

**Genomweite
Genexpressionsanalyse des klassischen
Hodgkin-Lymphoms:
Die verlorene B-Zellidentität**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Ines Schwering
aus Köln

Köln, 2003

Berichterstatter: PD Dr. Ralf Küppers
Prof. Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2003

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung	Erklärung
ABC-DLCL	In-vitro-aktivierter B-Zell-Typ-DLCL
AIDS	Erworbenes Immundefizienz-Syndrom
Aqua dest.	destilliertes Wasser
B-CLL	B-Zell chronische lymphozytische Leukämie
BCR	B-Zellrezeptor
BL	Burkitt-Lymphom
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
CC	Zentrozyten
cDNA	komplementäre DNA
cHL	klassisches HL
cRNA	komplementäre RNA
D	Diversitäts-Elemente der V-Gene
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	Apoptose-induzierender-Signalkomplex
DLCL	Diffus-großzelliges Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr Virus
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FL	Folikuläres Lymphom
h	Stunde
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
Ig	Immunoglobulin
J	Verbindungs-Elemente der V-Gene
KZ	Keimzentrum
KZ-DLCL	KZ-Typ-DLCL
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien
LPHL	Lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex
Min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
NHL	Nicht-Hodgkin-Lymphom
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression
SAK	Streptavidinkügelchen
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Variabilitäts-Elemente der V-Gene
ZB	Zentroblasten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Frühe B-Zellentwicklung	1
1.1.1	VDJ-Rekombination	2
1.1.2	Eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren determiniert die B-Zellidentität	2
1.2	Das BCR-Signal in reifen B-Zellen	4
1.3	Der Verlauf der T-Zell-abhängigen Immunantwort	5
1.4	B-Zell-Lymphome	6
1.5	B-Zell-Nicht-Hodgkin-Lymphome (B-Zell-NHL)	7
1.5.1	Das Diffus-Grosszellige Lymphom (DLCL)	7
1.5.2	Das Burkitt Lymphom (BL)	8
1.5.3	Das Follikuläre Lymphom (FL)	8
1.5.4	B-Zell-chronisch-lymphozytische Leukämie (B-CLL)	9
1.6	Das HL	10
1.6.1	Allgemeine Einleitung	10
1.6.2	Immunhistochemische Analysen des cHL	11
1.6.3	Ursprung und Klonalität der HRS-Zellen	12
1.6.4	Pathogenese	13
1.6.4.1	Epstein-Barr Virus (EBV) und andere Kandidatenviren	14
1.1.1.2	Chromosomale Instabilität	15
1.1.1.3	Chromosomale Aberrationen	15
1.1.1.4	Analyse von Onkogenen und Tumorsuppressorgen	16
1.1.1.5	Konstitutive Aktivität von Signalwegen im cHL: NF κ B, JAK/STAT, AP-1, IL-13	17
1.1.1.6	Apoptose	19
1.1.1.7	Signale zwischen HRS-Zellen und dem zellulären Infiltrat	20
1.1.5	Etablierung von HL-Zelllinien	21
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Zelllinien und Kulturbedingungen	24
2.2	Aufreinigung der Zellpopulationen für die Genexpressionsanalysen	24
2.2.1	Aufreinigung von humanen tonsillären KZ-B-Zellen für die SAGE Analyse	24
2.2.2	Aufreinigung von Zellen für die Chip-basierten Genexpressionsstudien	24
2.3	SAGE	25
2.3.1	Generierung und Analyse der SAGE-Genexpressionsprofile	25
2.3.1.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	26
2.3.1.2	Adapterligation	27
2.3.1.3	NlaIII-Reaktion und Bindung an die SAK	27
2.3.1.4	Ligation der Adapter	28
2.3.1.5	Herstellung der Tags durch Schneiden mit BsmFI	28

2.3.1.6	Ligation der Tags/Amplifizierung der Ditags.....	28
2.3.1.7	Gel-Aufreinigung der Ditags und NlaIII-Reaktion und Aufreinigung der Ditags nach Powell et al. (Powell, 1998).....	29
2.3.1.8	Generierung und Aufreinigung der Konkatemere	29
2.3.1.9	Klonierung der Konkatemere	30
2.3.1.10	Analyse der SAGE-Profile	30
2.4	Genchip-Analysen.....	30
2.4.1	Generierung von cRNA und Chip-Hybridisierung.....	31
2.4.2	Biostatistische Analyse der Chip-basierten Daten.....	31
2.5	Datenbankrecherche für B-Zellmarker.....	32
2.6	Sequenzanalyse von Pax-5 cDNA.....	33
2.7	Immunhistochemie für ausgewählte B-Zellmarker	33
2.8	Semiquantitative RT-PCR der cHL-Zelllinien	34
2.8.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	34
2.8.2	Durchführung der semiquantitativen RT-PCR	34
2.9	Immunoblot-Analyse.....	35
2.10	FACS-Analyse.....	35
2.11	RT-PCR von mikrodissektierten HRS-Zellen.....	35
2.11.1	Charakterisierung der Fälle	35
2.11.2	Färbung der Gewebeschnitte und Mikrodissektion	36
2.11.3	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	36
2.11.4	Durchführung der RT-PCR	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Aufreinigung humaner ZB.....	39
3.2	SAGE-Analyse der cHL-Zelllinie L1236 und humaner KZ-B-Zellen	40
3.2.1	Generierung und Analyse der SAGE-Profile der cHL-Zelllinie L1236 und humaner KZ-B-Zellen	40
3.2.2	Identifizierung der in der Zelllinie L1236 herunterregulierten Transkripte	42
3.2.3	Analyse der mittels SAGE identifizierten heraufregulierten Transkripte.....	43
3.2.4	Verifizierung der Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR.....	46
3.2.5	RT-PCR Daten für heraufregulierte Gene in drei weiteren cHL-Zelllinien.....	49
3.2.6	Expression der heraufregulierten Gene in primären cHL-Fällen	50
3.3	Chip-basierte Genexpressionsanalysen von cHL-Zelllinien, LCL, primären B-Zell-NHL und B-Zell-NHL-Zelllinien	51
3.3.1	Unsupervised Clusteringanalyse	52
3.3.2	Identifizierung von differentiell in HRS-Zellen ausgeprägten Genen.....	55
3.3.3	Proteinexpression in cHL-Zelllinien	57
3.3.4	RNA-Expression der HRS-Zell-spezifischen Gene in primären HL-Fällen.....	58
3.4	Die verlorene B-Zellidentität in HRS-Zellen.....	60

3.4.1	SAGE-Daten decken eine umfassende Herunterregulation von B-Zelllinien-spezifischen Genen in der Zelllinie L1236 auf	60
3.4.2	Genchip-Expressionsdaten verdeutlichen den Verlust der B-Zellidentität als ein generelles Merkmal von cHL-Zelllinien	63
3.4.3	Proteinexpression ausgewählter B-Zellidentitätsgene in primären HRS-Zellen	65
3.4.4	Verbleibende Expression von B-Zellliniengenen in HRS-Zellen	68
3.4.5	Sequenzanalyse der Pax-5-cDNA	69
4	Diskussion	70
4.1	Zelllinien versus Primärgewebe	70
4.2	SAGE oder Genchip: Die Methode der Wahl	71
4.3	Verlorene B-Zellidentität in HRS-Zellen	72
4.3.1	Systematische Herunterregulation von B-Zelllinien-spezifischen Genen in HRS-Zellen 72	
4.3.2	Potenzielle Mechanismen für den Verlust der B-Zellidentität	75
4.3.2.1	Partieller Plasmazellphänotyp?	75
4.3.2.2	Pax-5-Aktivität?	76
4.3.2.3	Dominant-negativer Regulator?	77
4.3.3	Verlust der B-Zellidentität: Bedeutung für die Lymphomentstehung des cHL	78
4.4	SAGE-Analyse	79
4.4.1	Herunterregulierte Transkripte in der cHL- Zelllinie L1236	80
4.4.2	Heraufregulierte Transkripte in der cHL-Zelllinie L1236 und ihre potenzielle Relevanz für die Pathogenese des HL	81
4.5	Genchip-Analyse	83
4.5.1	Genchipdaten identifizieren cHL-Zelllinien als eine distinkte Lymphomentität mit eigenem Genexpressionsprofil	83
4.5.2	cHL-Zelllinien zeigen eine Genexpressionssignatur „in-vitro-aktiverter B-Zellen“ und ähneln in diesem Aspekt LCL und ABC-DLCL	84
4.5.3	Identifizierung HRS-Zell-spezifischer Gene und ihre potenzielle Relevanz für die Pathogenese des HL	85
4.5.4	Implikationen für die Pathogenese, Diagnose und Behandlung des cHL	87
4.6	Ausblick	88
5	Zusammenfassung	90
6	Literatur	92
Anhang	105

1 Einleitung

Das Immunsystem schützt den Menschen vor Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen). Die Immunreaktion teilt sich in eine frühe Phase der angeborenen Immunität und eine spätere Phase der adaptiven Immunität ein. Die angeborene Immunität vermittelt die unspezifische Eliminierung von Pathogenen z.B. durch phagozytierende Zellen. Hierbei werden meistens konservierte Pathogenantigene durch Rezeptoren auf den phagozytierenden Zellen erkannt. Während der spezifischen adaptiven Immunantwort kann ein verstärkter Schutz bei wiederholten Infektionen gleichartiger Pathogene erworben werden. Am letzteren Prozess beteiligen sich vornehmlich zwei Zelltypen: Die B- und die T-Zellen. B-Zellen erkennen Antigene direkt, mittels ihres B-Zellrezeptors (BCR) bzw. der von ihnen gebildeten Antikörper. T-Zellen erkennen Antigene indirekt, in Form prozessierter Peptide, die auf Membranproteinen den sogenannten Haupt-Histokompatibilitätskomplexen (MHC-Komplexen) von verschiedenen Zellen präsentiert werden.

Die Immunreaktion wird abhängig von den beteiligten Zelltypen unterteilt in humoral- und zellulär-vermittelte Immunität. In der B-Zell-vermittelten, T-Zell-unabhängigen (meist ausgelöst durch polymere Antigene) und der T-Zell-abhängigen Immunantwort sekretieren B-Zellen Antikörper, die die Immunität vermitteln. Im Verlauf der T-Zell-abhängigen Immunantwort werden Antikörper-produzierende Plasmazellen und langlebige Gedächtnis-B-Zellen, mit hochaffinen BCR gebildet.

1.1 Frühe B-Zellentwicklung

B-Zellen werden während der menschlichen Embryonalentwicklung zunächst in der fötalen Leber und danach im Knochenmark gebildet. Aus hämatopoetischen Stammzellen werden sämtliche Zellen des peripheren Bluts gebildet, so auch ein gemeinsamer myeloiden-/lymphoider Vorläufer, aus dem alle Blutleukozyten entstehen. Durch verschiedene Differenzierungsschritte in der frühen B-Zelldifferenzierung entstehen aus einer lymphoiden Vorläuferzellen reife B-Zellen mit funktionellen, nicht-autoreaktiven BCR, die in die Peripherie auswandern (Rajewsky, 1996).

1.1.1 VDJ-Rekombination

Der BCR setzt sich aus je zwei schweren und zwei leichten Immunglobulin-Ketten zusammen. Beide bestehen aus einer konstanten Region und einer variablen (V) Region, welche die Spezifität des BCR ausmacht. Im Knochenmark wird die V-Region der schweren Ketten durch somatische Genumlagerung dreier Gensegmente, den V-, den Diversitäts (D)- und den Verbindungs (J)-Gensegmenten gebildet. RAG1 und 2 sind Proteine, die diese Reaktion vermitteln (McBlane et al., 1995; Oettinger et al., 1990). Die Verbindungsstellen werden durch Exonukleasen, die einzelne Basen an den Verbindungsstellen abbauen, und das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase, das zusätzliche Nukleotide, die sogenannten N-Nukleotide, an den Verbindungsstellen einsetzen kann, verändert. Diese Veränderungen können eine Verschiebung des Leserasters des V-Gens bewirken, was zu einem nicht-funktionellen BCR führt. Es besteht jedoch die Möglichkeit, den zweiten Locus der schweren Kette zu rekombinieren, sodass eine funktionelle Umlagerung gebildet wird (Rajewsky, 1996). Nach erfolgreicher Umlagerung des Schwere-Ketten-Locus wird im Knochenmark ein Prä-BCR mithilfe der surrogaten-leichten Kette auf der Oberfläche präsentiert (Meffre et al., 2000; Rajewsky, 1996). Meist nach der Umlagerung des Schwere-Ketten-Locus werden die V- und die J-Gensegmente für die leichten Ketten umgelagert. B-Zellen, die einen funktionellen, nicht-autoreaktiven BCR ausprägen, verlassen als naive B-Zellen das Knochenmark und gelangen in die Peripherie (Rajewsky, 1996). Prägen B-Zellen einen autoreaktiven BCR aus, so kann durch sekundäre Umlagerungsprozesse ein funktioneller, nicht-autoreaktiver BCR gebildet werden (Gay et al., 1993; Radic et al., 1993; Tiegs et al., 1993), ansonsten wird Apoptose eingeleitet.

Durch enorm große Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen V-, (D-) und J-Gensegmente sowie die oben genannten Veränderungen an den Verbindungsstellen können mehr als 10^{14} verschiedene BCR generiert werden (Sanz, 1991), sodass jede B-Zelle einen einzigartigen BCR aufweist, der als klonaler Marker benutzt werden kann.

1.1.2 Eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren determiniert die B-Zellidentität

Diverse Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der B-Zellentwicklung. Mäuse, die defizient für E2A, PU.1, EBF oder Pax-5 sind, zeigen eine blockierte B-Zellentwicklung. Der Zeitpunkt, an dem die B-Zellentwicklung stoppt, liegt bei allen Faktoren (außer Pax-5) noch vor der Expression und Umlagerung der Immunglobulin-V-Gene, also sehr früh in der B-Zellentwicklung (Bain et al., 1994; Lin

und Grosschedl, 1995; McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994; Urbanek et al., 1994; Zhuang et al., 1994).

PU.1 ist ein Ets-Transkriptionsfaktor. Es ist ein "Masterregulator" in der Entwicklung eines lymphoiden/myeloiden Vorläufers, indem es die Expression entscheidender B-Zell- und Myeloid-spezifischer Gene aktiviert (Oikawa et al., 1999). PU.1-defiziente Mäuse besitzen keine peripheren Blutleukozyten (Tondravi et al., 1997). Weiterhin geht man von einer transkriptionellen Hierarchie aus, in deren Verlauf Transkriptionsfaktoren die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren bzw. anderer Zielgene, die wichtig für den weiteren Verlauf der B-Zellentwicklung sind, aktivieren. So aktiviert das E2A Genprodukt die Expression von EBF, einem Transkriptionsfaktor, der daraufhin die Transkription von Pax-5 aktiviert (Kee et al., 2000). E2A Proteine werden ubiquitär in der Embryogenese und in adultem Gewebe ausgeprägt. Das Gen E2A kodiert für zwei Proteine, E12 und E47, die durch differenzielles Splicen entstehen. Während normalerweise E12/E47 Heterodimere gebildet werden, kommt es nur in B-Zellen zur Bildung von E47-Homodimeren. Auch wenn die B-Zell-spezifische Expression von E47-Homodimeren für eine Linien-spezifische Funktion spricht, werden doch beide Proteine, E12 und E47, benötigt, um eine normale B-Zellentwicklung zu gewährleisten (Greenbaum und Zhuang, 2002). Die transkriptionelle Aktivität von E2A kann durch Notch 1/Notch 2 (Ordentlich et al., 1998) oder durch Mitglieder der Id-Proteinfamilie (Loveys et al., 1996; Sun et al., 1991) gehemmt werden. Eine konstitutive Aktivität von Notch 1 im Knochenmark hemmt die B-Zellentwicklung zugunsten einer verstärkten T-Zellentwicklung im Knochenmark (Radtke et al., 1999). EBF wird in Pro-, Prä- und reifen B-Zelllinien ausgeprägt, jedoch nicht in Multiplen Myelomzelllinien, die transformierte Plasmazellen darstellen (Maier und Hagman, 2002). Es bindet als Homodimer an spezifische DNA-Bindungsstellen und reguliert die Transkription von Genen wie $\lambda 5$, VpreB, blk, CD19, Pax-5 oder Ig- β , die eine wichtige Rolle in der frühen B-Zellentwicklung spielen. E2A und EBF wirken in der Aktivierung diverser Zielgene synergistisch (Maier und Hagman, 2002). Pax-5 bindet degenerierte DNA-Erkennungssequenzen in vielen verschiedenen Genen, so z.B. CD19 und Ig- α (Fitzsimmons et al., 1996; Kozmik et al., 1992). Andere Faktoren tragen vermutlich zur DNA-Bindung von Pax-5 bei, so z.B. Ets-Proteine, c-Myb oder AML1, abhängig von dem zu aktivierenden Gen (Maier und Hagman, 2002). Die transkriptionelle Aktivität von Pax-5 wird vermutlich durch die Interaktion mit Mitgliedern der Id-Proteinfamilie inhibiert (Roberts et al., 2001). Pax-5 ist für die endgültige Determinierung der B-Zellidentität

zuständig, da Pax-5-defiziente Vorläufer-B-Zellen sich unter geeigneten Bedingungen in andere Zelllinien differenzieren lassen, eine Fähigkeit, die Pax-5⁺-Vorläufer-B-Zellen nicht besitzen (Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999)□.

1.2 Das BCR-Signal in reifen B-Zellen

Der BCR besteht aus einer Antigen-bindenden Untereinheit, dem Immunglobulin-Teil, und einer Signal-transduzierenden Untereinheit, einem Heterodimer aus Ig- α und Ig- β , zwei Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie. Das BCR-Signal vermittelt so unterschiedliche biologische Reaktionen wie Proliferation, Anergie oder Apoptose, abhängig vom Differenzierungsgrad der B-Zelle, Art des Antigens, Signalen durch Korezeptoren oder vom Vorhandensein von T-Zellhilfe.

Nach Ligandenbindung wird der BCR in Sphingolipid- und Cholesterin-reiche Lipidmikrodomänen, sogenannte „lipid-rafts“, rekrutiert und bestimmte Proteinmotive in den cytoplasmatischen Domänen von Ig- α und Ig- β werden durch Src-Kinasen (Lyn, Fyn, Blk) phosphoryliert. Die Mechanismen die nach der Antigenbindung zur Phosphorylierung von Ig- α und Ig- β führen sind umstritten (Gold, 2002). Das phosphorylierte Heterodimer rekrutiert Syk und Src-Kinasen und führt zu deren Aktivierung. Syk wiederum phosphoryliert das B-Zell-Linkerprotein (BLNK) (Wienands und Engels, 2001). Von beiden Proteinen Syk und BLNK ist eine (Prä-) Assoziation mit dem nicht-ligierten BCR berichtet worden. BLNK ist essenziell für das BCR-Signal, es rekrutiert weitere Signalmediatoren (z.B. PLC- γ 2, Vav, Grb2 und Btk) und vermittelt durch enge Kolokalisation der Faktoren deren Aktivierung (Wienands und Engels, 2001). Syk und Btk zusammen führen zu einer optimalen Aktivierung von PLC- γ 2. Die aktivierte PLC- γ 2 katalysiert die Bildung der Signalmediatoren IP₃ (Inositoltriphosphat) und Diacylglycerol, welche die Ca²⁺-Mobilisation und die Aktivierung der Proteinkinase C vermitteln (Gold, 2002). Die Aktivität von PLC- γ 2, PI3K und Vav resultiert schlussendlich in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und (NF)-AT (Gold, 2002).

Es existieren diverse Korezeptoren, die das BCR-Signal regulieren. CD19, ein aktivierender Korezeptor, interagiert über CD21 mit Komplementfaktoren. CD19 rekrutiert Moleküle wie Src-Kinasen, PI3K und Vav in die lipid rafts. Dies führt zur Aktivierung dieser Moleküle, was das BCR-Signal positiv beeinflusst. CD22 und CD72 wiederum sind negative Regulatoren, sie rekrutieren Phosphatasen, die zum Abbruch

des BCR-Signals führen. So z.B. die Phosphatase SHP-1, die für die Dephosphorylierung der verschiedenen Proteintyrosinkinasen und deren Substrate (z.B. BLNK) zuständig ist (Wienands und Engels, 2001).

1.3 Der Verlauf der T-Zell-abhängigen Immunantwort

Treffen naive B-Zellen in der T-Zellzone peripherer lymphoider Organe auf ihr spezifisches Antigen und binden dies an ihren BCR, werden sie aktiviert (Jacob und Kelsoe, 1992). Durch Proliferation bilden sich B-Zellfoci aus. Einige Zellen differenzieren sich zu kurzlebigen, niedrig-affinen Plasmazellen (Liu et al., 1991). Andere Zellen führen durch Wanderung in primäre Follikel und nachfolgende Proliferation zur Bildung von Keimzentren (KZ) (Jacob und Kelsoe, 1992). Hierbei entwickelt sich die dunkle Zone, die vornehmlich aus CD77-exprimierenden, proliferierenden Zentroblasten (ZB) besteht, und die helle Zone, in der sich nicht-proliferierende Zentrozyten sowie T-Helferzellen, Makrophagen und follikulär-dendritische Zellen befinden (Kroese et al., 1990; Stein et al., 1982). Im KZ findet eine Veränderung des BCR durch die somatische Hypermutation statt, ein Prozess, der vermutlich in den ZB stattfindet (Liu et al., 1992). Hierbei werden Mutationen in die Gene der variablen Regionen des BCR eingeführt und wird dessen Affinität verändert. Die somatisch mutierten ZB differenzieren sich zu Zentrozyten und wandern in die helle KZ-Zone ein, in der sie um Bindung an das spezifische Antigen, welches von follikulär-dendritischen Zellen präsentiert wird, konkurrieren. Während naive B-Zellen das anti-apoptotische Protein Bcl-2 ausprägen, wird es während der KZ-Reaktion herunterreguliert, dies führt zu einer Apoptoseneigung in KZ-Zellen (Martinez-Valdez et al., 1996). B-Zellen, die keinen oder nur einen gering-affinen Kontakt zu dem Antigen herstellen können, begehen Apoptose (Rajewsky, 1996). Nur die Zellen, die positiv durch die Antigenbindung selektioniert werden, überleben die KZ-Reaktion. Eine positive Selektion der KZ-B-Zellen erfordert jedoch nicht nur eine effektive Antigenerkennung, sondern auch ein kostimulatorisches Signal durch CD40, ein Mitglied der Tumornekrosefaktorezeptor-(TNFR)-Superfamilie, das von KZ-B-Zellen ausgeprägt wird. Das Signal wird vermutlich hauptsächlich durch aktivierte T-Zellen im KZ, die den CD40-Liganden ausprägen, vermittelt, obwohl auch diskutiert wird, daß KZ-B-Zellen in der Lage sind CD40 und dessen Liganden gleichzeitig zu exprimieren (Guzman-Rojas et al., 2002).

Schließlich differenzieren B-Zellen mit hoch-affinen, somatisch mutierten BCR zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen (MacLennan et al., 1992). Durch das Vorhandensein und das Muster somatischer Mutationen lassen sich B-Zellen, die einen KZ-Prozess durchlaufen haben, und ihre Nachfahren identifizieren.

Ein weiterer Prozess findet im KZ statt, der Klassenwechsel. Hierbei wird unter Beibehaltung der umgelagerten V-Gene die konstante Region der schweren Ketten durch andere konstante Regionen ersetzt. Durch Austausch der konstanten Region wird die Effektorfunktion des BCR verändert, die Spezifität, die durch die umgelagerten V-Gene gegeben ist, jedoch beibehalten.

1.4 B-Zell-Lymphome

Lymphome, maligne Erkrankungen lymphoider Zellen, werden nach der WHO-Klassifikation in Nicht-Hodgkin-Lymphome (NHL) und in Hodgkin-Lymphome (HL) unterschieden (Jaffe et al., 2001). Bei weitem der größte Teil der Lymphome weist einen B-zellulären Ursprung auf (ca. 90% der NHL) (Fisher, 2003). Die meisten dieser B-Zelllymphome zeigen eine Abstammung von KZ-B-Zellen oder deren Nachkommen auf, welche sich in den somatisch mutierten Immunglobulin-V-Genen der Lymphomzellen widerspiegelt (Klein et al., 1998). Tatsächlich ist in einigen Lymphomen der Prozess der somatischen Hypermutation noch aktiv, sodass man in diesen Fällen von einer direkten KZ-Abstammung ausgehen kann. In B-Zell-Lymphomen spielen erworbene Genomveränderungen, vor allem Translokationen in die Ig-Loci eine entscheidende Rolle für die Transformation.

