Pepton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl in 800 ml Aqua dest. lösen mit NaOH auf pH 7,4 einstellen mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen sterilisieren
Mastermix	2,5 ml deionisiertes Formamid 1,25 ml Dextransulfat 40% 0,5 ml 20 x SSC mit NaOH auf pH 7,5 einstellen mit Aqua dest. auf 4,5 ml auffüllen
Paraformaldehydlösung 1%	1 g Paraformaldehyd in 60 ml Aqua dest. lösen 5 Tropfen 10 N NaOH unter dem Abzug auf 70-100 °C erhitzen bis die Lösung klar wird auf pH 7,0-7,5 einstellen mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen bei 4 °C lichtgeschützt lagern
Säulenpuffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA 0,1 % SDS mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen
Sephadex G-50 Suspension	10 g Sephadex G-50 160 ml Aqua dest. 30 min bei Raumtemperatur quellen lassen 4 min bei 1200 U/min zentrifugieren Überstand dekantieren Sephadex zweimal mit Aqua dest. waschen und zentrifugieren
20 x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Na ₃ Citrat in 800 ml Aqua dest. lösen mit HCl auf pH 7,0 einstellen mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
SSC-Lösung 1	2 ml 20 x SSC 100 µl Igepal CA-630 mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
SSC-Lösung 2	10 ml 20 x SSC 300 µl Igepal CA-630 mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
Verdaulösung 1	5 mg Pepsin; 0,5 ml 2 N HCl in 99,5 ml Aqua dest. Lösen
Verdaulösung 2	10 mg Pepsin; 0,5 ml 2 N HCl in 99,5 ml Aqua dest. Lösen

¹ X steht hierbei für den jeweils gewünschten Fluoreszenzfarbstoff SO, SG oder DEAC

2.1.5 BAC- und PAC-Klone

Da für die zu untersuchenden Gene keine kommerziellen Sonden zur Verfügung standen, mussten zunächst FISH-Assays hergestellt und etabliert werden. Dabei waren die Sonden für die Gene *JAK2* und *IL6ST* bereits von unserer Arbeitsgruppe eingeführt worden.

Als Grundlage für die in dieser Arbeit entwickelten FISH-Assays dienten BAC- bzw. PAC-DNA aus Bakterienklonen, die von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) oder anderen Anbietern bezogen wurden, und Plasmid-DNA, die von Dr. Mariano Rocchi (Universität Bari, Italien) zur Verfügung gestellt wurde. Die Auswahl der BACs und PACs erfolgte mit Hilfe der UCSC Genome Bioinformatics Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>).

Einen Überblick über die verwendeten Klone gibt Tabelle 6 auf Seite 19.

2.1.6 Verwendete kommerziell erhältliche Zentromersonden

Tabelle 5 zeigt die in dieser Arbeit für die Herstellung der Assays genutzten kommerziell erhältlichen Zentromersonden.

Tabelle 5: In der Arbeit verwendete kommerziell erhältliche Zentromersonden

Name	Hersteller	Chromosomale Lokalisation	Markierung
CEP 9	Vysis Abbott (Wiesbaden)	Zentromer Chromosom 9	Spectrum aqua (SA)
CEP 16	Vysis Abbott (Wiesbaden)	Zentromer Chromosom 16	Spectrum aqua (SA)
CEP 17	Vysis Abbott (Wiesbaden)	Zentromer Chromosom 17	Spectrum aqua (SA)

2.1.7 Kits

Zur Extraktion der DNA aus den Bakterien diente das Perfectprep Plasmid Maxi Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Das Bioprime DNA-Labeling System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde zur anschließenden Markierung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.

Tabelle 6: In der Arbeit verwendete Bakterienklone

Name	Bibliothek	Typ	Chromosomale Lokalisation	Markierung
2227I18	CTD	BAC	5q11.2	Spectrum orange
332C17	RP11	BAC	5q11.2	Spectrum green
574F11	RP11	BAC	9p24.1	Spectrum orange
140C18	RP11	BAC	9p24.1	Spectrum orange
39K24	RP11	BAC	9p24.1	Spectrum orange
125K10	RP11	BAC	9p24.1	Spectrum green
6J24	RP11	BAC	9p24.1	Spectrum green
525I3	RP11	BAC	12p13.2	DEAC
434C1	RP11	BAC	12p13.2	DEAC
615I16	RP11	BAC	12p12.1	DEAC
100C20	RP11	BAC	12p12.1	DEAC
252K13	RP11	BAC	12p12.1	DEAC
114G22	RP11	BAC	12p12.1	Spectrum orange
1060J15	RP11	BAC	12p11	Spectrum green
268P4	RP11	BAC	12p12.1	Spectrum green
64J22	RP11	BAC	12p12.1	Spectrum orange
666F17	RP11	BAC	12p12.1	Spectrum green
64N21	RP11	BAC	12p12.1	Spectrum orange
pBR 12		Plasmid	12 Zentromer	DEAC
973D8	RP11	BAC	12q13.2	Spectrum green
112B10	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum orange
507N3	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum orange
145A4	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum green
474N8	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum green
183H16	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum green
176O5	RP11	BAC	12q14.13	Spectrum orange
1077C21	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum orange
936I7	RP11	BAC	12q13.3	Spectrum orange
184F14	RP11	BAC	16p12.2	Spectrum orange
2385L22	CTD	BAC	16p12.2	Spectrum green
156E6	RP11	BAC	17q21.2	Spectrum orange
400F19	RP11	BAC	17q21.2	Spectrum green
194N12	RP11	BAC	17q21.2	Spectrum orange
1151G10	RP11	BAC	17q21.2	Spectrum orange
242D8	RP11	BAC	17q21.31	Spectrum orange
266I24	RP11	BAC	17q21.31	Spectrum orange
380D15	RP11	BAC	20q13.31	Spectrum orange
1167H4	RP5	PAC	20q13.31	Spectrum orange
1153D9	RP5	PAC	20q13.31	Spectrum green
PZ 20		Plasmid	20 Zentromer	Spectrum green

BAC = künstliches Bakterienchromosom, PAC = vom Phagen P1 abgeleitetes künstliches Chromosom
 CTD = Caltech library D, RP = Roswell Park Cancer Institute

2.2 Methoden

Die Methoden folgen den Standardarbeitsanweisungen des Institutes für Humangenetik.

2.2.1 Kultivierung von Bakterienklonen

Zur Vermehrung der bestellten Bakterienklone wurden Übernachtskulturen angelegt. Dazu wurden 50 µl Bakterienstab in 150-200 ml LB-Medium gegeben. Je nach Resistenzlage wurde als Antibiotikum Chloramphenicol, Kanamycin oder Karbenicillin zugefügt. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht schwenkend inkubiert.

2.2.2 DNA-Extraktion

Die Extraktion der BAC-, PAC- und Plasmid-DNA wurde mit dem Perfectprep Plasmid Maxi Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.3 DNA-Markierung, Reinigung und Herstellung der Assays

Bei der FISH wird mit Hilfe einer DNA-Sonde, die durch einen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht wird, die zur Sonde komplementäre DNA im Untersuchungsgut angefärbt. Als Grundlage für die Assays wurde die extrahierte BAC-, PAC- und Plasmid-DNA der oben aufgeführten Bakterienklone verwendet. Die Markierung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte durch den Einbau markierter Nukleotide mit Hilfe des Bioprime DNA-Labeling Systems (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Dabei werden durch ein Enzym an denaturierter DNA aus den beigefügten Nukleotiden (dNTPs) kurze Stücke neuer DNA generiert. Eines der Nukleotide ist dabei zum Teil mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch den Einbau dieses markierten Nukleotids kann die Sonde später unter dem Mikroskop zur Emission von Licht angeregt werden.

Durchführung der DNA-Markierung

1. 1 µg DNA wurde mit Aqua dest. auf 24 µl verdünnt.
2. Hinzu kamen 20 µl 2,5 x Random Octamers.
3. Diese Mischung wurde 5 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend sofort eisgekühlt.

4. Dazu kamen 5 μ l dNTPs mit dem gewünschten Fluoreszenzfarbstoff.
5. Im Folgenden wurde 1 μ l Klenow-Fragment zugegeben, gründlich vermischt und kurz zentrifugiert.
6. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
7. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l Stopppuffer beendet.

Aufreinigung der DNA-Probe mittels Sephadex G-50-Säule

1. Sialinisierte Glaswolle wurde bis max. zur 0,2 ml Markierung einer 1 ml Spritze gestopft. Dann wurde Sephadex G-50 Lösung bis zum oberen Rand dazugegeben. Die Spritze wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gehängt.
2. Nun wurde bei Raumtemperatur für 10 min mit 2000 g zentrifugiert.
3. Das Auffüllen mit Sephadex G-50 Lösung und die Zentrifugation wurden so lange wiederholt bis die Säule die 1 ml Markierung der Spritze erreichte.
4. Anschließend wurden 100 μ l Säulenpuffer hinzugegeben. Wiederum wurde 10 min bei Raumtemperatur mit 2000 g zentrifugiert.
5. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt.
6. Ein 1,5 ml Röhrchen wurde ohne Deckel in ein weiteres 15 ml Zentrifugenröhrchen gesetzt. Die Spritze mit der fertigen Sephadex-Säule wurde so im Zentrifugenröhrchen platziert, dass der Durchlauf im kleinen Röhrchen aufgefangen wurde.
7. Die Probenlösung wurde vorsichtig auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert.
8. Das kleine Röhrchen enthielt die gereinigte Probe.

Präparation der FISH-Assays:

1. Zu je 10 μ l gereinigter DNA wurden 5 μ l Cot1-DNA (1 mg/ml) gegeben.
(Ausnahmen: Für die *JAK2*-Sonde wurden je 5 μ l der gereinigten DNA der Klone RP11-6J24 und RP11-125K10, je 3 μ l der Proben RP11-39K24, RP11-140C18 und RP11-574F11 sowie 10 μ l Cot1-DNA verwendet. Für die *STK15*-Sonde wurden 15 μ l Cot1-DNA benutzt.)
2. Hinzu kamen 1/10 des Volumens an NaAc 3 M pH 5,2 und 2,5 x das Volumen an absolutem Alkohol.
3. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 min mit 17000 rpm zentrifugiert.
4. Die Flüssigkeit musste nun gründlich abpipettiert werden. Dabei war darauf zu achten, das Pellet nicht zu zerstören.

5. Das Pellet wurde im Dunkeln getrocknet. Dunkelheit war wichtig, damit die Sonden nicht ausbleichten.
6. Anschließend wurden 9 µl 50%igen Mastermixes hinzugegeben.
7. Bei Bedarf konnte jetzt 1 µl einer kommerziellen Probe beigefügt werden.
8. In absoluter Dunkelheit wurde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler resuspendiert.

2.2.4 Protokoll für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Carnoys-fixierten Zellen aus Lymphknotengewebe

Verdau, Fixierung und Hybridisierung

1. Um die Zelldichte pro µl zu erhöhen, wurde die Zellsuspension für 10 min bei 2000g konzentriert.
2. 1,5 µl Zellen aus Carnoys-Lösung wurden auf einen markierten Bereich eines Objektträgers aufgetropft und getrocknet.
3. Der Objektträger wurde anschließend für 5 min bei 37°C in der Verdaulösung 1 inkubiert und danach 2 min in Aqua dest. gewaschen.
4. Zur Fixierung der Zellen wurde der Objektträger für 2 min in die 1%ige Paraformaldehydlösung gestellt und danach 1 min in Aqua dest. gewaschen.
5. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde dem Objektträger das Wasser entzogen. Hierzu wurde er für je 5 min in 70%igen, 80%igen und absoluten Alkohol gesetzt.
6. Nun wurde der Objektträger an der Luft getrocknet.
7. Nach dem Trocknen wurden auf die markierten Stellen 1,3 µl der entsprechenden FISH-Assays pipettiert und mit einem kleinen runden Deckgläschen abgedeckt.
8. Das Deckgläschen wurde mit Fixogum-Kleber versiegelt.
9. Der Objektträger wurde zusammen mit einem feuchten Tuch in eine Metallbox gelegt. Diese Box wurde in einem Wasserbad für 7 min einer Temperatur von 70°C ausgesetzt. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank hybridisiert.

2.2.5 Protokoll für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Paraffin-Präparaten

Entparaffinieren und Vorbehandlung mittels Drucktopf

1. Der Objektträger wurde bei Raumtemperatur dreimal 5 min in jeweils frisches Rotihistol gestellt.

2. Danach wurde er in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurde der Objektträger jeweils 5 min in absoluten, 80%igen und dann in 70%igen Alkohol gesetzt.
3. Anschließend wurde er für 5 min in Aqua dest. gewaschen.
4. Nun wurden 2 l 1mMol EDTA-Puffer im Schnellkochtopf zum Kochen gebracht. Der Objektträger wurde in einem Metallständer in die kochende Lösung gesetzt und bei geschlossenem Deckel und höchster Druckstufe 2 min und 40 sec gekocht.
5. Jetzt wurde der Topf unter fließendem Wasser abgekühlt.
6. Nach Öffnen des Deckels wurden ca. 2 l kaltes Leitungswasser dazugegeben. Dabei war darauf zu achten, das Wasser nicht über den Objektträger laufen zu lassen.
7. Nachfolgend wurde das Präparat für 2 min in Aqua dest. gewaschen.

Verdau, Fixierung und Hybridisierung

1. Der entparaffinierte Objektträger wurde für 20 min bei 37°C in der Verdaulösung 2 inkubiert und anschließend 2 min in Aqua dest. gewaschen.
2. Die Fixierung in Paraformaldehyd und die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe erfolgten wie bei der FISH an Carnoys-fixierten Zellen.
3. Nach dem Trocknen wurden je nach Größe des zu hybridisierenden Bereiches ca. 5 µl der entsprechenden FISH-Assays auf das Areal des Tissue Microarrays pipettiert.
4. Dies wurde mit einem ausreichend großen Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum-Kleber versiegelt.
5. Der Objektträger wurde nun in einer feuchten Kammer (s.o.) für 20 min einer Temperatur von 77°C ausgesetzt und anschließend für 2 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Waschprotokoll

Das folgende Waschprotokoll wurde für Präparate aus Carnoys-fixierten Zellen ebenso wie für Paraffinpräparate verwendet.

1. Nach Entfernen des Klebers und des Deckgläschens wurde der Objektträger für 2 min in einer Küvette bei 70°C mit SSC-Lösung 1 und danach für 1 min bei Raumtemperatur in einer Küvette mit SSC-Lösung 2 gewaschen.
2. Anschließend wurde 10 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC-Lösung (20 x SSC-Lösung 1:10 verdünnt) gewaschen.
3. Der Objektträger wurde jetzt für 5 min in der DAPI-Lösung gegengefärbt und danach für 5 min in 2 x SSC-Lösung gewaschen.

4. Zum Abschluß wurde der Objektträger mit etwas Antifade und einem großen Deckglas eingedeckt. Lagerung der Präparate im Dunkeln verhinderte vorzeitiges Ausbleichen.

2.3 Auswertung

Die Signale wurden am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit den entsprechenden Filtern (AHF, Tübingen, Deutschland) ausgewertet. Die Dokumentation und Darstellung (z.T. im Falschfarbenmodus) erfolgte mit dem ISIS-Programm der Firma MetaSystems (Altusheim, Deutschland).

2.3.1 Auswahl der Sonden und mögliche Signalmuster

Veränderungen von Genen, die mittels FISH-Diagnostik erfasst werden können, sind u.a. Brüche (Translokationen) und Änderungen der Anzahl (Duplikationen, Amplifikationen, Deletionen). Um diese Aberrationen erfassen zu können wurden die Komponenten der Sonden so gewählt, dass die Signale das Gen flankieren und zum Teil auch überspannen. Zur besseren Unterscheidung wurden bei den meisten Assays die Sonden auf der einen Seite des Gens rot und auf der anderen Seite grün markiert. Die Zentromer- bzw. Kontrollsonden wurden in blau gewählt. Aus technischen Gründen geschah dies beim *STK15*-Assay nicht. Hier wurden die beiden Sonden, die das Gen flankierten und überspannten, rot und die Zentromerkontrolle grün markiert.

Die Zusammensetzung der FISH-Assays erlaubt so verschiedene Signalmuster. Eine normale Zelle enthält von jedem Gen zwei intakte Kopien. Sie zeigt also zwei kolokalisierte rot-grüne und zwei blaue und im Fall des *STK15*-Assays zwei rote und zwei grüne Signale. Da die meisten HRS-Zellen tri- oder tetraploid sind, weisen diese entsprechend drei oder vier kolokalisierte Signale auf, ohne dass dies als Zugewinn im Vergleich zur Ploidie zu werten wäre.

Kommt es zu einem Bruchereignis innerhalb des Gens, werden die Signale getrennt und liegen weit auseinander.

Bei Duplikationen oder Amplifikationen eines Gens sind im cHL mehr kolokalisierte rot-grüne Signale zu erkennen, als nach der Ploidie des einzelnen Falles zu erwarten gewesen wären. Beim Verlust eines Gens oder Chromosoms sind entsprechend weniger Signale vorhanden. Je nachdem, welcher Teil eines Chromosoms amplifiziert ist, kann es auch zur Signalvermehrung in einer bestimmten Region kommen. Dies macht sich unter Umständen

durch eine Häufung der Signale nur einer Farbe des Assays bemerkbar. Abbildung 2 zeigt verschiedene mögliche Signalkonstellationen.