Welche Prozesse laufen im KZ ab, die diese Vielzahl an unterschiedlichen B-Zelllymphomen erklären könnten? Im KZ findet die somatische Hypermutation und der Klassenwechsel statt. Während dieser DNA-Umbauprozesse werden DNA-Strangbrüche eingeführt (Bross et al., 2000; Goossens et al., 1998; Papavasiliou und Schatz, 2000). Onkogenstranslokationen in Immunglobulin-Switch-Regionen (Klassenwechsel) oder in Immunglobulin-V-Genregionen sind häufig Folge dieser beiden Prozesse, z.B. die Translokation des c-myc-Onkogens im Burkitt-Lymphom (BL) (Klein et al., 1998; Küppers und Dalla-Favera, 2001). Der Prozess der somatischen Hypermutation ist vermutlich auch verantwortlich für Punktmutationen in einigen Nicht-Ig-Genen. So wurden somatische Mutationen in Bcl-6 und CD95 in KZ-B-Zellen entdeckt (Müschen et al., 2000b; Pasqualucci et al., 1998). Für das Diffus-grosszellige

Lymphom (DLCL) und einige AIDS-assoziierte NHL konnten zudem Mutationen in weiteren Nicht-Ig-Genen aufgezeigt werden. Da diese Mutationen jedoch nicht in anderen NHL nachzuweisen waren, schlossen die Autoren auf einen aberranten somatischen Hypermutationsprozess als transformierendes Ereignis in diesen Entitäten (Gaidano et al., 2003; Pasqualucci et al., 2001). Zudem spielt wahrscheinlich die starke Proliferation der ZB eine entscheidende Rolle in der Einführung maligner Mutationen. Zusammenfassend scheint es, dass einer Großzahl der Lymphome transformierende Ereignisse während der KZ-Reaktion zugrundeliegen, was sich nicht nur durch die starke Proliferation der KZ-B-Zellen, sondern vor allem durch genetische Umbauprozesse, die während einer normalen KZ-Reaktion stattfinden, erklären lässt (Klein et al., 1998; Küppers und Dalla-Favera, 2001).

1.5 B-Zell-Nicht-Hodgkin-Lymphome (B-Zell-NHL)

B-Zell-NHL werden in indolente, langsam verlaufende, Erkrankungen (z.B. Follikuläres Lymphom (FL)) und in aggressive Erkrankungen (z.B. DLCL, BL) unterteilt. Im Folgenden werden einige der wichtigsten B-Zell-NHL-Entitäten besprochen.

1.5.1 Das Diffus-Grosszellige Lymphom (DLCL)

Die Entität der DLCL umfasst diverse Subtypen, so z.B. das Immunoblastische, das Zentroblastische oder das Anaplastisch-Großzellige B-Zelllymphom. DLCL machen ca. 31% aller B-Zell-NHL aus (Fisher, 2003). Ca. 60% der DLCL-Fälle sind heute immer noch unheilbar (Staudt, 2003). Genexpressionsanalysen haben wichtige Erkenntnisse über dieses Lymphom erbracht. So konnten Subgruppen identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zu KZ-B-Zellen (KZ-DLCL) oder zu in-vitro-aktivierten B-Zellen (ABC-DLCL) besitzen (Alizadeh et al., 2000). Tatsächlich existiert eine Korrelation dieser Einteilung mit dem klinischen Verlauf der Patienten. Die Unterteilung der DLCL-Fälle anhand der Genexpression stimmt jedoch nicht immer mit den pathologischen Subtypen überein (Rosenwald et al., 2002). So war zwar ein Großteil der KZ-DLCL dem Zentroblastischen Subtyp zuzuordnen (75 von 115), die ABC-Fälle ließen sich jedoch nur zu einem geringen Teil den Immunoblastischen DLCL zuordnen (15 von 73) (Alizadeh et al., 2000; Rosenwald et al., 2002). Beide Subtypen besitzen somatisch mutierte Immunglobulin-V-Gene, doch nur in GC-DLCL ist der Prozess der somatischen Hypermutationen noch aktiv (Lossos et al., 2000). Translokationen des Bcl-6-Gens, welches für einen Transkriptionsrepressor kodiert, werden in ca. 32% der DLCL

aufgefunden. Diese Translokationen resultieren nur selten in einer verstärkten, sondern eher in einer konstitutiven Expression von Bcl-6, die vermutlich eine terminale Differenzierung der B-Zellen verhindert (Staudt et al., 1999). Interessanterweise ist das Bcl-6 Protein in einem Großteil der Fälle nachzuweisen, unabhängig ob ein KZ- oder ABC-Subtyp vorliegt (Huang et al., 2002b).

1.5.2 Das Burkitt Lymphom (BL)

Das BL gehört zu den aggressiven B-Zelltumoren; nicht behandelt würde es innerhalb von Monaten zum Tod führen. Es wird in die endemische und die sporadische Form unterteilt. Die endemische Form betrifft vornehmlich Kinder und junge Erwachsene in Afrika und ist in mehr als 95% der Fälle mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) assoziiert (Lindstrom und Wiman, 2002). Die sporadische Form kommt hauptsächlich in Europa und Nord-Amerika vor und weist selten eine EBV-Assoziation auf. Das molekulare Merkmal des BL ist die Translokation des c-myc-Onkogens in einen der Ig-Loci. Diese Translokation kann in allen BL nachgewiesen werden (Lindstrom und Wiman, 2002). Darüber hinaus ist in fast allen BL-Fällen der Tumorsuppressorsignalweg von p53 betroffen, durch i) Mutationen in dem p53-Gen, ii) Überexpression von Mdm2 oder iii) Methylierung des p14ARF-Locus (Lindstrom und Wiman, 2002). Das BL stammt von KZ-B-Zellen ab: Es exprimiert die KZ-Marker CD77 und CD10, weist somatisch mutierte IgH-Gene auf und zeigt andauernde somatische Hypermutation (Chapman et al., 1995; Lipinski et al., 1982; Ritz et al., 1981).

1.5.3 Das Follikuläre Lymphom (FL)

Das FL repräsentiert ca. 20% aller B-Zell-NHL-Erkrankungen (Fisher, 2003). Es gehört zu den indolenten Lymphomen, transformiert jedoch in ca. einem Drittel der Fälle nach einigen Jahren zu einem aggressiven Lymphom (z.B. DLCL) (Bastion et al., 1997). Das FL stammt von KZ-B-Zellen ab: Die Lymphomzellen besitzen somatisch mutierte Immunglobulin-V-Gene und weisen eine aktive somatische Hypermutation auf, die in intraklonaler V-Gen-Diversität resultiert (Bahler und Levy, 1992). Zudem zeigt das FL typischerweise ein follikuläres Wachstumsverhalten und scheint von Signalen abhängig zu sein, die von den reaktiven nicht-malignen Zellen abgegeben werden (Su et al., 2001). Das typische transformierende Ereignis im FL ist die Translokation des Onkogens Bcl-2 in den IgH-Locus während der V-Genrekombination früh in der B-Zellentwicklung (Gaulard et al., 1992; Tsujimoto et al., 1985). Ektopische Expression

von Bcl-2 in KZ-Zellen ermöglicht es den Vorläuferzellen des FL, die Selektion im KZ zu überleben. Die alleinige Translokation des Bcl-2-Gens genügt jedoch nicht für eine Transformation (Limpens et al., 1995; Strasser et al., 1990).

1.5.4 B-Zell-chronisch-lymphozytische Leukämie (B-CLL)

Die B-CLL ist die häufigste Leukämie der westlichen Welt mit einer Inzidenz von 1 pro 100.000 pro Jahr. Im Verlauf dieser Krankheit expandieren B-Zellen im peripheren Blut, im Knochenmark oder in lymphoiden Organen. Die Krankheit ist durch einen indolenten Verlauf gekennzeichnet, der schlussendlich immer in eine aggressive Form übergeht, die dann zum Tod führt.

Bisher wurden kaum genetische Alterationen in dieser Leukämie identifiziert, die in einem hohen Prozentsatz der Fälle vorkommen. Bis auf eine Deletion auf 13q14, die in 70% der B-CLL-Fälle nachgewiesen werden kann (Corcoran et al., 1998; Migliazza et al., 2001). In dieser Region liegen zwei Gene die für Micro-RNAs kodieren (Calin et al., 2002). Die Funktion dieser Mikro-RNA Moleküle in der B-CLL ist jedoch nicht bekannt.

Ca. 50-70% der B-CLL-Fälle besitzen somatisch mutierte Immunglobulin-V-Gene, was auf eine KZ-Passage schließen lässt, die restlichen 30-50% weisen unmutierte IgV-Gene auf (Oscier et al., 1997; Schroeder und Dighiero, 1994). Diese zwei Subgruppen der B-CLL haben unterschiedlich gute Prognosen. Unmutierte B-CLL zeigen ein aggressiveres Verhalten als die mutierten Fälle (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999). Da B-CLL-Zellen CD5⁺ ausprägen, war ursprünglich eine zelluläre Herkunft von CD5⁺-B-Zellen vermutet worden. CD5⁺-B-Zellen sekretieren ohne vorherigen Antigenkontakt natürliche Antikörper, die häufig gegen bakterielle, viruelle oder Selbstantigene gerichtet sind. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Immunantwort bzw. in der T-Zellunabhängigen Immunantwort (Boes, 2000; Fagarasan und Honjo, 2000; Martin und Kearney, 2001). Eine Chip-basierte Genexpressionsstudie wies jedoch keinerlei Ähnlichkeit mit CD5⁺-Zellen auf, sondern tendenziell eher zu Gedächtnis-B-Zellen. Dies gilt überraschenderweise für beide Subtypen der B-CLL (Klein et al., 2001).

1.6 Das HL

1.6.1 Allgemeine Einleitung

Das HL wurde von T. Hodgkin im Jahr 1832 zum ersten Mal beschrieben (Hodgkin, 1832). Das Charakteristikum für die Diagnose dieses Lymphoms ist das Auftreten einer kleinen Anzahl von typischen großen, häufig multinukleären Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen (Abbildung 1) in einem zellulären Infiltrat verschiedener Zelltypen (Hansmann et al., 1999; Weiss et al., 1999). Die HRS-Zellen machen in der Regel weniger als 1% der Zellen im Tumor aus, während sich die restlichen Zellen hauptsächlich aus T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen, Eosinophilen und Neutrophilen zusammensetzen (Hansmann et al., 1999; Weiss et al., 1999).

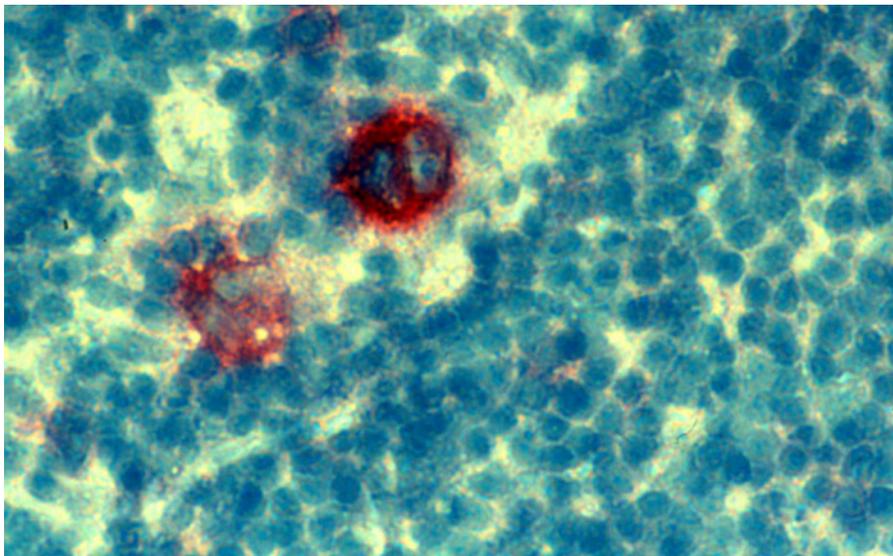


Abbildung 1: HRS-Zellen des cHL, gefärbt für CD30. Ein Gewebeschnitt einer Lymphknoten-biopsie eines an cHL erkrankten Patienten wurde für CD30 gefärbt (rot). Die Kerne sind mit Hämalaun angefärbt (blau). Die HRS-Zellen sind durch Größe und Multinuklearität sowie durch die Expression von CD30 klar zu erkennen.

Das HL ist eine recht seltene maligne Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 2 – 4 auf 100.000 pro Jahr. Es wird in zwei verschiedene Entitäten unterteilt: Das klassische HL (classical HL (cHL)), welches 95% aller Fälle ausmacht, und das Lymphozyten-prädominante HL (LP-HL) (Harris, 1999). Beim cHL werden aufgrund pathologischer Unterschiede im Tumorgewebe vier verschiedene Subtypen unterschieden: Nodulär sklerotisierendes HL (ca. 60-80% der Fälle), Gemischtzelliges HL (ca. 15-30% der Fälle), Lymphozyten-reiches HL und Lymphozyten-armes HL (weniger als 1% der Fälle) (Harris, 1999).

Das HL zeigt in der westlichen Welt eine bimodale Häufigkeitsverteilung, welche gehäuft Erkrankungen im jungen Erwachsenenalter und bei älteren Erwachsenen

anzeigt, während sich in Entwicklungsländern zwar auch eine bimodale Verteilung zeigt, die Häufigkeitsspitzen der Erkrankungen jedoch bei Kindern und älteren Erwachsenen liegt (Mueller und Grufferman, 1999). Die verschiedenen Subtypen des cHL zeigen Unterschiede in dieser Altersverteilung auf. Während das Nodulär sklerotisierende HL vor allem bei jungen Erwachsenen auftritt, findet man das Gemischtzellige HL vor allem bei Kindern und älteren Erwachsenen (Mueller und Grufferman, 1999).

Die klinischen Symptome des HL sind vielartig. Die meisten Patienten weisen einen vergrößerten, ansonsten asymptomatischen Lymphknoten, der häufig im unteren Halsbereich oder in der Supraclavicularregion (die Grube oberhalb des Schlüsselbeins) lokalisiert ist, auf. Ca 25% der Patienten zeigen zusätzlich systemische Symptome wie Müdigkeit, Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß. Hautjucken und plötzliches Fieber, meistens mit Nachtschweiß assoziiert, sind klassische Symptome des HL (Yung und Linch, 2003). Während das LP-HL meistens operativ entfernt wird, gefolgt von einer Bestrahlung der involvierten Körperregion, wird das cHL in der Regel mit einer Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie behandelt. Bei der Behandlung des LP-HL können auf diese Weise ca. 96% der Patienten geheilt werden, während fünf Jahre nach der Behandlung des cHL ca. 90% der Patienten rückfallsfrei sind (Yung und Linch, 2003).

1.6.2 Immunhistochemische Analysen des cHL

Zur immunhistochemischen Diagnose des cHL wird vor allem die starke Expression von CD30 in HRS-Zellen genutzt (wie in Abbildung 1 gezeigt) (Drexler, 1992). CD30 ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor-(TNFR)-Superfamilie und wird neben HRS-Zellen in aktivierten Lymphozyten ausgeprägt.

HRS-Zellen weisen desweiteren einen verwirrenden Immunphänotyp auf, der sich keinem hämatopoetischen Zelltyp zuordnen lässt. So exprimieren HRS-Zellen, im Gegensatz zu den malignen Zellen des LP-HL, den L&H Zellen, (Hansmann et al., 1999), nur in wenigen Fällen B-Zellmarker (Drexler, 1992; Kuzu et al., 1993; Pinkus und Said, 1988; Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Desweiteren prägen HRS-Zellen in einigen cHL-Fällen Marker verschiedener hämatopoetischer Zelllinien aus, z.B. CD15, ein Granulozyten- oder Monozytenmarker (Drexler, 1992), Restin, TARC und Fascin, drei dendritische Zellmarker (Delabie et al., 1992; Pinkus et al., 1997; van den Berg et al., 1999), oder TIA-1 und Granzym-B, zwei cytotoxische T-Zellmarker (Kanavaros et al., 1999; Krenacs et al., 1997; Oudejans et al., 1996). Die

Expression dieser hämatopoetischen Marker variiert stark von Fall zu Fall, was auf eine hohe phänotypische Heterogenität der cHL-Fälle schließen läßt.

1.6.3 Ursprung und Klonalität der HRS-Zellen

Der Ursprung und die klonale Verwandtschaft der HRS-Zellen war für eine lange Zeit unklar. Dies lag zum einen in der Seltenheit der Zellen im Gewebe begründet, die es nicht erlaubt, Standardmethoden wie Southernblot- oder PCR-Analysen anhand von Ganzschnitt-DNA durchzuführen. Zum anderen ließen immunhistochemische Färbungen keine Klärung des zellulären Ursprungs zu, da HRS-Zellen, wie oben beschrieben, in Bezug auf hämatopoetische Linienmarker einen verwirrenden Immunphänotyp aufweisen.

Die Isolierung einzelner HRS-Zellen mittels Mikromanipulation, gefolgt von einer Polymerasekettenreaktion (PCR) für umgelagerte V-Gene der Ig-Loci in Einzelzellen, klärte die Frage nach dem Ursprung und der Klonalität der HRS-Zellen. Die HRS-Zellen des cHL sowie die L&H-Zellen des LP-HL stammen in den meisten Fällen von B-Zellen ab, den einzigen Zellen mit vollständigen VDJ-Genumlagerungen des Ig-Locus, und zeigen klonale Verwandtschaft der V-Gene in den HRS-Zellen innerhalb eines Falles (Braeuninger et al., 1997; Bräuninger et al., 1999a; Kanzler et al., 1996a; Kanzler et al., 1996b; Küppers und Rajewsky, 1998; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 1997; Ohno et al., 1997). Die V-Genumlagerungen beider Entitäten sind somatisch mutiert (ein Hinweis auf eine Teilnahme der Zelle an einer KZ-Reaktion), die L&H-Zellen des LP-HL weisen jedoch, im Gegensatz zu den HRS-Zellen, intraklonale Diversität auf. Die aktive somatische Hypermutation in L&H-Zellen deuten auf einen direkten Ursprung dieser Zellen von KZ-B-Zellen hin. Desweiteren weist das Muster der somatischen Mutationen in der Ig-V-Genregion der L&H-Zellen auf die Selektion eines funktionellen BCR hin (Küppers, 2002). In HRS-Zellen des cHL hingegen werden in 25% der analysierten Fälle inaktivierende Mutationen, wie Stopkodons, Deletionen oder Insertionen, die zur Verschiebung des Leserasters führen, identifiziert (Küppers, 2002). Weitere inaktivierende Mutationen sind schwer zu identifizieren, da auch Aminosäureaustausche, die zu einer Verminderung der Affinität oder zu einer veränderten Faltung der Polypeptidketten führen als inaktivierend zu betrachten, jedoch kaum zu identifizieren, sind. Somit ist der Anteil von 25% vermutlich eine deutliche Unterschätzung der cHL-Fälle ohne funktionellen BCR. Da B-Zellen, welche die Expression eines BCR verlieren, normalerweise Apoptose begehen (Lam et al., 1997),

ist die Identifizierung von HRS-Zellen, die den Verlust des BCR durch die somatische Hypermutation überleben können verwunderlich, da auch in diesen Zellen Apoptoseinduktion zu erwarten wäre. Dies führte zu der Hypothese, dass HRS-Zellen generell von KZ-B-Zellen, die ihre Fähigkeit, einen funktionellen BCR auszuprägen, verloren haben und daraufhin das Apoptoseprogramm eingeleitet haben, sogenannten präapoptotischen KZ-B-Zellen, abstammen (Kanzler et al., 1996b; Küppers et al., 1998). Ein weiterer Hinweis darauf, dass entscheidende Schritte der Transformation des cHL innerhalb des KZ geschehen, ist die Analyse bestimmter Kombinationslymphome. So wurde z.B. in zwei Patienten das gleichzeitige Vorkommen eines cHL und eines FL beobachtet. Die V-Genanalyse der Ig-Loci zeigte auf, dass jeweils die malignen Zellen beider Tumore klonal verwandt waren und dass eine KZ-B-Zelle die Vorläuferzelle dieser Lymphome war (Bräuninger et al., 1999b; Küppers et al., 2001).

Wie oben beschrieben (Abschnitt 1.6.2) existieren cHL-Fälle (ca. 10-15%) die einzelne T-Zellmarker ausprägen (Küppers, 2002). Um zu überprüfen ob HRS-Zellen in einzelnen Fällen auch einen T-Zellursprung aufweisen können, wurden 17 cHL-Fälle, die mehrere T-Zellmarker exprimierten ausgesucht und mittels PCR auf T-Zell-Rezeptor-Genumlagerungen analysiert. In drei dieser Fälle konnten tatsächlich klonale T-Zell-Rezeptor-Genumlagerungen (und das Fehlen von Ig-Genumlagerungen) nachgewiesen werden (Müschen et al., 2000a; Seitz et al., 2000). Die restlichen Fälle stammten trotz T-Zellmarkerexpression von B-Zellen ab. Aufgrund der Seltenheit von cHL-Fällen, die mehrere T-Zellmarker ausprägen, wurde geschätzt, dass der Anteil der cHL-Fälle mit T-Zell-Rezeptor-Genumlagerungen deutlich unter 5% liegt (Müschen et al., 2000a).

1.6.4 Pathogenese

Die Pathogenese des cHL ist immer noch zu großen Teilen unverstanden. Im Folgenden werden einige pathologische Aspekte des cHL vorgestellt, z.B. die pathogene Rolle von Viren, das Vorkommen chromosomaler Instabilität in cHL-Patienten und die Funktion spezifischer chromosomaler Aberrationen. Darüberhinaus werden physiologische Besonderheiten von HRS-Zellen, die eine Rolle in der Proliferation und dem Überleben der Zellen einnehmen, besprochen, auch wenn die zugrundeliegenden transformierenden Ereignisse nicht immer geklärt sind, z.B. die konstitutive Aktivität einiger Signalwege, die Apoptoseresistenz von cHL-Zelllinien

gegen bestimmte Signale und das Zusammenspiel von HRS-Zellen und dem zellulären Infiltrat.

1.6.4.1 Epstein-Barr Virus (EBV) und andere Kandidatenviren

EBV ist ein γ -Herpesvirus, mit dem mehr als 90% aller Menschen weltweit infiziert sind. Die primäre Infektion in der Kindheit verläuft normalerweise asymptomatisch, und danach verbleibt das Virus latent in Gedächtnis-B-Zellen mit einer Frequenz von ca. einer infizierten Zelle pro $10^5 - 10^6$ Gesamt-B-Zellen (Khan et al., 1996). Bei einer verspäteten Infektion, im jungen Erwachsenenalter, kann es zur Ausbildung der infektiösen Mononukleose kommen. Menschen, die an einer infektiösen Mononukleose erkranken, haben ein signifikant höheres Risiko, später an einem cHL zu erkranken (Hjalgrim et al., 2000; Munoz et al., 1978). In der westlichen Welt sind in ca. 40% der cHL-Fälle die HRS-Zellen mit dem EBV infiziert. Wesentlich höher liegt der Anteil an EBV⁺-cHL-Fällen in Entwicklungsländern (Jarrett und MacKenzie, 1999). Die L&H-Zellen des LP-HL zeigen hingegen keine Assoziation mit dem Virus. Neben der Assoziation eines großen Teils der cHL-Fälle mit dem EBV gilt als weiterer Hinweis auf eine pathogene Rolle bei der Entstehung des cHL, der Befund, dass aufgrund der Struktur des Virusgenoms eine einmalige Infektion der Ursprungszelle des cHL angenommen werden kann (Anagnostopoulos et al., 1989; Weiss et al., 1989).

In HRS-Zellen werden wenige viruskodierte Gene ausgeprägt. In der Folge werden zwei dieser in HRS-Zellen ausgeprägten EBV-kodierten Proteine besprochen, für die eine pathogene Bedeutung im cHL angenommen wird, die latenten Membranproteine-1 und -2A. LMP1 ist in der Lage, Rattenfibroblasten zu transformieren; und Mäuse, die ein Transgen, kodierend für LMP1, tragen, entwickeln B-Zelllymphome (Kulwichit et al., 1998; Wang et al., 1985). LMP1 besitzt eine ähnliche Funktion wie ein konstitutiv aktivierter CD40-Rezeptor; letzterer ist entscheidend für die Differenzierung und das Überleben von KZ-B-Zellen (Kilger et al., 1998; Liu et al., 1989). LMP1 führt zur Aktivierung von NF κ B (Gires et al., 1997; Mosialos et al., 1995), von AP-1 und des JAK/STAT-Signalwegs (Gires et al., 1999; Kieser et al., 1997). Von allen drei Signalwegen ist eine konstitutive Aktivierung in HRS-Zellen bekannt (siehe unten). Ein weiteres Virus-kodiertes Protein ist LMP2A. Es konnte gezeigt werden, dass LMP2A-transgene Mäuse, die das Protein bereits in Pro-B-Zellen ausprägen, BCR-negative B-Zellen ohne V-Genumlagerungen produzieren können (Caldwell et al., 1998), obwohl B-Zellen ohne BCR normalerweise Apoptose begehen (Lam et al., 1997). LMP2A kann

offensichtlich das fehlende BCR-Signal in diesen Zellen ausgleichen. Ob LMP2A die gleiche Funktion in rezeptorlosen KZ-B-Zellen übernehmen könnte, ist unklar.

Auch wenn die Expression dieser Moleküle in HRS-Zellen vermutlich einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese leisten, sind nur ca. 40% der cHL-Fälle mit EBV infiziert. In den verbleibenden 60% müssten demnach andere Ereignisse diese Funktion erfüllen.

Lange Zeit wurde nach anderen Pathogenen, speziell Viren, gesucht, die eine Rolle im HL spielen. Es konnte jedoch keine Infektion mit den Herpesviren HHV6, HHV7, HHV8, Papovaviren oder Adenoviren nachgewiesen werden (Armstrong et al., 1998; Jarrett und MacKenzie, 1999). Erst kürzlich sind Arbeiten erschienen, die einen Zusammenhang mit Masernviren oder Cytomegaloviren nahelegen (Benharroch et al., 2003; Huang et al., 2002a). Die letztere Studie wird sich vermutlich nicht für einen Großteil der Fälle bestätigen, da andere Gruppen dieses Ergebnis nicht verifizieren konnten (persönliche Mitteilung von A. Bräuninger und R. Jarrett). Die Studie, die ein potentielle Infektion der HRS-Zellen mit Masernviren aufzeigt, beinhaltet leider nur wenige Primärdaten (Benharroch et al., 2003), sodass eine Rolle von Masernviren im cHL noch unklar ist.

1.6.4.2 Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität bezeichnet das gehäufte Auftreten von chromosomalen Aberrationen und ist ein bekanntes Merkmal vor allem von soliden Tumoren (Gisselsson, 2002). Doch auch HRS-Zellen des cHL weisen typischerweise einen stark abnormen Karyotyp auf, der Verluste und Zugewinne ganzer Chromosomen aufzeigt (Weber-Matthiesen et al., 1995). Abgesehen von klonalen Aberrationen, die in jeder HRS-Zelle eines Tumors nachgewiesen werden können, treten auch diverse subklonale Veränderungen auf, was für eine generelle chromosomale Instabilität in diesen Zellen spricht. Diese Instabilität scheint jedoch nicht auf die HRS-Zellen begrenzt zu sein, da normale Lymphozyten von HL-Patienten ebenfalls eine Häufung an chromosomalen Aberrationen im Vergleich zu Lymphozyten gesunder Donoren aufweisen (Barrios et al., 1988; Fonatsch et al., 1989). Der Mechanismus dieser generellen genomischen Instabilität in cHL-Patienten ist nicht geklärt.

1.6.4.3 Chromosomale Aberrationen

Chromosomale Aberrationen, die in einem Großteil der cHL-Fälle vorkommen und ein spezifisches Merkmal des cHL darstellen, sind selten: DNA-Bereiche, die wiederholt

Amplifizierung in HRS-Zellen zeigen, beinhalten das MDM2-Gen (amplifiziert in 4 von 6 Fällen) (Küpper et al., 2001) bzw. das JAK-2-Gen (Region amplifiziert in 4 aus 12 Fällen) (Joos et al., 2000). MDM2 inaktiviert das Tumorsupressorprotein p53, und JAK-2 ist entscheidend für die Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren. Desweiteren ist in 54% aller cHL-Fälle eine DNA-Region amplifiziert, in der das c-Rel-Gen lokalisiert ist (Joos et al., 2002). Das c-Rel kodierte Protein ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors NF κ B. Die Amplifikationen korrelieren mit einer verstärkten Aktivität von NF κ B in HRS-Zellen (Barth et al., 2003). Kürzlich wurden chromosomale Zugewinne im Chromosom 17 (17q) beschrieben, die in 70% aller Fälle von HL vorkommen (Chui et al., 2003). Die involvierten Gene sind jedoch unbekannt. Weder Translokationen des bcl-2-Gens, eines Gens, das üblicherweise im FL tranloziert ist, noch Translokationen, die zu einer Fusion des NPM und des ALK Gens führen, häufig repräsentiert im Großzellig-anaplastischen Lymphom, wurden im cHL nachgewiesen (Gravel et al., 1998; Miura et al., 2000; Poppema et al., 1992; Weber-Matthiesen et al., 1996; Weiss et al., 1995; Wellmann et al., 1995). Aberrationen im Bereich des IgH Lokus, entscheidendes Merkmal vieler anderer Lymphomentitäten, wurden nur in 10 – 20% der cHL-Fälle beschrieben, die involvierten Gene sind nicht bekannt (Falzetti et al., 1999; Poppema et al., 1992)□.

1.6.4.4 Analyse von Onkogenen und Tumorsupressorgenen

Bisher gibt es nur wenige Studien über Mutationen in Onkogenen oder in Tumorsupressorgenen im cHL. Der Grund hierfür liegt in der Notwendigkeit, einzelne HRS-Zellen zu analysieren, da diese im Tumorgewebe zu selten vorkommen, um Gesamtschnitt-DNA zu verwenden. Einzelzellstudien wurden durchgeführt für N-ras, p53, CD95 und für den Inhibitor von NF κ B (I κ B α). Es konnten keine Mutationen in dem N-ras Protoonkogen identifiziert werden (Trümper et al., 1996), und nur eine marginale Anzahl von Mutationen des Tumorsupressorgens p53 wurde beschrieben (Maggio et al., 2001; Montesinos-Rongen et al., 1999). Nur knapp 10% der cHL-Fälle tragen Mutationen, die den Apoptose-induzierenden Rezeptor CD95 inaktivieren (Maggio et al., 2003; Müschen et al., 2000b).

Nach einer Studie, die von einer konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B berichtete (siehe unten), wurde das I κ B α -Gen auf Mutationen hin analysiert. In fünf von insgesamt 23 analysierten cHL-Fällen konnten inaktivierende Mutationen

nachgewiesen werden (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Jungnickel et al., 2000).

Desweiteren konnte eine deregulierte Expression einzelner Proteine (Mdm2, p16, p14^{AFR}) beobachtet werden, die vermutlich zur Inaktivierung wichtiger Tumorsuppressorsignalwege führt (Garcia et al., 2003; Garcia et al., 1999; Garcia et al., 2002; Maggio et al., 2003). Die Ursachen für diese deregulierte Expression der oben genannten Proteine sind jedoch nicht bekannt. Für die MDM-2 Genexpression könnte die oben beschriebene Amplifikation in einem Teil der cHL-Fälle jedoch eine Rolle spielen.

1.6.4.5 Konstitutive Aktivität von Signalwegen im cHL: NF κ B, JAK/STAT, AP-1, IL-13

Für einige zelluläre Signalwege in HRS-Zellen wurde eine konstitutive Aktivierung nachgewiesen. Auch wenn die transformierenden Ereignisse, die zu dieser aberranten Aktivität führen nicht immer bekannt sind, werden diese Signalwege hier vorgestellt, da sie als physiologische Merkmale des cHL von entscheidender Bedeutung für die Proliferation und das Überleben von HRS-Zellen sind.

Eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B kann in nahezu allen Fällen des cHL nachgewiesen werden (Bargou et al., 1997). NF κ B reguliert spezifische Zielgene in Antwort auf diverse Stimuli: Zytokine, Mitogene, bakterielle Antigene, virale Proteine oder Apoptose-induzierende Agentien (Garg und Aggarwal, 2002). Es ist in der Kontrolle des zellulären Wachstums und in der Bildung von Neoplasien involviert (Rayet und Gelinas, 1999). In den meisten normalen B-Zellen liegt NF κ B in inaktiver Form, gebunden an einen Inhibitor (I κ B), im Zytoplasma vor. Aktivierung durch diverse Signale, z.B. Zytokine führt zur Phosphorylierung und zur anschließenden Degradierung von I κ B. Daraufhin kann NF κ B in den Kern wandern und dort Zielgene aktivieren. Da es auch die Expression seines eigenen Inhibitors aktiviert, ist diese Aktivität normalerweise nur von kurzer Dauer (Sun et al., 1993). Die konstitutive Aktivierung von NF κ B ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben der HRS-Zellen, da eine Verminderung der Aktivität durch Transfektion eines dominant-negativen Inhibitors der I κ B-Familie zu einer Apoptoseinduktion in HL-Zelllinien führt (Bargou et al., 1997; Hinz et al., 2001). In einem Teil der Fälle ist die konstitutive Aktivität vermutlich durch die oben beschriebenen Mutationen im I κ B α -Gen verursacht. Eine Genexpressionsanalyse entdeckte wichtige Zielgene von NF κ B in HL-Zelllinien: IL-13, ein Zytokin, TNF- α , LT α ,

CD86, CD40, Gene, für die eine hohe Expression in HRS-Zellen bekannt ist, und interessanterweise Bcl-X_L, ein antiapoptotisches Protein, und STAT-5, ein Mitglied der STAT-Proteinfamilie (Hinz et al., 2002).

Ein weiterer konstitutive aktiver Signalweg in HRS-Zellen ist der JAK/STAT-Signalweg. Die STAT-Transkriptionsfaktoren liegen normalerweise inaktiv im Zytoplasma vor. Zytokinsignale führen zur Aktivierung der Januskinasen (JAK), welche wiederum die STAT-Proteine phosphorylieren, die daraufhin dimerisieren, in den Kern wandern und die Expression ihrer Zielgene aktivieren. Konstitutive Aktivierung von STAT-Proteinen, im Besonderen von STAT3 und STAT5, steht im Zusammenhang mit onkogener Transformation (Bowman et al., 2000). STAT5, heraufreguliert durch NF κ B, zeichnet sich jedoch nicht durch eine konstitutive Aktivierung in einem großen Anteil der cHL-Fälle aus (26%), während andere Vertreter der STAT-Familie, STAT3 und STAT6, in jeweils ca. 80% der cHL-Fälle in einem phosphorylierten bzw. aktivierten Status vorliegen (Skinnider et al., 2002).

Die konstitutive Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors, AP-1, konnte in HRS-Zellen nachgewiesen werden (Mathas et al., 2002). AP-1 stellt ein Homo- oder Heterodimer aus Jun- und/oder Fos-Proteinen dar. Die Aktivität von AP-1, insbesondere c-jun, ist eng mit der Proliferationskontrolle und Transformationsprozessen in verschiedensten Zelltypen assoziiert (Shaulian und Karin, 2001). In HRS-Zelllinien beeinflusst die konstitutive Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors die Proliferation, da Hemmung von AP-1 die Proliferation von cHL-Zelllinien einschränkt (Mathas et al., 2002). Die Aktivierung von AP-1 in HRS-Zellen wird vermutlich über MAPK vermittelt, es existieren jedoch diskrepante Ergebnisse bezüglich des Aktivierungszustands von MAPK in cHL-Zelllinien (Mathas et al., 2002; Zheng et al., 2003), so daß die Signalwege, die zu einer Aktivierung von AP-1 führen unklar sind.

Knapp 90% aller cHL-Fälle prägen IL-13 (heraufreguliert durch NF κ B) und den entsprechenden Rezeptor aus (Kapp et al., 1999; Skinnider et al., 2001). In cHL-Zelllinien trägt die hierdurch vermittelte autokrine Stimulierung zur Proliferation bei, das Ausmaß ist jedoch fraglich, da Zugabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen IL-13 oder eines Inhibitors die Proliferation in zwei Zelllinien hemmt (L1236, HDLM2), in zwei weiteren jedoch keinen Effekt erzielt (KMH2, L428) (Kapp et al., 1999; Oshima und Puri, 2001). Der fehlende Effekt wird mit der extrem starken Ausprägung von IL-13 in den zuletzt genannten Zelllinien begründet.

1.6.4.6 Apoptose

Apoptose bezeichnet ein zelluläres "Selbstmord"-Programm, daß zum Absterben der involvierten Zellen führt. Dieses Programm kann von extrazellulären Signalen z.B. CD95 oder von intrazellulären Signalen z.B. p53 induziert werden. Unterschiedliche Signalwege führen schlussendlich zur Aktivierung von Caspasen, die die Prozesse einleiten, die zum Absterben der Zellen führen.

Wie oben beschrieben ist die konstitutive Aktivität von NF κ B entscheidend für das Überleben von HRS-Zellen. Einer der Gründe hierfür liegt vermutlich in der NF κ B-abhängigen Heraufregulation von antiapoptotischen Genen wie c-IAP2, Bfl-1/A1 und bcl-X_L (Hinz et al., 2001). Das bcl-X_L-Protein wird stark in HRS-Zellen ausgeprägt (Chu et al., 1999) und scheint essenziell für ihr Überleben zu sein, da Transfektion eines bcl-X_L-Transgens in HRS-Zellen den Verlust der NF κ B-Funktion kompensieren kann (Hinz et al., 2001).

Obwohl HRS-Zellen den Apoptose-induzierenden Rezeptor CD95 ausprägen (Metkar et al., 1999), sind sie jedoch vermutlich resistent gegen CD95-Ligand-induzierte Apoptose (Metkar et al., 1999; Re et al., 2000; Verbeke et al., 2001). Da nur in einem kleinen Teil der Fälle (weniger als 10%) inaktivierende Mutationen im CD95-Gen nachgewiesen werden können (Maggio et al., 2003; Müschen et al., 2000b), muss der Resistenz im Hauptteil der Fälle ein anderer Mechanismus zugrunde liegen. Eine mögliche Erklärung ist die starke Überexpression des c-FLIP-Proteins in HRS-Zellen (Thomas et al., 2002), da c-FLIP, in ausreichender Menge, die Apoptoseinduktion durch Rezeptoren wie CD95, DR3 (Apo-3), TNF-R1 oder TRAIL-R verhindert (Irmeler et al., 1997). Neben CD95-medierten Signalen, die über den Apoptose-induzierenden-Signalkomplex (DISC) Apoptose induzieren, gibt es auch diverse Signale, die dieses über einen Mitochondrien-abhängigen Signalweg erreichen. Dieser zweite Signalweg resultiert in der mitochondrialen Ausschüttung proapoptotischer Signalmoleküle, wie Cytochrom C. Die Bcl-2-Superfamilienmitglieder spielen eine wichtige Rolle in der Regulation dieses Signalwegs. Bax, ein proapoptotisches Molekül, wird in den meisten cHL-Fällen synthetisiert (Rassidakis et al., 2002), wird jedoch in Antwort auf das Apoptose-induzierende Molekül Staurosporin in den meisten cHL-Zelllinien nicht aktiviert (Kashkar et al., 2002). Der Grund für die fehlende Aktivierung von Bax ist unklar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß HRS-Zellen gegen einige Apoptose-induzierenden Signale z.B. CD95 und Staurosporin resistent sind. Diese Resistenz wird zum Teil durch die Heraufregulation antiapoptosischer Proteine vermittelt.

1.6.4.7 Signale zwischen HRS-Zellen und dem zellulären Infiltrat

Eine Besonderheit des cHL ist die Tatsache, daß HRS-Zellen nur ca. 1% der Tumormasse repräsentieren (Abschnitt 1.6.1 und Abbildung 1). Die restlichen Zellen bestehen aus einem gemischten zellulären Infiltrat. Es existieren diverse Hinweise, dass HRS-Zellen stark von Interaktionen mit diesem Infiltrat abhängig sind, so z.B. die Schwierigkeiten, Zelllinien von primären HRS-Zellen zu etablieren (siehe auch Punkt 1.1.5) (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996), und das Unvermögen, von HRS-Zellen in immundefizienten Mäusen zu wachsen (Kapp et al., 1993; Meggetto et al., 1996). Welcher Art ist diese Abhängigkeit? HRS-Zellen und das umliegende Gewebe synthetisieren eine große Anzahl von Molekülen, die für die Interaktion zwischen HRS-Zellen und den umliegenden Zellen von Bedeutung sind. Besprochen wird im Folgenden eine Auswahl dieser Moleküle/Interaktionen, die für die Pathologie des cHL von besonderem Interesse sind.

HRS-Zellen sind häufig von CD4⁺-T-Helferzellen eng umgeben. Zwischen diesen beiden Zelltypen besteht ein enger Kontakt. HRS-Zellen prägen die Adhäsionsmoleküle CD58 (ICAM-1) und CD54 (LFA-3) aus (Delabie et al., 1995; Ellis et al., 1992), deren Liganden auf den umliegenden T-Zellen exprimiert sind. Zudem sind die Moleküle B7.1 und B7.2 auf der Oberfläche von HRS-Zellen vertreten (Munro et al., 1994), die an CD28 bzw. CTLA4 auf den umliegenden T-Zellen binden können. Die Expression dieser Moleküle vermittelt vermutlich den starken zellulären Kontakt. HRS-Zellen sekretieren zudem das Chemokin TARC, das normalerweise von dendritischen Zellen synthetisiert wird und CD4⁺-T-Zellen vom Th2-Typ anzieht (van den Berg et al., 1999). Die starke Produktion von TARC könnte somit für die massive Einwanderung von T-Zellen des Th2-Typs verantwortlich sein.

Neben den oben genannten Adhäsionsmolekülen prägen HRS-Zellen verschiedene Mitglieder der TNFR-Superfamilie aus (z.B. CD30, CD40, RANK) (Fiumara et al., 2001; O'Grady et al., 1994; Schwab et al., 1982), deren Signal zur Aktivierung von NFκB führt (Skinnider und Mak, 2002). Von den umliegenden Zellen werden einige der Liganden synthetisiert. So wird der CD40-Ligand von umgebenden T-Zellen und der CD30-Ligand von unterschiedlichen Zelltypen im Tumor ausgeprägt (z.B. von Eosinophilen oder von

Mastzellen) (Skinnider und Mak, 2002). Der Ligand für RANK wird in HRS-Zellen und außerdem im Normalgewebe von Thymus und Milz, sowie in ruhenden T-Zellen ausgeprägt (Fiumura Blood 2001). Signale durch die oben genannten Mitgliedern der TNFR-Superfamilie können zu der oben beschriebenen konstitutiven Aktivierung von NF κ B in HRS-Zellen beitragen.

IL-13 ist ein Zytokin, das normalerweise von T-Zellen synthetisiert wird, und einen starken Einfluss auf Proliferation und Überleben von B-Zellen ausübt. Das Zytokin und sein Rezeptore wird, wie oben beschrieben, in HRS-Zellen in einem Großteil der cHL-Fälle synthetisiert (Kapp et al., 1999; Skinnider et al., 2001). Der Rezeptor von IL-13 wird jedoch auch auf umliegenden Histozyten und Lymphozyten ausgeprägt (Skinnider et al., 2001), so daß das von HRS-Zellen sekretierte IL-13 Einfluß auf die umgebenden B-Zellen einnehmen könnte.

Weitere Zytokine, die von HRS-Zellen sekretiert werden sind z.B. IL-10 und TGF- β (Skinnider und Mak, 2002), zwei Moleküle, die eine immunsupprimierende Wirkung auf (unter anderem) CD8⁺-T-Zellen ausüben (Herbst et al., 1996; Newcom und Gu, 1995; Ohshima et al., 1995). Die Expression von IL-10 korreliert mit einer EBV-Infektion der HRS-Zellen (Herbst et al., 1996). Die Suppression von CD8⁺-T-Zellen kann Einfluß auf den Erfolg einer Anti-Tumorimmunantwort in cHL-Patienten ausüben.

1.6.5 Etablierung von HL-Zelllinien

Im Gegensatz zu manch anderen Lymphomentitäten wie z.B. B-CLL oder BL existieren nur wenige HL-Zelllinien. Der Grund hierfür liegt in der enormen Schwierigkeit solche Zelllinien zu etablieren. Teilweise waren hunderte von Ansätzen notwendig, um eine einzige Zelllinien zu generieren. So stellt die in dieser Studie verwendete cHL-Zelllinie L1236 den 1236ten Ansatz dar, aus dem betroffenen Patienten eine Zelllinie zu etablieren (Wolf et al., 1996). Insgesamt wurden vermutlich nur 13 verlässliche HL-Zelllinien generiert (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996), ausgenommen einige Zelllinien die fälschlicherweise upsprünlich als cHL definiert wurden, wie z.B. CO und HD-M μ Z (Drexler, 1993; Stein et al., 1999). Nicht alle dieser Zelllinien sind heute noch erhalten. Nahezu alle der 13 cHL-Zelllinien prägen die cHL-Marker CD30 und CD15 aus (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996).

Zwei Besonderheiten der etablierten HL-Zelllinien sind, dass i) alle Zelllinien von Patienten im fortgeschrittenen Stadium etabliert wurden, bzw. aus pleuralen oder pericardialen Ausschwemmungen, peripherem Blut oder Knochenmark stammen und

ii) die meisten Zelllinien aus Patienten generiert wurden, die an einem Nodulär sklerotisierendes HL erkrankt waren (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996), welches aber auch den häufigsten Subtyp des cHL darstellt.

Bisher wurde nur für eine cHL-Zelllinie die Herkunft von den primären HRS-Zellen des Patienten auf molekularer Ebene nachgewiesen, für die cHL-Zelllinie L1236 (Kanzler et al., 1996a).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Klonalität und die Herkunft der HRS-Zellen des cHL waren lange unklar. Mittels der Einzelzell-PCR für umgelagerte Ig-V-Gene konnte ein KZ-B-Zellursprung der HRS-Zellen für die allermeisten Fälle des cHL nachgewiesen werden. Mit der Identifizierung der Ursprungszelle ist es nun zum ersten Mal möglich ein Vergleich der Genexpression zwischen HRS-Zellen und ihren nicht-malignen Ursprungszellen, humanen KZ-B-Zellen durchzuführen. Eine häufig genutzte Methode um Mechanismen der malignen Entartung darzustellen. Für das HL existiert bisher keine solche Studie.

Zu diesen Zweck sollten Genexpressionsprofile der cHL-Zelllinie L1236 und von KZ-B-Zellen generiert und verglichen werden. Hierzu wurde die seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) gewählt (detailliertere Beschreibung siehe Material und Methoden), da diese Methode den Vorteil hat auch bisher unbekannte mRNA Moleküle zu erfassen. Diese Analyse sollte Aufschlüsse über die Unterschiede zwischen den malignen HRS-Zellen und den nicht-malignen KZ-B-Zellen, bzw. über die Mechanismen der Pathogenese geben.

Desweiteren sollten Genexpressionsprofile von vier cHL-Zelllinien mittels Genchips (Affymetrix) generiert werden. Durch eine Kooperation mit U. Klein (Columbia University, New York) sollten Genchip-Daten normaler B-Zellpopulationen und verschiedener Lymphomentitäten zur Verfügung gestellt werden. Diese Genexpressionsprofile sollten unter verschiedenen Aspekten analysiert werden.

Da die Herunterregulation einiger B-Zellmarker in HRS-Zellen bereits bekannt war, sollte überprüft werden, in welchem Maße die B-Zellidentität in HRS-Zellen erhalten ist. Dies sollte mit den Daten beider Versuchsansätze (SAGE und Genchip) durch einen Vergleich cHL-Zelllinien mit normalen nicht-malignen B-Zellpopulationen überprüft werden.

Außerdem sollte eine Verwandtschaftsanalyse, basierend auf den Genchip-Genexpressionsprofilen, Aufschluß über die Ähnlichkeit vom cHL mit normalen B-Zellpopulationen, verschiedenen B-Zelllymphomentitäten (B-CLL, BL, DLCL, FL) und LCL geben. Ähnlichkeiten im Genexpressionsprofil verschiedener Zelllinien könnten als Hinweis auf gleichartiger Genexpressionssignaturen oder Aktivierungszustände dienen. Schließlich sollten, um Aufschlüsse über die Pathologie des HL zu erhalten, cHL-spezifisch ausgeprägte Gene in einem Vergleich der cHL-Profile mit allen anderen Profilen identifiziert werden.

Da die Genexpressionsprofile aus Materialgründen von cHL-Zelllinien generiert werden sollten, waren Verifizierungsstudien an primären HRS-Zellen geplant, die die Expression der mittels SAGE oder Genchip identifizierten differentiell ausgeprägten Gene im Primärgewebe untersuchen sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Die verwendeten cHL-Zelllinien stammen von Patienten, die an einem Nodulär sklerotisierenden-HL (L428 und HDLM2). oder an einem Gemischtzelligen-HL (KMH2 und L1236) erkrankten Die Zelllinie HDLM2 stammt von einer T-Zelle ab, während die anderen drei cHL-Zelllinien von B-Zellen abstammen (Drexler, 1993; Kanzler et al., 1996a; Wolf et al., 1996). Alle Zelllinien wurden in RPMI1640 versetzt mit Glutamax-1 (Gibco), 10% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

2.2 Aufreinigung der Zellpopulationen für die Genexpressionsanalysen

2.2.1 Aufreinigung von humanen tonsillären KZ-B-Zellen für die SAGE Analyse

Die Tonsillen wurden im Verlauf von Routinetonsillektomien entnommen. Mononukleäre Zellen wurden mit einer Ficoll-Dichtezentrifugation aufgereinigt. ZB wurden konsekutiv mit Ratte-anti-CD77 (Immunotech), Maus-anti-Ratte-IgM (Serotec) und Anti-Maus-IgG1-Microbeads (Miltenyi Biotec) angefärbt und anschließend mittels magnetischer Zellseparation (Miltenyi Biotec) aufgereinigt. Die gesamte Prozedur fand bei 4°C statt, um Änderungen in der Genexpression zu vermeiden. Die Reinheit der in dieser Studie verwendeten CD77⁺-Zellen lag höher als 95%. Insgesamt wurden 2,5 x 10⁸ ZB für die Erstellung des SAGE-Profiles verwendet.