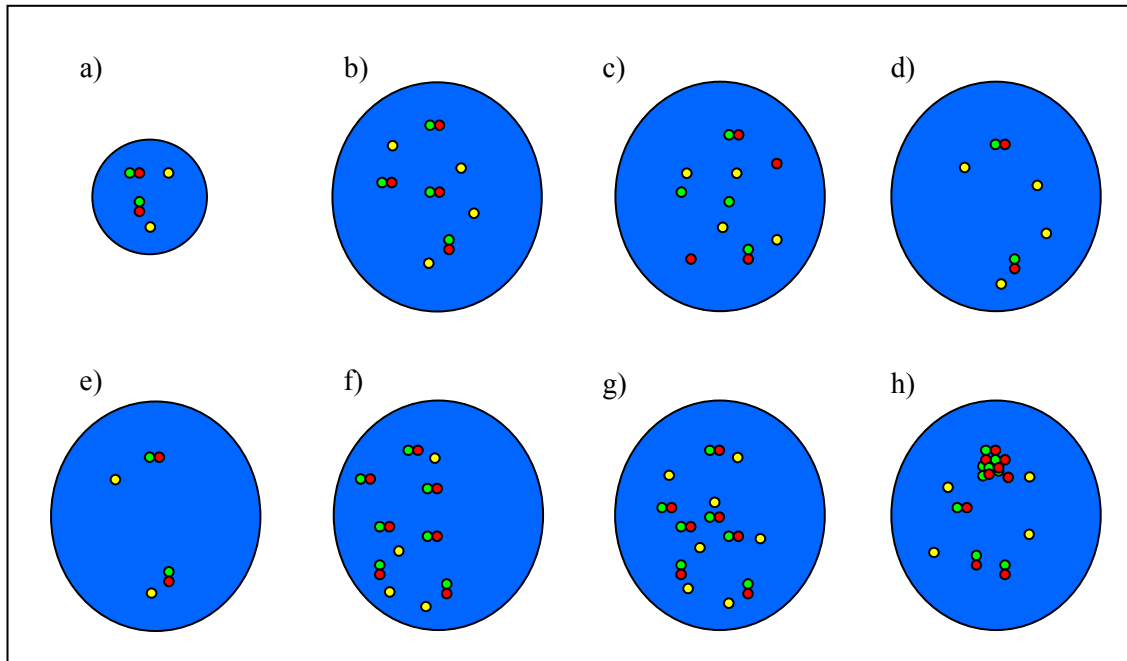


Abbildung 2: Mögliche Signalkonstellationen bei Verwendung bruchpunktflankierender FISH-Assays (rot/grün) mit Zentromerkontrolle (gelb)

- a) Normale diploide Zelle mit zwei kolokalisierten Signalen des untersuchten Genlokus und zwei Signalen der Zentromerkontrolle
- b) Tetraploide oder tetrasome HRS-Zelle mit vier kolokalisierten Signalen des untersuchten Genlokus und vier Signalen der Zentromerkontrolle
- c) Tetraploide oder tetrasome HRS-Zelle mit zwei kolokalisierten Signalen und zwei Bruchpunkten des untersuchten Genlokus (je zwei isolierte rote und grüne Signale) sowie vier Signalen der Zentromerkontrolle
- d) Tetraploide oder tetrasome HRS-Zelle mit zwei kolokalisierten Signalen des untersuchten Genlokus und vier Signalen der Zentromerkontrolle (entspricht bei HRS-Zellen in der Regel einem Verlust des Genlokus)
- e) Entweder diploide HRS-Zelle mit zwei kolokalisierten Signalen des untersuchten Genlokus und zwei Signalen der Zentromerkontrolle oder, falls eine Polyploidie bekannt ist, mit einem Verlust des gesamten Chromosoms
- f) Tetraploide oder tetrasome HRS-Zelle mit sieben kolokalisierten Signalen des untersuchten Genlokus und vier Signalen der Zentromerkontrolle (entspricht einem Zugewinn des Genlokus)
- g) Entweder heptaploide oder heptasome HRS-Zelle mit sieben kolokalisierten Signalen des untersuchten Genlokus und sieben Signalen der Zentromerkontrolle oder, falls eine geringere Ploidie bekannt ist, mit einem Zugewinn des gesamten Chromosoms
- h) Tetraploide oder tetrasome HRS-Zelle mit drei kolokalisierten Signalen und einer Amplifikation des untersuchten Genlokus sowie vier Signalen der Zentromerkontrolle

2.3.2 Nachweisgrenzen für Bruchereignisse, Zugewinne und Verluste

Zur Testung der Assays wurden Zellen aus dem peripheren Blut von fünf gesunden Probanden mit den FISH-Assays hybridisiert.

Um die Nachweisgrenzen der flankierenden Assays für Bruchereignisse festzulegen, wurde anschließend die Lage der zwei verschiedenfarbigen Signale eines Signalpaares zueinander beurteilt. Diese können fusionieren, nebeneinander liegen, mehr als einen, mehr als zwei oder

mehr als drei Signaldurchmesser voneinander entfernt liegen. Die Nachweisgrenze legt fest, ab welchem Prozentsatz betroffener Zellen von einem Bruchereignis ausgegangen werden kann. Sie ist definiert als Mittelwert der falsch positiven Ergebnisse in fünf gesunden Kontrollpersonen plus drei Standardabweichungen (Bentz et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde von einem intakten Genlokus ausgegangen, wenn das Signalpaar eine Distanz von nicht mehr als zwei Signaldurchmesser hatte. Ein Abstand von drei oder mehr Signaldurchmessern wurde als Split definiert (Abbildung 3). Dabei wurde immer das Signalpaar mit dem größten Signalabstand gewertet.

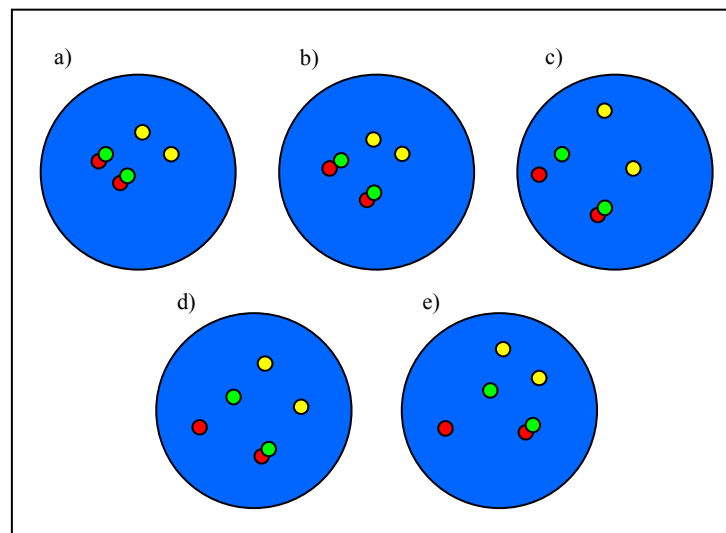


Abbildung 3: Definition eines Bruchpunktes bezogen auf den Abstand der bruchpunktflankierenden Signale zueinander

- a) Die beiden bruchpunktflankierenden Signale fusionieren. Es liegt kein Bruchereignis vor.
- b) Die beiden bruchpunktflankierenden Signale liegen nebeneinander. Zum Vergleich ist ein fusionierendes Signalpaar abgebildet. Es liegt kein Bruchereignis vor.
- c) Die beiden bruchpunktflankierenden Signale liegen einen Signaldurchmesser voneinander entfernt. Zum Vergleich ist ein fusionierendes Signalpaar abgebildet. Es liegt kein Bruchereignis vor.
- d) Die beiden bruchpunktflankierenden Signale liegen zwei Signaldurchmesser voneinander entfernt. Zum Vergleich ist ein fusionierendes Signalpaar abgebildet. Es liegt kein Bruchereignis vor.
- e) Die beiden bruchpunktflankierenden Signale liegen drei Signaldurchmesser voneinander entfernt. Zum Vergleich ist ein fusionierendes Signalpaar abgebildet. Ab diesem Abstand liegt ein Bruchereignis vor.

Um die Nachweisgrenzen für Zugewinne und Verluste festzulegen, wurde die Anzahl der Signale bestimmt. Eine normale Zelle mit jeweils zwei Chromosomen sollte zwei Signalpaare für das Gen und zwei Signale der Chromosomenkontrolle aufweisen.

Lagen mehr Signalpaare vor als Kontrollsignale (z.B. 3 rot-grün, 2 blau) wurde dies ebenso als Zugewinn (im Beispiel im Sinne einer Duplikation) gewertet wie eine Zunahme aller Signale (z.B. 3 rot-grün, 3 blau, im Sinne einer Trisomie). Dementsprechend lag sowohl ein Verlust vor, wenn die Zahl der Kontrollen die der Doppelsignale überstieg (Deletion) (z.B. 1

rot-grün, 2 blau) als auch wenn insgesamt weniger Signale vorhanden waren (z.B. 1 rot-grün, 1 blau, im Sinne einer Monosomie) (s. Abbildung 2).

Auch hier sind die Grenzen definiert als Mittelwert der falsch positiven Ergebnisse plus drei Standardabweichungen in fünf gesunden Probanden.

3 Ergebnisse

Die Entstehungsmechanismen des cHL sind bisher nicht ausreichend geklärt. Das cHL ist ein malignes B-Zell-Lymphom, das unter anderem häufig eine konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade aufweist. Diese konstitutive Aktivierung könnte durch eine Fehlregulierung der durch sie gesteuerten Zellfunktionen zur Pathogenese beitragen.

Weiterhin zeichnen sich die HRS-Zellen durch eine ausgeprägte genetische Instabilität aus. Diese könnte durch Fehlregulationen bei der Zellteilung entstehen. Bei der Zellteilung haben Zentrosomen eine zentrale Funktion. Für das cHL konnten bereits Zentrosomenveränderungen nachgewiesen werden.

Diese wichtigen Vorgänge der Zelle werden u.a. durch die Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade *JAK2* (9p24), *STAT2* (12q13), *STAT6* (12q13), *STAT3/5A/5B* (17q21) oder auch *IL6ST* (5q11) und die an der Zentrosomenfunktion beteiligten Gene *STK15* (20q13) und *PLK1* (16p12) reguliert. Interessanterweise belegen CGH-Untersuchungen, dass Zugewinne in den Regionen, die die genannten Gene enthalten, d.h. 5q, 9p, 12q, 16p, 17q und 20q im cHL häufig sind (Joos et al., 2002).

Die vorliegende Arbeit sollte mittels FISH-Analyse klären, ob die Aktivierung der JAK/STAT-Kaskade im cHL durch chromosomale Aberrationen der Genloci bedingt ist, die für die einzelnen Komponenten kodieren und ob Veränderungen der Genorte *STK15* und *PLK1* die chromosomale Instabilität der HRS-Zellen und die Zentrosomenaberrationen erklären könnten.

3.1 Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Assays

Für die FISH-Assays wurden zunächst aus der UCSC Genome Bioinformatics Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>) je zwei Klone ausgewählt, die das entsprechende Gen flankierten.

Nach der DNA-Extraktion erfolgte die Markierung in der gewünschten Farbe. Zur Testung wurden Metaphase-Kerne gesunder Probanden mit den Assays hybridisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Um für die späteren Analysen verwertbar zu sein, mussten die Sonden helle und kompakte Signale ergeben. Außerdem durften sie nur an die Zielregion binden, und der Hintergrund sollte möglichst keine stärkeren fluoreszierenden Artefakte aufweisen.

Nach den ersten Kontrollhybridisierungen zeigte sich, dass einige Änderungen nötig waren. So wiesen einige Klone Kreuzhybridisierungen mit anderen Chromosomen auf. Die Zahl der Signale entspricht in solchen Fällen nicht der Anzahl der Kopien des zu untersuchenden Gens. Da in dieser Arbeit hauptsächlich die Interphasekerne der HRS-Zellen untersucht wurden, in denen eine Unterscheidung zwischen einzelnen Chromosomen nicht möglich ist, erlauben solche kreuzhybridisierenden Klone keine eindeutigen Ergebnisse. Die entsprechenden Klone mussten ausgetauscht werden. Weitere Klone ergaben in der Kontrollhybridisierung keine kräftigen Signale. Auch diese waren für die Auswertung nicht brauchbar und mussten ersetzt werden.

Es wurden insgesamt 33 Bakterienklone präpariert und getestet. Für die in dieser Arbeit neu etablierten fünf FISH-Assays für die Gene *STAT2*, *STAT6*, *STAT3/5*, *PLK1* und *STK15* wurden letztlich 14 Klone ausgewählt. Tabelle 7 auf Seite 30 zeigt alle getesteten Klone. Die kreuzhybridisierenden Klone sind entsprechend gekennzeichnet.

Die Herstellung des *STK15*-Assays gestaltete sich aufwendiger. Die beiden ausgewählten Klone kreuzhybridisierten auch nach Ersatz des chimären Klons. Dies trat bei beiden Klonen vermehrt auf, wenn diese grün markiert waren. Deshalb wurden die beiden Klone rot markiert. Aufgrund der Literaturrecherche (Katayama et al., 2001; Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998) wurden im Bereich des *STK15*-Gens weniger Brüche als vielmehr Amplifikationen erwartet, weshalb dieses Vorgehen vertretbar war. Die Menge der Cot-DNA wurde erhöht, weil die Sonde auch nach Ersatz des chimären Klones kreuzhybridisierte. Die Cot-DNA deckt sich wiederholende DNA-Abschnitte, so genannte repetitive Sequenzen, ab. Eine Sonde für eine Genregion, die viele repetitive Sequenzen enthält, würde ohne Cot-DNA an vielen Stellen der DNA binden. Die Erhöhung der Cot-DNA sollte diesen Effekt abschwächen. Eine kommerziell erhältliche Zentromersonde für das Chromosom 20 war weder in blau noch in grün verfügbar, so dass eine selbst hergestellte grün markierte Zentromerprobe (Plasmid pZ20) verwendet wurde.

Für die Assays für *STAT2* und *STAT6* wurde eine blau markierte Kontrollprobe für das Chromosom 12 benötigt. Eine Zentromerkontrolle für das Chromosom 12 war in blau kommerziell nicht erhältlich. Zunächst wurde das blau markierte Plasmid pBR12 (Zentromer Chromosom 12) getestet. Die Kontrollen zeigten hier nur sehr schwache spezifische Signale dafür aber sehr viel unspezifischen Hintergrund. Die daraufhin verwendeten Klone RP11-434C1 und RP11-525I3 (12p) ergaben nicht auswertbar schwache blaue Signale. Erst die

gemeinsam markierten Klone RP11-615I16, RP11-252K13 und RP11-100C20 (12p) erbrachten die für die Auswertung als Kontrolle für das Chromosoms 12 nötigen blauen Signale.

Tabelle 7: Ergebnisse der Austestung der Klone für die FISH

Adresse	Bibliothek	Typ	Chromosomale Lokalisation	Kreuzhybridisierung
2227I18	CTD	BAC	5q11.2 ²	
332C17	RP11	BAC	5q11.2 ²	
574F11	RP11	BAC	9p24.1 ²	
140C18	RP11	BAC	9p24.1 ²	
39K24	RP11	BAC	9p24.1 ²	
125K10	RP11	BAC	9p24.1 ²	
6J24	RP11	BAC	9p24.1 ²	
525I3	RP11	BAC	12p13.2	
434C1	RP11	BAC	12p13.2	
615I16	RP11	BAC	12p12.1	
100C20	RP11	BAC	12p12.1	
252K13	RP11	BAC	12p12.1	
114G22	RP11	BAC	12p12.1	
1060J15	RP11	BAC	12p11	Kreuzhybridisierung
268P4	RP11	BAC	12p12.1	
64J22	RP11	BAC	12p12.1	Kreuzhybridisierung
666F17	RP11	BAC	12p12.1	
64N21	RP11	BAC	12p12.1	
pBR 12		Plasmid	12 Zentromer	
973D8	RP11	BAC	12q13.2	
112B10	RP11	BAC	12q13.3	
507N3	RP11	BAC	12q13.3	
145A4	RP11	BAC	12q13.3	
474N8	RP11	BAC	12q13.3	Kreuzhybridisierung
183H16	RP11	BAC	12q13.3	Kreuzhybridisierung
176O5	RP11	BAC	12q14.13	
1077C21	RP11	BAC	12q13.3	Kreuzhybridisierung ³
936I7	RP11	BAC	12q13.3	
184F14	RP11	BAC	16p12.2	
2385L22	CTD		16p12.2	
156E6	RP11	BAC	17q21.2	
400F19	RP11	BAC	17q21.2	
194N12	RP11	BAC	17q21.2	
1151G10	RP11	BAC	17q21.2	
242D8	RP11	BAC	17q21.31	
266I24	RP11	BAC	17q21.31	
380D15	RP11	BAC	20q13.31	
1167H4	RP5	PAC	20q13.31	
1153D9	RP5	PAC	20q13.31	Kreuzhybridisierung
pZ 20		Plasmid	20 Zentromer	

BAC = künstliches Bakterienchromosom, PAC = vom Phagen P1 abgeleitetes künstliches Chromosom
CTD = Caltech library D, RP = Roswell Park Cancer Institute

² Diese Klone waren bereits im Vorfeld von unserer Arbeitsgruppe evaluiert worden.

³ Dieser Klon konnte unter Berücksichtigung der Kreuzhybridisierung ausgewertet werden.

Die endgültige Zusammensetzung der einzelnen Assays ist nachfolgend in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Endgültige Zusammensetzung der verwendeten FISH-Assays

Gen	Zentromerische Sonde	Telomerische Sonde	Kontrollsonde
<i>IL6ST</i> (5q11)	RP11-332C17	CTD-2227I18	Keine
<i>JAK2</i> (9p24)	RP11-140C18 + RP11-574F11 + RP-11 39K24	RP11-125K10 + RP11-6J24	CEP 9 (Zentromer 9)
<i>STAT2</i> (12q13)	RP11-973D8	RP11-507N3	RP11-615I16 + RP11-100C20 + RP11-252K13 (12p)
<i>STAT6</i> (12q13)	RP11-145A4	RP11-176O5	RP11-615I16 + RP11-100C20 + RP11-252K13 (12p)
<i>STAT3/5</i> (17q21)	RP11-156E6	RP11-400F19	CEP 17 (Zentromer 17)
<i>PLK1</i> (16p12)	CTD-2385L22 (überspannend)	RP11-184F14 (überspannend)	CEP 16 (Zentromer 16)
<i>STK15</i> (20q13)	RP11-380D15	RP5-1167H4 (überspannend)	pZ20 (Zentromer 20)

Grün gedruckte Klone wurden mit SG grün markiert, rot gedruckte Klone wurden mit SO rot markiert und blau gedruckte Klone wurden mit SA oder DEAC blau markiert. Diejenigen Klone, die das zu untersuchende Gen überspannen sind entsprechend gekennzeichnet.

3.2 Kontrollen und Nachweisgrenzen

Wie oben angegeben wurden die Nachweisgrenzen der einzelnen Assays bestimmt, um die Qualität der Assays zu testen. Dazu wurden Zellen aus dem peripheren Blut von fünf gesunden Probanden mit den FISH-Assays hybridisiert.

Nachweisgrenzen für Bruchereignisse

Es wurde die Lage der zwei verschiedenfarbigen Signale eines Signalpaares zueinander beurteilt. Wie bereits ausgeführt wurde von einem intakten Genlokus ausgegangen, wenn das Signalpaar nicht mehr als zwei Signaldurchmesser voneinander entfernt lag. Tabelle 9 zeigt die Nachweisgrenzen für Bruchereignisse der bruchpunktf flankierenden Assays.

Da es sich bei dem Assay für *STK15* um einen überspannenden Assay handelt, wurde für diesen keine Nachweisgrenze hinsichtlich eines Bruchereignisses festgelegt.

Tabelle 9: Nachweisgrenzen für Bruchereignisse der eingesetzten bruchpunktflankierenden Assays

Assay	Anzahl Kontrollen	Ausgewertete Signalpaare pro Kontrolle, Spannweite (Median)	Prozentsatz falsch positive Signalpaare (Mittelwert ⁴ /Standardabweichung ⁴ (SD))	Nachweisgrenze für Bruchereignisse ⁴ (Mittelwert plus drei SD)
<i>IL6ST</i>	5	200-225 (203)	0%-0,4% (0,1%/0,2%)	0,6%
<i>JAK2</i>	5	199-211 (202)	0%-0,5% (0,1%/0,2%)	0,7%
<i>STAT2</i>	5	198-209 (206)	0,4%-1,4% (0,8%/0,4%)	2,1%
<i>STAT6</i>	5	200-211 (205)	7,7%-10,8% (9,6%/1,2%)	13,1%
<i>STAT3/5</i>	5	403-416 (409)	0,2%-0,6% (0,3%/0,2%)	0,9%
<i>PLK1</i>	5	194-208 (200)	0%-0,5% (0,2%/0,3%)	1,0%

Nachweisgrenzen für Zugewinne und Verluste

Um die Nachweisgrenzen für Zugewinne und Verluste festzulegen, wurden die Anzahl der Signale bestimmt. Tabelle 10 zeigt die Nachweisgrenzen der in dieser Arbeit verwendeten Assays für Zugewinne, Tabelle 11 deren Nachweisgrenzen für Verluste.