2.2.2 Aufreinigung von Zellen für die Chip-basierten Genexpressionsstudien

Für die Chipanalyse wurden ebenfalls die cHL-Zelllinien L1236, L428, KMH2 und HDLM2 verwendet. Die Daten der Vergleichspopulationen, welche normale B-Zellpopulationen, LCL, B-Zell-NHL und B-Zell-NHL-Zelllinien umfassten, wurden uns von U. Klein (Columbia University, New York) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung dieser B-Zellpopulationen wurde bereits detailliert beschrieben (Klein et al., 2001). Magnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi) diente zur Aufreinigung dieser Zellen. Die verwendeten Zellmarker lauten wie folgt: Naïve B-Zellen (CD27⁻, CD10⁻, CD3⁻, CD38^{low}, CD14⁻, IgD⁺), ZB (CD77⁺, CD38^{high}), Zentrozyten (CD77⁻, CD38^{high}, CD39⁻, CD10⁺, CD3⁻

), Gedächtnis-B-Zellen (CD10⁻, CD3⁻, CD38^{low}, CD14⁻, CD27⁺). Da die Genexpressionsprofile der CD77⁺- und der CD77⁻-Keimzentrumzellen erstaunlich wenig Unterschiede erkennen ließen, werden die beiden Zellpopulationen im Folgenden als KZ-B-Zellen zusammengefasst. Eine Erklärung für die wenigen Unterschiede könnte sein, dass CD77 nicht vollständig zwischen ZB und Zentrozyten unterscheidet, obwohl CD77 üblicherweise als ZB-Marker benutzt wird (Fyfe et al., 1987; Gregory et al., 1987).

2.3 SAGE

2.3.1 Generierung und Analyse der SAGE-Genexpressionsprofile

SAGE (Velculescu et al., 1995) basiert auf dem Prinzip, dass eine Nukleotidsequenz von zehn Basen Länge (ein so genanntes „Tag“) in den meisten Fällen, sofern die Position dieser Nukleotidsequenz innerhalb der Messenger-RNA (mRNA) bekannt ist, ausreicht, um einem einzigen Transkript spezifisch zugeordnet zu werden (Abbildung 2).

Letzteres ist dadurch gegeben, dass die Tagsequenz aufgrund der Methodik (Abb. 2) immer die 10 Basenpaare (bp) flussabwärts der am meisten 3`-gelegenen NlaIII-Erkennungssequenz darstellt. Diese Tags werden zu sogenannten Ditags Kopf an Kopf ligiert, die an ihren Enden jeweils eine der beiden Adaptersequenzen tragen. Durch Oligonukleotide, die an den Adaptern binden, können nun die Ditags amplifiziert werden. Dadurch, dass der Bereich in den Ditags mit unterschiedlicher Sequenz so kurz ist (ca. 20 bp), geht man davon aus, dass alle Tags mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden, anders als das bei längeren komplementären DNA (cDNA)-Fragmenten der Fall wäre. Hierdurch wird die quantitative Natur der SAGE-Profile gewährleistet. Nach Vermehrung der Ditagsequenzen werden durch enzymatische Schritte und Aufreinigung die Adapter entfernt und die entstehenden Ditags (ohne Adapter) zu langen Konkatemeren ligiert. Diese werden kloniert und sequenziert. Durch Sequenzierung eines einzelnen Klons erhält man so Information über ca. 35 mRNA- bzw. cDNA-Moleküle. Durch das Sequenzieren tausender Konkatemere wird dann ein SAGE-Profil generiert.

SAGE wurde im Wesentlichen nach folgendem Protokoll durchgeführt (1.0 d von Velculescu et al., <http://www.sagenet.org>). Eine Kurzfassung dieses Protokolls mit leichten Abwandlungen wird hier gegeben.

(Protokoll1; Invitrogen) hergestellt. Für die cDNA-Synthese wurde ein biotinyliertes Starteroligonukleotid von 20 dT-Nukleotiden und einer 5`-gelegenen 15 basenlangen Sequenz verwendet (oligo dT-20+15, 5`Biotin-CAA TGA GTG AAC TAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3`). Die Qualität der cDNA wurde in einem 1%igen Agarosegel überprüft (Längenmaximum bei ca. 1,5 kb).

2.3.1.2 Adapterligation

Je zwei komplementäre Oligonukleotide (1A und 2A sowie 2A und 2B) werden zunächst denaturiert und dann langsam abgekühlt, um eine effektive Hybridisierung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Die Sequenzen der Oligonukleotide lauteten: Adapter 1A, 5`-TTT GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG-3`; Adapter 1B, 5`-TCC CTA TTA AGC CTA GTT GTA CTG CAC CAG CAA ATC C-amino mod. C7-3`; Adapter 2A: 5`-TTT CTG CTC GAA TTC AAG CTT CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG-3`; Adapter 2B: 5`-TCC CCG TAC ATC GTT AGA AGC TTG AAT TCG AGC AG-amino mod. C7-3`. Die Aminomodifikation am 3`-Ende der Adapter verhindert eine Ligation der Adapter während der Ditagligation. Die Hybridisierung erfolgte in einem Puffer mit der Konzentration 1,2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,08 mM EDTA, pH 7,5. 3,1 µg je Oligonukleotid (Endkonz. 103 ng/µl).

2.3.1.3 NlaIII-Reaktion und Bindung an die SAK

Die cDNA wurde mit dem Enzym NlaIII (NEB) geschnitten und anschließend in einer Ethanol-fällung aufgereinigt. Die geschnittenen 3`-cDNA-Fragmente wurden an Streptavidin-gekoppelte magnetische Kügelchen (Abk. SAK; Dynal) gebunden und mittels eines Magneten (Dynal) aufgereinigt. Vor der Bindung wurden die SAK gewaschen (200 µl der SAK + 200 µl 1 x B+W Puffer; Immobilisierung der SAK durch einen Magneten (Dynal) an der Röhrenwand; Überstand abnehmen).

Die Hälfte der synthetisierten cDNA wurde zur Bindung zu den gewaschenen SAK gegeben (100 µl 2 x B+W Puffer, 90 µl Aqua dest. 10 µl der cDNA aus der NlaIII-Reaktion) und 15 min bei Raumtemperatur (RT) unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal wie oben beschrieben gewaschen.

2.3.1.4 Ligation der Adapter

Je 10 µl der oben beschriebenen Adapterligation wurden je mit der Hälfte der SAK (mit gebundenen cDNA-Fragmenten) unter Zugabe von 20 µl LoTE (3 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM EDTA, pH 7,5) und 8 µl 5 x Ligase-Puffer (Invitrogen) gemischt. Die Lösung wurde zunächst für 2 min auf 50°C erhitzt, danach 15 min bei RT gehalten und dann mit je 10 U T4-Ligase (Invitrogen) versetzt. Die Ligation erfolgte zwei Stunden bei 16°C. Nach der Ligation wurden die SAK (mit gebundenen cDNA-Fragmenten) viermal mit 200 µl 1 x B+W Puffer und zweimal mit 200 µl 1 x Puffer 4 gewaschen (wie oben beschrieben).

2.3.1.5 Herstellung der Tags durch Schneiden mit BsmFI

Die SAK (mit gebundenen cDNA-Fragmenten) wurden mit 95 µl LoTE, 2 µl 100 x BSA (NEB); 10 µl 10 x Puffer 4 (NEB) und 6 U BsmF1 (NEB) versetzt und bei 65°C für eine Stunde inkubiert. Der Überstand wird nach Immobilisation der SAK abgenommen und mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit einer Ethanol-/Salz-Fällung präzipitiert, gewaschen und in 10 µl LoTE aufgenommen. Die überhängenden Enden der aufgereinigten Tags werden mit dem Klenow-Enzym zu glatten Enden umgebildet (5 µl 10 x 2nd strand buffer (Invitrogen), 1 µl 100 x BSA (NEB), 1,25 µl dNTP Mischung (20 mM; Amersham), 29,75 µl Aqua dest., 3 U Klenow Enzym (Pharmacia)). Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37°C. Nach der Reaktion wurden 200 µl LoTE zugegeben, mit Phenol/Chloroform extrahiert, eine Ethanol-/Salzfällung durchgeführt und das Sediment in 6 µl LoTE gelöst.

2.3.1.6 Ligation der Tags/Amplifizierung der Ditags

Je 2 µl der Tags (mit Adapter 1 ligiert bzw. mit Adapter 2 ligiert) werden mit 0,6 µl 10 x Ligasepuffer (Promega) und 1,3 µl T4-DNA-Ligase (3 U/µl; Promega) gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 14 µl LoTE zugegeben.

Die optimalen Bedingungen für die Ditag-PCR wurden zunächst ausgetestet (Einsatz von verschiedenen Mengen an Zielmolekülen; je 1 µl von einer 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 oder 1/200 Verdünnung des Ditagansatzes). Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: Je 1 µl Primer1bio/Primer2bio (Primer1bio, Biotin-5'-GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA-3'; Primer2bio, Biotin-5'-CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT-3') wurde

gemischt mit 5 μl 10 x PCR-Puffer (Invitrogen), 3 μl DMSO (Sigma), 3,75 μl dNTP-Mischung (20 mM, Amersham), 3 μl MgCl_2 (50 mM; Gibco) und 31,3 μl Aqua dest. sowie 1 μl Taq-DNA-Polymerase (im Institut für Genetik hergestellt oder Invitrogen). Das Temperaturprogramm lief 1 min bei 95°C und 27 Zyklen von 30 s bei 95°C, 1 min bei 55°C, 1 min bei 70°C, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 70°C. Nach Bestimmung der effektivsten PCR-Bedingungen (Taq-DNA-Polymerase (im Institut für Genetik hergestellt), 27 Zyklen, 1/20 Verdünnung des Ligationsansatzes) wurden 100 PCR-Ansätze mit je 100 μl Volumen angesetzt. Nach der Reaktion wurden die PCR-Ansätze vereinigt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und eine Ethanol-/Salzfällung durchgeführt. Das Sediment wurde in je 10 μl TE* (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM NaEDTA) aufgenommen.

2.3.1.7 Gel-Aufreinigung der Ditags und NlaIII-Reaktion und Aufreinigung der Ditags nach Powell et al. (Powell, 1998)

Die Ditags wurden in einem 12%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (Gellauf bei 8 V/cm) aufgereinigt. Die Banden der Ditags wurden präpariert und die Ditags mittels der „Crush and Soak“ Methode in Lösung gebracht (Zentrifugation durch ein Loch im Röhrchenboden, Zugabe von LoTE und Gabe der Lösung mit Polyacrylamidgelfragmenten auf SpinX-Zentrifugiersäulchen (Costar), Abzentrifugation). Das Eluat wurde mit einer Ethanol-/Salzfällung präzipitiert. Die aufgereinigten Ditags wurden mit NlaIII geschnitten (1 h bei 37°C), mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit einer Ethanol-/Salzfällung präzipitiert. Die Aufreinigung der Ditags erfolgte nach Powell et al. (Powell, 1998). Je 100 μl SAK wurden mit 200 μl 1 x B+W Puffer gewaschen. Zu der NlaIII-Reaktion wurde das gleiche Volumen an 100 μl 2 x B+W Puffer gegeben. Die Ditags wurden auf die SAK gegeben. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei RT. Der Überstand sowie die erste Waschlösung wurde vereinigt und ethanolpräzipitiert.

2.3.1.8 Generierung und Aufreinigung der Konkatemere

Die gereinigten Ditags wurden in kleinem Volumen aufgenommen und über Nacht bei 16°C ligiert. Die Aufreinigung erfolgte durch ein 8%iges Polyacrylamidgel (6,5 V/cm). Kurz vor dem Gelauftrag wurden die Konkatemere für 15 min bei 65°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt (Kenzelmann und Mühlemann, 1999). Verschiedene Größenfraktionen

der Konkatemere wurden präpariert (200 - 500 bp, 500 - 800 bp, 800 - 2500 bp). Die DNA wurde wie oben beschrieben extrahiert.

2.3.1.9 Klonierung der Konkatemere

Der Vektor pZerO-1 (pZerO-1 cloning kit; Invitrogen) wurde zunächst mit SphI (NEB) geschnitten. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde die Klonierung durchgeführt (25 ng pZerO-1 sowie je die gesamte Menge an Konkatemeren (verschiedene Fraktionen) wurden über Nacht bei 16°C ligiert). Nach Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-/Salzpräzipitation wird ein Teil des Ligationsansatzes transformiert.

2.3.1.10 Analyse der SAGE-Profile

Für jedes SAGE-Profil wurden ca. 30.000 Tags sequenziert. Die Primäranalyse (Extraktion der Tags aus den Sequenzen und Auflistung der Tags nach Häufigkeit) wurde mithilfe der SAGE-Software 2000, Version 4.12 durchgeführt. Die in dieser Arbeit angegebenen Tag-Mengen sind auf 30.000 normalisiert. Der Faktor der Herauf- oder Herunterregulation ist dargestellt als Quotient der Taganzahl beider Profile (zur Errechnung des Quotienten wurde für 0 = 1 eingesetzt). Es wurden in die Analyse alle Gene eingeschlossen, die sich in der Expressionsstärke in beiden Profilen um mindestens einen Faktor von fünf unterschieden. Die Tagzahlen, die in Text, Abbildungen und Tabellen erwähnt werden, sind gerundet.

2.4 Genchip-Analysen

In dieser Analyse wurden U95A-Chips der Firma Affymetrix verwendet. Auf diesem Chip sind ca. 12.000 cDNA oder 9.000 Gene vertreten. Für jede cDNA sind aus dem 3'-gelegenen cDNA-Bereich 20 verschiedene 25 Basen lange Sonden auf den Chip gespottet (Lipshutz et al., 1999). Die große Anzahl der Sonden wurde gewählt, um Ungenauigkeiten, die durch ineffektiv oder falsch hybridisierende Oligonukleotide entstehen, ausgleichen zu können. Eine weitere Kontrolle wird durch die dazugehörigen 20 „Mismatch“-Oligonukleotide gewährleistet. Diese weisen, bis auf ein Nukleotid in der Mitte der Sequenz, die gleiche Struktur auf wie die genspezifischen Sonden. Auch dieses dient dazu, Kreuzhybridisierung zu erkennen und die dadurch entstehenden falschen Ergebnisse aus der Analyse herausnehmen zu können. Der Großteil der Gene liegt am 3'Ende der cDNA-Moleküle, um Einflüsse durch partiell degradierte RNA zu

vermindern. Für einige Kontrollgene gibt es jedoch 3'- wie 5'-gelegene Sonden, sodass ein Verhältnis der Fluoreszenzwerte beider Sonden einen Eindruck der Qualität der verwendeten komplementären RNA (cRNA) gibt.

2.4.1 Generierung von cRNA und Chip-Hybridisierung

Die Hybridisierung der Chips wurde von R. Küppers (Institut für Genetik, Köln, Deutschland) und U. Klein (Columbia University, New York) durchgeführt. Die Isolierung der Gesamt-RNA sowie die Synthese der cDNA und cRNA wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (Klein et al., 2001). Nach dem Affymetrix-Protokoll wurde die cRNA fragmentiert und 15 µg biotinylierter cRNA wurde auf den U95A-Oligonukleotid-Chip (Affymetrix) hybridisiert. Auf dem U95A-Chip sind ca. 12.000 cDNA mit Oligonukleotidsonden repräsentiert. Die Expressionwerte der Gene wurden mit der Affymetrix Microarray Suite 4.0 Software bestimmt. Niedrige oder negative Expressionswerte wurden gleichgesetzt mit dem arbiträr gewählten Wert 20.

2.4.2 Biostatistische Analyse der Chip-basierten Daten

Der hierarchische Clusteralgorithmus basiert auf der average-linkage-Methode (Eisen et al., 1998) und wurde verwendet, um den genealogischen Stammbaum in der Abb. 6 (zusätzliche Abb. 1 im Anhang) zu erstellen. Um diesen zu bilden, wurde eine Gruppe von Genen verwendet, deren Expressionsstärken sich unter den 23 verschiedenen Zellgruppen am stärksten unterschieden (Klein et al., 2001). Der Expressionswerte eines jeden Gens wurde normalisiert auf Null als Mittelwert und die Standardabweichung wurde berechnet. Der Abstand bzw. der Grad der Ähnlichkeit zweier Zellpopulationen wird durch den Pearson-Abstand, basierend auf den normalisierten Expressionswerten, berechnet. Der Grad der Ähnlichkeit der cHL-Zelllinien untereinander sowie mit den Vergleichspopulationen wurde auf diese Weise ermittelt. Die Software ordnet die Zellpopulationen nach der Ähnlichkeit der Genexpression.

Die Genes@Work-Software basiert auf dem Mustererkennungsalgorithmus SPLASH (Califano, 2000). Sie wurde entwickelt, um Gene zu identifizieren, die zwischen Probengruppen **konsistent** differenziell ausgeprägt sind. Verglichen wird jeweils eine definierte Phänotypengruppe (z.B. cHL-Zelllinien) mit der Vergleichsgruppe. Die Konsistenz wird durch den Support-Faktor eingestellt. Ein Faktor von $n = n_0$ bedeutet, daß die identifizierten Gene in allen Populationen der Phänotypengruppe herunter- bzw.

Heraufreguliert sein müssen. Ein Support-Faktor von $n = n_0 - 1$ hingegen bedeutet, daß ein Ausreißer erlaubt ist. Um konsistent differentiell ausgeprägte Gene zu identifizieren, waren zumindest vier Proben pro Zellpopulation benötigt. Für die cHL-Zelllinien wählten wir die vier Zelllinien aus, die mit größter Sicherheit von primären HRS-Zellen abstammen. Alle vier Zelllinien prägen die HL-assoziierten Antigene CD30 und CD15 aus (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996).

Für die Analyse der B-Zellidentität wurde eine „supervised“ Clustering-Analyse durchgeführt, in der die cHL-Zelllinien (L1236, L428, KMH-2, HDLM-2) sowie 20 Proben der fünf B-Zellpopulationen (naïve B-Zellen, ZB, Zentrozyten, Gedächtnis-B-Zellen) zunächst jeweils als separate Gruppen (cHL = Phänotypengruppe, restliche Zellpopulationen = Vergleichsgruppe) definiert wurden. Die Genes@Work-Software identifizierte dann die zwischen cHL-Zelllinien und B-Zellen differentiell ausgeprägten Gene. Eine der in der Chip-Analyse verwendeten cHL-Zelllinien stammt ursprünglich von einer T-Zelle ab (HDLM2) (Drexler, 1993). Die Einbeziehung dieser Zelllinie behinderte nicht die Identifizierung von herunterregulierten B-Zell-spezifischen Genen in den drei cHL-Zelllinien, die von B-Zellen abstammen, da HDLM2 (als T-Zellderivat) erwartungsgemäß keine B-Zellmarker exprimiert und die Software nur Gene identifiziert, die konsistent in allen vier Zelllinien herunterreguliert sind. Zudem ist die Zelllinie HDLM2 wertvoll bei der Identifizierung von Lymphozyten- und hämatopoetisch-spezifisch ausgeprägten Genen, die in den cHL-Zelllinien herunterreguliert sind.

cHL-spezifische Gene wurden ebenfalls in einer „supervised“ Analyse identifiziert: Die cHL-Zelllinien wurden als Phänotypengruppe definiert, alle anderen Populationen wurden in einer Vergleichsgruppe zusammengefasst. Die Primärdaten der Genexpression aller Zellpopulationen sind frei zugänglich unter <http://ICG.cpmc.columbia.edu/faculty.htm>.

2.5 Datenbankrecherche für B-Zellmarker

Um Gene zu identifizieren, die spezifisch in B-Zellen ausgeprägt werden, wurde Literaturrecherche in der PubMed-Datenbank betrieben. Suchbegriffe wie „B cell-specific expression“, „B cell marker, human, staining“ wurden verwendet. Die Mehrzahl der hierdurch gefundenen Gene wurden als herabreguliert in cHL-Zelllinien identifiziert.

2.6 Sequenzanalyse der Pax-5 cDNA

Gesamt-RNA der cHL-Zelllinien wurde mit Trizol (Gibco) isoliert, und cDNA wurde mit dem Omniscript RT kit (Qiagen) synthetisiert. RT-PCR zur Amplifizierung der gesamten kodierenden Sequenz von Pax-5 wurde mit cDNA entsprechend 30 ng Gesamt-RNA durchgeführt. Die PCR-Reaktionslösung enthielt 100 μ M von jedem Desoxynukleotid, 1 x High Fidelity PCR-Puffer (Roche), 2 mM MgCl₂, 2 U High Fidelity DNA-Polymerase mix (Roche) und 125 nM beider Oligonukleotide (Pax-5-forward: 5'-AAA AAG GCA CAA AAA AGT GGA AAC-3' und Pax-5-reverse: 5'-ACC CTC AAT AGG TGC CAT CAG T-3'). Das Amplifikationsprogramm verlief folgendermaßen: 60 s bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen von 50 s bei 95°C, 30 s bei 59°C, 60 s bei 72°C, abschließend erfolgt eine fünfminütige Inkubation bei 72°C. Das RT-PCR-Produkt (1287 bp) wurde durch Agarosegelelektrophorese getrennt, anschließend aufgereinigt und direkt mit den Oligonukleotiden „Pax-5-forward“ und „Pax-5-reverse“ sequenziert. Um Sequenzinformation über die gesamte Länge der kodierenden Sequenz zu erhalten, wurden die PCR-Produkte zusätzlich mit vier intern gelegenen Oligonukleotiden sequenziert (5'-TGA CAC CGT GCC TAG CGT CAG-3', 5'-GAC CGC GTG TTT GAG AGG CAG-3', 5'-GTG GTC TGC TCG GGC TTG ATG G-3', 5'-CAC TAT GCT GTG ACT GGA AGC TG-3').

2.7 Immunhistochemie für ausgewählte B-Zellmarker

Immunhistochemische Färbungen wurden auf Gewebeschnitten von Tonsillen (entnommen bei einer Routinetonsillektomie) und auf Gewebeschnitten von Lymphknotenbiopsaten von an cHL erkrankten Patienten durchgeführt. Einige Färbungen wurden auf Gefriergewebe (RP105, BCMA, BLNK, CD52, Blk, SIT und Lck), andere auf Paraffin-fixiertem Gewebe durchgeführt (Syk und SWAP-70). Die Fälle 7, 8, 12 und 13 (Tabelle 7) stammten von Patienten, die am NS-Subtyp des cHL erkrankt waren. Die verbleibenden Fälle entsprachen dem MC-Subtyp des cHL. Die Gewebeschnitte wurden gefärbt mit anti-RP105 (CD180) (1:100, Bioscience), anti-Lck (1:100; Santa Cruz), anti-SWAP-70 (Santa Cruz), anti-Syk (1:500; Santa Cruz), anti-BCMA (1:100, Santa Cruz), anti-BLNK (1:20, Santa Cruz), anti-Blk (1:25, Serotec), anti-SIT (1:50; Abcam) und anti-CD52 (1:80, Biosource), gefolgt von einer Standard ABC-Färbung. Die Entwicklung wurde mit FastRed oder DAB-Substrat (Dako) durchgeführt.

Der EBV-Status der cHL-Fälle wurde mit einer EBER-in-situ-Hybridisierung untersucht (Niedobitek et al., 1991).

2.8 Semiquantitative RT-PCR der cHL-Zelllinien

2.8.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die cDNA der ZB und der cHL-Zelllinie L1236 wurde wie in Punkt 2.3.1.1 beschrieben synthetisiert. Die Gesamt-RNA der anderen drei cHL-Zelllinien wurde mit Trizol (Gibco) extrahiert und anschließend mit DNaseI (Promega) behandelt. Die Synthese der cDNA erfolgte durch das SuperScript first-strand Synthesis System für RT-PCR (Invitrogen).