Tabelle 10: Nachweisgrenzen der eingesetzten Assays für Zugewinne

Assay	Anzahl Kontrollen	Ausgewertete Zellen pro Kontrolle, Spannweite (Median)	Prozentsatz falsch positive Zellen (Mittelwert ⁴ /Standardabweichung ⁴ (SD))	Nachweisgrenze für Zugewinne ⁴ (Mittelwert plus drei SD)
<i>IL6ST</i>	5	100 (100)	0%-2,0% (0,4%/0,9%)	3,1%
<i>JAK2</i>	5	100-104 (101)	0%-3,0% (2,0%/1,2%)	5,6%
<i>STAT2</i>	5	99-100 (99)	2,0%-14,1% (6,5%/4,6%)	20,3%
<i>STAT6</i>	5	98-100 (98)	4,1%-13,1% (6,5%/3,8%)	17,9%
<i>STAT3/5</i>	5	196-209 (202)	3,4%-6,7% (5,3%/1,2%)	9,0%
<i>PLK1</i>	5	93-99 (96)	5,1%-11,5% (8,5%/3,1%)	17,7%
<i>STK15</i>	5	200-209 (207)	1,9%-5,8% (3,7%/1,6%)	8,3%

⁴ gerundet

Tabelle 11: Nachweisgrenzen der eingesetzten Assays für Verluste

Assay	Anzahl Kontrollen	Ausgewertete Zellen pro Kontrolle, Spannweite (Median)	Prozentsatz falsch positive Zellen (Mittelwert ⁵ /Standardabweichung ⁵ (SD))	Nachweisgrenze für Verluste ⁵ (Mittelwert plus drei SD)
<i>IL6ST</i>	5	100 (100)	0%-2,0% (0,6%/0,9%)	3,3%
<i>JAK2</i>	5	100-104 (101)	0%	0%
<i>STAT2</i>	5	99-100 (99)	0%-6,1% (2,2%/2,3%)	9,1%
<i>STAT6</i>	5	98-100 (98)	0%-4,1% (1,2%/1,7%)	6,2%
<i>STAT3/5</i>	5	196-209 (202)	2,0%-4,5% (3,8%/1,0)	6,7%
<i>PLK1</i>	5	93-99 (96)	0%-4,1% (2,3%/1,5%)	6,8%
<i>STK15</i>	5	200-209 (207)	1,5%-5,8% (3,3%/1,6%)	8,2%

3.3 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Untersuchungen an klassischen Hodgkin-Lymphomen

Es wurde Tumormaterial von 36 Patienten mit cHL mit den FISH-Assays für die Gene *IL6ST*, *JAK2*, *STAT2*, *STAT6*, *STAT3/5A/5B*, *PLK* und *STK15* untersucht. Von diesen 36 Fällen waren 21 auswertbar. Die hohe Ausfallquote lässt sich durch die geringe Zahl an Tumorzellen im Untersuchungsgut erklären. Hinzu kam in einem Teil der Fälle stark behindernder Hintergrund durch autofluoreszierende Granula der beim cHL häufig vorkommenden eosinophilen Granulozyten. In die Bewertung gingen nur die Fälle ein, die pro Sonde mindestens eine nach Form und Größe eindeutige HRS-Zelle aufwiesen.

Zunächst war vorgesehen, die Zahl der Signale für einen Genlocus mit der Signalzahl für die interne Kontrolle zu vergleichen, um herauszufinden, ob eine Deletion, ein Zugewinn oder eine Amplifikation vorliegt. Es stellte sich heraus, dass oftmals Genort und Chromosomenkontrolle gleichsinnig verändert vorlagen und so keine aussagekräftigen Ergebnisse zu gewinnen waren. Dieses Problem wurde gelöst, indem die Anzahl der Signale eines Assays im Verhältnis zur im jeweiligen Fall vorliegenden Anzahl der homologen Chromosomensätze (Ploidie) betrachtet wurde.

Hierzu musste zunächst die Ploidie der einzelnen Fälle geschätzt werden. Dies geschah, indem die Signale der sieben Assays in den Zellkernen jedes Falles gezählt wurden. Anschließend wurde der Lokus-spezifische Median ermittelt (s. Tabelle 1 des Anhangs).

⁵ gerundet

Daraus wiederum konnte der globale Median dieser Lokus-spezifischen Mediane für die einzelnen Fälle ermittelt werden (Tabelle 12). Dieser globale Median wurde als Ploidie definiert. Nun konnte der Lokus-spezifische Median auf die Ploidie bezogen werden.

Tabelle 12: Lokus-spezifischer Median der einzelnen Assays für jeden Fall (und jede Zelllinie) und der daraus ermittelte globale Median (= Ploidie) der untersuchten Fälle (und Zelllinien)

Fall	<i>IL6ST</i> (lokus-spezifischer Median)	<i>JAK2</i> (lokus-spezifischer Median)	<i>STAT2/6</i> (lokus-spezifischer Median)	<i>STAT3/5</i> (lokus-spezifischer Median)	<i>PLK1</i> (lokus-spezifischer Median)	<i>STK15</i> (lokus-spezifischer Median)	Globaler Median = Ploidie
1	4	3	4	4	5	4	4
2	3	6	4	3	4	4	4
3	4	4	4	4	4	3	4
4	2	2	3	4	3	2	2,5
5	4	3	5	3	3	6	3,5
6	4	7	5	3	3	4	4
7	4	8	3	4,5	4	3	4
8	4	9	4	4	4	4	4
9	2	5	2	2	2	2	2
10	4	7	3	4	3	4	4
11	4	3	4	4	3	3	3,5
12	3	9	8	4	3	3	3,5
13	5	8,5	5	4	4	4	4,5
14	4	2	5	4	3	4	4
15	3	2	2	2	2	2	2
16	3	3	3	3	3	3	3
17	5	3	6	3	5	4	4,5
18	5	3	5	5	4	3	4,5
19	3	2	5	3	4	4	3,5
20	4	4	4	4	4	4	4
21	3	5	4	4	4	3	4
HDLM-2	1	amp. ⁶	2	2	2	1	2
L428	3SO/5SG	6	5	5	3	4	4,5
KM-H2	3	4	4	3	4	2	3,5
L1236	3	6	<i>STAT2</i> : 4 <i>STAT6</i> : 2SO/SG amp. ⁶	3	3	4	3,5

⁶ amp. = amplifiziert. Amplifikationen wurden in die Ermittlung der Ploidie nicht einbezogen, da hier offensichtlich massive Veränderungen der Genkopienzahl vorlagen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse für jeden Assay einzeln aufgeführt. Es wurde der lokus-spezifische Median der einzelnen Assays entsprechend der Formel 1 auf die Ploidie des Falles bezogen.

Formel 1:

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Lokus-spezifischer Median}}{\text{Ploidie}} \quad \left\{ \begin{array}{l} \leq 0,7: \text{ Deletion} \\ > 0,7 - < 1,3: \text{ balanciert} \\ \geq 1,3 - < 2,0: \text{ Zugewinn} \\ \geq 2,0: \text{ Amplifikation} \end{array} \right.$$

Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der auf diese Weise ermittelten Quotienten. Hervorgehoben sind diejenigen Ergebnisse, die per definitionem von einem balancierten Ergebnis abweichen. Als Zugewinn wurde ein Quotient von 1,3-1,9, ein Quotient von ≥ 2 als Amplifikation definiert. Ein Verlust lag entsprechend bei einem Quotienten von $\leq 0,7$ vor.

3.3.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen von klassischen Hodgkin-Lymphomen und Zelllinien für die Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade

IL6ST-Locus:

Von 21 Fällen wiesen 20 (95%) weder einen Zugewinn noch einen Verlust auf. In einem Fall (5%) konnte ein Zugewinn gefunden werden. Bruchpunkte ließen sich nicht ermitteln.

Eine Zelllinie (HDLM-2) wies einen Verlust des Genortes auf. In den Zelllinien KM-H2 und L1236 konnten keine Veränderungen gefunden werden. Die Zelllinie L428 zeigte zwei Splits der grünen Signale (Klon RP11-332C17). Es fanden sich hier im Median drei rote und fünf grüne Signale, was neben dem Bruch im Verhältnis zur Ploidie auch einen Verlust der roten Sonde bedeutet. Die anderen Zelllinien zeigten keine Bruchereignisse.

Tabelle 13: Quotient aus lokus-spezifischem Median der einzelnen Assays und der ermittelten Ploidie des Falles (s. Formel 1)

Fall	ermittelte Ploidie	<i>IL6ST</i>	<i>JAK2</i>	<i>STAT2</i>	<i>STAT6</i>	<i>STAT3/5</i>	<i>PLK1</i>	<i>STK15</i>
1	4	1	0,75	1	1	1	1,25	1
2	4	0,75	1,5	1	1	0,75	1	1
3	4	1	1	1	1	1	1	0,75
4	2,5	0,8	0,8	1,2	1,2	1,6	1,2	0,8
5	3,5	1,14	0,86	1,43	1,43	0,86	0,86	1,71
6	4	1	1,75	1,25	1,25	0,75	0,75	1
7	4	1	2	0,75	0,75	1,13	1	0,75
8	4	1	2,25	1	1	1	1	1
9	2	1	2,5	1	1	1	1	1
10	4	1	1,75	0,75	0,75	1	0,75	1
11	3,5	1,14	0,86	1,14	1,14	1,14	0,86	0,86
12	3,5	0,86	2,57	2,29	2,29	1,14	0,86	0,86
13	4,5	1,11	1,89	1,11	1,11	0,89	0,89	0,89
14	4	1	0,5	1,25	1,25	1	0,75	1
15	2	1,5	1	1	1	1	1	1
16	3	1	1	1	1	1	1	1
17	4,5	1,11	0,67	1,33	1,33	0,67	1,11	0,89
18	4,5	1,11	0,67	1,11	1,11	1,11	0,89	0,67
19	3,5	0,86	0,67	1,43	1,43	0,86	1,14	1,14
20	4	1	1	1	1	1	1	1
21	4	0,75	1,25	1	1	1	1	0,75
HDLM-2	2	0,5	>2	1	1	1 ⁷	1	0,5
L428	4,5	0,67 ⁸	1,33	1,11	1,11	1,11	0,67	0,89
KM-H2	3,5	0,86	1,14	1,14	1,14	0,86	1,14	0,57
L1236	3,5	0,86	2	1,14	0,67 ⁹	0,86	0,86	1,14

Hierbei wurde ein Quotient von 1,30-1,99 als Zugewinn (hellgrün), ein Quotient > 1,99 als Amplifikation (dunkelgrün) und ein Quotient ≤ 0,70 als Verlust (rot) gewertet.

⁷ Diese Zelllinie zeigte im Median 2 Signale der in SO markierten Sonde und 3 Signale der in SG markierten Sonde, die sich nach weiterführenden Untersuchungen als Split herausstellten.

⁸ Diese Zelllinie wies 2 Splits der SG markierten Sonde auf.

⁹ Dieser Wert gilt nur für die SO markierte Sonde. Die SG markierte Sonde war hier amplifiziert.

JAK2-Locus

Acht der 21 Fälle (38%) wiesen einen Zugewinn genetischen Materials auf (s. Abbildung 4b). Von diesen zeigten vier Fälle (19%) (Fälle Nr. 7, 8, 9 und 12) eine Amplifikation des *JAK2*-Locus. Interessanterweise konnte in ebenfalls vier Fällen (19%) ein Verlust des Genortes gefunden werden. Von den 21 Fällen zeigten 9 (43%) keine Verluste oder Zugewinne.

Zusätzliche Signale für den *JAK2*-Locus zeigten drei der vier Zelllinien (HDLM-2, L428 und L1236), wobei HDLM-2 und L1236 eine Amplifikation aufwiesen. In der Zelllinie HDLM-2 fiel weiterhin ein Bruchpunkt auf. Neben der Amplifikation und drei weiteren kolokalisierten rot-grünen Signalen für den *JAK2*-Assay zeigte sich in der Zelllinie HDLM-2 durchgehend ein isoliertes grünes Signal.

STAT2-Locus:

Von 21 Fällen wiesen 17 (81%) keine Veränderungen auf. Vier Fälle (19%) zeigten einen Zugewinn (s. Abbildung 4c) wobei in einem Fall (Fall Nr.12) (5%) eine Amplifikation gefunden wurde. Hier konnte neben der *STAT2*-Amplifikation auch eine deutliche Amplifikation der Kontrolle auf 12p gefunden werden. Dies wiederholte sich bei Verwendung des *STAT6*-Assays, da für beide Assays dieselbe Kontrolle genutzt wurde. Ein Bruchereignis lag in keinem Fall vor

Keine der untersuchten Zelllinien wies für diesen Assay Veränderungen auf.

STAT6-Locus:

Wie auch beim eng benachbarten *STAT2*-Gen zeigten 17 von 21 Fällen (81%) keine Veränderungen. In vier Fällen (19%) konnte auch für den *STAT6*-Genort ein Zugewinn gefunden werden. Fall Nr.12 (5%) wies ebenso eine Amplifikation auf.

Auch mit dem *STAT6*-Assay fand sich in diesem Fall die oben bereits erwähnte 12p-Amplifikation.

Ein Bruchereignis konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Der *STAT6*-Locus war in den Zelllinien HDLM-2, L428 und KM-H2 nicht verändert. Die Zelllinie L1236 zeigte eine auffällige Signalkonstellation. Im Median fanden sich zwei Signale des rot markierten Klons RP11-176O5, dies entspricht einem Verlust desselben, und

im Median sechs Signale der 12p-Kontrolle. Der grün markierte Klons RP11-145A4 zeigte eine Amplifikation. Ein Bruchereignis fand nicht statt.

STAT3/5-Locus:

Von 21 Fällen zeigten 19 (90%) keinerlei Auffälligkeiten. Ein Fall (5%) wies einen Zugewinn genetischen Materials auf. In ebenso einem Fall (5%) konnte ein Verlust gefunden werden. Ein Bruchereignis fand in keinem Fall statt.

Die Zelllinie HDLM-2 fiel durch im Median drei Signale des grün markierten Klons RP11-400F19 und im Median zwei Signale des rot markierten Klons RP11-156E6 auf. Weiterführende Untersuchungen legten einen Bruchpunkt im Bereich des grün markierten Klons nahe (s.u.). Die anderen Zelllinien waren in Bezug auf den *STAT3/5*-Assay unauffällig.

Die folgenden Tabellen (Tabellen 14 und 15) fassen die Ergebnisse der Assays für die Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade in Primärfällen und Zelllinien zusammen.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der Assays in Primärfällen für die Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade

Genlocus	Fälle ausgewertet	Zahl der beurteilten Kerne min-max (Median)	Keine Veränderungen, Fälle (%)	Zugewinn, Fälle (%)	Amplifikation, Fälle (%)	Verlust, Fälle (%)	Bruchpunkt, Fälle (%)	Signale pro Zellkern min-max
<i>IL6ST</i>	21	1-190 (13)	20 (95%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2-8
<i>JAK2</i>	21	2-101 (14)	9 (43%)	4 (19%)	4 (19%)	4 (19%)	0 (0%)	2-15
<i>STAT2</i>	21	1-112 (10)	17 (81%)	3 (14%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	2-14
<i>STAT6</i>	21	2-93 (9)	17 (81%)	3 (14%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	2-13
<i>STAT3/5</i>	21	2-135 (11)	19 (90%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	1-9

Tabelle 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Assays in den Zelllinien für die Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade. Da in den einzelnen Zelllinien zum Teil verschiedene Veränderungen gleichzeitig vorlagen, muss die Summe der jeweils betroffenen Fälle nicht der Gesamtzahl ausgewerteter Zelllinien entsprechen.

Genlocus	Zelllinien ausgewertet	Keine Veränderungen	Zugewinn	Verlust	Amplifikation	Bruchpunkt
<i>IL6ST</i>	4	2	0	2 ¹⁰	0	1 ¹⁰
<i>JAK2</i>	4	1	1	0	2 ¹¹	1 ¹¹
<i>STAT2</i>	4	4	0	0	0	0
<i>STAT6</i>	4	3	0	1 ¹²	1 ¹²	0
<i>STAT3/5</i>	4	3	0	0	0	1 ¹³

3.3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen an klassischen Hodgkin-Lymphomen und Zelllinien für die Zentrosomen-Gene *PLK1* und *STK15*

PLK1-Locus:

In keinem der Fälle konnten Zugewinne oder Verluste gefunden werden. Ebenso zeigte sich kein Bruchereignis im *PLK1*-Gen.

Die Zelllinie L428 zeigte einen Verlust des Genorts. Die anderen Zelllinien wiesen keine Auffälligkeiten auf. Bruchpunkte fanden sich auch in den Zelllinien nicht.

STK15-Locus:

Von den 21 Fällen zeigten 19 (90%) keine Auffälligkeiten. In einem Fall (5%) konnte ein Zugewinn gefunden werden. Ebenso fand sich in einem Fall (5%) ein Verlust genetischen Materials. Einen Bruchpunkt wies keiner der untersuchten Fälle auf.

In den Zelllinien HDLM-2 und KM-H2 fand sich ein Verlust des *STK15*-Locus. Die Zelllinien L1236 und L428 waren unauffällig. Auch hier fanden sich keine Bruchereignisse.

¹⁰ Die Zelllinie L428 wies 2 Splits der grün markierten Sonde auf.

¹¹ Zusätzlich zur Amplifikation wies die Zelllinie HDLM-2 noch einen Split der grün markierten Sonde auf.

¹² Die Zelllinie L1236 wies einen Verlust der rot markierten Sonde und eine Amplifikation der grün markierten Sonde auf.

¹³ Die Zelllinie HDLM-2 wies einen isolierten Split der grün markierten Sonde auf.

In den folgenden Tabellen (Tabellen 16 und 17) sind die Ergebnisse für die Zentrosomengene *PLK1* und *STK15* in den Primärfällen und den Zelllinien zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Assays in Primärfällen für die Zentrosomengene *PLK1* und *STK15*

Genlokus	Fälle ausgewertet	Zahl der beurteilten Kerne min-max (Median)	Keine Veränderungen, Fälle (%)	Zugewinn, Fälle (%)	Amplifikation, Fälle (%)	Verlust, Fälle (%)	Bruchpunkt, Fälle (%)	Signale pro Zellkern (Streuungsbreite)
<i>PLK1</i>	21	1-110 (12)	21 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2-8
<i>STK15</i>	21	2-75 (11)	19 (90%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	2-11

Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Assays in den Zelllinien für die Zentrosomengene *PLK1* und *STK15*

Genlokus	Zelllinien ausgewertet	Keine Veränderungen	Zugewinn	Verlust	Amplifikation	Bruchpunkte
<i>PLK1</i>	4	3	0	1	0	0
<i>STK15</i>	4	2	0	2	0	0

Abbildung 4 zeigt einige Beispiele der Signalmuster der einzelnen FISH-Assays in verschiedenen cHL-Primärfällen.