2.8.2 Durchführung der semiquantitativen RT-PCR

Die RT-PCR Reaktionen wurden jeweils in Duplikaten (jeweils ein Ergebnis dieser Reaktionen ist dargestellt) mit den gleichen Mengen an cDNA der L1236 und der ZB durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden mit quantitativer RT-PCR auf die Menge an β -Aktin Zielmolekülen normalisiert. Diese Technologie erlaubt eine Normalisierung mit höchstmöglicher Genauigkeit. β -Aktin wurde als cDNA zur Normalisierung ausgewählt, da es in beiden Zellpopulationen (L1236 und ZB) laut der SAGE-Analyse in gleichem Maße ausgeprägt ist (Abbildung 4). Für den Vergleich der cHL-Zelllinie L1236 mit den ZB wurde die cDNA pur oder dreifach, neunfach oder siebenundzwanzigfach verdünnt eingesetzt. Die RT-PCR-Reaktion wurde in einem Endvolumen von 20 - 50 μ l angesetzt. Die Reaktionslösung hatte folgende Zusammensetzung: 200 μ M von jedem Desoxynukleotid, 1 x Sigma PCR-Puffer, 3 mM $MgCl_2$, 2 U Sigma Taq-DNA-Polymerase (Sigma) und 187 nM je Oligonukleotid. Das Amplifikationsprogramm bestand aus 60 s bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen von 20 s bei 95°C, 20 s bei 60°C, 20 s bei 72°C und abschließend 5 min bei 72°C. Die Oligonukleotidsequenzen lauteten wie folgt: ATBF1 for: 5'-GTC TGA CAC GGA TCT CAG C-3' (for: bezeichnet hier und im Folgenden das stromaufwärts gelegene Oligonukleotid) ATBF1 rev: 5'-GTC CGT TCC TAC ACT GGT C-3' (rev: bezeichnet hier und im Folgenden das stromabwärts gelegene Oligonukleotid), FK506-bindendes Protein-4 for: 5'-CTG GTT GGA TGG TGG CTT TAG-3', FK506 bindendes Protein-4 rev: 5'-TTC ATG TGC AAT GGA GGA GG-3', Hnmp1 for: 5'-TGC TGT CTC TCC TTC ATC CTG T-3', Hnmp1 rev: 5'-ATC AAG GCG CCA GTA AAC ACC-3', IRAK1 for: 5'-GGG AAG GGA AAC ATT TTC AGG-3', IRAK1 rev: 5'-GGC TAC TTT TGG ACA CGC AAG-3', JunB for: 5'-GGC TCG GTT TCA GGA

GTT TGT-3', JunB rev: 5'-GCC CGG ATG TGC ACT AAA AT-3', L-myc for: 5'-TCC ACA CCC GTG AGA AAT CCT-3', L-myc rev: 5'-TTC CAT ACC CCA TTC CCC A-3', P21^{SNFT} for: 5'-AAG GCT GAC AAG CTC CAT GAG-3', P21^{SNFT} rev: 5'-CCG CAG CAT GGT GTT TTC TT-3', Prame for: 5'-TGT TTC ATG CCT AAC TAG CTG-3', Prame rev: 5'-AAC TGT GGC TGC TTT GTT G-3', PTP4A for: 5'-GAA ATA CCG GCC CAA ACA GAG-3', PTP4A rev: 5'-TCC TGA CCT ACA TGA CGA CCA G-3', Px19 Homolog for: 5'-GAA TTT GGT CTT GCC CGG T-3', Px19 Homolog rev: 5'-CGT CTC CTT TGC CTT CTC CTT-3', RhoC for: 5'-CAG TGC CTT TGG CTA CCT TGA-3', RhoC rev: 5'-TTG TTC TTG CGG ACC TGG A-3'.

2.9 Immunoblot-Analyse

Der Immunoblot wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Menge des aufgetragenen Proteins wurde mit dem D_c Protein Assay (Bio-Rad) vermessen. Die folgenden Primärantikörper wurden verwendet: Anti-Neogenin, sc-6536; Anti-Gas1, sc-9585; Anti-GATA-3, sc-268 (alle von Santa Cruz); Anti-ABF-1 (zur Verfügung gestellt von C. Murre).

2.10 FACS-Analyse

Die Zellen wurden mit Anti-IL-1R2-Antikörper (HyCult) in 1 x PBS/0,05% BSA inkubiert, gewaschen und mit einem FITC-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper gefärbt. Die Analyse wurde auf dem FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt.

2.11 RT-PCR von mikrodisektierten HRS-Zellen

Die RT-PCR-Analysen in der hier vorliegenden Arbeit wurden von V. Distler (Institut für Pathologie, Frankfurt am Main, Deutschland) in Kooperation mit R. Küppers und mir durchgeführt. Frau V. Distler hatte die Etablierungsarbeiten für diese Technik bereits geleistet, da sie eine möglichst hoch effiziente Isolierung von RNA und Synthese von cDNA benötigt, um begrenztes Zellmaterial mit Affymetrix-Chips zu analysieren.

2.11.1 Charakterisierung der Fälle

Für die Konfirmierung der SAGE-0Daten (Tabelle 4) wurden Gewebeschnitte involvierter Lymphknoten von vier cHL-Patienten verwendet. Patienten 1 - 4 waren ein

29-jähriger Mann, der an einem Rückfall an NS-HL erkrankt war, und je eine 40-, 31- und 33-jährige Frau mit einer Ersterkrankung an NS-HL.

Für die Konfirmation der Genchipdaten (Tabelle 5) wurden Gewebeschnitte von neun HL-Patienten verwendet. Sieben von ihnen (Patienten 1 – 7) waren an einem cHL erkrankt, zwei wiesen ein LP-HL auf (Patienten 8 und 9). Die Patienten 1, 2, 3, 5 und 6 zeigten eine Ersterkrankung, während Patient 4 einen Rezidiv erlitt. Für die Patienten 7 – 9 liegen keine Patienteninformationen vor. Das Alter der Patienten (für die Patienteninformationen vorliegen) reichte von 29 bis 65 Jahre.

2.11.2 Färbung der Gewebeschnitte und Mikrodissektion

Fünf µm-dicke Gewebeschnitte (aus Gefriergewebe) wurden auf Membran-bedeckte Objektträger aufgelegt und vier min mit Hematoxylin angefärbt. Die Hematoxylinlösung enthielt RNase-Inhibitor (200 U/ml, Roche). Die Gewebeschnitte wurden in DEPC-behandeltem Wasser für zwei min gewaschen, 15 s in einer 2%igen Eosinlösung inkubiert, noch einmal gewaschen und dann bei 37°C für 3 h getrocknet. Einzelne HRS-Zellen wurden mit einem UV-Lasergerät (PALM) isoliert und in 20 µl Purescript® Lysis-Puffer (Biozym) katapultiert. Je 50 Zellen wurden gepoolt. Von den gleichen Gewebeschnitten wurden ebenfalls Gruppen von 5 Nicht-HRS-Zellen isoliert und ebenfalls in Gruppen von 50 Zellen gepoolt. Keimzentrums-B-Zellen wurden aus Gewebeschnitten zweier Tonsillen isoliert und ebenfalls in Gruppen von 50 Zellen gepoolt.

2.11.3 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur RNA-Isolierung wurde das Purescript® RNA-Isolierungs-Kit (Biozym) in einer leicht abgewandelten Form verwendet. Glykogen wurde als Fällhilfe benutzt und die Menge aller Reagenzien wurde auf ein Zehntel der Mengen, die im Standardprotokoll angegeben sind, reduziert. Vor der cDNA-Synthese, welche in die RT-PCR für rab13 und ATBF1 eingesetzt werden sollte, wurde eine DNaseI Reaktion (Stratagene) durchgeführt, da prozessierte Pseudogene dieser Transkripte im menschlichen Genom existieren.

Die isolierte RNA sowie 0,6 µM eines genspezifischen Oligonukleotids (RhoC rev^{sc} 5'-CGC TTG TTC TTG CGG ACC TGG A-3', ATBF1 rev^{sc} 5'-GGT GTC CGT TCC TCA ACT GGT C-3', p21^{SNFT} rev2^{sc} 5'-TCC CGA TCT CTC TCC GCA GCA TGG-3', CD52 rev^{sc} 5'-CTG GTG ATG TCT GGC ATC AAC C-3', PRAMErev_a, 5'-AGG GCA AGG

AGC TGA TCA TCC G-3'; IPLUTRrev, 5'-CTA GCC TCG GTC CGA CTC GTC C-3'; rab13rev, 5'-CTC ATC CGT GAT GTC GTA TAC TAG G-3'; Ear3rev, 5'-TGG ATT GGG CTG GGT TGG AGG C; FERrev, 5'-CGG ACA AAC CCC TAA GCT GAA GG-3') wurden für 10 min bei 70°C denaturiert. Das T4-Gen-32-Protein (Ambion) wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/Probe während dieser Denaturierung dazu gegeben. Die cDNA Synthese wurde mit dem OneStep RT-PCR-Kit (Qiagen) unter Zugabe von 10 U eines RNase-Inhibitors (Roche) durchgeführt. Das Enzym (2 µl Qiagen OneStep RT-PCR Enzymmix) wurde nach einem Hitzeschritt bei 50°C für 2 min zugegeben.

2.11.4 Durchführung der RT-PCR

Für die RT-PCR-Analyse von mikrodisektierten Einzelzellen wurden zwei Runden der Amplifizierung durchgeführt. In der zweiten Amplifikationsrunde wurde 1 µl Reaktionslösung der ersten Runde als Zielmolekül eingesetzt. Alle Oligonukleotidpaare außer für ATBF1 waren intronumspannend gewählt. In allen Reaktionen waren folgende Bedingungen gegeben: Die Desoxynukleotidkonzentration betrug 200 µM, die Oligonukleotidkonzentration betrug 0,125 µM, und das HotStarTaq DNA-Polymerase System (Qiagen) wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Die erste Amplifikationsrunde wurde mit dem flußabwärts gelegenen Oligonukleotid (welches schon für die cDNA-Synthese eingesetzt wurde) und dem korrespondierenden flußaufwärts gelegenen Oligonukleotid durchgeführt (RhoC for^{1sc} 5'-ACC CGG ACA CTG ATG TCA TCC TC-3', ATBF1 for^{1sc} 5'-CCT CCA GGA AGT CTT GGC CGC-3', p21^{SNFT} for^{sc} 5'-AGC TCC CGG CAT GTC GCA AGG-3', PRAMEfor 5'-GCA GTA TAT CGC CCA GTT CAC C-3'; IPLfor 5'-GAG CCC TCG GAG CCC TCC AGG-3'; rab13for_a 5'- GTC TGA TCA TTC GCT TTG CAG AGG-3'; EAR3for_a 5'- CCA ATT CAC CTG CGA GGG CTG C-3'; FERfor_a 5'-GCT GCA AGA AAC TGC CTG GTA GG-3').

Die genauen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Temperaturprogramm lautete wie folgt: 15 min bei 95°C, 60 s bei der Hybridisierungstemperatur (genspezifisch, siehe Tabelle 1), 60 s bei 72°C und eine bestimmte Anzahl an Zyklen (genspezifisch, siehe Tabelle 1) von 30 s bei 95°C, 30 s bei Hybridisierungstemperatur und 45 s bei 72°C, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 72°C. In der zweiten Runde der Amplifikation wurde ein intern gelegenes 5' Oligonukleotid (RhoC for^{2sc} 5'-CAG TGC CTT TGG CTA CCT TGA-3'; ATBF1 for^{2sc} 5'-GGA GTC TGA CAC GGA TCT CAG C-3'; p21^{SNFT} rev^{1sc} 5'-TTC GGA CCT TCC TGT CAT CAT CC-3'; PRAMErev_i 5'-GGT TTC CAA GGG GTT CAT CAC G-3';

rab13for_i 5`- CTA CAA GTC TGG GAC ACG GCT GG-3`); EAR3for_i 5`-CTT ACA CAT GCC GTG CCA ACA GG -3`; FERfor_i 5`- CAT TAA ATG GAC AGC ACC GGA AGC`-3`) zusammen mit dem entsprechenden Oligonukleotid, welches in der ersten Amplifikationsrunde eingesetzt wurde, verwendet. Einige RT-PCR-Produkte wurden sequenziert, um die richtige Sequenz zu bestätigen. Gruppen von HRS-Zellen und von Kontrollzellen sowie Pufferkontrollen (Purescript®-Lysis-Puffer ohne Zellen) wurden parallel analysiert, zudem wurden einige Nicht-HRS-Zellgruppen ebenfalls parallel zu den Gruppen der KMH2-Zellen (Positiv-Kontrolle) analysiert.

Zur Überprüfung der grundsätzlichen Amplifizierbarkeit der cDNA in KZ-B-Zellen wurde eine RT-PCR für CD52 durchgeführt.

Gen	1. Runde			2. Runde			Produktlänge (bp)
	MgCl ₂ (mM)	Zykluszahl	Hybr. temp. (°C)	MgCl ₂ (mM)	Zykluszahl	Hybr. temp. (°C)	
RhoC	3	29	65	2	27-30	65	105
ATBF1	3	24	60	2	24	65	115
Fer	2	20	60	2,5	30	60	114
PRAME	2	39	60	2	30	60	352
IPL	1,5	39	67	-	-	-	98
rab13	1,5	20	61	2	30	61	104
p21 ^{SNFT}	2	29	65	1,5	29	65	131
EAR	2	20	60	2	30	60	151
CD52	2	40	65	-	-	-	327

Tabelle 1: PCR-Bedingungen für die RT-PCR-Reaktionen auf mikrodisssektierten HRS-Zellen.

1. Runde bezeichnet die erste Amplifikationsrunde, von der 1 µl als Zielmolekül in die zweite Amplifikationsrunde (2. Runde) eingesetzt wurde. MgCl₂ bezeichnet die Endkonzentration an MgCl₂ im Reaktionsansatz. Hybr.temp. bezeichnet die jeweilige Hybridisierungstemperatur, welche im Temperaturprogramm verwendet wurde. Die in der letzten Spalte aufgeführten Produktlängen beziehen sich auf das RT-PCR-Produkt der 2. Runde, außer für die Ansätze, in denen keine zweite Runde erforderlich war.

3 Ergebnisse

3.1 Aufreinigung humaner ZB

KZ-B-Zellen setzen sich aus Zentrozyten, ruhenden Zellen, die nicht oder wenig CD77 exprimieren, und ZB, stark proliferierenden Zellen, die CD77 in unterschiedlichem Maße exprimieren, zusammen. Zur Analyse der Genexpression in der nicht malignen Ursprungszelle des cHL haben wir uns entschieden, ZB aufzureinigen, da es ungünstig gewesen wäre, die Genexpression ruhender Zellen (Zentrozyten) mit denen einer proliferierender Zelllinie (L1236) zu vergleichen.

Nach Erstellung der SAGE-Profile bekamen wir Einsicht in Gen-Chip (Affymetrix)-Daten von ZB und Zentrozyten (welche uns von U. Klein (Columbia University, New York) zur Verfügung gestellt wurden), die erstaunlich wenige Unterschiede in der Genexpression dieser beiden Zellpopulationen erkennen ließen (Klein et al., 2003b). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Expression des CD77-Markers nicht vollständig zwischen ZB und Zentrozyten unterscheidet. Aus diesem Grund werden im Folgenden sowohl in der SAGE- als auch in der Gen-Chip-Analyse die ZB (SAGE) bzw. die ZB/Zentrozyten (Gen-Chip) zusammenfassend als KZ-B-Zellen bezeichnet.

Die für SAGE verwendeten ZB wurden insgesamt aus acht Donoren mittels MACS aufgereinigt, um donorabhängige Unterschiede in der Genexpression dieser Zellen zu mitteln. Die Reinheit der verwendeten ZB betrug über 95% (Abbildung 3).

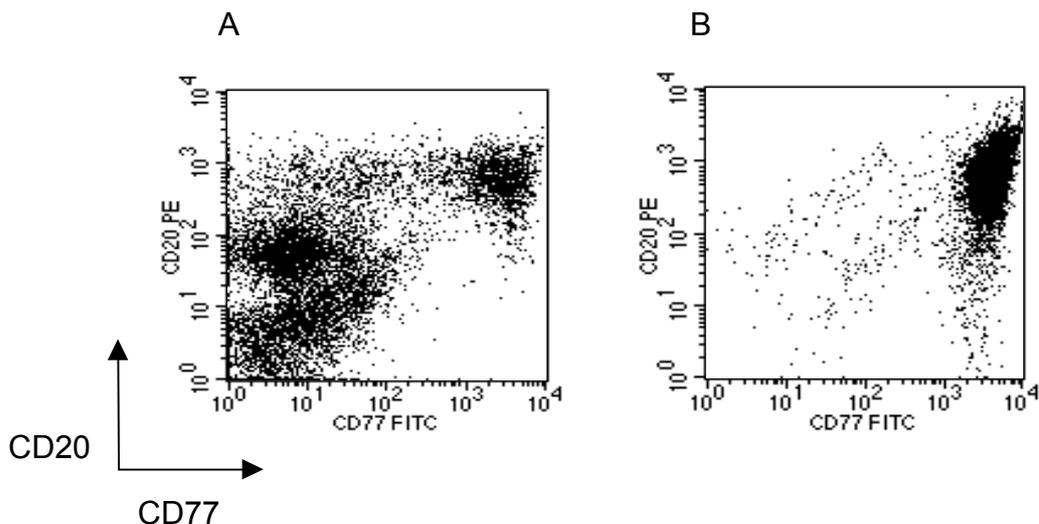


Abbildung 3: Aufreinigung humaner tonsillärer CD77⁺-KZ-B-Zellen (Exemplarische FACS-Analyse).

Darstellung A zeigt tonsilläre mononukleäre Zellen nach der Ficoll-Aufreinigung, gefärbt für CD20 und CD77.

Darstellung B zeigt CD77⁺, CD20⁺-doppeltpositive Zellen nach einer zweifachen MACS-Aufreinigung. Die Reinheit beträgt über 95%.

3.2 SAGE-Analyse der cHL-Zelllinie L1236 und humaner KZ-B-Zellen

3.2.1 Generierung und Analyse der SAGE-Profile der cHL-Zelllinie L1236 und humaner KZ-B-Zellen

Mittels der SAGE-Methode wurden genomweite Genexpressionsprofile von der cHL-Zelllinie L1236 und von KZ-B-Zellen generiert. Hierfür wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert, geschnitten und die flussabwärtsgelegenen Fragmente aufgereinigt. Durch eine Reihe enzymatischer Schritte wurden Ditags (jedes Tag repräsentiert ein Transkript) generiert, die mittels PCR amplifiziert wurden (siehe Material und Methoden, Abbildung 2). Weitere Schritte lieferten aufgereinigte Ditagmoleküle, die zu Konkatemeren ligiert und kloniert wurden. Die Sequenzen vielfacher Plasmide bilden die Grundlage für die Genexpressionsprofile. Die SAGE-Software identifiziert die Tags in den Sequenzen und ordnet sie nach Häufigkeit im gegebenen Profil auf. So repräsentiert jedes distinkte Tag im Profil ein bestimmtes Transkript, das mit einer spezifischen Häufigkeit in den Profilen vertreten ist. Aus der Analyse der SAGE-Tags werden durch die SAGE-Software automatisch folgende Tags, die methodisch bedingte Artefakte darstellen, ausgeschlossen: Ditag-Duplikate, die PCR- oder

Klonierungsartefakte darstellten (in dieser Studie vornehmlich Klonierungsartefakte (ca. 5-13% der Tags)), sowie Tags mit Adaptersequenz, die durch Adapterdimere entstehen (ca. 8-13% der Tags). Es gingen 29.514 Tags für die Population der KZ-B-Zellen und 30.034 Tags für die Zelllinie L1236 in die SAGE-Profile ein. Diese Tags repräsentierten 11.056 (KZ-B-Zellen) und 10.493 (L1236) verschiedene Transkripte bzw. cDNAs. Die Verteilung der Häufigkeitsklassen (Tabelle 2) war vergleichbar mit anderen SAGE-Studien (Chen et al., 1998; Welle et al., 1999). Der größte Anteil der Tags (83%) ist in den Profilen nur mit einem oder zwei Tags vertreten, repräsentiert also niedrig exprimierte Gene. Nur 8% der Tags sind mit 5 Tags oder mehr vertreten.

	CD77 ⁺ -KZ-B-Zellen	Zelllinie L1236
Anzahl der distinkten Transkripte	11056	10493
Transkripte ≥ 10 Tags/Profil	352/3,2%	348/3,3%
Transkripte > 4 < 10 Tags/Profil	520/4,7%	525/5%
Transkripte 3 oder 4 Tags/Profil	937/8,5%	939/9%
Transkripte 2 Tags/Profil	1563/14,1%	1478/14,1%
Transkripte 1 Tags/Profil	7684/69,5%	7203/68,6%

Tabelle 2: Abundanzklassen der SAGE-Profile.

Die Tags der beiden SAGE-Profile sind nach der Häufigkeit, in der sie im Profil erscheinen, eingeteilt. Der Großteil der Transkripte entspricht niedrig exprimierten Genen, während nur ein kleiner Teil der Gene hoch exprimiert wird.

Um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde eine elektronische Subtraktion der beiden Profile vorgenommen (SAGE-Software 2000). Da stark differenziell ausgeprägte Gene potenziell eher von Interesse für die Pathogenese sind und aufgrund der hohen Anzahl der identifizierten Gene, setzten wir eine arbiträre Grenze von mindestens fünffach herauf- oder herunterreguliert. Natürlich befinden sich unter den Genen, die weniger stark differenziell exprimiert sind, auch Gene mit einer sehr hohen Expression in der Zelllinie L1236 und einer geringeren in den KZ-B-Zellen. Auch diese Gene könnten von Bedeutung für die Pathogenese des HL sein. Zudem wären sicherlich bei der Generierung größerer SAGE-Profile zusätzliche Gene

identifiziert worden, die sich in diesen Profilen noch unter der von uns gesetzten Grenze befinden.

Nach Anwendung der Grenze der fünffachen Herauf- oder Herunterregulation zeigten sich 464 distinkte Transkripte als differenziell zwischen den beiden untersuchten Zellpopulationen exprimiert. 177 Transkripte wiesen eine höhere Expression in der Zelllinie L1236 auf (Anhangstabelle 1), und 287 Transkripte waren herunterreguliert im Vergleich zu KZ-B-Zellen (Anhangstabelle 2). (Die Liste der gesamten differenziell exprimierten Gene ist erhältlich unter <http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/101/4/1505/DC1>).

Um die Verlässlichkeit der beiden SAGE-Profile bzw. des Vergleichs zu überprüfen, wurde in der Gruppe der differenziell exprimierten Gene nach Transkripten gesucht, von denen bekannt ist, dass sie spezifisch in HRS-Zellen ausgeprägt werden. Dies ist tatsächlich der Fall für Fascin (17 Tags in L1236 : 0 Tags in KZ-B-Zellen), TARC (14 : 0), TNF (8 : 1), CD44 (6 : 0), Neuronspezifische Enolase 2 (8 : 1) und CCR7 (18 : 0) (Anwar und Wood, 2000; Hopken et al., 2002; Messineo et al., 1998; Oka et al., 1990; Pinkus et al., 1997; van den Berg et al., 1999). Einige andere Gene wurden jedoch nicht gefunden, so z.B. CD30 und IL-13 (Kapp et al., 1999; Wolf et al., 1996). IL-13-RNA wird jedoch, wie wir in quantitativen RT-PCR-Analysen in einer anderen cHL-Zelllinie (L428) beobachten konnten, abhängig vom Proliferationsstatus stark herauf- bzw. herunterreguliert (Daten hier nicht gezeigt). Dies könnte eventuell auch der Fall für die Zelllinie L1236 sein. Für das Fehlen von CD30-Transkripten im SAGE-Profil der L1236 könnten eine niedrige Expression in dieser Zelllinie (Wolf et al., 1996) sowie Polymorphismen eine Erklärung sein.

3.2.2 Identifizierung der in der Zelllinie L1236 herunterregulierten Transkripte

Insgesamt 287 Transkripte zeigten eine mindestens fünffach geringere Expression in der Zelllinie L1236 im Vergleich zu KZ-B-Zellen. Bei der Analyse dieser Gene zeigte sich, dass erstaunlich viele dieser Transkripte B-Zell-, Lymphozyten-, und hämatopoetisch-spezifisch exprimiert sind (siehe Tabelle 6 und Anhangstabelle 2). Der Aspekt der herunterregulierten „B-Zellidentitätsgene“ wird zusammen mit den korrespondierenden Genchip-Daten in Punkt 3.4 dargestellt.

Neben den B-Zellidentitätsgenen wurden auch einige andere Transkripte identifiziert. Da nur wenige dieser Gene von erkennbarem Interesse für die Pathogenese des cHL waren, beschränken wir uns hier auf einige wenige. So zeigt z.B. der Regulator von G-

Proteinsignalen-13 (regulator of G-protein signaling 13), ein Regulator, der G-Proteinsignale hemmt, eine siebzehnfache Herunterregulation in der L1236. Zudem zeigen zwei weitere Proteine mit inhibierender Funktion auf G-Proteinsignale eine ähnliche Regulierung, nämlich der Regulator von G-Proteinsignale-5 (regulator of G-protein signaling 5; 16-fach herunterreguliert), sowie G-Proteinsignalwegsuppressor 1 (G-protein pathway supressor 1; 6-fach herunterreguliert). Die Aktivierung von kleinen G-Proteinen betrifft möglicherweise auch die verminderte Expression von Rho-GDP-Dissoziierungsinhibitor- (GDI) alpha und beta. GDI inhibiert die Dissoziation von GDP, welches an kleine G-Proteine gebunden ist, und somit den Übergang in die GTP-gebundene aktive Form des G-Proteins.

3.2.3 Analyse der mittels SAGE identifizierten heraufregulierten Transkripte

Bei dem Vergleich der SAGE-Profile wurden insgesamt 177 verschiedene Transkripte als heraufreguliert (mindestens um den Faktor 5) in der Zelllinie L1236 identifiziert. Um diese Liste zu fokussieren, wurden einige Tags aus den weiteren Analysen ausgenommen. Dies gilt für Tags, für die kein entsprechender Eintrag in der UniGene-Datenbank zugeordnet werden konnte (bisher unbekannte Transkripte), für die nur nicht weiter spezifizierte cDNA-Einträge identifiziert werden konnten (EST-Einträge oder „hypothetical protein“-Einträge) oder für die Transkripte, welche eine eher grundsätzliche Rolle in metabolischen Prozessen (Haushaltsgene) einnehmen, zugeordnet wurden. Die verbliebenen hochregulierten Transkripte wiesen eine „bekannte Funktion“ sowie eine potenziell-funktionelle Bedeutung auf. Aus dieser Gruppe wurden 46 Transkripte ausgesucht, die wir als besonders interessant für die Pathogenese des HL erachteten. Diese wurden in funktionelle Klassen wie z.B. Transkriptionsfaktoren oder Kinasen/Phosphatasen eingeteilt (Tabelle 3). Diverse Transkripte, die bekannt für eine Rolle in bzw. für eine Assoziation mit maligner Transformation sind, sind hochreguliert bzw. spezifisch in der Zelllinie L1236 exprimiert. Dazu gehören potenzielle Onkogene, wie PTP4A (Saha et al., 2001), RhoC (Clark et al., 2000) oder l-myc (Barrett et al., 1992), Cathepsine, die eine Rolle in der Tumorprogression haben (Lah und Kos, 1998) oder Gene mit einer Rolle in der Zelladhäsion, wie der Lamininrezeptor (Menard et al., 1998) oder CD44 (Goodison et al., 1999). Zudem zeigen etliche Signalwegsmoleküle, wie Dvl-1 (Boutros und Mlodzik, 1999) oder Nm23H1 (Aryee et al., 1996), sowie Transkriptionsfaktoren eine Hochregulation in der L1236-Zelllinie (Tabelle 3).

Gene (sortiert nach funktionellen Klassen)	Genfunktion/Kurzbeschreibung
<u>Tumor-bezogene Transkripte</u>	
Ferritin	Protein zur Speicherung von Eisen, häufig überexprimiert in Tumorzellen
CD23A	Niedrig affiner IgE-Rezeptor, hoch exprimiert in B-CLL
HNMP-1 (EMP-3)	Eventuelle Rolle in Proliferationskontrolle
PTP4A	Potenzielles Onkogen, Phosphatase
RhoC [#]	Mitglied der Ras-homologen Familie
Methallothionein 2A	Metallbindendes Protein, Rolle in Proliferation und Differenzierung, häufig induziert in Lymphomen
Prame	Allgemeines Tumorantigen
Neuron-spezifische Enolase 2	Publiziert als in HRS-Zellen exprimiert
Cathepsin B	Protease, involviert in Tumorprogression
Putative c-Myc-abhängige mRNA (RCL)	Vermutliche Rolle in Proliferation und c-myc induzierter Transformation
Überexprimiertes Brustkrebsprotein L34839 [#]	Protein-Protein-Interaktion
Serin Proteaseinhibitor, Kunitz-Typ, 2	Vermutliche Rolle in Tumorzellverbreitung und Metastasierung
Laminin-Rezeptor	Integrin, Rolle in Metastasierung
L-myc [#]	Mitglied der Myc-Proteinfamilie, Onkogen
CDK-Inhibitor 2A	Tumorsuppressorgen
FK506 bindendes Protein 4	Immunophilin, überexprimiert in Brustkrebs
Dipeptidylpeptidase IV (CD26)	Rolle in Zelladhäsion, induziert durch IL-13, überexprimiert in verschiedenen Krebserkrankungen, z. B. CD30 ⁺ -B-Zelllymphom
N-Myristoyltransferase 1	Überexprimiert in Krebsgewebe
Nm23H1	Kinase, überexprimiert in vielen Lymphomentitäten
<u>Transkriptionsfaktoren</u>	
ATF-5	Repressor der cAMP-induzierten Expression durch Binden an CRE-Elemente
Aktivierter RNA-Polymerase II Transkriptionskofaktor-4	Transkriptioneller Coaktivator, ubiquitär exprimiert
EBNA-2-Koaktivator (100kDa) [#]	Koaktiviert Genexpression, welche durch EBNA-2 reguliert wird
DSIPI	Delta-schlafinduzierendes Peptid, Leucin-Zipper-Protein
ATBF1	Transkriptionsfaktor mit Homeodomänen und Zinkfinger Motiven, involviert in Neurogenese
L-myc [#]	Mitglied der c-Myc-Proteinfamilie
p21 ^{SNFT}	Potenzieller Repressor der AP-1-Funktion durch Dimerisierung mit JUN-Proteinen
Jun-B	Leucin-Zipper-Protein, aktiv als Hetero- oder Homodimer
<u>Kinasen und Phosphatasen</u>	
IRAK-1	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase, aktiv in IL-1, IL-18 und Toll-like-Rezeptorsignalwegen
PTP4A	Potenziell onkogene Phosphatase

Ergebnisse

Nm23H1	Kinase, überexprimiert in vielen Lymphomentitäten
CDK2	Progression von G1- zur S Phase
<u>Rezeptoren</u>	
CD23A	Niedrig affiner IgE-Rezeptor, hoch exprimiert in B-CLL
HNMP-1 (EMP-3)	Eventuelle Funktion in Proliferationskontrolle
CCR7	Chemokinrezeptor für ELC, DLC, Exodus2 oder TCA4
<u>Signalmoleküle</u>	
TRAF1 [#]	Überexpression dieses Proteins führt zur Apoptose
Quiescin	Induziert bei Wechsel von Proliferationsstatus zu ruhendem Status
Guanidinnukleotidbindendes Protein	Ubiquitär exprimierte Gammauntereinheit von G-Proteinen
Gamma-5	
Dvl-1	Mediiert wnt-Signalweg über Beta-Catenin
FK506 bindendes Protein-4	Immunophilin, interagiert mit IRF-4, inhibiert die transkriptionelle Aktivität
CDK Inhibitor 2A	Tumorsuppressorgen
Rab13	Mitglied der RAS-Onkogen-Familie
Bax Inhibitor 1	Supprimiert Apoptose induziert durch Bax
<u>Adhäsion</u>	
Galectin 1	Involviert in Modulierung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen
Laminin-Rezeptor	Integrin, Rolle in Metastasierung
Dipeptidylpeptidase IV (CD26)	Rolle in Zelladhäsion, induziert durch IL-13, überexprimiert in verschiedenen Krebserkrankungen, z.B. CD30 ⁺ -B-Zelllymphom
CD44	Stimulation von CD44 verstärkt die LFA-1-vermittelte Adhäsion von Krebszellen zu Endothelzellen und induziert die Expression von c-Met, bekannt dafür, in HRS-Zellen exprimiert zu sein
<u>Chemokine, Zytokine</u>	
TARC	T-Lymphozytenanziehung
TNF-Familienmitglied-2	Tumornekrosefaktor, induziert Apoptose oder Proliferation, abhängig von Zielzelle
<u>Interferon-induzierte Transkripte</u>	
Interferon-induziertes 15-kd-Protein	Funktion unbekannt
Komplementkomponente C4A	Esterase in der Komplementkaskade, hochreguliert durch Interferon-gamma
Proteasomaktivator	Positiver Effektor des 20S Proteasoms, induzierbar durch IFN-gamma und andere Zytokine
Untereinheit-2, hPA28	
Interferon-induzierbares	Involviert in der Weitergabe antiproliferativer Signale
Transmembranprotein-1	
Interferon-induzierter	Aktiviert Transkription in Antwort auf Interferon-alpha
Transkriptionsfaktor 3, γ	
<u>Transkripte, für die eine hohe Expression in HRS-Zellen bereits bekannt war</u>	
Fascin	Dendritischer Zellmarker
TARC	T-Lymphozytenanziehung
Topoisomerase-II-alpha	Expression assoziiert mit Proliferation
TNF-Superfamilie Mitglied 2	TNF-Superfamilie-Mitglied, induziert Apoptose oder Proliferation,

	abhängig von Zielzelle
CD44	Stimulation durch CD44 verstärkt die LFA-1-medierte Adhäsion von Krebszellen zu Endothelialzellen, Induktion von c-Met
Neuronspezifische Enolase 2	Bekannt für die Expression in HRS-Zellen
Cathepsin B	Protease, involviert in Tumorprogression

Tabelle 3: Transkripte mit einer erhöhten Expression in der cHL-Zelllinie L1236.

In dieser Tabelle ist eine Auswahl der differentiell hochregulierten Gene dargestellt (46 aus 92 Genen). Die Gene wurden in funktionelle Klassen mit Kurzbeschreibung ihrer Funktion eingeteilt, wobei manche Gene mehreren Klassen zugeteilt wurden.

Diese Gene werden durch Tags repräsentiert, die in der Unigene-Datenbank mehr als ein Gen identifizieren. Für einige dieser Gene wurde die Tag-Gen-Zuordnung durch RT-PCR-Ergebnisse unterstützt (RhoC, l-myc) (Abbildung 4).

3.2.4 Verifizierung der Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR

Zur Untersuchung der Verlässlichkeit der SAGE-Ergebnisse wurde für einige der mittels SAGE als heraufreguliert identifizierten Gene eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Zwölf der in Tabelle 3 aufgeführten Gene wurden aufgrund ihrer potenziellen Rolle für die Pathogenese des cHL für weitere Analysen ausgesucht (Abbildungen 4 und 5 und Tabelle 4): PRAME, ein Tumorantigen (Ikeda et al., 1997); PTP4A, eine putativ Onkogen-wirkende Phosphatase (Saha et al., 2001); p21^{SNFT}, ein Protein, das mit Mitgliedern der Jun-Proteinfamilie dimerisieren kann und damit die transkriptionelle Aktivität von AP-1 hemmt (Iacobelli et al., 2000); RhoC, ein Mitglied der Ras-homologen Proteinfamilie, das eine Funktion in der Transformation und in der Tumorprogression aufweist (Clark et al., 2000; Horiuchi et al., 2003); ATF-5, ein Transkriptionsfaktor der ATF/CREB-Proteinfamilie (Peters et al., 2001); ATBF-1, ein Transkriptionsfaktor, der als DNA-bindende Domänen Zinkfinger-Strukturen sowie Homeodomänen aufweist (Morinaga et al., 1991); L-myc, ein Transkriptionsfaktor der Myc-Proteinfamilie (Barrett et al., 1992); IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1 (IRAK-1), die in den Signalwegen von IL-1, IL-18 und der Toll-ähnlichen Rezeptoren involviert ist (Li et al., 2001); Hnmp-1, ein Transmembranprotein mit potenzieller Rezeptorfunktion (Bolin et al., 1997); Px19-Homolog, ein Transkriptionsfaktor mit unbekannter Funktion (Guzman-Rojas et al., 2000); FK506-bindendes-Protein-4, ein Immunophilin, welches an den immunsupprimierenden Wirkstoff FK506 bindet und ubiquitär exprimiert ist (Peattie et al., 1992) und Jun-B, ein Transkriptionsfaktor der basischen Leucin-Zipper-Proteinfamilie (Shaulian und Karin, 2001).

Um gleiche Mengen an cDNA-Molekülen in die semiquantitative RT-PCR einzusetzen, wurde cDNA der Zelllinie L1236 und der KZ-B-Zellen mit quantitativer Echtzeit-RT-PCR (Technologie: Taqman) auf die Expression des β -Aktin-Gens normalisiert (Daten nicht gezeigt). Das Gen β -Aktin wurde gewählt, da die SAGE-Profile eine gleich hohe Expression dieses Gens in den beiden untersuchten Zellpopulationen gezeigt hatten (Abbildung 4). Um eine semiquantitative Einschätzung des Unterschieds im Expressionsniveau der Gene zu ermöglichen, wurde die normalisierte cDNA in vier Konzentrationen (Pur, 1:3, 1:9, 1:27 Verdünnungen) in die RT-PCR eingesetzt (Abbildung 4). Für alle untersuchten zwölf Transkripte konnte die differenzielle Expression, die durch SAGE identifiziert wurde, mittels RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 4).

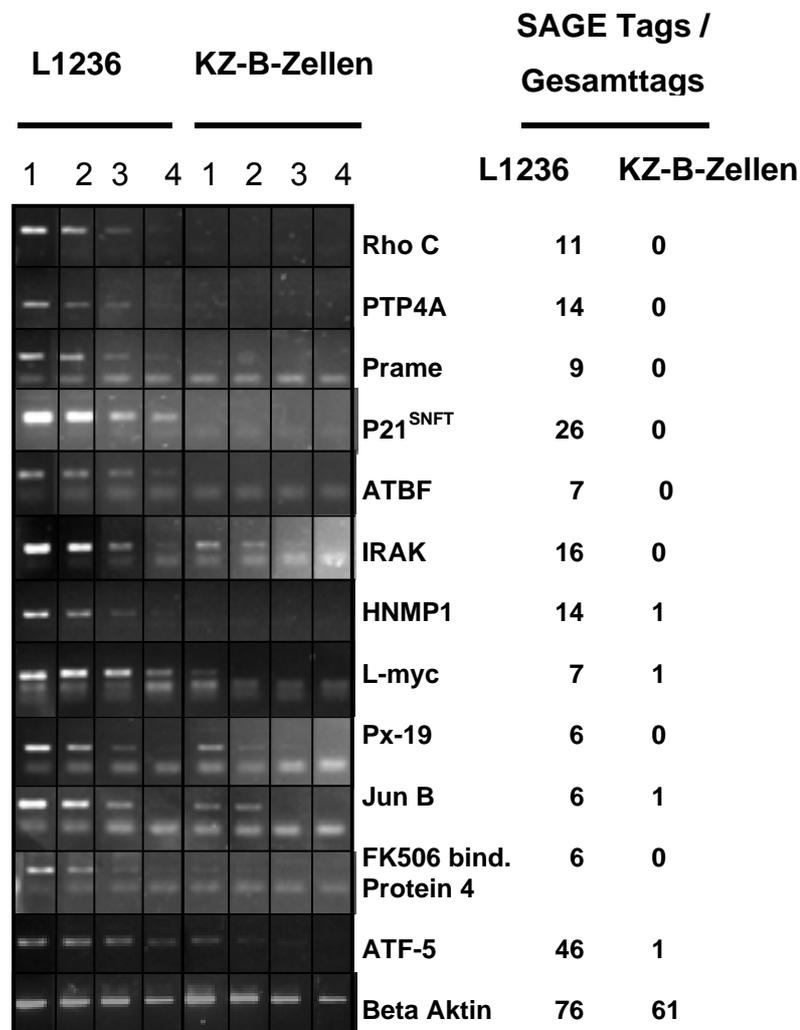


Abbildung 4: Semiquantitative RT-PCR Analyse von zwölf Genen in Zelllinie L1236 und KZ-B-Zellen

cDNA der Zelllinie L1236 und der KZ-B-Zellen wurde durch quantitative PCR auf die Expression von β -Aktin normalisiert. Gleiche Mengen an cDNA (1 = Pur, 2 = 1 : 3, 3 = 1 : 9 oder 4 = 1 : 27 verdünnt) der L1236 (linke Bildseite) und der KZ-B-Zellen (rechte Bildseite) wurden in die Reaktionen eingesetzt. Es wurden so viele PCR-Zyklen durchgeführt, bis eine sehr schwache Bande bei der geringsten DNA-Menge (4 = 1 : 27 verdünnt) für die Zelllinie L1236 auf dem Agarosegel zu sehen war. Durch den Vergleich der Bandenintensitäten der L1236 und der KZ-B-Zellen kann der Unterschied in der Expression abgeschätzt werden. Die RT-PCR-Analyse für β -Aktin ist in der untersten Reihe dargestellt und zeigt die gleiche Expressionsstärke dieses Gens in beiden Zellpopulationen. In einigen Ansätzen kam es zur Bildung von Oligonukleotiddimeren. Diese repräsentieren die unteren Banden (wenn vorhanden). Die korrespondierenden SAGE-Ergebnisse (Tagzahlen) sind rechts von den RT-PCR Ergebnissen aufgeführt.

Die Tendenz der differentiellen Expression bestätigte sich für alle analysierten Transkripte. Einige kleine Unterschiede in der Differenz der Expression konnten jedoch beobachtet werden. So für Hnmp-1, ATF-5 und Px-19 Homolog. Für Hnmp-1 ergab sich eine leicht größere Differenz der Expression in der RT-PCR-Analyse (Faktor höher als 1 : 27) als in der SAGE-Analyse (14 : 1). Für die Gene Px-19 Homolog und ATF-5 sahen die mittels RT-PCR ermittelten Werte (1 : 3 und 1 : 27) etwas schwächer aus, als die mittels SAGE ermittelten Daten (0 : 6 und 1 : 46). Diese Unterschiede können durch die niedrige Expression dieser drei Gene (zumindest in KZ-B-Zellen) verursacht worden sein, da sie jeweils nur mit einer sehr kleinen Tagzahl in dem Profil der KZ-B-Zellen vertreten sind. In solchen Fällen ist die Transkriptionsstärke, die SAGE für diese Gene ermittelt, nicht so verlässlich wie für Gene, die mit einer höheren Tagzahl pro Profil vertreten sind. Zusammenfassend, konnte für zwölf Gene die differentielle Expression, die mittels SAGE identifiziert wurden, durch eine RT-PCR Analyse verifiziert werden.

Im Verlauf der hier vorgestellte SAGE-Arbeiten wurden Genchip-Daten von vier cHL-Zelllinien generiert, die in Punkt 3.3 vorgestellt werden. Weiterhin standen Genchipdaten von normalen B-Zellpopulationen unter anderem KZ-B-Zellen zur Verfügung (siehe Punkt 3.3). Das Vorliegen dieser Daten ermöglicht es theoretisch die mittels SAGE-gewonnenen Daten an den korrespondierenden Genchip-Daten zu verifizieren. Es ist jedoch grundsätzlich schwierig, die Expressionsdaten der SAGE-Methode mit denen einer Genchip-Analyse zu vergleichen. Während SAGE-Ergebnisse quantitative Expressionsverhältnisse darstellen, sind Genchip-Ergebnisse normalisierte Fluoreszenzwerte. Zum einen ist die Fluoreszenz abhängig von der Bindungsstärke der Sonde (wird durch die Verwendung mehrerer Sonden pro Gen versucht auszugleichen), zum anderen besitzt der Detektor nur einen gewissen Rahmen an schwacher bis

starker Fluoreszenz, die er messen kann und der nicht vollkommen linear ist. Darüberhinaus gibt es bisher keine Software, welche eine Vernetzung von SAGE-Daten und Genchip-Daten erlauben würde, sodass ein Vergleich ganzer Profile zur Zeit nicht möglich ist.

Für die zwölf mit RT-PCR analysierten Transkripte wurde jedoch ein Vergleich mit den Genchip-Daten vorgenommen, auch wenn die untersuchten Zellpopulationen nicht vollkommen identisch sind. In der SAGE-Analyse wurde ein Gemisch aus ZB von acht Donoren untersucht, in der Genchip-Analyse fünf Einzelpopulationen von ZB. Dennoch bestätigten sich für 10 der 12 oben beschriebenen Gene eine Heraufregulation in der L1236 gegenüber ZB (Daten nicht gezeigt); zwei der Transkripte (Px19 Homolog und p21^{SNFT}) waren nicht auf dem U95A-Chip vertreten. Somit lässt sich sagen, daß SAGE- und Genchip-Daten, zumindest in Bezug auf die hier genannten 12 Gene, gut korrelieren.

3.2.5 RT-PCR Daten für heraufregulierte Gene in drei weiteren cHL-Zelllinien

Nach der Verifizierung der SAGE-Ergebnisse über die differenzielle Expression von zwölf Genen stellte sich die Frage, ob diese Gene nur in der Zelllinie L1236 oder generell im cHL heraufreguliert sind. Um dieses zu klären, wurden dieselben zwölf Gene mittels semiquantitativer RT-PCR auf ihre Expression in drei weiteren cHL-Zelllinien (L428, KMH2, HDLM2) hin untersucht. Die RT-PCR-Analyse zeigt, dass die zwölf Gene in allen vier cHL-Zelllinien (teilweise in unterschiedlichem Maße) exprimiert werden. In den drei zusätzlich analysierten Zelllinien zeigte sich eine ähnlich hohe oder sogar höhere Expression der zwölf Gene als in der Zelllinie L1236, mit Ausnahme von PTP4A und I-myc (siehe Legende zu Abbildung 5) (Abbildung 5). Hierdurch wird gezeigt, dass die mittels SAGE identifizierten differenziell ausgeprägten Gene zum Großteil Transkripte repräsentieren, die generell in cHL-Zelllinien im Vergleich zu KZ-B-Zellen heraufreguliert sind.

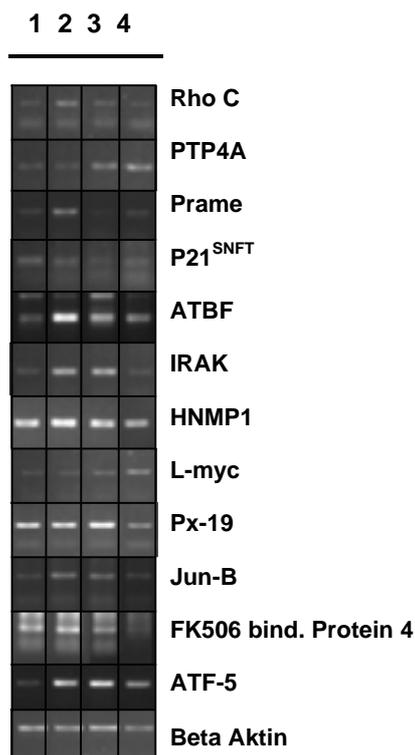


Abbildung 5: Semiquantitative RT-PCR-Analyse für zwölf Gene in vier HL-Zelllinien (1 = L428, 2 = KMH2, 3 = HDLM2, 4 = L1236).

cDNA aller vier HL-Zelllinien wurde durch quantitative PCR auf die Expression von β -Aktin normalisiert. RT-PCR-Ergebnisse für β -Aktin sind unten in der Figur dargestellt und zeigen eine gleich starke Expression von β -Aktin in den verwendeten cDNA-Populationen. Eine limitierte Anzahl an RT-PCR-Zyklen wurde durchgeführt, sodass Unterschiede in der Bandenintensität im Agarosegel, bzw. Unterschiede in der Expressionsstärke erkennbar blieben. Für jede RT-PCR sind die Ergebnisse dargestellt, die für jede Zelllinie eine Produktbande lieferten. Die Zyklenzahlen variierten von 28 bis 35. In einigen RT-PCR-Ansätzen sind Oligonukleotiddimere sichtbar und repräsentieren die untere (kleinere) Bande. Für zwei der Transkripte, PTP4A und L-myc, zeigt die HL-Zelllinie L1236 die höchste Expression. Somit kann für diese cDNAs nicht ausgesagt werden, ob die Expression dieser Transkripte in den drei weiteren cHL-Zelllinien stärker als in KZ-B-Zellen ist.

3.2.6 Expression der heraufregulierten Gene in primären cHL-Fällen

Da die RT-PCR-Ergebnisse aufzeigen, dass die zwölf Gene generell in cHL-Zelllinien ausgeprägt werden, sollten Verifizierungsstudien zeigen, ob auch Expression in primären HRS-Zellen nachgewiesen werden kann. Lediglich für RhoC und L-myc standen kommerziell-erhältliche Antikörper zur Verfügung. Da immunhistochemische Färbungen mit diesen Antikörpern jedoch nicht auswertbar waren, wurde auch in dieser Analyse RT-PCR angewendet, um die Expression einzelner Gene in HRS-Zellen zu untersuchen. Diese Arbeiten wurden von V. Distler (Institut für Pathologie, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Da diese Technik aufwändig ist, wurden nur drei der zwölf oben untersuchten Gene in primären HRS-Zellen analysiert: RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT}. Ca. 2000 mikrodissizierte einzelne HRS-Zellen von vier cHL-Fällen wurden jeweils in Gruppen zu 50 Zellen mittels RT-PCR analysiert. Je drei Gruppen zu 50 HRS-Zellen wurden pro Gen und Fall untersucht. Parallel wurden Gruppen von 50 Nicht-HRS-Zellen (hauptsächlich Lymphozyten) von denselben Gewebeschnitten bzw. 50 ZB aus tonsillären Gewebeschnitten analysiert. Für jedes der untersuchten Gene lieferten mindestens zwei der drei untersuchten Zellgruppen ein RT-PCR-Produkt, während

nahezu alle Zellgruppen der Nicht-HRS-Zellen aus den Gewebeschnitten der cHL-Fälle sowie die tonsillären ZB kein RT-PCR-Produkt zeigten (Tabelle 4). Somit konnten wir für jedes der drei analysierten Gene (RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT}) eine spezifische Expression in primären HRS-Zellen nachweisen.

Proben	Positive Proben/ Analysierte Proben		
	RhoC	ATBF1	p21 ^{SNFT}
HRS-Zellen			
Fall 1	3/3	3/3	3/3
Fall 2	3/3	3/3	2/3
Fall 3	3/3	3/3	3/3
Fall 4	3/3	3/3	2/3
Kontrollen			
KMH2-Zellen	6/6	5/5	5/6
Nicht-HRS-Zellen	3/19	1/12	0/12
Fälle 1-4			
KZ-B-Zellen	0/6	0/6	0/6
Pufferkontrollen	0/14	0/12	1/12
Fälle 1-4			

Tabelle 4: RT-PCR-Analyse von primären HRS-Zellen für die Gene: RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT}.