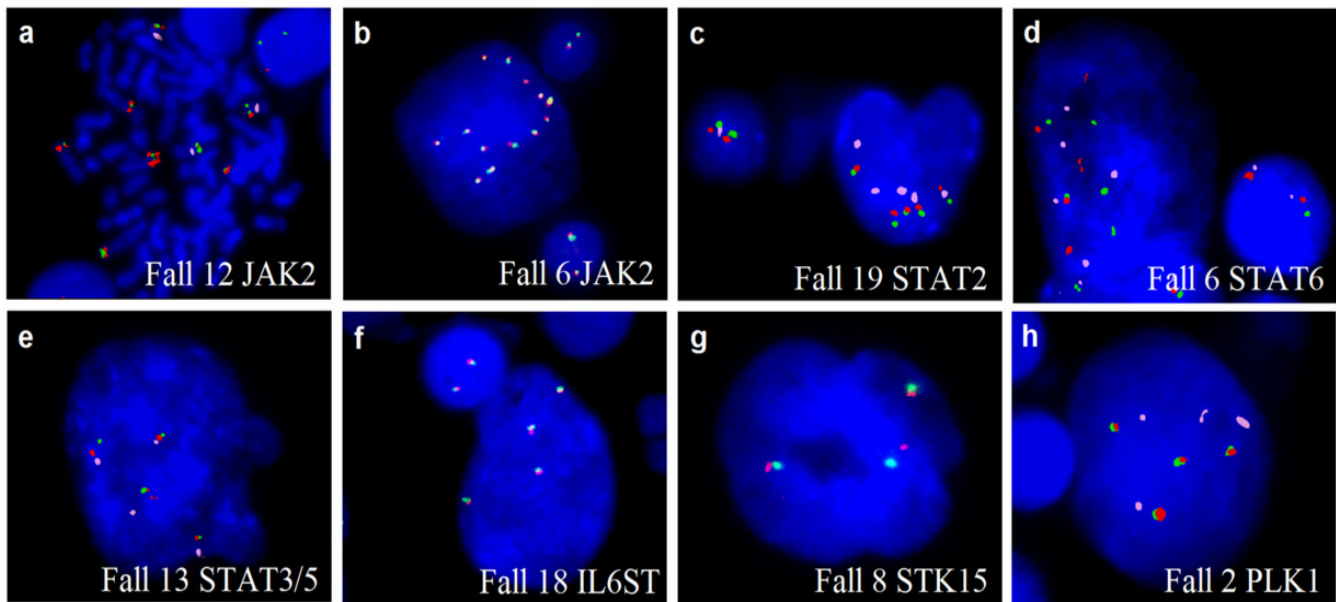


Abbildung 4: Beispiele der Signalmuster der einzelnen FISH-Assays in verschiedenen cHL-Primärfällen. Beschrieben ist immer der große HRS-Zellkern im Bildausschnitt

- a) Seltener Fall einer HRS-Zell-Metaphase mit einer *JAK2*-Amplifikation. Der Fall hat eine Ploidie von 3,5. Es finden sich 9 Kopien von *JAK2* in dieser Metaphase, was einen Quotienten von 2,57 und damit eine Amplifikation ergibt.
- b) HRS-Zelle mit einer *JAK2*-Amplifikation. Der Fall ist tetraploid. In diesem Zellkern finden sich 13 Kopien von *JAK2*, was einen Quotienten von 3,25 ergibt, also eine Amplifikation. Für *JAK2* lag in den meisten Zellen des Falls jedoch ein Zugewinn und keine Amplifikation vor. Dies lässt sich durch die hohe Varianz der Signale innerhalb eines Falles erklären (s.u.)
- c) HRS-Zelle mit einem *STAT2*-Zugewinn. Für den Fall wurde eine Ploidie von 3,5 ermittelt. In der Zelle liegen 5 Kopien von *STAT2* vor. Dies ergibt einem Quotienten von 1,43, was einem Zugewinn entspricht.
- d) HRS-Zelle mit fünf Kopien des *STAT6*-Genlokus. Da der Fall 6 tetraploid ist, war dies nicht als Zugewinn zu werten (Quotient 1,25). Nebenbefundlich findet sich in dieser Zelle dreimal eine Signalkonstellation, die auf einen Bruch im *STAT6*-Gen hinweist (Distanz der rot-grünen Signale mehr als 2 Signaldurchmesser), wobei dies in diesem Fall nicht gehäuft vorkam.
- e) HRS-Zelle mit vier Kopien des *STAT3/5*-Lokus. Die für den Fall ermittelte Ploidie lag bei 4,5. Es liegt kein Zugewinn oder Verlust vor (Quotient 0,89).
- f) HRS-Zelle mit vier Kopien des *IL6ST*-Lokus. Die für den Fall ermittelte Ploidie lag bei 4,5. Es liegt kein Zugewinn oder Verlust vor (Quotient 0,89).
- g) HRS-Zelle mit drei Kopien des *STK15*-Lokus. Die für den Fall ermittelte Ploidie lag bei 4. Es liegt kein Zugewinn oder Verlust vor (Quotient 0,75).
- h) HRS-Zelle mit vier Kopien des *PLK1*-Lokus. Die für den Fall ermittelte Ploidie lag bei 4. Es liegt kein Zugewinn oder Verlust vor (Quotient 1).

Aus technischen Gründen sind die blauen Kontrollsonden als Falschfarbe in pink dargestellt.

3.4 Varianz der Signale innerhalb eines Falles

Ein bekanntes Phänomen im cHL ist die chromosomale Instabilität mit hochkomplexen Karyotypen und intraklonaler Variabilität. Dies zeigt sich auch anhand der Ergebnisse dieser Arbeit. So variiert die Anzahl der gefundenen Signale in den einzelnen Zellkernen eines Falles zum Teil beträchtlich. Hierbei zeigt sich auch, dass offensichtlich einige Genregionen instabiler sind als andere. Um die Varianz der Signale innerhalb eines Falles zu ermitteln, wurde für jeden Assay die Differenz zwischen der höchsten Anzahl gezählter Signale in einem Zellkern und der niedrigsten Zahl gezählter Signale in einem Zellkern desselben Falles

ermittelt (Differenz Max-Min). Je höher der Wert, desto größer die Varianz und damit die chromosomale Instabilität.

Abbildung 5 verdeutlicht die Streubreite der Signalzahlen. Obwohl alle Genorte eine Varianz aufweisen, zeigen doch einige (*STAT2*, *STAT6* und *JAK2*) eine stärkere Streuung als andere. Es ist anzunehmen, dass diese genetisch instabiler sind als die übrigen.

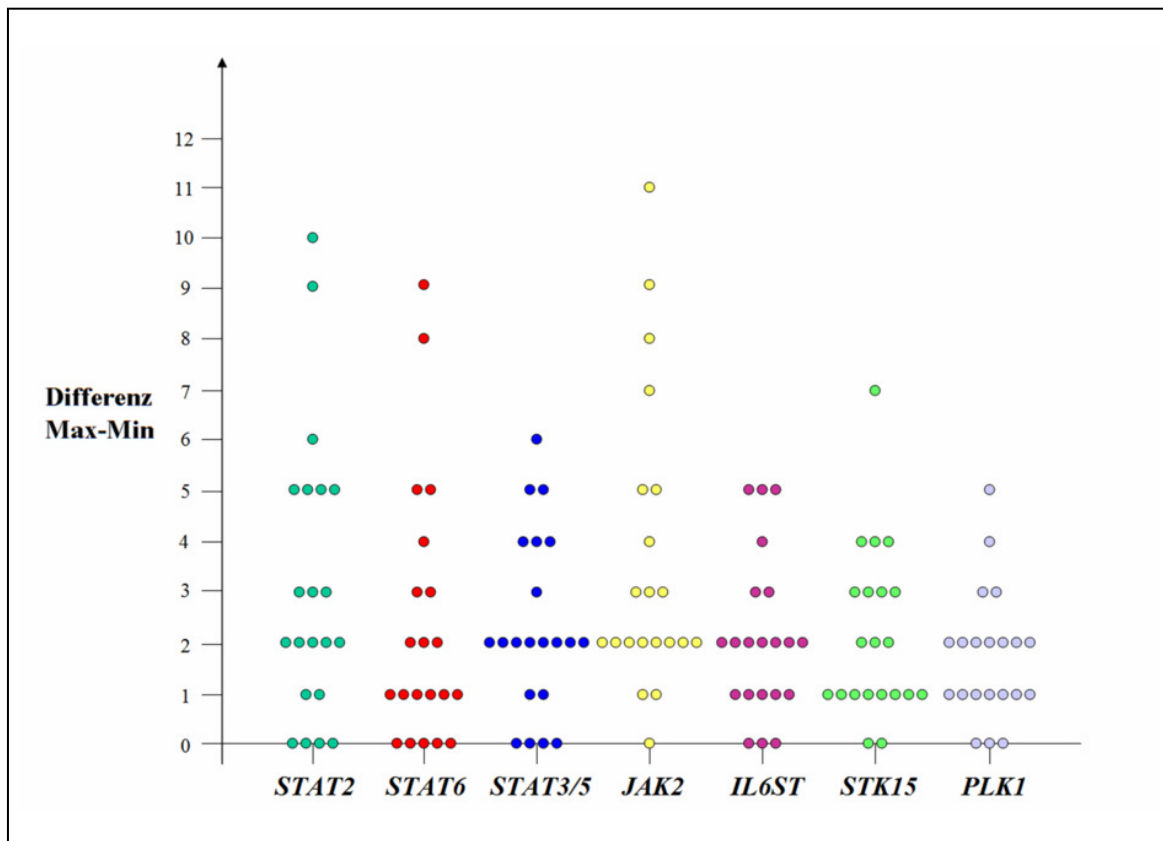


Abbildung 5: Streubreite der Signalzahlen.

Es wurde für jeden Assay die Differenz zwischen der höchsten Anzahl gezählter Signale in einem Zellkern und der niedrigsten Zahl gezählter Signale in einem Zellkern desselben Falles ermittelt und auf dem Graphen aufgetragen. Beispiel: Im Falle des *IL6ST*-Locus zeigten in drei Fällen alle Kerne dieselbe Anzahl von Signalen, in sieben Fällen variierte die Anzahl der Signale pro Zellkern um zwei Signale, und in drei Fällen variierte die Anzahl der Signale um fünf Signale. Die Genorte für *STAT2*, *STAT6* und *JAK2* wiesen die größte Streubreite auf.

3.5 Weiterführende Untersuchungen zur Eingrenzung von Amplifikationen und Bruchereignissen

3.5.1 12p Amplifikation in Fall Nr. 12

Die Auswertung der Hybridisierung des Falles Nr. 12 mit den Assays für *STAT2* und *STAT6* hatte eine Amplifikation des auf 12p12.1 befindlichen Kontrollassays ergeben. Dieser setzte

sich aus den drei Klonen RP11-615I16, RP11-100C20 und RP11-252K13 zusammen. Die Hybridisierung des Falles mit jedem einzelnen Klon zeigte, dass alle drei amplifiziert waren. Um das Amplikon einzugrenzen, wurde der Fall mit Hilfe sechs weiterer Klone untersucht. Die Klone RP11-268P4 und RP11-114G22, die telomerisch der bereits entdeckten Amplifikation lagen, waren auch amplifiziert. Der zentromerisch gelegene Klon RP11-64N21 zeigte ebenso eine Amplifikation. Die ebenfalls zentromerischen Klone RP11-64J22 und RP11-1060J15 erbrachten keine auswertbaren Ergebnisse, da sie Kreuzhybridisierungen mit anderen Chromosomen aufwiesen. Es stellte sich heraus, dass der Klon RP11-666F17 nicht auf Chromosom 12p, sondern auf 3p hybridisierte. Dieser konnte also ebenfalls nicht ausgewertet werden. Die bis dahin ermittelten Ergebnisse zeigten, dass sich das Amplikon über mindestens fünf Megabasen erstreckt (s. Abbildung 6). Da sich in diesem großen Bereich ca. 50 Gene befinden, wären weiterführende Untersuchungen möglicher Kandidatengene zu umfangreich. Es wurde von einer weiteren Eingrenzung abgesehen.

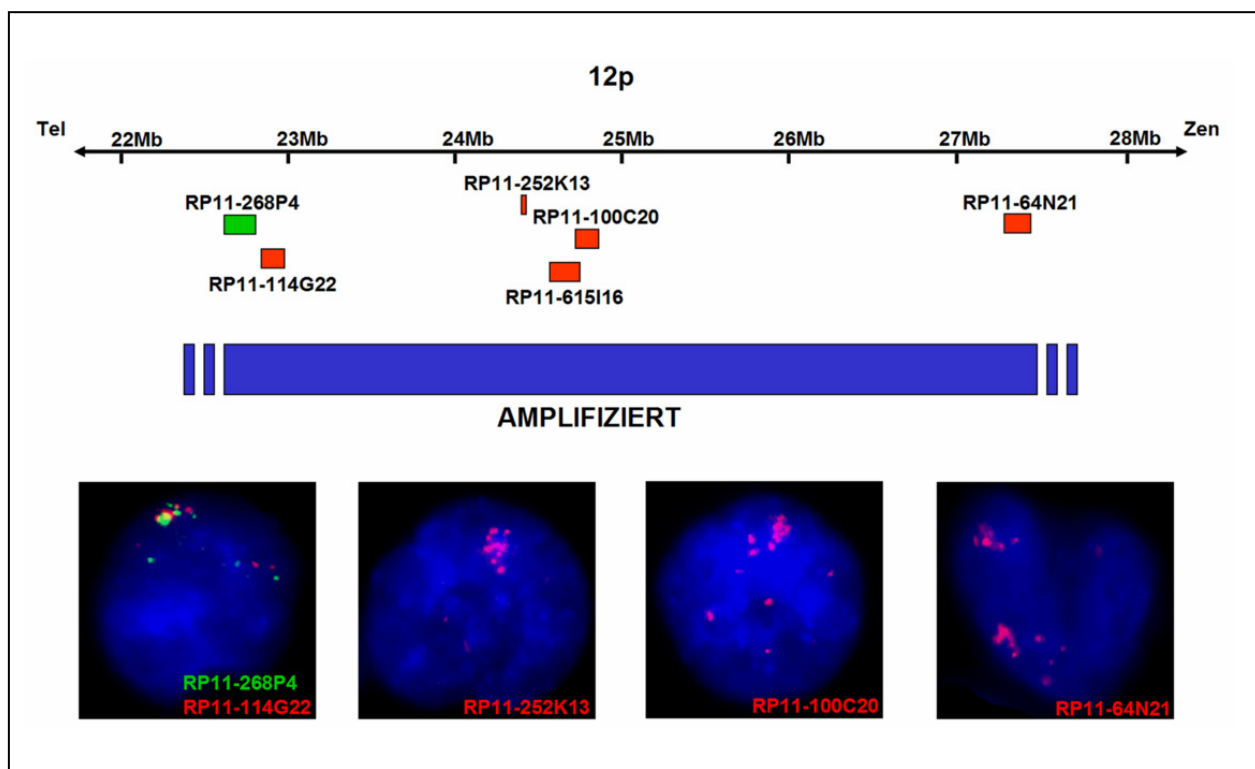


Abbildung 6: Abschnitt des kurzen Armes des Chromosoms 12. Das linke Ende zeigt Richtung Telomer, das rechte Ende Richtung Zentromer. An der entsprechenden Stelle sind die verwendeten Klone in der Farbe aufgetragen, in der sie markiert wurden. Unten finden sich die FISH-Hybridisierungsmuster von fünf der amplifizierten Klone. Mindestens der Abschnitt zwischen RP11-268P4 und RP11-64N21 war amplifiziert. Das Amplikon wurde aufgrund der Größe nicht weiter eingegrenzt.

3.5.2 12q Amplifikation in der Zelllinie L1236

Bei der Untersuchung der Zelllinie L1236 mit dem *STAT6*-Assay waren ein Verlust des rot markierten Klon RP11-176O5 und eine Amplifikation des grün markierten Klon RP11-145A4 gefunden worden. Um dieses Amplikon einzugrenzen, wurde die Zelllinie mit den Klonen RP11-112B10, RP11-507N3 und RP11-973D8, die zentromerisch von RP11-145A4 gelegen sind, sowie RP11-1077C21 und RP11-936I7, die telomerisch des amplifizierten Klon liegen, weiter untersucht. Es stellte sich heraus, dass RP11-112B10 und RP11-1077C21 ebenfalls amplifiziert waren, wohingegen RP11-936I7, RP11-507N3 und RP11-973D8 im Median vier Signale zeigten. Auf diese Weise wurde das Amplikon auf ungefähr eine Megabase eingegrenzt (s. Abbildung 7). Im Bereich des Amplikons liegen ca. 31 Gene.

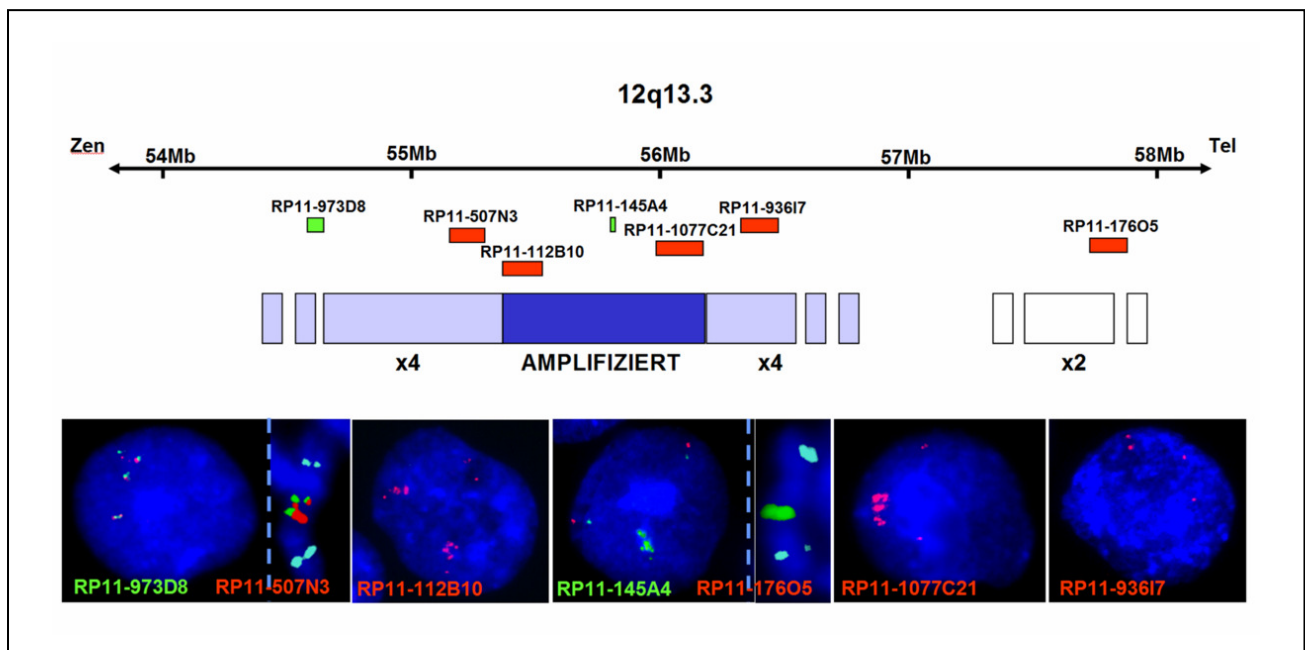


Abbildung 7: Abschnitt des langen Armes des Chromosoms 12. Das linke Ende zeigt Richtung Zentromer, das rechte Ende Richtung Telomer. An der entsprechenden Stelle sind die verwendeten Klone in der Farbe aufgetragen, in der sie markiert wurden. Unten finden sich die FISH-Hybridisierungsmuster der sieben verwendeten Klone. Die Klone RP11-112B10, RP11-145A4 und RP11-1077C21 waren amplifiziert. Die Klone RP11-973D8, RP11-507N3 und RP11-936I7 waren jeweils in vier Kopien vorhanden. Damit war das Amplikon auf eine Größe von ca. einer Megabase eingegrenzt. Der Klon RP11-176O5 lag nur in zwei Kopien vor, was einem Verlust desselben entspricht.

3.5.3 17q Bruchereignis in der Zelllinie HDLM-2

Die Zelllinie HDLM-2 war bei der Auswertung des *STAT3/5*-Assays durch ein zusätzliches Signal des grün markierten Klons RP11-400F19 aufgefallen. Um Herauszufinden, ob es sich hierbei um eine Duplikation oder ein Bruchereignis handelt, wurden vier weitere Klone eingesetzt. Die Klone RP11-1151G10 und RP11-194N12 liegen zentromerisch, die Klone RP11-266I24 und RP11-242D8 telomerisch von RP11-400F19. Diese Klone zeigten alle in der Untersuchung im Median zwei Signale. Dieses Ergebnis lässt eine Duplikation unwahrscheinlich erscheinen. Die Hybridisierung der Zelllinie HDLM-2 mit einem Dreifarben-Assay bestehend aus dem rot markierten Klon RP11-266I24, dem grün markierten Klon RP11-400F19 und dem blau markierten Klon RP11-194N12 ergab ein kolokalisiertes rot-grün-blaues Signal und ein weiter telomerisch gelegenes grünes Signal (s. Abbildung 8). Die Vermutung liegt nahe, dass nach einem Bruchereignis innerhalb der chromosomalen Region, die durch den Klon RP11-400F19 abgedeckt wird, keine Inversion, sondern eine Insertion des Bruchstückes weiter telomerisch erfolgte.

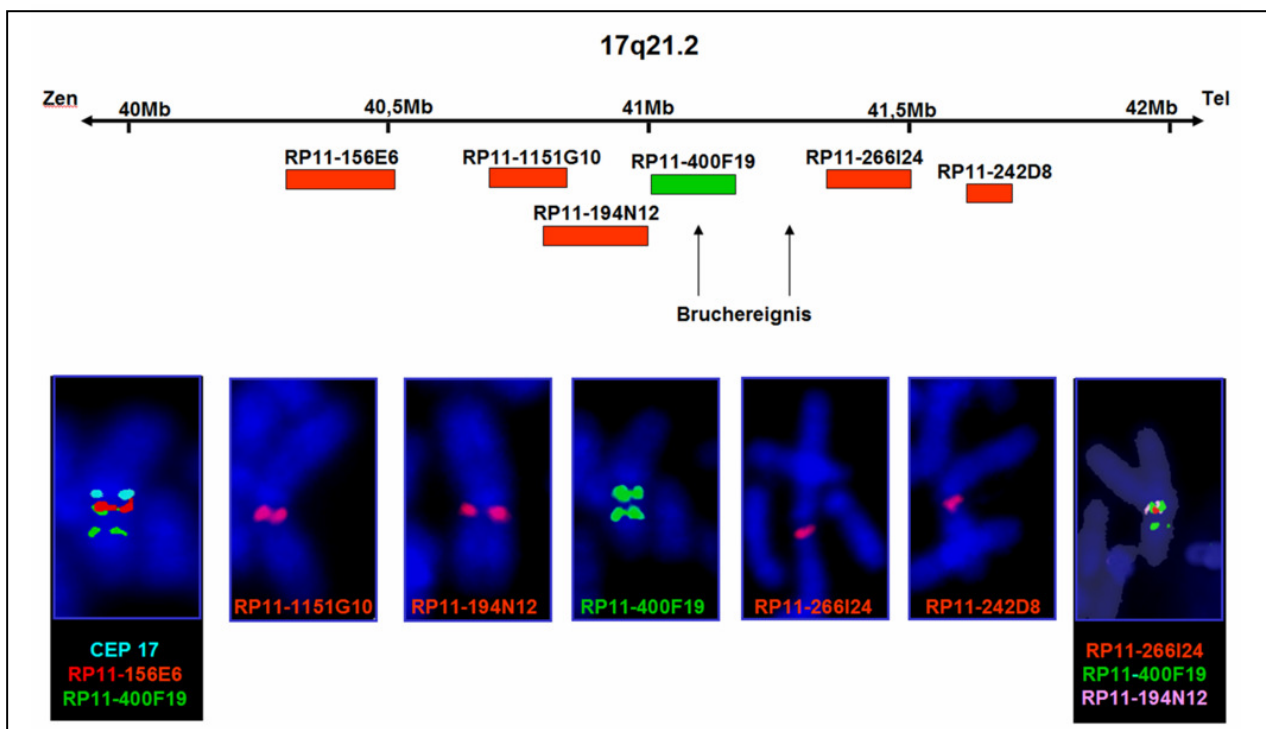


Abbildung 8: Abschnitt des langen Armes des Chromosoms 17. Das linke Ende zeigt Richtung Zentromer, das rechte Ende Richtung Telomer. An der entsprechenden Stelle sind die verwendeten Klone in der Farbe aufgetragen, in der sie markiert wurden. Das Bruchereignis ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Unten finden sich die FISH-Hybridisierungsmuster. Ganz links befindet sich das Bild des Original-*STAT3/5*-Assays, ganz rechts das Bild des neuen Dreifarben-Assays (aus technischen Gründen ist die blaue Kontrollsonde hier pink dargestellt). Dazwischen liegen die Bilder der einzeln hybridisierten Klone.

3.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Analysen des *JAK2*-Gens an Tissue

Microarrays

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen an Carnoys-fixierten Zellen und vorheriger Arbeiten zeigen, dass es im cHL besonders häufig im Bereich des *JAK2*-Gens (9p24) zu Veränderungen kommt. Daher wurden die Tissue Microarrays von cHL ausschließlich mit dem *JAK2*-Assay untersucht.

Es wurden zwei Objektträger mit insgesamt 33 Fällen hybridisiert. Von diesen waren 30 auswertbar. Die übrigen drei Fälle waren aufgrund starker Hintergrundanfärbung technisch nicht auswertbar.

Die Untersuchung der Paraffinpräparate war aufgrund der größeren Dicke des Gewebes schwieriger als dies bei in Carnoys-fixiertem Lymphknotengewebe der Fall war. Nach der Auswertung wurden die Fälle daher in Gruppen eingeteilt (s. Tabelle 18).

Bei 9 von 30 auswertbaren Fällen (30%) konnten keine eindeutigen HRS-Zellkerne identifiziert werden. Die Mehrzahl der Kerne zeigte in diesen Fällen zwei (bis maximal vier) kolokalisierte Signale für den *JAK2*-Locus. Die Kerne wiesen auch nicht die typische Kernmorphologie auf.

Eine für HRS-Zellen aufgrund der häufigen Polyploidie normale und zu erwartende Signalkonstellation von drei bis vier kolokalisierten Signalen zeigten ebenfalls 9 von 30 Fällen (30%). Ein leichter Zugewinn fand sich in 8 Fällen (26,7%), die fünf und sechs kolokalisierte Signale des *JAK2*-Assays pro Zellkern aufwiesen. Ein deutlicher Zugewinn mit sieben bis neun Signalen je Zellkern konnte in 2 Fällen (6,7%) gefunden werden und weitere 2 Fälle (6,7%) zeigten Amplifikationen von ungefähr zehn kolokalisierten Signalen, die in einer Traube (Cluster) zusammenlagen. Korrigiert man die Prozentanteile bezogen auf die Fälle, in denen eindeutig HRS-Zellen nachweisbar waren, sind diese sogar noch höher. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Einteilung der Ergebnisse der Tissue Microarrays in Gruppen

Gruppe	Anzahl der Signale	Anzahl der Fälle	Prozentanteil	Prozentanteil an Fällen mit eindeutig identifizierten Hodgkin-Zellen
Keine eindeutigen HRS-Zellkerne identifiziert	2-4 kolokalisierte Signale, untypische Morphologie	9	30%	
Normal (tri-/tetraploid)	3-4 kolokalisierte Signale	9	30%	42,9%
Leichter Zugewinn	5-6 kolokalisierte Signale	8	26,7%	38,1%
Zugewinn	7-9 kolokalisierte Signale	2	6,7%	9,5%
Amplifikation/Cluster	~10 kolokalisierte Signale	2	6,7%	9,5%

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnten regelmäßig wiederkehrende Veränderungen im Bereich der Genloci *IL6ST* und *STAT3/5* in dieser Studie nicht gefunden werden. Wie in vorausgegangenen Arbeiten bereits beschrieben, stellen Zugewinne inklusive Amplifikationen von *JAK2* die häufigsten genomischen Veränderungen im cHL dar. Zugewinne des Gens zeigten 19% der Fälle. Weitere 19% wiesen eine Amplifikation auf. Untermauert werden diese Ergebnisse durch die Beobachtungen der TMA-Analysen. Hier konnten in 38,1% der Fälle ein leichter Zugewinn und in jeweils 9,5% ein deutlicher Zugewinn bzw. eine Amplifikation nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten weitere 19% der cHL-Primärfälle einen Verlust genetischen Materials, ein Ergebnis, das in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde.

Außerdem konnten erstmals wiederkehrende Zugewinne von *STAT2* und *STAT6* nachgewiesen werden. Diese traten jeweils in 19% der Fälle auf, wobei 4,8% der Fälle sogar Amplifikationen aufwiesen.

Regelmäßig auftretende Veränderungen der Zentrosomenloci *PLK1* und *STK15* wurden nicht gefunden.

4 Diskussion

Ein für cHL typisches Phänomen ist die konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade (Küppers, 2009). Diese reguliert verschiedene wichtige Funktionen der Zelle wie die Zellentwicklung, Differenzierung und Apoptose. Die mit dieser Kaskade assoziierten Gene *STAT2* (12q13), *STAT6* (12q13), *STAT3/5A/5B* (17q21), *JAK2* (9p24) und *IL6ST* (5q11) liegen in Chromosomenabschnitten mit gehäuftem Zugewinn an genetischem Material (Joos et al., 2002; Joos et al., 2003; Chui et al., 2003). Frühere Arbeiten zeigten bereits regelmäßig vorkommende Amplifikationen des *JAK2*-Gens im cHL (Joos et al., 2000).

Die Form und Größe der HRS Zellen sowie die Komplexität der Karyotypen lassen auf einen Zentrosomendefekt oder eine Zentrosomendysfunktion schließen. Zwei der in dieser Arbeit untersuchten Gene, *STK15* (20q13) und *PLK1* (16p12) regulieren u.a. die Zentrosomenaktivität (Dutertre et al., 2002; Dai et al., 2002). Diese Gene liegen wiederum beide in Bereichen, die im cHL genetisches Material hinzugewinnen.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der FISH-Technik herauszufinden, ob die Aktivierung des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges in HRS-Zellen des cHL durch chromosomale Veränderungen der Genorte bedingt ist, welche für die Komponenten dieser Signalkaskade kodieren, und ob die Zentrosomenaberrationen im cHL bzw. die chromosomale Instabilität der HRS-Zellen durch Aberrationen der Genloci *STK15* und *PLK1* entsteht.

Da für die genannten Genorte keine kommerziellen FISH-Assays erhältlich sind, mussten diese zunächst hergestellt und getestet werden.

4.1 Technischer Ansatz

4.1.1 Methoden

Im Gegensatz zu anderen malignen B-Zell-Erkrankungen, sogenannten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, ist das Bild chromosomaler Aberrationen im cHL weiterhin schlecht charakterisiert (Re et al., 2002). Dies liegt einerseits an der Schwierigkeit, Metaphasen der seltenen HRS-Zellen zu gewinnen, die im Tumorgewebe nur einen Anteil von weniger als 1% der Zellen ausmachen (Staudt, 2000). Andererseits weisen die Metaphasen der HRS-Zellen eine extrem hohe zytopenetische Komplexität und chromosomale Instabilität auf (Schouten et al., 1989; Tilly et al., 1991). Herkömmliche zytopenetische Analysen des cHL sind also

schwierig (Fonatsch et al., 1999). Die in dieser Arbeit angewandte FISH-Technik ermöglicht hingegen gezielte zytogenetische Untersuchungen an Interphase-Kernen.

Die Sensitivität der FISH-Technik liegt in der Regel bei 1-5% (Martin-Subero et al., 2003a). Sie ist also eigentlich für Tumoren mit wenigen Tumorzellen nicht geeignet. Eine Ausnahme stellt hierbei jedoch das cHL dar. Aufgrund ihrer auffälligen Morphologie und Hyperploidie sind die HRS-Zellen leicht zu identifizieren. Eine gezielte FISH-Analyse großer atypischer Zellkerne wird so möglich (Wlodarska et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit der gerichteten Analyse stellt die FICTION-Technik dar. Hierbei wird die Fluoreszenz-Immunphenotypisierung mit der FISH-Methode kombiniert (Martin-Subero et al., 2002). Auf diese Weise können die HRS-Zellen gezielt aufgesucht werden. Um diese Methode anwenden zu können, werden allerdings ganze, weitgehend unversehrte Zellen benötigt. Die für diese Arbeit zur Verfügung stehenden zytogenetischen Suspensionen ermöglichen jedoch nur die Untersuchung von Zellkernen. Daher konnte die FICTION-Methode nicht angewandt werden.

4.1.2 Nachweisgrenzen

Für die zu untersuchenden Gene waren keine kommerziellen FISH-Assays erhältlich. In der vorliegenden Arbeit konnten erfolgreich für alle Genorte auswertbare Assays hergestellt werden.

Für den Nachweis von Bruchpunkten mittels FISH-Technik sind verschiedene Ansätze beschrieben worden. So kann man zum Nachweis wiederkehrender Translokationen mit konstanten Partnern FISH-Assays nutzen, bei denen eine Sonde den Bruchpunkt auf dem einen Chromosom überspannt und die andere Sonde den Translokationspartner auf dem anderen Chromosom flankiert. So entsteht im Falle des Vorliegens einer Translokation ein kolokalisiertes zweifarbiges Signal (Siebert et al., 1998 a und b). Wechselt der Translokationspartner oder ist dieser unbekannt eignen sich Assays besser, bei denen unterschiedlich markierte Sonden den vermuteten Bruchpunkt flankieren. Liegt eine Translokation vor, kommt es zur Dissoziation der beiden unterschiedlich gefärbten Signale („Split“) (Taniwaki et al., 1995).

Im cHL sind bisher keine wiederkehrenden Translokationen für die untersuchten Gene bekannt. Zur Ermittlung von Bruchereignissen wurden also die Gene mit unterschiedlich markierten Fluoreszenzsignalen flankiert.

Für die Definition eines Splits liegen in der Literatur verschiedene Beispiele vor. Einige definierten zwei klar voneinander abgrenzbare unterschiedlich gefärbte Signale als Split (Bergh et al., 2000). Diese Definition könnte zu einer hohen Rate an falsch-positiven Ergebnissen führen. Andere legten einen Abstand zwischen den zwei Signalen von mindestens 20% des Kerndurchmessers als Split fest (Vaandrager et al., 2000). Wieder andere gingen von einem Bruchereignis aus, wenn beide Signale mehr als 2µm auseinander lagen (Taniwaki et al., 1995; Ueda et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde von einem Bruchereignis ausgegangen, wenn der Signalabstand mehr als drei Signaldurchmesser betrug (Kahl et al., 2001). Das Beschreiben des Abstandes zweier Signale zueinander im Verhältnis zum Signaldurchmesser hat verschiedene Vorteile. Dieses System ist nicht nur einfach in der Auswertung, es passt sich auch den verschiedenen Kondensationszuständen der DNA in den Stadien des Zellzyklus an.

Um die Qualität der in dieser Arbeit neu etablierten Assays zu sichern und die Aussagefähigkeit dieser abzuschätzen, mussten zunächst die Nachweisgrenzen definiert werden. Dies geschah, indem der Mittelwert der falsch positiven Ergebnisse in fünf gesunden Kontrollpersonen plus drei Standardabweichungen berechnet wurde (Bergh et al., 2000; Vaandrager et al., 2000).

Es wurden die Nachweisgrenzen für Bruchereignisse, Zugewinne und Verluste ermittelt.

Die ermittelten Nachweisgrenzen der verwendeten Assays für Bruchpunkte lagen zwischen 0,6% und 13,1% (Tabelle 9). Zum größten Teil lagen die in dieser Arbeit etablierten Assays mit den ermittelten Nachweisgrenzen für Translokationen unter den Werten aus der Vergleichsliteratur (Bergh et al., 2000; Vandraager et al., 2000; Taniwaki et al., 1995; Ueda et al., 1996). Im Falle des *STAT6*-Assays lag sie jedoch bei 13,1%. Dies lässt sich durch den verhältnismäßig größeren Abstand (ca. zwei Megabasen) zwischen den roten und grünen Signalen der Sonden auf der DNA voneinander erklären.

Die Tabellen 10 und 11 zeigen die festgelegten Nachweisgrenzen der neu etablierten Assays für Zugewinne (3,1% - 20,3%) und Verluste (0%-9,1%). In der Vergleichsliteratur lagen die Nachweisgrenzen für Zugewinne bei 3-6% und für Deletionen bei 6-10% (Martin-Subero et al. 2003a). Damit sind die Ergebnisse unserer Assays für Verluste mit denen anderer Publikationen vergleichbar. Die im Verhältnis dazu zum Teil recht hohen Grenzen für Zugewinne, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, erklären sich durch Kreuzhybridisierungen einiger Sonden mit so genannten repetitiven Sequenzen der DNA auf anderen Chromosomenabschnitten.

4.1.3 Interpretation der Ergebnisse

HRS-Zellen sind zumeist tri- bis tetraploid, was die Beurteilung von Zugewinnen und Verlusten erschwert (Weber-Matthiesen et al., 1995a). Die Auswertung der absoluten Anzahl der Signale ist ungenau und führt zu falschen Ergebnissen. So kann man das Vorliegen von drei Genkopien nicht als Zugewinn werten, wenn die entsprechende Zelle einen triploiden Chromosomensatz aufweist. Andererseits kann in demselben Fall das Vorliegen von nur zwei Kopien nicht als normal eingeschätzt werden. Bei der Auswertung der Signalkonstellationen war zunächst vorgesehen, die Anzahl der Signale für den zu untersuchenden Genlocus mit der Anzahl der Signale der Chromosomenkontrolle zu vergleichen, um so festzustellen, ob Zugewinne oder Verluste vorlagen. Dies hätte jedoch zu einer Unter-Detektion geführt, da oftmals Genort und Kontrolle gleichsinnig verändert waren. Wie bereits beschrieben, wurde nun in dieser Arbeit die Signalzahl der Assays auf die zuvor ermittelte Ploidie des einzelnen Falles bezogen. Es wurde also die relative Anzahl der Signale bewertet.

Mathas et al. untersuchten in ihrer Arbeit unter anderem den *BCL3*-Genlocus in den Zelllinien des cHL mittels FISH-Technik. Sie werteten das Vorliegen von drei oder mehr Signalen als Zugewinn. Sie fanden einen Zugewinn von *BCL3* in den Zelllinien L1236 (3 Signale/Zelle) und L428 (4 Signale/Zelle) (Mathas et al., 2005). In unserer Arbeit ermittelten wir die Ploidie der Zelllinie L1236 mit 3,5 und die Ploidie der Zelllinie L428 mit 4,5. Somit befinden sich die Ergebnisse von Mathas et al. für das *BCL3*-Gen im balancierten Bereich für diese Zelllinien. Es liegt also kein wirklicher Zugewinn vor (Martin-Subero et al., 2006).