Gruppen von 50 HRS-Zellen bzw. Nicht-HRS-Zellen (kleine Nicht-HRS-Zellen aus denselben Gewebeschnitten) wurden mittels RT-PCR analysiert. Als zusätzliche Kontrolle wurden Gruppen von 50 ZB analysiert. Dass die RNA-Qualität der tonsillären Gewebeschnitte eine erfolgreiche RT-PCR erlaubte, wurde mit einer RT-PCR für CD52 überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Pufferkontrollen (Kontaminationskontrollen) sind PCR-Reaktionen, die Puffer, jedoch keine Zellen enthielten. Als Positivkontrolle dienten 10 KMH2-Zellen (FACS-sortiert). Die wenigen positiven Nicht-HRS-Zellen könnten durch eine zelluläre Kontamination der Zellgruppen mit Fragmenten von HRS-Zellen oder durch reale Expression dieser Gene in einigen Nicht-HRS-Zellen herrühren.

3.3 Chip-basierte Genexpressionsanalysen von cHL-Zelllinien, LCL, primären B-Zell-NHL und B-Zell-NHL-Zelllinien

Um die Genexpression von cHL-Zelllinien, LCL, primärer B-Zell-NHL und B-Zell-NHL-Zelllinien zu analysieren, wurden U95A-Genchips verwendet, auf denen ca. 12.000 cDNAs (ca. 9.000 Gene) vertreten sind (siehe Material und Methoden).

3.3.1 Unsupervised Clusteringanalyse

In dieser Chip-basierten Genexpressionsstudie wurden vier cHL-Zelllinien untersucht. Während die Zelllinien L1236, L428 und KMH2 von B-Lymphozyten abstammen, zeigt die HDLM2 eine Herkunft von T-Zellen. Als Vergleichsdaten wurden Profile von normalen B-Lymphozyten (Naïve B-Zellen, KZ-B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen) sowie einer Reihe von B-Zell-NHL (BL, FL, DLCL und B-CLL) und Zelllinien (Lymphoblastoide Zelllinien (LCL), BL-Zelllinien und DLCL-Zelllinien) verwendet. Diese Vergleichsprofile wurden von U. Klein (Columbia University, New York) zur Verfügung gestellt. Die Hybridisierung der cRNA der cHL-Zelllinien wurde von R. Küppers (Universität zu Köln, Köln) und U. Klein vorgenommen. Um die Verwandtschaft der cHL-Zelllinien untereinander sowie die zu den anderen normalen und malignen B-Zellpopulationen bezüglich der Genexpression zu untersuchen, wurde eine „unsupervised“ Clustering-Analyse durchgeführt (siehe Material und Methoden). Diese Analyse teilte alle Zellpopulationen in zwei Hauptgruppen ein. Die eine Gruppe umfasste alle normalen B-Zellpopulationen und die Tumorbiopsien, die andere alle Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Um die Verwandtschaftsbeziehungen der vier cHL-, fünf LCL-, sechs BL- und acht DLCL-Zelllinien zu analysieren, wurde mit diesen Zellpopulationen eine weitere unsupervised Clusteringanalyse durchgeführt. Die verschiedenen Zelllinien wurden in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die eine umfasste alle cHL-, alle LCL- und zwei der DLCL-Zelllinien (ABC-Typ, siehe Einleitung), die andere, untereinander gemischt, die BL- und die restlichen sechs DLCL-Zelllinien (vier davon als KZ-Typ beschrieben; siehe Einleitung) (Abbildung 6).

Der EBV-Status der Zelllinien scheint interessanterweise keinen erkennbaren Einfluss auf das Einteilen der Zelllinien zu nehmen, da EBV⁺-LCL nicht zusammen mit EBV⁺-BL, sondern mit EBV⁻-cHL-Zelllinien eingegliedert werden.

Um die Frage zu klären, welche Gene zwischen den beiden Hauptgruppen differenziell exprimiert sind, wurde eine supervised Clustering-Analyse mit der Genes@Work-Software durchgeführt. Insgesamt wurden 37 differenziell exprimierte Gene identifiziert (Abbildung 6). Die meisten dieser Gene zeigten sich überexprimiert in der Gruppe der LCL, cHL, ABC-DLCL. Einige dieser heraufregulierten Gene sind Bestandteil einer „in-vitro aktivierten B-Zellsignatur“ (Alizadeh et al., 2000; Davis et al., 2001), nämlich Cyclin D2, CD44, IRF-4/MUM-1, CCR7, I κ B- α , CLARP (c-Flip), TNF und aktivierte RNA-

Polymerase II transkriptioneller Cofaktor-4. Hingegen waren in der Gruppe der BL und der KZ-Typ DLCL nur wenige Gene heraufreguliert, so z.B. CD10. Ein Befund, der mit

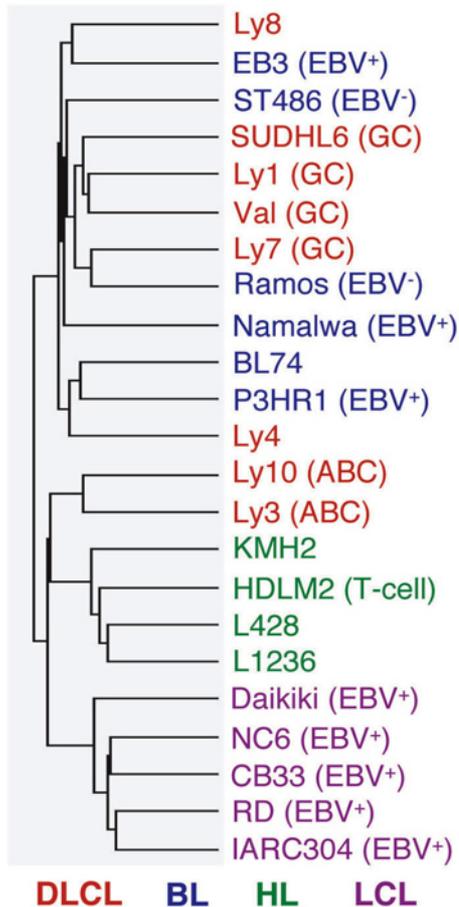


Abbildung 6: Das Genexpressionsprofil der cHL-Zelllinien ist ähnlich zu dem der LCLs und der ABC-Typ DLCL.

Das Dendrogramm zeigt das hierarchische Clustering, basierend auf der „average-linkage“-Methode (siehe Material und Methoden), der Genexpression von insgesamt 23 B-Zelllinien. Das Genexpressionsprofil der cHL-Zelllinien ist am ähnlichsten zu dem der LCLs und der ABC-Typ-DLCL. Die Zelllinien sind farblich, abhängig vom Zelltyp, markiert: DLCL = rot; BL = blau, cHL = grün, LCL = lila. Soweit bekannt ist der EBV-Status in Klammern hinter dem Namen der Zelllinie aufgeführt. Auch der Subtyp der DLCL-Zelllinien ist soweit bekannt in Klammern hinter dem Namen der Zelllinie aufgeführt (GC = KZ-Typ). Die dem Dendrogramm zugrunde liegende Matrix ist im Anhang (Figur Anhang 1) dargestellt.

der Abstammung dieser beiden Lymphomentitäten von KZ-B-Zellen in Einklang steht. Wenn die Kriterien für die supervised Clusteringanalyse etwas relaxiert wurden, konnte auch eine differenzielle Expression von BCL-2 und BCL-6 identifiziert werden (Abbildung 7 unterer Abschnitt). Eine niedrige Expression von BCL-2 und eine hohe Expression von BCL-6, einem Keimzentrumsmarker, in den BL und KZ-DLCL stimmen mit dem KZ-B-Zellphänotyp dieser Lymphomentitäten überein.

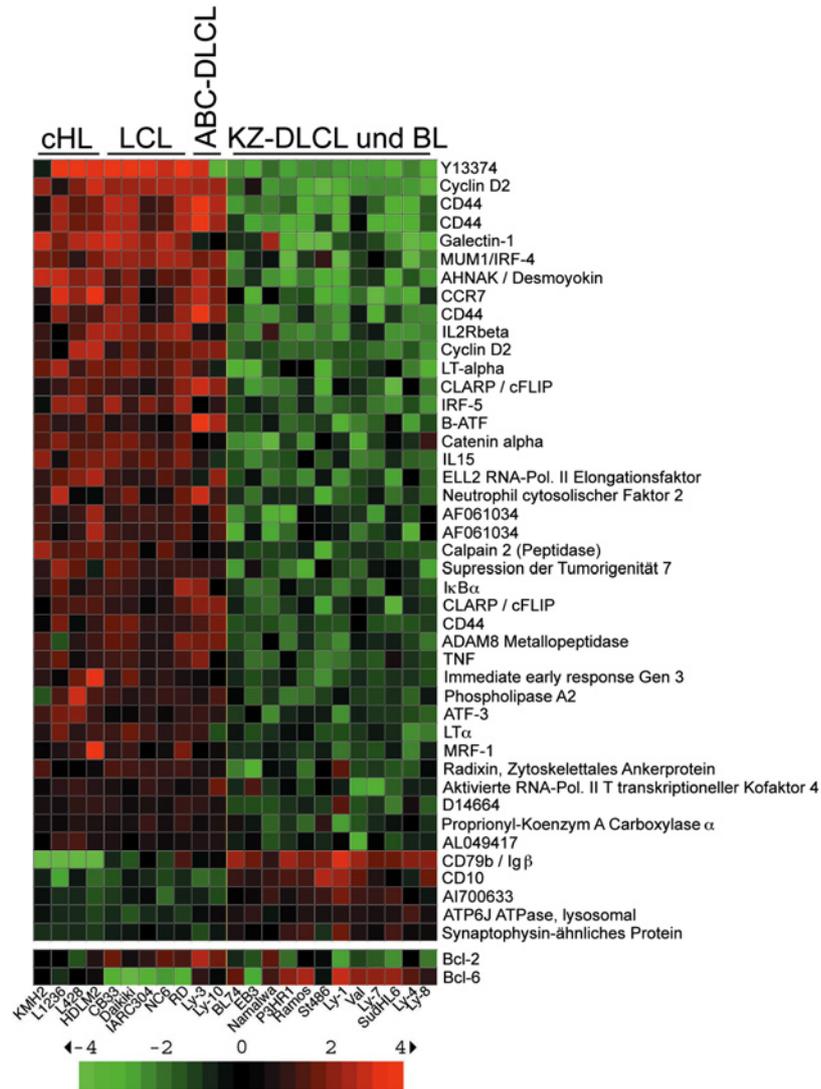


Abbildung 7: Identifizierung der Gene, die im Vergleich von HL, LCL, ABC-DLCL versus KZ-DLCL und BL differenziell exprimiert sind.

Die Genexpressionsprofile von vier HL-Zelllinien, fünf LCL und zwei ABC-DLCL, die in der Clusteringanalyse in einem Hauptzweig zusammenlagen, wurden mit Profilen von sechs BL und sechs DLCL (nicht ABC-Typ) verglichen. Diese supervised Clusteringanalyse wurde mittels der Genes@Work-Software durchgeführt. Die Spalten repräsentieren verschiedene Zelllinien, die Reihen repräsentieren individuelle Gene. Die Farbgebung innerhalb einer Reihe zeigt den Expressionsunterschied relativ zum Mittelwert der gesamten Zellpopulationen an. Die Expressionswerte sind quantitativ (nach Signifikanz) dargestellt, entsprechend dem Farbbalken unterhalb der Figur, der den Unterschied im ζ -Wert (Expressionswert/Mittelwert der Expression) zum Mittelwert widerspiegelt. Gene sind nach dem z-Faktor (Mittelwert des Unterschieds in der Expression zwischen Phänotyp- und Kontrollgruppe des bestimmten Gens) aufgelistet. Der „Support-Value“ für die supervised Clusteringanalyse wurde als $n = n_0 - 1$ gewählt für $n_0 =$ die Anzahl der Zellen in einem gegebenen Phänotypset, wobei eine nicht geclusterte Probe pro Muster im Phänotyp-Set erlaubt war. Die unten aufgeführten Expressionsdaten für BCL2 und BCL6 wurden mit weniger stringenten Kriterien in der supervised Analyse identifiziert und sind aus diesem Grund separat angezeigt. Die Gennamen und die Namen der Zelllinien sind angegeben.

Ein weiteres Ergebnis der unsupervised Clusteringanalyse zeigt, dass sich die cHL-Zelllinien als distinkte Einheit von den anderen B-Zelllinien abgrenzen. Im Dendrogramm (Abbildung 7) ist dies daran zu erkennen, dass alle cHL-Zelllinien zusammen in einem Abzweig liegen. Diese gleichartige Genexpression scheint unabhängig von der zellulären Herkunft der vier cHL-Zelllinien zu sein, da drei eine B-Zellherkunft aufweisen und eine von einem T-Lymphozyten abstammt.

3.3.2 Identifizierung von differentiell in HRS-Zellen ausgeprägten Genen

Um Gene zu identifizieren, die spezifisch in HRS-Zellen herauf- oder herunterreguliert sind, wurden die Genexpressionsprofile der vier cHL-Zelllinien mit denen der normalen (Naive-, KZ- und Gedächtnis-B-Zellen), mit LCL und mit malignen B-Zellpopulationen (FL, BL, DLCL, B-CLL) verglichen. Durch eine supervised Clusteringanalyse wurden 27 Gene als spezifisch und konsistent in den cHL-Zelllinien heraufreguliert identifiziert (Abbildung 8). 45 Gene zeigten eine spezifische und konsistente Herunterregulation in den cHL-Zelllinien.

Drei der in cHL-Zelllinien heraufregulierten Gene sind nicht weiter beschrieben bzw. nur als cDNAs eingetragen. Die Funktion dieser drei Gene ist unbekannt. Unter den verbleibenden 24 beschriebenen heraufregulierten Genen, sind Gene, die für ihre spezifische Expression in HRS-Zellen bekannt sind, so z.B. das Aktin-bündelnde Protein Fascin oder das Chemokin, TARC (Pinkus et al., 1997; van den Berg et al., 1999). Auch die Expression des TNF-Rezeptor-Familienmitglieds RANK und der Metalloproteinase TIMP1 ist bereits publiziert (Fiumara et al., 2001; Oelmann et al., 2002). Der HRS-Zellmarker CD30, ebenfalls ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, wurde nicht unter den HL-Zelllinien-spezifischen Genen identifiziert. Der Grund hierfür liegt in der Ausprägung von CD30 in LCL und einer niedrigen Expression in einigen der B-Zell-NHL.

Keines der verbleibenden 20 spezifisch in cHL-Zelllinien heraufregulierten Transkripte wurde bisher als in HRS-Zellen exprimiert beschrieben. Unter diesen 20 Genen befinden sich Transkriptionsfaktoren (GATA3, ABF1, Nrf3, Ear3), das genomisch geprägte ("imprinted") Gen IPL, das Tumorantigen PRAME, die Tyrosinkinase Fer, zwei Gene, die in den zellulären Wachstumsstop involviert sind (Hep27, Gas1), der IL1-R2, welcher zwar IL1 bindet, jedoch kein Signal an die Zelle weiterleitet, Sarcolectin, involviert in DNA-Synthese, und die GTPase Rab13 (Abbildung 8).

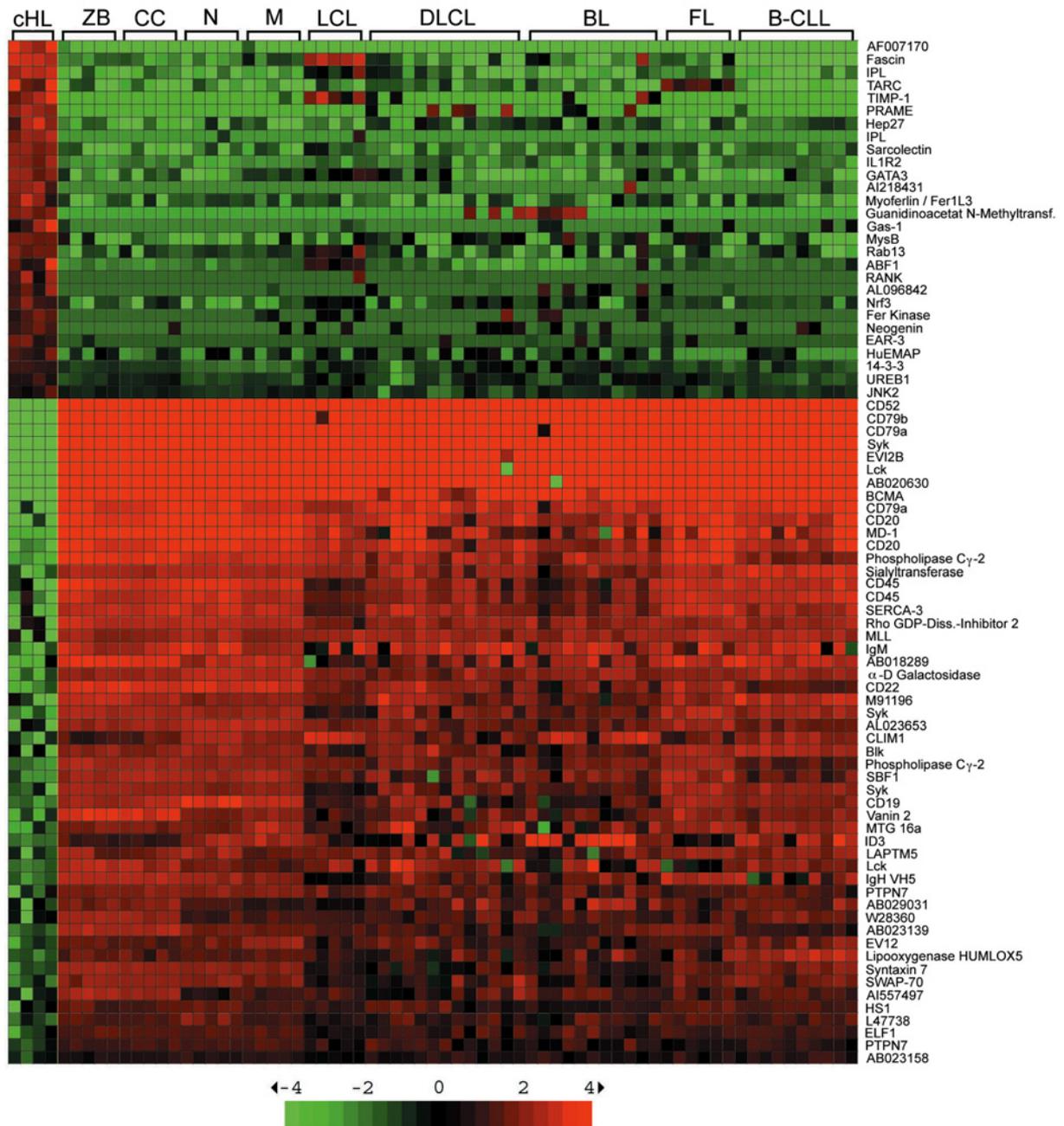


Abbildung 8: Identifizierung von HRS-Zell-spezifisch ausgeprägten Genen.

Die supervised Clusteringanalyse wurde mittels der Genes@Work-Software durchgeführt. Die Genexpressionprofile von vier cHL-Zelllinien wurden mit denen von normalen B-Lymphozyten (Naïve B-Zellen (Anzahl der Proben: 5), KZ-B-Zellen (10), Gedächtnis-B-Zellen (5)) sowie einer Reihe von primären B-Zell-NHL (BL (4), FL (6), DLCL (7), B-CLL (10)) und Zelllinien (LCL (5), BL (8), DLCL (7)) verglichen. Die Matrix und die Reihenfolge der Gene wurde wie in Abbildung 7 beschrieben erstellt. Der „Support-Value“ für die supervised Clusteringanalyse wurde als $n = n_0$ gewählt für $n_0 =$ die Anzahl der Zellen in einem gegebenen Phänotypset, wobei keine nicht geclusterte Probe pro Muster im Phänotyp-Set erlaubt war. Gennamen sind angegeben. 27 verschiedene Gene sind signifikant in den HL-Zelllinien heraufreguliert, 45 Transkripte zeigen Herunterregulation. (Eines der heraufregulierten (IPL) und sieben der herunterregulierten Gene (Ig α , Syk, Lck, CD20, PLC γ 2, CD45, PTPN7) sind mit zwei Sondengruppen auf dem U95A-Chip vertreten, das signifikantere Ergebnis ist in der Matrix dargestellt). CC = Zentrozyten

Die 45 in den cHL-Zelllinien herunterregulierten Transkripte umfassen viele B-Zelllinien-spezifische Gene. Diese Daten werden unter Punkt 3.4 zusammen mit den korrespondierenden SAGE-Daten dargestellt. Zudem finden sich zwei Phosphatasen (SBF1 und PTPN7) sowie einige Gene, die in die Regulation des Zytoskeletts oder der Zellwanderung involviert sind (HSRHO2, MSF, Vanin2) unter den herunterregulierten Transkripten. Interessant ist auch die verminderte Expression von Id3, ein Mitglied der Id-Proteinfamilie, dessen Mitglieder bHLH Transkriptionsfaktoren wie E2A hemmen.

3.3.3 Proteinexpression in cHL-Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die Heraufregulation in cHL-Zelllinien in einer erhöhten Proteinmenge resultiert, wurde dieses für einige Proteine überprüft. ABF-1, Neogenin, Gas1 und GATA-3 wurden mittels Immunoblot, IL-1R2 mittels FACS analysiert (Abbildung 9).

In der Immunoblot-Analyse wurden vier cHL-, zwei BL- und die Jurkat-T-Zelllinie (T-Zelllymphom) untersucht. Das ABF-1-Protein wird in drei der vier cHL-Zelllinien (L1236, L428, KMH2) gebildet, nicht jedoch in der HDLM2-Zelllinie. Zwei BL-Zelllinien sowie die Jurkat-Zelllinie zeigen keine Expression des ABF-1-Proteins. Das N-cam-Familienmitglied Neogenin ist extrem hoch in drei der cHL-Zelllinien (L1236, L428, KMH2) exprimiert. Geringere Proteinmengen sind in der HDLM2-, den zwei BL- und der Jurkat-Zelllinie nachweisbar. Für Gas-1 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Proteinmengen der untersuchten Zellpopulationen, sodass festzustellen ist, dass für dieses Gen die erhöhte mRNA-Menge nicht zu einer markanten Erhöhung der Proteinmenge führt. Der T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor GATA3 wird wie erwartet in der Jurkat-Zelllinie als Protein exprimiert. Er ist jedoch auch deutlich in den cHL-Zelllinien L1236, L428 und KMH2 zu erkennen. Die zwei BL-Zelllinien und seltsamerweise die HDLM2-Zelllinie, die von einer T-Zelle abstammt, zeigen hingegen keine Expression des GATA3 Proteins. Das Fehlen von GATA3 in der HDLM2 Zelllinie steht jedoch in Einklang mit früheren Ergebnissen, die das Fehlen von bestimmten T-Zellmarkern in cHL-Fällen, die von T-Zellen abstammen, beschreiben (Seitz et al., 2000; Willenbrock et al., 2002). Die FACS-Analyse für die Proteinexpression von IL-1R2 zeigte nur in der Zelllinie L1236 ein positives Ergebnis, obwohl hohe Transkriptionswerte für alle vier HL-Zelllinien ermittelt wurden. Insgesamt konnte für drei der fünf analysierten Gene eine stark differentiell ausgeprägte Proteinexpression in cHL-Zelllinien beobachtet werden.

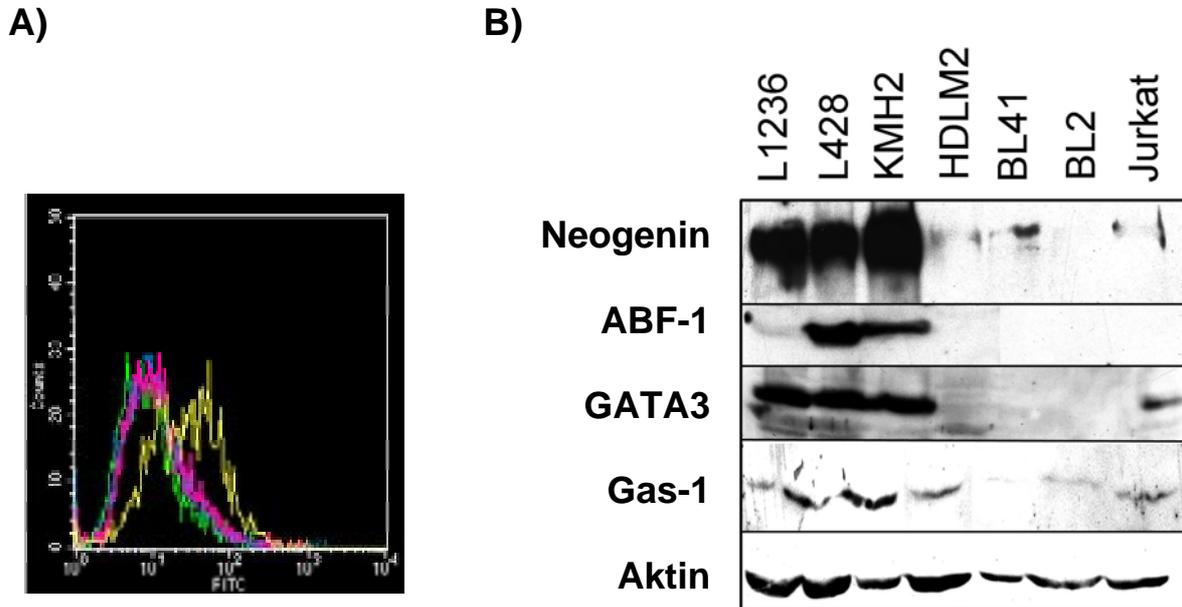


Abbildung 9: FACS- (A) und Immunoblotanalyse (B) der Expression cHL-spezifischer Marker

(A) Die HRS-Zellen wurden mit Anti-IL-1R2-Antikörper (bzw. Isotypenkontrolle) in 1 x PBS/0,05% BSA inkubiert, gewaschen und mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper gefärbt. Die Analyse wurde auf dem FACSCalibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Gezeigt sind nur die Ergebnisse für die Zelllinie L1236 (andere HL-Zelllinien zeigten keine Expression). Farben: grün = keine Färbung, pink = Isotypenkontrolle/anti-Maus IgG1 FITC, blau = anti-Maus IgG1 FITC, gelb = anti-IL-1RII/anti-Maus IgG1 FITC

(B) Der Immunoblot wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Menge des aufgetragenen Proteins wurde mit dem D_c Protein Assay (Bio-Rad) vermessen, gleiche Mengen/Laufspur wurden geladen. Es wurde mit verschiedenen Antikörpern inkubiert (Anti-Neogenin; Anti-Gas1; Anti-GATA-3, Anti-ABF-1 (Letzterer wurde von C. Murre zur Verfügung gestellt)).