4.2 Chromosomale Instabilität im klassischen Hodgkin-Lymphom und die Rolle der Zentrosomengene *PLK1* und *STK15*

Wie bereits dargestellt, zeichnet sich das cHL durch genetische Instabilität in Form hochkomplexer Karyotypen und intraklonaler Variabilität aus (Weber-Matthiesen et al., 1995b; Falzetti et al., 1999; Re et al., 2002). Wie Abbildung 5 zeigt, variierte die Signalanzahl für die verschiedenen untersuchten Loci zwischen den einzelnen HRS-Zellen desselben Falles auch in dieser Arbeit. Es werden auch Unterschiede zwischen den einzelnen Loci deutlich. Einige Genorte scheinen instabiler zu sein als andere.

Es ist beschrieben worden, dass Amplifikationen der Gene *PLK1* und *STK15* mit Zentrosomenaberrationen und CIN in soliden Tumoren zusammenhängen (Zhou et al., 1998). Die hier untersuchten cHL-Fälle und -Zelllinien wiesen keine wiederkehrenden

Veränderungen der beiden Gene auf. Daher müssen alternative pathogenetische Mechanismen, wie die Mutation anderer Gene oder fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen, der CIN im cHL zugrunde liegen.

4.2.1 Bedeutung der Zentrosomengröße in Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen

Laut Pihan et al. (1998) werden Zentrosomenaberrationen bezogen auf die Anzahl, die Größe und die Form der Zentrosomen beschrieben. In ihrer Arbeit an Brust-, Prostata-, Lungen- und Darmkarzinomen zeigten die meisten Tumorzellen signifikant größere Zentrosomen als die umgebenden Zellen (Pihan et al., 1998). Sie postulierten, dass Zentrosomenaberrationen die genetische Instabilität in malignen Zellen bedingen könnten. Von unserer Arbeitsgruppe wurden zwei cHL-Fälle mit starker CIN im Hinblick auf die Zentrosomengröße untersucht. Verglichen mit den Zentrosomen der Zellen des reaktiven Infiltrats waren die Zentrosomen in den HRS-Zellen signifikant vergrößert. Bezogen auf die Größe der Tumor-Zellen war dieser Unterschied jedoch nicht mehr bedeutsam. Es ist also fraglich, ob die Größe der Zentrosomen im cHL eine Rolle in der Entstehung der CIN spielt oder ob sie lediglich die Größe der HRS-Zellen widerspiegelt (Martin-Subero et al., 2003b).

4.3 Bedeutung von Veränderungen der Gene der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Bekanntes Phänomen im cHL ist die konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade (Küppers, 2009). Diese Arbeit beschäftigt sich u.a. mit der Frage, ob die Gene, die für die Proteine der Kaskade kodieren, im cHL regelmäßig Veränderungen unterworfen sind. Die Ergebnisse dieses systematischen genomischen Screenings zeigen, dass Zugewinne mit insgesamt 38,1% einschließlich Amplifikationen (19%) von *JAK2* in 9p24 die häufigsten genomischen Veränderungen der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade im cHL darstellen. Auch 75% der Zelllinien wiesen einen Zugewinn von *JAK2* auf. Diese Ergebnisse korrelieren mit bereits publizierten Studien über *JAK2*-Amplifikationen im cHL (Joos et al., 2000). Interessanterweise konnte im primären mediastinalen B-Zell-Lymphom (MBL), einem dem cHL verwandten B-Zell-Lymphom (Rosenwald et al. 2003), ebenfalls ein häufiger Zugewinn der Chromosomenregion 9p23-24, in der auch das *JAK2*-Gen liegt, nachgewiesen werden (Bentz et al., 2001). Diese Amplifikationen könnten über eine erhöhte Anzahl von Genkopien zur konstitutiven Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade führen.

Für das *REL*-Onkogen, dessen Amplifikation im cHL mit einer Akkumulation des c-Rel Transkriptionsfaktors im Zellkern assoziiert sind, konnte dies bereits gezeigt werden (Barth et al., 2003).

Reiter et al. konnten in Fallstudien verschiedener hämatoonkologischer Erkrankungen, u.a. akuter und chronischer Leukämien, eine Translokation t(8;9)(p21-23;p23-24), die das *JAK2*-Gen betrifft, zeigen (Reiter et al., 2005). In dieser Arbeit konnte in keinem der Primärfälle ein das *JAK2*-Gen betreffender Bruchpunkt gefunden werden. Van Roosbroeck et al. (2011) fanden hingegen in ihrem cHL-Patientengut in 2,3% der Fälle Brüche im Bereich des *JAK2*-Gens, u.a. die Translokation t(4;9)(q21;p24). Diese führt zur Entstehung eines Onkoproteins (SEC31A-JAK2), welches konstitutive Kinaseaktivität zeigt und auf JAK-Inhibitoren sensibel reagiert (Van Roosbroeck et al., 2011).

Levine et al. (2005) identifizierten eine *JAK2*-Punktmutation (*JAK2*V617F), die im MPS, speziell bei der Polyzythämia vera (PV), der essentiellen Thrombozythämie (ET) und der Osteomyelofibrose (OMF), zu einer konstitutiven Aktivierung der *JAK2*-Tyrosinkinase führt (Levine et al., 2005). Chen et al. (2010) zeigten, dass dieselbe Mutation über unterschiedliche STAT1- und STAT5-Aktivierung zur Ausprägung der verschiedenen Phänotypen (PV oder ET) führt. Sie schlossen, dass dies auch in anderen Neoplasien, die mit Mutationen von Signaltransduktionskaskaden assoziiert sind, zutreffen könnte (Chen et al., 2010). Interessanterweise konnte die *JAK2*V617F-Mutation im cHL und im MBL nicht nachgewiesen werden (Melnzer et al., 2006). Auch in NHL scheint die *JAK2*V617F-Mutation keine Rolle zu spielen (Lee et al., 2006).

Zusätzlich zu den bereits bekannten *JAK2*-Amplifikationen zeigt diese Arbeit erstmals auch Verluste des *JAK2*-Genlokus in 19% der Fälle. Dies könnte z.B. durch unbalancierte Translokationen zentromerisch von *JAK2* bedingt sein. Kürzlich konnten Steidl et al. (2011) im cHL wiederkehrende Bruchpunkte des MHC-Klasse-II-Transaktivator-Gens (*CIITA*) nachweisen, wobei es sich in 50% der Fälle um unbalancierte Translokationen handelte. Als Fusionspartner identifizierten sie u.a. die Gene *PDL* (*programmed death ligand*)1 und *PDL*-2 (Steidl et al., 2011). PDL1 und PDL2 kontrollieren die T-Zell-Immuntoleranz und verhindern so Autoimmunangriffe auf Gewebe (Sharpe et al., 2007). Beide Gene liegen ca. 350kb zentromerisch von *JAK2*.

Außerdem konnten zum ersten Mal wiederkehrende Zugewinne von *STAT2* und *STAT6* in jeweils 19% der untersuchten cHL-Primärfälle nachgewiesen werden. Dies ist ein alternativer zytogenetischer Mechanismus, der zu einer konstitutiven Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade führen könnte.

Im Gegensatz hierzu wiesen die anderen in dieser Arbeit untersuchten Mitglieder der Transduktionskaskade (*STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* und *IL6ST*) keine gehäuft auftretenden chromosomalen Veränderungen auf. Chromosomenveränderungen dieser Loci scheinen also nicht an der regelmäßigen Aktivierung der STATs beteiligt zu sein.

4.3.1 Segmental Chromosomal Aberrations (SCAs)

Segmental Chromosomal Aberrations (SCAs) representieren einen besonderen Mechanismus der Genamplifikation, bei dem es zur Translokation oder Insertion multipler Kopien eines bestimmten chromosomalen Segments in verschiedene Teile des Genoms kommt (Martin-Subero et al., 2003b). Interessanterweise konnten verschiedene SCAs in den Hodgkin-Zelllinien HDLM-2, KM-H2, L428 und L1236 gefunden werden, die meist die subtelomerische Regionen betreffen, u.a. 9p24 (*JAK2*) (Joos et al., 2003). Aufgrund einer Assoziation von SCAs und ribosomaler DNA (rDNA) in der Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 vermuteten MacLeod et al. (2000), dass komplizierte chromosomale Veränderungen der rDNA-Loci SCAs begünstigen und eine Rolle in der Tumorgenese spielen könnten (MacLeod et al., 2000). Die Untersuchung primärer cHL-Fälle auf SCAs ist aufgrund mangelnder Metaphasen sehr schwierig. Dennoch konnte in dieser Arbeit in einem der Fälle (Fall 12) das Vorkommen von SCAs mit dem *JAK2*-Assay nachgewiesen werden (s. Abbildung 4a). Bemerkenswerterweise konnten weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in demselben Fall rDNA-Amplifikationen zeigen, die zum Teil mit den *JAK2*-Signalen kolokalisiert waren. Dieser primäre cHL-Fall weist also dasselbe Phänomen auf wie die Zelllinie HDLM-2, in der Kolokalisationen von rDNA-Sequenzen und der *JAK2*-Genregion gefunden worden waren (Martin-Subero et al., 2003b).

4.3.2 Alternative Mechanismen, die zur konstitutiven Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade führen könnten

Neben einer Beteiligung der direkt für Mitglieder der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade kodierenden Gene, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, gibt es noch weitere mögliche Mechanismen, die zur konstitutiven Aktivierung führen könnten.

Denkbar wäre z.B. eine Beteiligung von SOCS (suppressor of cytokine signaling)-1. Das SOCS-1-Protein wirkt negativ rückkoppelnd auf die Zytokin-Signalwirkung, indem es die Phosphorylierung von STATs durch JAK-Proteine hemmt (Endo et al., 1997). So wird die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade herunterreguliert (Larsen und Röpke, 2002). Für das hepatozelluläre Karzinom konnte ein Zusammenhang zwischen der Ausschaltung des *SOCS-1*-Gens (16p13.3) und einer konstitutiven JAK2-Aktivierung gezeigt werden, was eine Zellproliferation zur Folge hatte (Yoshikawa et al., 2001). Neuere Studien bestätigten diese Ergebnisse auch für das cHL und das MBL. Weniger et al. wiesen in beiden Lymphomen eine Verbindung zwischen dem mutierten *SOCS-1*-Gen und einer Anhäufung von phosphoryliertem, und somit aktiviertem, STAT5 im Kern nach (Weniger et al., 2006). Mottok et al. (2007) fanden in 50% ihrer NPLHL-Fälle Mutationen von SOCS1, was zur erhöhten JAK2-Expression und Aktivität der JAK2/STAT6-Signaltransduktionskaskade beitragen könnte (Mottok et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *SOCS-1*-Mutationen Folge einer aberranten B-Zell-spezifischen somatischen Hypermutation sind, entsprechend konnten in Nicht-B-Zell-Neoplasien keine *SOCS1*-Mutationen nachgewiesen werden (Mottok et al., 2009).

Die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade ist einer der wichtigsten Signalwege der Zytokinrezeptoren (Imada und Leonard, 2000). HRS-Zellen bilden selbst eine Vielzahl von Zytokinen (Skinnider et al., 2001). Diese wirken sowohl autokrin direkt auf die HRS-Zellen als auch parakrin auf die Zellen des reaktiven Infiltrates, die daraufhin ihrerseits zu HRS-Zell-Proliferation und -Überleben beitragen (Skinnider und Mak, 2002). Interessanterweise scheint die Anwesenheit des EBV die Expression von IL-6 im cHL zu erhöhen (Herbst et al., 1997). Wie bereits erwähnt, wird eine EBV-Infektion mit der Entstehung des cHL in Verbindung gebracht (Weinreb et al., 1996). Vockerodt et al. (2008) zeigten, dass LMP (latent membrane protein)1, ein EBV-Onkoprotein, bei Keimzentrums-B-Zellen Veränderungen bewirkt, die für HRS-Zellen typisch sind, inklusive des Verlustes der B-Zell-Identität (Vockerodt et al., 2008). Chen et al., (2003) entwickelten für EBV-infizierte Epithelzellen das Model eines sich

selbstverstärkenden Mechanismus, nach dem die Bindung von IL-6 über die JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade zur vermehrten Expression von LMP1 führt, welches wiederum zur konstitutiven Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade führt und die Synthese von IL-6 hochreguliert (Chen et al., 2003). Auch für das cHL wurde ein Zusammenhang zwischen der JAK/STAT-Signaltransduktion und der LMP1-Expression gefunden (Chen et al., 2001). Durch seine Eigenschaften als fremdes Antigen und seine Wirkung auf die Tumorzellen stellt LMP1 ein mögliches therapeutisches Ziel in EBV-assoziierten Neoplasien dar (Hannigan und Wilson, 2010).

4.4 Fazit

Ziel dieser Arbeit war es mittels neu zu etablierender FISH-Assays das cHL einerseits hinsichtlich Aberrationen der Gene des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges *IL6ST*, *JAK2*, *STAT2*, *STAT6* und *STAT3/5* zu untersuchen, um so Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen eventuellen Genveränderungen und der bekannten konstitutiven Aktivierung der genannten Kaskade zu gewinnen. Außerdem sollte das cHL auf Veränderungen der Zentrosomengene *STK15* und *PLK1* hin untersucht werden, da die HRS-Zellen typische zytogenetische Auffälligkeiten aufweisen, die durch Zentrosomenveränderungen verursacht sein könnten.

Es konnten Antworten auf alle zu Beginn gestellten Fragen gefunden werden.

- Zunächst gelang es, zuverlässige FISH-Assays zu etablieren, um die o.g. Gene in Interphase-Kernen des cHL zu untersuchen.
- Mit Hilfe dieser Assays konnte bestätigt werden, dass Zugewinne und Amplifikationen des *JAK2*-Gens zu den häufigsten genetischen Ereignissen im cHL gehören. Außerdem konnten erstmals auch Verluste desselben Gens gezeigt werden. Ebenfalls erstmalig beschreibt diese Arbeit wiederkehrende Zugewinne von *STAT2* und *STAT6*. Die anderen Mitglieder der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade wiesen keine signifikanten Aberrationen auf.
- Es konnten keine wiederholten Veränderungen der Zentrosomengene *PLK1* und *STK15* gefunden werden, so dass andere Mechanismen die Entstehung der komplexen Karyotypen der HRS-Zellen bedingen müssen.

4.5 Ausblick

4.5.1 Folgen der *JAK2*-Amplifikationen

In dieser Arbeit konnte das in früheren Arbeiten bereits beschriebene Phänomen der wiederholt auftretenden *JAK2*-Amplifikationen im cHL bestätigt werden. Für die Zukunft wird es wichtig zu sein, die physiologische Signifikanz dieser Ergebnisse zu klären. Einerseits wäre es interessant zu wissen, ob *JAK2*-Amplifikationen auch zu einer verstärkten Genexpression führen. Dies ließe sich durch die FICTION-Technik mit Hilfe eines Antikörpers, mit dem das *JAK2*-Protein sichtbar gemacht wird, ermitteln.

Green et al. konnten nachweisen, dass *JAK2*-Amplifikationen in cHL- und MBL-Zelllinien mit einer erhöhten *JAK2*-Expression und –Aktivität assoziiert waren (Green et al., 2010). Interessanterweise fanden zwei weitere Studien keinen Zusammenhang zwischen 9p-Zugewinnen und der *JAK2*-Expression im cHL (Kluiver et al., 2007; Renné et al., 2007).

Andererseits wären funktionelle Analysen von *JAK2* nötig, wie z.B. die Inhibition durch RNAi in Zelllinien mit *JAK2*-Amplifikationen und die Auswertung der Folgen.

4.5.2 Ursache der chromosomalen Instabilität im klassischen Hodgkin-Lymphom

Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, scheinen Veränderungen der Zentrosomengene *PLK1* und *STK15* nicht die Ursache der ausgeprägten CIN im cHL zu sein. Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die Gründe zu ermitteln.

Von großem Interesse wird sein, herauszufinden, ob der Non-homologous-end-joining(NHEJ)-DNA-Reparaturmechanismus im cHL, einer Erkrankung, die dramatische zytogenetische Unregelmäßigkeiten aufweist, gestört ist, und ob eventuelle Fehlfunktionen durch Veränderungen der zugehörigen Gene (z.B. *Ku70*, *Ku80*, *XRCC4*, *Lig4*, *DNA-Proteinkinase* und *Artemis*) ausgelöst sind. Untersuchungen dieser Gene mittels FISH-Technik wären denkbar.

4.5.3 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Es bleibt abzuwarten, inwieweit die chromosomalen Veränderungen der Gene *JAK2* und *STAT2/6* eine Bedeutung für die Diagnostik oder Prognoseeinschätzung des cHL haben. Um

dies abschätzen zu können, sind Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv mit verfügbaren klinischen Daten (z.B. Studienpatienten) notwendig.

Sollten die Zusammenhänge der Veränderungen in der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade im cHL aufgeklärt werden, könnte sich aus diesen Erkenntnissen möglicherweise die Entwicklung von Therapieformen z.B. durch gezielte Hemmung ergeben. Erste Versuche der JAK2-Inhibition in anderen hämatologischen malignen Erkrankungen (multiples Myelom, CML, ATL) waren bereits erfolgreich (Scuto et al., 2010; Samanta et al., 2010; Yang et al., 2010). Da die Mitglieder der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle in allen Zellen des menschlichen Körpers spielen, sollten solche Therapieformen vorsichtig eingesetzt werden, um schwere Nebenwirkungen zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) ist eine von den B-Zellen ausgehende maligne Erkrankung. Aufgrund der Tumorbilogie des cHL sind konventionelle zytogenetische Untersuchungen schwierig. Zur Klärung des zytogenetischen Hintergrundes eignet sich unter anderem die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Ein bekanntes pathophysiologisches Kennzeichen des cHL ist die konstitutive Aktivierung der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade. Dies könnte einer der Mechanismen der Apoptoseresistenz der Hodgkin-Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen sein. Amplifikationen des *JAK2*-Genortes sind bekannte genetische Veränderungen im cHL. HRS-Zellen zeichnen sich zudem durch komplexe Karyotypen aus. Die Zentrosomen spielen eine maßgebliche Rolle bei der Zellteilung. Aberrationen der Zentrosomen-Gene *STK15* und/oder *PLK1* könnten im cHL Ursache für die Aneuploidie und die Chromosomeninstabilität sein. Ziel dieser Arbeit war es deshalb mittels FISH-Technik wiederkehrende chromosomale Aberrationen in Genorten für den JAK/STAT-Signalweg und Komponenten der Zentrosomenaktivität zu identifizieren.

Zunächst mussten neue Interphase-FISH-Assays validiert werden, mit denen numerische und strukturelle Veränderungen der genannten Genloci nachgewiesen werden können. Insgesamt wurden 33 Klone getestet und 5 Assays etabliert. Es wurden 36 cHL-Primärfälle und 4 cHL-Zelllinien mit den FISH-Assays hybridisiert. Zusätzlich wurden Tissue Microarrays (TMA) von 33 cHL-Primärfällen mit dem *JAK2*-Assay untersucht.

Von 36 hybridisierten Fällen waren 21 auswertbar. Amplifikationen und Zugewinne von *JAK2* wurden in je 4 Fällen (19%) gefunden. Untermuert werden diese Ergebnisse durch die TMA-Analysen für das *JAK2*-Gen. Hier zeigten 12 Fälle (57%) Zugewinne oder Amplifikationen. Interessanterweise traten in 4 der cHL-Fälle (19%) *JAK2*-Verluste auf. In 4 Fällen (19%) zeigten sich Zugewinne oder Amplifikationen der Genloci *STAT2* und *STAT6*. Die Genloci *IL6ST*, *STAT3/5A/5B*, *PLK1* und *STK15* wiesen keine signifikanten Veränderungen auf. Wiederkehrende chromosomale Bruchpunkte der untersuchten Loci wurden nicht entdeckt.

Zusätzlich wurden weitere FISH-Untersuchungen durchgeführt, um Bruchpunkte in 2 Zelllinien und einem Primärfall einzugrenzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Zugewinne von *JAK2* die häufigsten genomischen Veränderungen der JAK/STAT-Signaltransduktionskaskade im cHL darstellen. Außerdem konnten erstmals wiederkehrende Zugewinne von *STAT2* und *STAT6* beschrieben werden. Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Zentrosomen-Gene *PLK1* und *STK15* und im cHL gefundenen Auffälligkeiten der Zentrosomen und der Zellstruktur sind dagegen unwahrscheinlich. Weiterführende funktionelle Untersuchungen sind nötig, um die physiologische Signifikanz dieser Ergebnisse zu klären. Weiterhin muss die klinische Bedeutung der genomischen Veränderungen in *JAK2*, *STAT2* und *STAT6* ermittelt werden.

6 Literaturverzeichnis

Ambrosio R, Fimiani G, Monfregola J, Sanzari E, De Felice N, Salerno MC, Pignata C, D'Urso M, Ursini MV: The structure of human STAT5A and B genes reveals two regions of nearly identical sequence and an alternative tissue specific STAT5B promoter. *Gene* 285, 311-318 (2002)

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

Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, Royer HD, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dörken B: Constitutive nuclear factor- κ B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100, 2961-2969 (1997)

Barth TFE, Martin-Subero JI, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechttersheimer G, Parwaresch RM, Lichter P, Siebert R, Möller P: Gains of 2p involving the *REL* locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 3681-3686 (2003)

Bentz M, Cabot G, Moos M, Speicher M, Ganser A, Lichter P, Döhner H: Detection of chimeric BCR-ABL genes on bone marrow samples and blood smears in chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemia by in situ hybridization. *Blood* 83, 1922-1928 (1994)

Bentz M, Barth TFE, Brüderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, Joos S, Viardot A, Feller AC, Müller-Hermelink H-K, Lichter P, Döhner H, Möller P: Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-Cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 393-401 (2001)

Bergh von A, Emanuel B, Zelderen-Bhola van S, Smesters T, Soest van R, Stul M, Vranckx H, Schuurin E, Hagemeijer A, Kluin P: A DNA probe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 14-22 (2000)

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CSM, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD: A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052–3065 (1998)

Boveri T: *Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren*. Fischer Verlag, Jena (1914)

Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R: STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488 (2000)

Bräuninger A, Hansmann ML, Strickler JG, Dummer R, Burg G, Rajewsky K, Küppers R: Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 340, 1239-1247 (1999)

Brinkley BR, Goepfert TM: Supernumerary Centrosomes and Cancer: Boveri's Hypothesis Resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton* 41, 281-288 (1998)

Bromberg J, Darnell Jr JE: The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468-2473 (2000)

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernández-Luna JL, Nuñez G, Dalton WS, Jove R: Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115 (1999)

Chai SK, Nichols GL, Rothman P: Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 159, 4720-4728 (1997)

Chen E, Beer PA, Godfrey AL, Ortmann CA, Li J, Costa-Pereira AP, Ingle CE, Dermitzakis ET, Campbell PJ, Green AR: Distinct Clinical Phenotypes Associated with JAK2V617F Reflect Differential STAT1 Signaling. *Cancer Cell* 18, 524-535 (2010)

Chen H, Lee JM, Zong Y, Borowitz M, Ng MH, Ambinder RF, Hayward SD: Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol* 75, 2929-2937 (2001)

Chen H, Hutt-Fletcher L, Cao L, Hayward SD: A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cell latently infected with Epstein-Barr virus. *J Virol* 77, 4139-4148 (2003)

Chui DT, Hammond D, Baird M, Shield L, Jackson R, Jarrett RF: Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 126-136 (2003)

Coffer PJ, Koenderman L, de Groot RP: The role of STATs in myeloid differentiation and leukaemia. *Oncogene* 19, 2511-2522 (2000)

Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG, Gauderman WJ, Pike MC, Bernstein L, Nathwani BN, Salam MT, Danley KL, Wang W, Gage J, Gundell-Miller S, Mack TM: IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 103, 3216-3221 (2004)

Dai W, Wang Q, Traganos F: Polo-like kinases and centrosome regulation. *Oncogene* 21, 6195-6200 (2002)

Daniel NN, Rothman P: JAK-STAT signalling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 19, 2523-2531 (2000)

Darnell Jr JE: STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635 (1997)

Deerberg-Wittram J, Weber-Matthiesen K, Schlegelberger B: Cytogenetics and molecular cytogenetics in Hodgkin's disease. *Ann Oncol*, (Suppl.4) S49-S53 (1996)

Diehl V, Pfreundschuh M: Hodgkin-Lymphome. In: Ostendorf PC, Seeber S (Hrsg.) *Hämatologie-Onkologie*. Urban und Schwarzenberg, München. 534-544 (1997)

Drexler HG: *The leukemia-lymphoma cell line facts book*. Academic Press, London (2001)

Dutertre S, Descamps S, Prigent C: On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 21, 6175-6183 (2002)

Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A: A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-924 (1997)

Falzetti D, Crescenzi B, Mateucci C, Falini B, Martelli MF, van den Berghe H, Mecucci C: Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. *Haematologica* 84, 298-305 (1999)

Fonatsch C, Jox A, Streubel B, Wolf J, Diehl V: Cytogenetic findings in Hodgkin's disease. In: Mauch, PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM (Hrsg.) *Hodgkin's Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 213-219 (1999)

Frank DA, Varticovski L: BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats. *Leukemia* 10, 1724-1730 (1996)

Glover DM, Hagan IM, Tavares AAM: Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev* 12, 3777-3787 (1998)

Golsteyn RM, Schultz SJ, Bartek J, Ziemiecki A, Ried T, Nigg EA: Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila polo* and *Saccharomyces cerevisiae Cdc5*. *J Cell Sci* 107, 1509-1517 (1994)

Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, Chapuy B, Takeyama K, Neuberg D, Golub TR, Kutok JL, Shipp MA: Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 116, 3268-3277 (2010)

Hannigan A, Wilson JB: Evaluation of LMP1 of Epstein-Barr virus as a therapeutic target by its inhibition. *Mol Cancer* 9, 184 (2010)

Harris NL: Hodgkin's disease: Classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* 12, 159-176 (1999)

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334, 297-314 (1998)

Herbst H, Samol J, Foss H-D, Raff T, Niedobitek G: Modulation of Interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed–Sternberg cells by Epstein–Barr virus. *J Pathol* 182, 299-306 (1997)

Hirano T, Ishihara K, Hibi M: Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19, 2548-2556 (2000)

Ho JM, Beattie BK, Squire JA, Frank DA, Barber DL: Fusion of the ets Transcription Factor TEL to Jak2 Results in Constitutive Jak-Stat Signaling. *Blood* 93, 4354-4364 (1999)

Hodgkin, T: On some morbid appearances of the absorbent gland and spleen. *Med Chir Trans* 17, 68-114 (1832)

Ihle JN, Witthuhn JA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O: Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13, 369-389 (1995)

Ihle JN: STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-334 (1996)

Ilaria Jr RL, Van Etten RA: P210 and P190^{BCR/ABL} induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704-31710 (1996)

Imada K, Leonard W: The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 37, 1-11 (2000)

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

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

Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martin-Subero JI, Wolf J, Adamowicz M, Barth TFE, Lichter P, Jauch A: 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 (2003)

Jove R: Preface: STAT signalling. *Oncogene* 19, 2466-2467 (2000)

Jücker M, Abts H, Li W, Schindler R, Merz H, Gunther A, von Kalle C, Schaadt M, Diamantstein T, Feller AC, Krueger GRF, Diehl V, Blankenstein T, Tesch H: Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood* 77, 2413-2418 (1991)

Junqueira LC, Carneiro J: *Histologie*, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (1996)

Kagami S, Nakajima H, Kumano K, Suzuki K, Suto A, Imada K, Davey HW, Saito Y, Takatsu K, Leonard WJ, Iwamoto I: Both Stat5a and Stat5b are required for antigen-induced eosinophil and T-cell recruitment into the tissue. *Blood* 95, 1370-1377 (2000)

Kahl C, Gesk S, Harder L, Harbott J, French L, Deloukas P, Grote W, Schlegelberger B, Siebert R: Detection of translocations involving the HOX11/TCL3-locus in 10q24 by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 129, 80-84 (2001)

Kanzler H, Küppers R, Hansmann M-L, Rajewsky K: Hodgkin and Reed Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184, 1495-1505 (1996)

Katayama H, Zhou H, Li Q, Tatsuka M, Sen S: Interaktion and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem* 276, 46219-46224 (2001)

Kazansky AV, Kabotyanski EB, Wyszomierski SL, Mancini MA, Rosen JM: Differential effects of prolactin and src/abl kinases on the nuclear translocation of STAT5B and STAT5A. *J Biol Chem* 274, 22484-22492 (1999)

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T: Interleukin-6 Family of Cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243-1254 (1995)

Kluiver J, Kok K, Pfeil I, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, van der Vlies P, Diepstra A, Atayar Ç, Poppema S, Küppers R, van den Berg A: Global correlation of genome and transcriptome changes in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 25, 21-29 (2007)

Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, Heinrich PC, Diehl V, Tesch H: STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 98, 762-770 (2001)

Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML: Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10962-10966 (1994)

Küppers R, Sousa AB, Baur AS, Strickler JG, Rajewski K, Hansmann M-L: Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med* 7, 285-292 (2001)

Küppers R: Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 84, 277-312 (2002)

Küppers R: The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 9, 15-27 (2009)

Lacronique V, Boueux A, Della Valle V, Poirel H, Quang CT, Mauchauffé M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA: A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-1312 (1997)

Larsen L, Röpke C: Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 110, 833-844 (2002)

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH: JAK2 V617F mutation is uncommon in non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma* 47, 313-314 (2006)

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck J, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387-397 (2005)

Levy DE, Gilliland DG: Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruption in mice. *Oncogene* 19, 2505-2510 (2000)

Lin J-X, Leonard WJ: The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 19, 2566-2576 (2000)

Lin TS, Mahajan S, Frank DA: STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 19, 2496-2504 (2000)

Lingle WL, Barrett SL, Negron VC, D'Assoro AB, Boeneman K, Liu W, Whitehead CM, Reynolds C, Salisbury JL: Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1978-1983 (2002)

Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M: Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 7, 1630-1636 (1989)

MacLeod RAF, Spitzer D, Bar-Am I, Sylvester JE, Kaufmann M, Wernich A, Drexler HG: Karyotypic dissection of Hodgkin's disease cell lines reveals ectopic subtelomers and ribosomal DNA at sites of multiple jumping translocations and genomic amplification. *Leukemia* 14, 1803-1814 (2000)

Mani H, Jaffe ES: Hodgkin lymphoma: an update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma* 9, 206-216 (2009)

Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Hansmann ML, Dyer MJS, Siebert R: Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 1474-1477 (2002)

Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R: Interphase cytogenetics of haematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 23, 1139-1148 (2003a)

Martin-Subero JI, Knippschild U, Harder L, Barth TFE, Riemke J, Grohmann S, Gesk S, Höppner J, Möller P, Parwaresch RM, Siebert R: Segmental chromosomal aberrations and centrosome amplifications: pathogenetic mechanisms in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma? *Leukemia* 17, 2214-2219 (2003b)

Martin-Subero JI, Wlodarska I, Bastard C, Picquenot JM, Höppner J, Giefing M, Klapper W, Siebert R: Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 108, 401-402 (2006)
Kommentar zu Mathas et al., *Blood* 106, 4287-4293 (2005)

Mathas S, Jöhrens K, Joos S, Lietz A, Hummel F, Janz M, Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Lichter P, Stein H, Scheidereit C, Dörken B: Elevated NF- κ B p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large cell, and other peripheral T cell lymphomas. *Blood* 106, 4287-4293 (2005)

Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Möller P: Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20, 157-158 (2006)

Meraldi P, Honda R, Nigg EA: Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* 21, 483-492 (2002)

Merdes A, Cleveland DW: Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J Cell Biol* 138, 953-956 (1997)

Mottok A, Renné C, Willenbrock K, Hansmann M-L, Bräuninger A: Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 110, 3387-3390 (2007)

Mottok A, Renné C, Seifert M, Oppermann E, Bechstein W, Hansmann M-L, Küppers R, Andreas Bräuninger A: Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood* 114, 4503-4506 (2009)

Mueller NE, Grufferman S: The epidemiology of Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM (Hrsg.) *Hodgkin's Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 61-77 (1999)

Nakatsuka S, Aozasa K: Epidemiology and pathologic features of Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol* 83, 391-397 (2006)

Nigg EA: Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32 (2001)

Nigg, EA: Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2, 815-825 (2002)

Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ: Centrosome defects and genetic instability in malignant tumours. *Cancer Res* 58, 3974-3985 (1998)

Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Malhotra R, Liotta L, Doxsey SJ: Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res* 61, 2212-2219 (2001)

Re D, Zander T, Diehl V, Wolf J: Genetic Instability in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13, 19-22 (2002)

Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S: IL-3 signaling and the role of src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* 19, 2532-2547 (2000)

Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, Berger U, Telford N, Aruliah S, Yin JA, Vanstraelen D, Barker HF, Tayler PC, O'Driscoll A, Benedetti F, Rudolph C, Kolb H-J, Hochhaus A, Hehlmann R, Chase A, Cross NCP: The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukaemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 65, 2662-2667 (2005)

Renné C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, Hinsch N, Döring C, Tiacci E, Klapper W, Möller P, Küppers R, Hansmann ML, Siebert R, Bräuninger A: High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 21, 780-787 (2007)

Reynolds GM, Billingham LJ, Gray LJ, Flavell JR, Najafipour S, Crocker J, Nelson P, Young LS, Murray PG: Interleukin 6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 118, 195-201 (2002)

Rodriguez C, Grosgeorge J, Nguyen VC, Gaudray P, Theillet C: Human gp130 transducer chain gene (IL6ST) is localized to chromosome band 5q11 and possesses a pseudogene on chromosome band 17p11. *Cytogenet Cell Genet* 70, 64-67 (1995)

Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, Chan WC, Zhao T, Haioun C, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Ott G, Müller-Hermelink HK, Connors JM, Braziel R, Grogan TM, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Chiorazzi M, Zhao H, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Staudt LM: Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favourable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198, 851-862 (2003)

Samanta A, Perazzona B, Chakraborty S, Sun X, Modi H, Bhatia R, Priebe W, Arlinghaus R: Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Epub* (2010)

Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Maehara N, Minamishima YA, Nishio S, Nagai E, Tanaka M: Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* 126, 13-19 (2001)

Schindler C, Darnell Jr JE: Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT-pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651 (1995)

Schmitz R, Renne C, Rosenquist R, Tinguely M, Distler V, Menestrina F, Lestani M, Stankovic T, Austen B, Bräuninger A, Hansmann ML, Küppers R: Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 19, 1452-1458 (2005)

Schouten HC, Sanger WG, Duggan M, Weisenburger DD, MacLennan KA, Armitage JO: Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Blood* 73, 2149-2154 (1989)

Scuto A, Krejci P, Popplewell L, Wu J, Wang Y, Kujawski M, Kowolik C, Xin H, Chen L, Wang Y, Kretzner L, Yu H, Wilcox WR, Yen Y, Forman S, Jove R: The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival. *Leukemia Epub* (2010)

Sen S, Zhou H, Zhang R-D, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W, Czerniak B: Amplification/Overexpression of a Mitotic Kinase Gene in Human Bladder Cancer. *J Natl Cancer Inst* 94, 1320-1329 (2002)

Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ: The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8, 239-245 (2007)

Siebert R, Schlegelberger B: Combined immunophenotyping and interphase cytogenetics in malignant lymphomas: results from FICTION studies. *Rev Clin Exp Hematol* 4, 41-55 (1997)

Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, Plendl H, Metzke S, Joos S, Zucca E, Weber-Matthiesen K, Roggero E, Grote W, Schlegelberger B: Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol* 9, 519-526 (1998a)

Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, Metzke S, Joos S, Weber-Matthiesen K, Grote W, Schlegelberger B: Application of Interphase Fluorescence In Situ Hybridization for the Detection of the Burkitt Translocation t(8;14)(q24;q32) in B-Cell Lymphomas. *Blood* 91, 984-990 (1998b)

Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trümper LH, von Bonin F, Kapp U, Patterson B, Snow BE, Mak TW: Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 97, 250-255 (2001)

Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, Mak TW: Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 618-626 (2002)

Skinnider BF, Mak TW: The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 4283-4297 (2002)

Smithgall TE, Briggs SD, Schreiner S, Lerner EC, Cheng H, Wilson MB: Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 19, 2612-2618 (2000)

Song JI, Grandis JR: STAT signalling in head and neck cancer. *Oncogene* 19, 2489-2495 (2000)

Staudt SM: The molecular and cellular origins of Hodgkin's disease. *J Exp Med* 191, 207-212 (2000)

Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, Johnson NA, Zhao Y, Telenius A, Neriah SB, McPherson A, Meissner B, Okoye UC, Diepstra A, van den Berg A, Sun M, Leung G, Jones SJ, Connors JM, Huntsman DG, Savage KJ, Rimsza LM, Horsman DE, Staudt LM, Steidl U, Marra MA, Gascoyne RD: MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 471, 377-381 (2011)

Stein H, Diehl V, Marafioti T, Jox A, Wolf J, Hummel M: The nature of Reed-Sternberg cells, lymphocytic and histiocytic cells and their molecular biology in Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM (Hrsg.) *Hodgkin's Disease*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 121-137 (1999)

Stein H, Delsol G, Pileri SA, Weiss LM, Poppema S, Jaffe ES: Classical Hodgkin lymphoma, introduction. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Hrsg.) *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4. Auflage. IARC Press, Lyon. 326-329 (2008)

Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Misawa S, Nagai M, Tagawa S, Yamagami T, Sugiyama H, Abe M, Fukuhara S, Kashima K: Interphase and metaphase detection of the breakpoint of 14q32 translocations in B-cell malignancies by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood* 85, 3223-3228 (1995)

Tilly H, Bastard C, Delastre T, Duval C, Bizet M, Lenormand B, Dauce JP, Monconduit M, Piguet H: Cytogenetic studies in untreated Hodgkin's disease. *Blood* 77, 1298-1304 (1991)

Ueda Y, Matsuda F, Misawa S, Taniwaka M: Tumor-specific rearrangements of the immunoglobulin heavy-chain gene in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma detected by in situ hybridization. *Blood* 87, 292-298 (1996)

Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P: Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 85-94 (2000)

Van Roosbroeck K, Cox L, Tousseyn T, Lahortiga I, Gielen O, Cauwelier B, De Paepe P, Verhoef G, Marynen P, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C, Cools J, Wlodarska I: *JAK2* rearrangements, including the novel *SEC31A-JAK2* fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. Epub (2011)

Vockerodt M, Morgan SL, Kuo M, Wei W, Chukwuma MB, Arrand JR, Kube D, Gordon J, Young LS, Woodman CB, Murray PG: The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol* 216, 83-92 (2008)

Wasielewski von R, Werner M, Fischer R, Hansmann M-L, Hubner K, Hasenclever D, Franklin J, Sextro M, Diehl V, Georgii A: lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. An immunohistochemical analysis of 208 reviewed Hodgkin's disease cases from the German Hodgkin Study Group. *Am J Pathol* 150, 793-803 (1997)

Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B: Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's Disease. *Blood* 86, 1464-1468 (1995a)

Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B: Clarification of dubious karyotypes in Hodgkin's disease by simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics (FICTION). *Cytogenet Cell Genet* 70, 243-245 (1995b)

Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heinrich PC, Horn F: Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 13, 276-288 (1993)

Weinreb M, Day PJR, Niggli F, Powell JE, Raafat F, Hesseling PB, Schneider JW, Hartley PS, Tzortzatou-Stathopoulou F, Khalek ERA, Mangoud A, El-Safy UR, Madanat F, Al Sheyyab M, Mpofu C, Revesz T, Rafii R, Tiedemann K, Waters KD, Barrantes JC, Nyongo A, Riyat MS, Mann JR: The role of Epstein-Barr virus in Hodgkins' disease from different geographical areas. *Arch Dis Child* 74, 27-31 (1996)

Weiss LM, Chan JKC, MacLennan K, Warnke RA: Pathology of classical Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM (Hrsg.) Hodgkin's Disease. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 101-120 (1999)

Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth TFE, Möller P: Mutations of the tumor suppressor gene *SOCS-1* in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 25, 2679-2684 (2006)

Wlodarska I, Nooyen P, Maes B, Martin-Subero JI, Siebert R, Pauwels P, de Wolf-Peeters C, Hagemeijer A: Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 706-710 (2003)

Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ: The biology of STAT4 und STAT6. *Oncogene* 19, 2577-2584 (2000)

Yahalom J: Favorable Early-Stage Hodgkin Lymphoma. *J Natl Compr Canc Netw* 4, 233-240 (2006)

Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Furihata M, Yokoyama A: AZ960, a novel Jak2 inhibitor, induces growth arrest and apoptosis in adult T-cell leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 9, 3386-3395 (2010)

Yoshikawa H, Matsubara K, Qian G-S, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG: SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28, 29-35 (2001)

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S: Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20, 189-193 (1998)

7 Anhang

Tabelle 1A: Rohwerte, aus denen die Ploidie der einzelnen Fälle, sowie die Abweichungen der einzelnen Assays davon, ermittelt wurden. Für jeden Fall und jede Zelllinie ist für jeden Genlokus die Zahl der Zellen angegeben, die eine bestimmte Anzahl an Signalen der jeweiligen Genorte zeigte. Daraus wurde der lokus-spezifische Median des Genortes für den jeweiligen Fall oder die jeweilige Zelllinie ermittelt.

Fall	<i>IL6ST</i>		<i>JAK2</i>		<i>STAT2/6</i>		<i>STAT3/5</i>		<i>PLK1</i>		<i>STK15</i>	
	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Zellen
1	3	5	78	3	3	7	4	5	3	7	71	4
	88	4	6	4	2	6	86	4	2	6	4	3
	8	3	3	5	4	5	6	3	63	5		
					165	4			19	4		
				4	3			5	3			
	Median = 4		Median = 3		Median = 4		Median = 4		Median = 5		Median = 4	
2	2	5	1	7	1	6	2	6	22	4	4	5
	1	4	17	6	67	4	12	3	6	3	28	4
	30	3	16	5	3	3	6	2			6	3
					3	2	1	1			1	2
	Median = 3		Median = 6		Median = 4		Median = 3		Median = 4		Median = 4	
3	9	4	8	4	11	4	1	7	7	4	2	6
	1	3	1	3	1	3	1	4	1	3	1	4
			2	2	1	2	1	3			5	3
											1	2
	Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 3	
4	1	4	2	4	1	6	2	4	2	3	1	3
	1	3	3	3	1	5					7	7
	9	2	9	2	1	4						
					4	3						
				5	2							
	Median = 2		Median = 2		Median = 3		Median = 4		Median = 3		Median = 2	
5	1	6	1	4	2	5	1	4	1	3	2	6
	2	4	2	3	1	4	2	3			1	4
	Median = 4		Median = 3		Median = 5		Median = 3				Median = 6	
6	1	8	1	13	1	10	2	4	1	6	1	6
	1	5	1	8	1	6	6	3	5	3	2	5
	10	4	3	7	12	5	3	2			10	4
	6	3	3	6	7	4					1	3
				2	3							
				1	2							
	Median = 4		Median = 7		Median = 5		Median = 3		Median = 3		Median = 4	
7	2	3	2	12	3	4	8	5	2	5	7	4
	17	4	3	11	37	3	7	4	22	4	8	3
			8	10			2	3	4	3		
			6	9								
		7	8									
		7	7									
		2	6									
		4	5									
		5	4									
		1	3									
	Median = 4		Median = 8		Median = 3		Median = 4,5		Median = 4		Median = 3	

Fall	<i>IL6ST</i>		<i>JAK2</i>		<i>STAT2/6</i>		<i>STAT3/5</i>		<i>PLK1</i>		<i>STK15</i>	
	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Zellen
8	1	6	2	12	1	10	2	6	1	6	1	6
	3	5	5	10	2	8	3	5	11	4	15	4
	7	4	5	9	1	5	21	4			3	3
	2	3	6	8	21	4	2	3				
			2	7								
			2	4								
	Median = 4		Median = 9		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4	
9	10	2	4	8	32	2	11	2	2	4	11	2
			9	7					29	2		
			18	6								
			48	5								
		15	4									
		1	3									
	Median = 2		Median = 5		Median = 2		Median = 2		Median = 2		Median = 2	
10	4	4	2	7	1	13	1	6	1	8	1	11
					1	8	3	4	1	4	1	8
					6	3	1	3	5	3	1	5
											5	4
	Median = 4		Median = 7		Median = 3		Median = 4		Median = 3		Median = 4	
11	1	5	1	8	1	8	4	4	7	4	2	5
	4	4	1	7	6	4	1	3	9	3	3	4
	4	3	1	6	1	3	1	2			6	3
			1	5								
		5	3									
	Median = 4		Median = 3		Median = 4		Median = 4		Median = 3		Median = 3	
12	145	3	16	4	4	4	12	3	87	3	1	2
	23	4	3	6	9	5	83	4	13	4	33	3
	9	5	3	7	31	6	23	5	3	5	16	4
	13	6	18	8	30	7	4	6	7	6	4	5
			34	9	34	8	3	7			2	6
			15	10	27	9	5	8				
			7	11	14	10						
			1	12	8	11						
			2	13	8	12						
			2	15	2	13						
				3	14							
	Median = 3		Median = 9		Median = 8		Median = 4		Median = 3		Median = 3	
13	1	5	1	7	3	5	2	4	2	4	2	4
			1	10					1	5		
	Median = 8,5		Median = 5		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4	
14	1	3	8	2	12	4	7	2	3	3	1	3
	8	4	1	3	21	5	2	3			4	4
	2	5	1	4	2	6	9	4				
	1	6	1	6	1	9	2	6				
	1	8										
	Median = 4		Median = 2		Median = 5		Median = 4		Median = 3		Median = 4	
15	10	2	14	2	29	2	13	2	19	2	21	2
	17	3	8	3	9	3	6	3	3	3	5	3
	5	4	4	4	4	4	1	4	4	4	2	4
	Median = 2		Median = 2		Median = 2		Median = 2		Median = 2		Median = 2	
16	16	3	31	3	66	3	7	3	1	2	1	2
	52	4	2	6	21	4	33	4	32	3	19	3
					3	5	3	5			7	4
											3	5
	Median = 4		Median = 3		Median = 3		Median = 4		Median = 3		Median = 3	

Fall	<i>IL6ST</i>		<i>JAK2</i>		<i>STAT2/6</i>		<i>STAT3/5</i>		<i>PLK1</i>		<i>STK15</i>		
	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Zellen	
17	1	3	10	3	2	3	5	3	1	4	9	4	
	2	4	2	4	1	5	1	4	11	5	1	5	
	3	5			8	6	3	6					
	1	7											
	Median = 5		Median = 3		Median = 6		Median = 3		Median = 5		Median = 4		
18	4	3	57	3	1	3	3	3	9	3	1	2	
	32	4	4	4	18	4	38	4	68	4	33	3	
	40	5	1	5	128	5	84	5	4	5	1	4	
	5	6	5	6	3	6	4	6			1	5	
	1	7			3	7	1	7			1	6	
	3	8			1	8	5	9					
		Median = 5		Median = 3		Median = 5		Median = 5		Median = 4		Median = 3	
		Median = 5		Median = 3		Median = 5		Median = 5		Median = 4		Median = 3	
19	1	2	12	2	6	4	1	2	3	3	9	4	
	20	3	2	3	25	5	9	3	10	4	1	5	
			1	4	3	6	4	4	1	5			
						9							
	Median = 3		Median = 2		Median = 5		Median = 3		Median = 4		Median = 4		
20	1	3	1	2	3	3	3	4	1	3	1	3	
	8	4	4	4	8	4			11	4	2	4	
	1	5											
	Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 4		
21	3	3	1	4	1	2	1	3	1	3	5	3	
	2	4	1	6	3	3	3	4	6	4	4	4	
					5	4			1	5			
					1	6							
					1	7							
	Median = 3		Median = 5		Median = 4		Median = 4		Median = 4		Median = 3		
KM-H2	89	3	10	3	1	2	3	2	44	3	71	2	
	10	4	86	4	42	3	96	3	55	4	23	3	
	2	5	4	5	147	4	1	4	1	5	5	4	
			2	6	6	5			1	8	1	5	
					1	6					2	6	
				3	7					2	7		
	Median = 3		Median = 4		Median = 4		Median = 3		Median = 4		Median = 2		
L428	1	1	10	4	24	4	10	4	96	3	35	3	
	13	2	33	5	125	5	82	5	1	4	57	4	
	84	3	24	6	39	6	5	6	1	10	6	5	
	1	5	38	7	8	7	2	7			1	6	
	1	9	8	8	1	8	1	8			1	7	
			2	9	1	10							
	Median = 3 ¹⁴		Median = 6		Median = 5		Median = 5		Median = 3		Median = 4		
HDL M-2	95	1	5	6	176	2	96	2	90	2	93	1	
	5	2	1	7	9	3	4	3	7	3	7	2	
			12	8	9	4	1	4	3	4			
			15	9									
			14	10			1	5					
			5	11									
			1	12									
			1	16									
			1	19									
			1	25									
		1	27										
	Median = 1		Median = 9 ¹⁵		Median = 2		Median = 2 ¹⁶		Median = 2		Median = 1		

¹⁴ Dieser Wert gilt nur für die rot markierte Sonde. Die grün markierte Sonde wies regelmäßig 1-3 Splits pro Zellkern auf.

¹⁵ Dieser Assays zeigte neben der Amplifikation noch drei weitere kolokalisierte rot-grüne Signale und ein isoliertes grünes Signal im Sinne eines Split.

¹⁶ Dieser Assay zeigte durchgehend ein zusätzliches grünes Signal. Weiterführende Untersuchungen wiesen hier auf ein Bruchereignis mit Insertion des Bruchstückes weiter telomerisch hin.

Fall	<i>IL6ST</i>		<i>JAK2</i>		<i>STAT2/6</i>		<i>STAT3/5</i>		<i>PLK1</i>		<i>STK15</i>	
	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Signale	Anzahl Zellen	Anzahl Zellen
L1236	10	2	4	3	3	3	1	2	8	2	3	2
	61	3	14	4	73	4	63	3	71	3	34	3
	12	4	26	5	11	5	24	4	11	4	29	4
	4	5	22	6	3	6	2	5	4	5	15	5
	8	6	13	7	3	7	6	6	6	6	7	6
	1	7	8	8	9	8	2	7	1	7	7	7
	2	8	1	9			1	8	1	11	2	8
	1	11	3	10			1	14			2	9
	1	15	1	11			1	15			1	11
			1	12								
			2	13								
			1	21								
			1	23								
			1	25								
			1	27								
	Median = 3		Median = 6		Median = 4 ¹⁷		Median = 3		Median = 3		Median = 4	

Tabelle 2A: Ergebnisse der Hybridisierungen der TMA mit dem *JAK2*-Assay. Dem jeweiligen Fall ist die entsprechende Anzahl kolokalisierter rot-grüner Signale des *JAK2*-Assays zugeordnet.

TMA-Fall-Nr.	<i>JAK2</i> -Ergebnis	TMA-Fall-Nr.	<i>JAK2</i> -Ergebnis
1	2-4 kolokalisierte Signale	16	3 kolokalisierte Signale
2	Amplifiziert	17	3-4 kolokalisierte Signale
3	3-6 kolokalisierte Signale	18	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen
4	3-7 kolokalisierte Signale	19	3-7 kolokalisierte Signale
5	4-10 kolokalisierte Signale	20	4-8 kolokalisierte Signale
6	Amplifiziert	21	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen
7	2-4 kolokalisierte Signale	22	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen
8	3-8 kolokalisierte Signale	23	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen
9	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen	24	3-4 kolokalisierte Signale
10	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen	25	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen
11	4 kolokalisierte Signale	26	3-5 kolokalisierte Signale
12	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen	27	2-4 kolokalisierte Signale
13	4-6 kolokalisierte Signale	28	4 kolokalisierte Signale
14	4-5 kolokalisierte Signale	29	2 kolokalisierte Signale keine eindeutigen HRS-Zellen
15	3-6 kolokalisierte Signale	30	3-4 kolokalisierte Signale

¹⁷ Diese Zahlen gelten nur für den *STAT2*-Lokus. Für den *STAT6*-Lokus konnte ein Verlust des SO markierten Klons mit einem Median von zwei Signalen und eine Amplifikation des SG markierten Klons mit im Median sechs Signalen gefunden werden.

03/02/2005 13:39 +4943116971264
03/02/2005 12:40 +4943116971264
DATEI Nr.970 17.11.03 15:30 CODE:

2.MED KLINIK MOL.LAB

S. 02

FAX:+49 431 597-44

SEITE 1

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universität Kliniklinik - Schwannenweg 20 - 24105 Kiel

Herrn
Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Parwaresch
Institut für Hämatopathologie und Lymphknotenregister
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Niemannsweg 11
24105 Kiel

Schwannenweg 20
D-24105 Kiel
Telefon 0431 597-1610
Telefax 0431 597-1611

Datum: 31. Oktober 2003

Az.: D 425/03
Verbundprojekt Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen
Antrag Nr. 70-3173-TR3

Lieber Herr Parwaresch,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 10.10.2003.

Wenn das entnommene Material vollständig anonymisiert ist, das heißt, wenn kein Personenbezug mehr hergestellt werden kann, hat die Ethik-Kommission weder juristische noch ethische Bedenken, die o.g. Studie durchzuführen.

Mit freundlichen Grüßen

J. Schaub

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Herrn
PD Dr. R. Siebert
Institut für Humangenetik
Schwanenweg 24
24105 Kiel

Datum:

09.02.2005

AZ.: D 403/05

Studienplan:

Verbundprojekt "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen"

Studienprotokoll, Patienteninformation und Einverständniserklärung vom 19. 11.2005

Leiter der Studie: Prof. L. Trümper, Göttingen

Antragsteller: PD. Dr. R. Siebert, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Datum des Antrages: 05.02.2005

Lieber Herr Siebert,

nach den Verfahrensgrundsätzen des Arbeitskreises Medizinischer Ethik-Kommissionen in der Bundesrepublik Deutschland erkennt die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nach Durchsicht der Unterlagen durch mich als Vorsitzenden das Votum der Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen vom 27.01.2005 an. Sie haben damit Ihre berufsethischen und berufsrechtlichen Pflichten erfüllt.

Wir bitten Sie, unsere Kommission über wesentliche Änderungen des Protokolls (Amendments) zu unterrichten und das Ende der Studie mitzuteilen, einschließlich eines kurzen abschließenden Berichts mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind
Ich wünsche Ihnen für die Bearbeitung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

J. Schaub

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

8 Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen Personen, die an der Durchführung dieser Arbeit beteiligt waren, und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Dr. med. R. Siebert, Direktor des Institutes für Humangenetik, Kiel, für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, sowie für die Themenstellung. Durch seine freundliche, zugewandte Art, sein enormes Wissen und die vielen guten Ratschläge, war er der beste Doktorvater, den ich mir hätte wünschen können. Außerdem danke ich für die Möglichkeit, Teile der Ergebnisse im Rahmen des allrussischen Wettbewerbs der Sechenov Akademie in Moskau vorstellen zu können.

Herrn Dr. I. Martin-Subero danke ich für die Hilfe und Unterstützung in praktisch allen Phasen dieser Arbeit und die Freundschaft innerhalb und außerhalb des Institutes.

Allen Kollegen des Institutes danke ich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung bei der Literaturrecherche und die Hilfe in allen großen und kleinen Fragen.

Frau C. Becker und Frau D. Schuster gilt mein herzlicher Dank für die Einführung in die Laborarbeit und die kontinuierliche Hilfe bei derselben.

Meinem Mann, Herrn Dr. med. E. Oates, danke ich für seine Geduld, die unverzichtbare Hilfe bei der Textverarbeitung und vor allem für die liebevolle Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jennifer Oates, geb. Riemke
Geburtsdatum: 28. März 1979
Geburtsort: Flensburg
Anschrift: Stauffenbergstr. 8, 24937 Flensburg
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

1985-1989 Grundschule Eggebek
1989-1992 Konrad-Adenauer-Gymnasium, Meckenheim
1992-1998 Lornsenschule, Schleswig

Hochschulstudium

1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
8/2000 Ärztliche Vorprüfung
8/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

02/2004-05/2004 PJ-Tertial Innere Medizin (Westküstenklinikum, Heide)
05/2004-09/2004 PJ-Tertial Gynäkologie und Geburtshilfe (Westküstenklinikum, Heide)
10/2004-12/2004 PJ-Tertial Allgemeinchirurgie (Nepean Hospital, Penrith, Australien)
12/2004-02/2005 PJ-Tertial Herz- und Gefäßchirurgie (Universitätsklinikum, Kiel)

Berufliche Tätigkeit

06/2005-07/2007 Weiterbildungsassistentin in der Frauenklinik der Ev.-Luth.
Diakonissenanstalt in Flensburg
09/2007-01/2010 Weiterbildungsassistentin in der Frauenklinik im Nepean Hospital,
Kingswood, Australien (Lehrkrankenhaus der Universität Sydney)
03/2010-06/2011 Weiterbildungsassistentin in der Frauenklinik der Ev.-Luth.
Diakonissenanstalt in Flensburg
Seit 06/2011 Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe in der Frauenklinik
der Ev.-Luth. Diakonissenanstalt in Flensburg

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen und Präsentationen

01/2005 Präsentation von Teilen der Ergebnisse auf dem Kongress für junge
Wissenschaftler an der Sechenov Medizinakademie, Moskau, Russland

Martin-Subero JI, Knippschild U, Harder L, Barth TFE, Riemke J, Grohmann S, Gesk S, Höppner J, Möller P, Parwaresch RM, Siebert R: Segmental chromosomal aberrations and centrosome amplifications: pathogenetic mechanisms in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma? *Leukemia* 17, 2214-2219 (2003)

Martin-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A, Callet-Bauchu E, Harder L, Bastard C, Schmitz R, Grohmann S, Höppner J, Riemke J, Barth TFE, Berger F, Bernd H-W, Claviez A, Gesk S, Frank GA, Kaplanskaya IB, Möller P, Parwaresch RM, Rüdiger T, Stein H, Küppers R, Hansmann ML, Siebert R: Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 66, 10332-10338 (2006)

Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, Hüsken J, Giefing M, Nagel I, Riemke J, Chott A, Klapper W, Parrens M, Merlio J-P, Küppers R, Bräuninger A, Siebert R, Hansmann M-L: Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. *Haematologica* 93, 1318-1326 (2008)