3.3.4 RNA-Expression der HRS-Zell-spezifischen Gene in primären HL-Fällen

Um die Proteinexpression der heraufregulierten Gene in primären HRS-Zellen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen auf Paraffin-fixiertem und gefrorenem Gewebe durchgeführt. Kommerzielle Antikörper waren erhältlich für GATA3, ABF-1, EAR3, Neogenin, GAS1 oder IL-1R2. Keiner dieser Antikörper lieferte eine verlässliche immunhistochemische Färbung. Aus diesem Grund wurde die RT-PCR-Methode gewählt, um die Expression einzelner in der Genchip-Analyse als heraufreguliert identifizierter Gene in HRS-Zellen zu analysieren.

Für PRAME, IPL, FER, Rab13 und EAR3 wurden von V. Distler (Institut für Pathologie, Frankfurt am Main, Deutschland) RT-PCR-Analysen an primären HRS-Zellen durchgeführt. Einzelne mikrodisektierte HRS-Zellen von sieben HL-Fällen wurden jeweils in Gruppen (zu 25 oder 50 Zellen) mittels RT-PCR analysiert. Je drei Gruppen von HRS-Zellen wurden pro Gen und Fall untersucht. Parallel wurden Gruppen von Nicht-HRS-Zellen (hauptsächlich Lymphozyten) von denselben Gewebeschnitten analysiert. Für alle fünf analysierten Transkripte zeigten alle oder zumindest die Mehrheit der Ansätze ein positives RT-PCR-Ergebnis, d.h. Expression in primären HRS-Zellen (mit der Ausnahme von PRAME in den Fällen 4 und 6 sowie EAR3 in den Fällen 1 und 7). Es konnte kein Unterschied in der Expression zwischen EBV-positiven oder EBV-negativen Fällen beobachtet werden. Die Kontrollgruppen der Nicht-HRS-Zellen zeigten nahezu alle ein negatives Ergebnis, d.h. keine Expression (Tabelle 5). Somit konnte die Expression von fünf der in der Chip-Analyse identifizierten Gene in primären HRS-Zellen nachgewiesen werden. Drei der hier analysierten Gene (Rab13, Fer, IPL) zeigten zudem eine substantielle Expression in den L&H-Zellen der untersuchten LP-HL-Fälle. PRAME schien nur sehr niedrig in den zwei analysierten LP-HL-Fällen ausgeprägt zu werden. Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die These, dass die Ergebnisse der Genchip-Analyse der cHL-Zelllinien ein verlässliches Muster der Genexpression in primären HRS-Zellen widerspiegeln.

Ergebnisse

Fälle	Subtyp	EBV status	Positive Zellgruppen/analyisierte Zellgruppen				
			PRAME	IPL	FER	Rab13	EAR3
cHL							
1	NS	-	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
2	MC	+	3/3	3/3	nd	nd	nd
3	NS	-	4/4	3/3	2/3	3/3	3/3
4	NS	+	2/4*	3/3	3/3	3/3	3/3
5	NS	-	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3
6	MC	+	0/3*	2/3	3/3	3/3	(0/1)
7	MC	-	3/3	3/3	3/3	3/3	(0/1)
LP-HL							
8	LP	-	1/2*	2/2	2/2	2/2	
9	LP	-	2/2*	2/2	2/2	2/2	(0/1)
Kontrollen							
Positivkontrollen			15/16	11/12	13/13	10/10	8/9
Nicht-HRS-Zellen							
1-9			1/27	0/25	0/22	3/22	1/12
Pufferkontrollen							
1-9			0/27	0/25	0/22	0/22	0/12

Tabelle 5: RT-PCR-Analyse mikrodisektierter HRS-Zellen für die Gene: PRAME, IPL, Fer, Rab13 und EAR3.

Gruppen von 25 oder 50 HRS-Zellen bzw. Nicht-HRS-Zellen (kleine Zellen derselben Gewebeschnitte, aus denen die HRS-Zellen isoliert wurden) wurden mittels RT-PCR analysiert. Insgesamt wurden 37 Gruppen von 25 HRS-Zellen und 81 Gruppen von 50 HRS-Zellen sowie 26 Gruppen mit 25 Nicht-HRS-Zellen und 92 Gruppen von 50 Nicht-HRS-Zellen analysiert. Die wenigen positiven Nicht-HRS-Zellen könnten durch eine zelluläre Kontamination der Zellgruppen mit Fragmenten von HRS-Zellen oder durch reale Expression dieser Gene in einigen Nicht-HRS-Zellen herrühren. Die Pufferkontrollen (Kontaminationskontrollen) sind PCR-Reaktionen, die Puffer, jedoch keine Zellen enthielten. Als Positivkontrolle der cDNA-Synthese und der RT-PCR dienten 10 KMH2-Zellen (FACS-sortiert). Die PCR für PRAME und IPL bestand aus einer Amplifikationsrunde mit 40 Zyklen, die anderen drei Gene wurden mit zwei Amplifikationsrunden mit je 20 bzw. 30 Zyklen analysiert.

*In den Fällen 4, 8 und 9 zeigte eine der HRS-Zellgruppen erst nach zwei Amplifikationsrunden ein positives Ergebnis (die Kontrollzellen blieben bei denselben PCR-Bedingungen negativ). Die HRS-Zellgruppen des Falles 6 zeigten auch nach zwei Amplifikationsrunden keine PRAME-Expression.

3.4 Die verlorene B-Zellidentität in HRS-Zellen

3.4.1 SAGE-Daten decken eine umfassende Herunterregulation von B-Zelllinienspezifischen Genen in der Zelllinie L1236 auf

Das Fehlen oder die Herunterregulation einiger B-Zellmarker in HRS-Zellen wurde bereits beschrieben (Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Watanabe et al., 2000). In

welchem Maß exprimieren HRS-Zellen noch Proteine, die eine B-Zelle ausmachen? Um diese Frage zu klären, analysierten wir das SAGE-Profil bezüglich der Expression von B-Zelllinien-spezifischen Genen, die hier in der vorliegenden Arbeit als die Gruppe der B-Zell-, Lymphozyten und hämatopoetisch-spezifisch ausgeprägten Gene definiert werden. Interessanterweise repräsentierten 31 der 287 herunterregulierten Transkripte B-Zelllinien-spezifische Transkripte (Tabelle 6). Weitete man die Suche auf weniger stark herunterregulierte Transkripte aus (zweifach bis weniger als fünffach herunterreguliert), konnten zusätzlich fünf weitere B-Zellmarker identifiziert werden (Tabelle 6).

Die meisten der B-Zellmarker, die bereits für ihre Herunterregulation in HRS-Zellen bekannt waren, wurden auch in dieser Analyse identifiziert (z.B. CD19, CD20, CD45, CD79a/b, OBF-1, Oct-2) (Kuzu et al., 1993; Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Der Großteil der B-Zellliniengene, die in dieser Analyse als herunterreguliert identifiziert wurde, ist bisher jedoch nicht in der Literatur beschrieben. Bemerkenswert ist der Verlust oder die verminderte Expression vieler Moleküle, die im BCR-Signalweg eine Rolle spielen, so z.B. Tyrosinkinasen (Syk, Lyn, Blk) und das BLNK-Protein oder auch Transkriptionsfaktoren (Spi-B, Lyl-1, A-myb) (Tabelle 6, Abbildung 10).

Ergebnisse

	Gene	Anzahl der Tags für:		Genfunktion
		KZ-B-Zellen	L1236	
B-Zell-spezifische Gene	Ig-β (CD79b)	45	1	BCR-assoziiertes Protein
	Ig-α (CD79a)	21	0	BCR-assoziiertes Protein
	OBF	19	0	Transkriptionsfaktor
	CD22	16	0	BCR-Korezeptor
	SWAP-70	9	0	Untereinheit des SWAP-Proteinkomplexes
	CD20	8	0	BCR-Korezeptor
	RP105 (CD180)	8	0	Toll-like-Rezeptor, LPS-Rezeptor
	CD19	8	1	BCR-Korezeptor
	Ig κ	7	0	BCR leichte Kette
	A-myb	7	0	Transkriptionsfaktor
	BLNK	4	0	B-Zell-Linker-Protein
Lymphozyten-spezifische Gene	LPAP (CD45-AP)	41	0	CD45-assoziiertes Protein
	Campath-1 (CD52)	36	0	(GPI)-geankertes Protein
	Jaw-1	33	2	Integrales Membranprotein des ER
	Lck	6	0	Proteintyrosinkinase
	Blk	5	0	Proteintyrosinkinase
	Spi-B (PU.B)	5	0	Transkriptionsfaktor
	SIT	4	0	SHP2-interagierendes Protein
hämatopoetisch-spezifische Gene	CD53	25	0	Tetraspanin
	CD37	19	1	Tetraspanin
	hICSBP-1	17	0	Vermutlicher Repressor der ICS-enhaltenden Gene
	CXCR4	15	1	Chemokinrezeptor
	c-Src	15	1	Proteintyrosinkinase
	HPK-1	10	1	STE20-verwandte Serin-Threonin-Kinase
	CD45	19	2	Allgemeines Leukozytenantigen, Phosphatase
	PLC-γ2	12	1	Signaltransmitter (z.B Rezeptortyrosinasen)
	CD72	8	1	C-Typ-Lektin
	Spi-1 (PU.1)	6	0	Transkriptionsfaktor
	HS1 (HCLS1)	6	0	Hämatopoetisch-spezifisches Lyn-Substrat
	Lyl-1	5	0	Transkriptionsfaktor
	47 kDa Protein	5	0	NCF-1 (Humanes 47-kDa-autosomale-chronische Granulomatose-Protein)
	LFA-1	5	0	Leukozytenintegrin
	GPI80	3	0	GPI-Protein, Rolle in Leukozytenwanderung
	WASP	3	0	Organisation des Aktinzytoskeletts
	Lyn	3	0	Proteintyrosinkinase

Tabelle 6: SAGE-Daten zur Herunterregulation von B-Zelliniengen in der Zelllinie L1236.

Die Gene wurden eingeteilt in B-Zell-, Lymphozyten- und hämatopoetisch-spezifisch exprimierte Gene. Die Anzahl der Tags ist für beide Expressionsprofile angegeben (normalisiert auf 30.000). Einige der Gene, z.B. c-Src, Syk, PLC- γ , sind in die hämatopoetisch-spezifische Klasse eingeteilt, obwohl sie auch in anderen Gewebearten exprimiert werden. Der Grund hierfür war die entscheidende Funktion dieser Gene in B-Zellsignalwegen. B-Zelliniengene, die durch SAGE als nur sehr gering herunterreguliert identifiziert wurden (mit einem Faktor von kleiner als 3-fach) wurden nicht in die Tabelle mit aufgenommen, obwohl sie in der Genchipanalyse als signifikant herunterreguliert identifiziert wurden (Syk, MD-1, LPTP, TTF; alle Gene zeigten ein Expressionsverhältnis von 2:0).

3.4.2 Genchip-Expressionsdaten verdeutlichen den Verlust der B-Zellidentität als ein generelles Merkmal von cHL-Zelllinien

Um der Frage nachzugehen, ob die Herunterregulation der B-Zelliniengene ein generelles Merkmal von cHL-Zelllinien darstellt, wurden die Genchipdaten auf diesen Aspekt hin untersucht. Hierfür wurde eine supervised Clusteringanalyse durchgeführt, in der die cHL-Zelllinien, die eine Phänotypengruppe darstellten, und die normalen B-Zellpopulationen (fünf Zellpopulationen von naiven- und Gedächtnis-B-Zellen und zehn Zellpopulationen von KZ-B-Zellen) als Vergleichsgruppe festgelegt wurden. Die Gruppe der Gene, die als signifikant herunterreguliert identifiziert wurde, zeigte einen umfassenden Defekt in der B-Zelllinien-spezifischen Expression auf, welcher mit den SAGE-Daten korreliert (Abbildung 10).

Insgesamt zeigten 374 Gene eine Herunterregulation in der Genchip-Analyse. 46 Gene, die als B-Zelllinien-spezifisch publiziert sind, konnten darunter identifiziert werden.

Die meisten der B-Zelliniengene, die in der SAGE-Analyse gefunden wurden, wurden ebenso in der Genchip-Analyse identifiziert (30 Gene, die in Abbildung 10 mit (S) gekennzeichnet sind), was die Daten beider Methoden kreuzweise validiert. Dennoch wurden in beiden Analysen auch jeweils einige Gene gefunden, die mit der anderen Methode nicht identifiziert wurden. Zum einen kann die Repräsentation von Transkripten in dem SAGE-Profil durch die Größe des Profils eingeschränkt sein, zum anderen ist SAGE durch das Vorhandensein von Polymorphismen in der Tagsequenz oder das Fehlen von NlaIII-Bindungsstellen in bestimmten Transkripten limitiert. Auf der anderen Seite sind auf dem U95A-Genchip nur ca. 9.000 verschiedene Transkripte repräsentiert, sodass für einige Gene keine Sonden auf dem Chip aufgebracht sind. Zudem können Sonden suboptimal sein, sodass der Nachweis jener Transkripte nicht gelingt. Unterschiede in der Art des Vergleichs an sich können auch dazu führen, dass

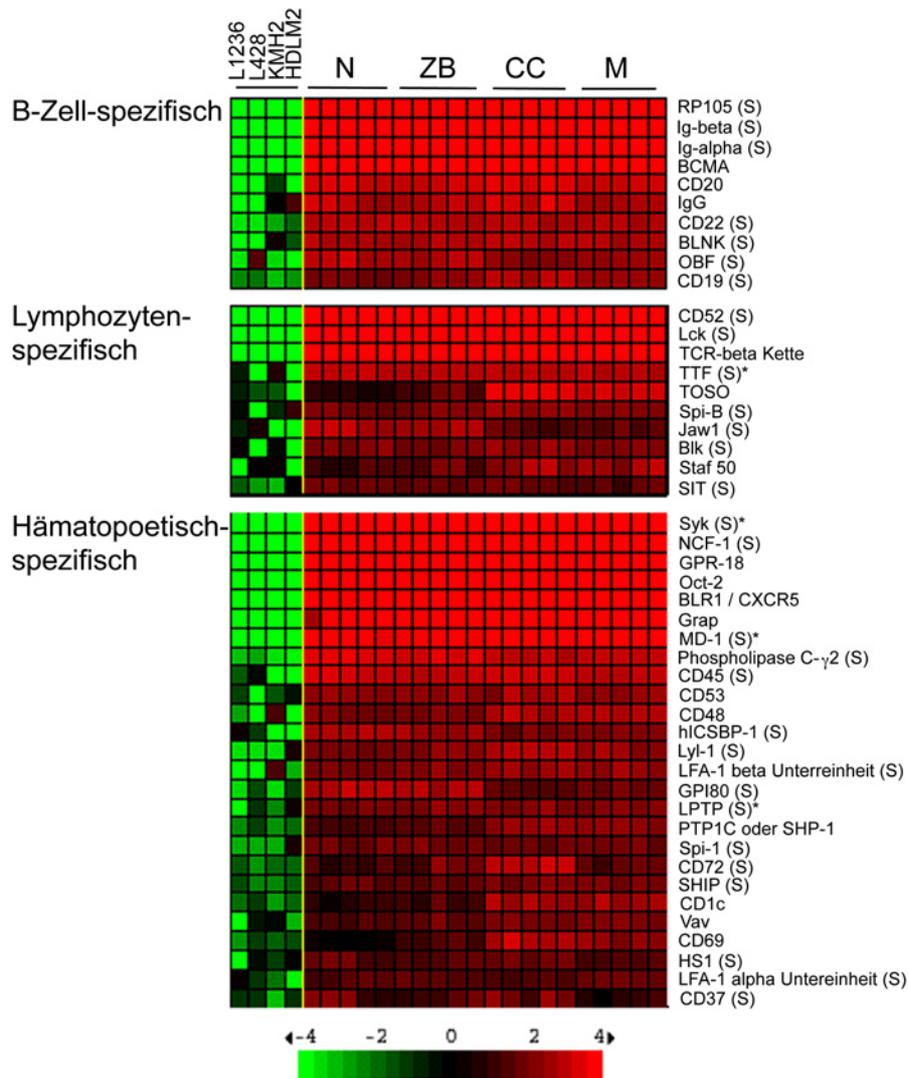


Abbildung 10: Herunterregulierte B-Zellliniengene in cHL-Zelllinien.

Die herunterregulierten B-Zellliniengene (Reihen) wurden mittels einer supervised Clusteringanalyse identifiziert. Die cHL-Zelllinien (Spalten) stellten die Phänotypgruppe, die normalen B-Zellpopulationen (Spalten) die Vergleichsgruppe dar. Die Gene sind nach der statistischen Signifikanz ihrer differentiellen Expression (z-score) geordnet. Die Farbänderungen innerhalb einer Reihe zeigt die Expressionsstärke relativ zum Mittelwert aller Populationen an. Die Farbwerte werden anhand des Farbbalkens unter der Figur, die den Unterschied im ζ -score (Expressionsunterschied/Standardabweichung) angibt, quantifiziert.

Gene die auch in der SAGE-Analyse identifiziert wurden, sind mit einem „S“ gekennzeichnet. Die Gene, die in der SAGE-Analyse nur mit einem Tagverhältnis von 2 : 0 identifiziert wurden, sind mit „S*“ gekennzeichnet. Die Gene wurden nach ihrer Expression im Normalgewebe in B-Zell-, Lymphozyten- und hämatopoetisch-spezifisch eingeordnet. IgG ist aufgelistet als ein Beispiel für diverse Immunglobulingene, die nicht in cHL-Zelllinien exprimiert werden. Einige Gene, wie c-Src oder Syk, werden aufgrund ihrer entscheidenden Funktion in B-Zellen in der hämatopoetisch-spezifischen Genklasse erwähnt, obwohl sie auch in nicht-hämatopoetischen Zellen ausgeprägt werden. Für einige Gene (TTF, TOSO, Staf50, SIT) liegen nur limitierte Expressiondaten für Normalgewebe vor. Die Einteilung bezüglich der Expression ist daher als vorläufig zu erachten. Es ist bekannt, daß TCR-beta-Keimbahntranskripte in tonsillären B-Zellen ausgeprägt werden (Calman und Peterlin, 1986). CC = Zentrozyten

Transkripte in der einen Analyse identifiziert werden und in der anderen nicht. So wurde z.B. A-myb als KZ-spezifisches Gen nur in dem SAGE-Vergleich zwischen der Zelllinie L1236 und KZ-B-Zellen, nicht jedoch in der Genchip-Analyse identifiziert, da A-myb nicht konsistent in allen normalen B-Zellpopulationen ausgeprägt wird.

3.4.3 Proteinexpression ausgewählter B-Zellidentitätsgene in primären HRS-Zellen

Das Fehlen oder die Herunterregulation einiger B-Zell-spezifischer Gene war bereits bekannt, so z.B. CD19, CD20, Oct-2 oder OBF-1 (Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Für neun weitere Marker wurde die Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbungen auf Paraffin-fixiertem oder gefrorenem Gewebe reaktiver Tonsillen (Kontrollen) und von Lymphknotenbiopsien von cHL-Patienten untersucht (Tabelle 7, Abbildung 11). Diese Arbeiten wurden in der Gruppe von M.L. Hansmann (Institut für Pathologie, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt.

RP105 ist ein Toll-like-Rezeptor, welcher im Großteil der reifen B-Zellen ausgeprägt wird und eine Rolle in der LPS-vermittelten B-Zellaktivierung spielt (Ogata et al., 2000). Zudem wurden Färbungen durchgeführt für Syk, Lck und Blk, drei Tyrosinkinase. Syk ist eine Kinase, die essenziell für den Signalweg des BCR- sowie für den der Immunrezeptoren ist. Lck wird als schwach exprimiert in naiven B-Zellen beschrieben, wird jedoch während der B-Zellstimulierung heraufreguliert (Taieb et al., 1993). Von Blk wird ebenfalls vermutet, dass es eine Rolle in der BCR-Signaltransduktion einnimmt (Islam et al., 1995). BCMA ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie und primär in reifen B-Zellen exprimiert (Gras et al., 1995; Madry et al., 1998). BLNK, ein Protein mit „scaffold“-Funktion (rekrutiert diverse Proteine in einen Komplex), ist ebenfalls entscheidend in den BCR-Signalweg involviert (Fu et al., 1998; Wienands et al., 1998). CD52, ein Glykopeptidantigen, ist hoch in T- und B-Zellen ausgeprägt (Rowan et al., 1995). Von SWAP70 wurde ursprünglich vermutet, dass es eine Funktion im Klassenwechsel der V_H-Gene innehat, es wird im Zytoplasma ruhender B-Zellen ausgeprägt und wandert nach Aktivierung der Zellen in den Kern oder assoziiert mit IgG (Masat et al., 2000). SIT ist ein Transmembranadapterprotein, das mit der Phosphatase SHP interagiert. Eine Lymphozyten-spezifische Expression von SIT wird vermutet (Marie-Cardine et al., 1999).

In keinem der analysierten cHL-Fälle (8-11 Fälle, siehe Tabelle 7) konnte Proteinexpression von Syk, BLNK und CD52 nachgewiesen werden. Für Lck, RP105,

SIT und SWAP70 (7-12 Fälle, siehe Tabelle 7) zeigte jeweils einer der Fälle Proteinexpression in einigen wenigen HRS-Zellen. Die Expression von BCMA variierte stärker: Drei der zwölf Fälle wiesen BCMA-Protein in einigen der HRS-Zellen auf. Zusammenfassend sind die immunhistochemischen Proteinfärbungen der primären HRS-Zellen konsistent mit den mRNA-Daten, die anhand der cHL-Zelllinien generiert wurden, und bestätigen die konsistent herunterregulierte Expression dieser neun B-Zelllinienproteine in primären HRS-Zellen.

B-Zell- proteine	cHL-Fälle														Fälle ohne Exp. in HRS- Zellen/analys. Fälle
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
RP105	-	ne	-	-	+	-	-	-	-	ne	-	nd	nd	nd	8/9
Lck	ne	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	9/10
Syk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	11/ 11
BCMA	ne	-	+	ne	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	9/12
BLNK	nd	-	na	na	-	-	-	-	na	-	na	na	-	-	8/8
SWAP70	+	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	nd	nd	nd	6/7
CD52	-	-	na	-	na	-	-	na	-	-	-	-	-	-	11/11
Blk	na	na	na	na	na	na	-	na	-	na	na	na	-	-	4/4
SIT	+	-	-	na	na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11/12
EBV status	+	+	+	+	+	na	-	-	-	-	+	nd	nd	nd	

Tabelle 7: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen für neun B-Zellmarker.

Ergebnisse der Färbungen von Gewebeschnitten reaktiver Tonsillen (Kontrollen) und von cHL-involvierten Lymphknoten. Die Proteinexpression in Normalgewebe (Tonsillen): RP105 (stark in Mantelzonenzellen, niedrig in KZ-Zellen, einigen interfollikulären Zellen); Lck (stark in interfollikulären Zellen (vermutlich T-Lymphozyten), KZ-Zellen und Mantelzonenzellen); Syk (KZ-Zellen, einige Mantelzonenzellen und einzelne interfollikuläre Zellen); BLNK (KZ-Zellen und Mantelzonenzellen); SWAP70 (hoch in KZ-Zellen); CD52 (viele KZ-Zellen, Mantelzonenzellen und viele interfollikuläre Zellen); Blk (hoch in KZ-Zellen, Mantelzonenzellen, einigen interfollikulären Zellen); SIT (stark in KZ-Zellen, niedriger in Mantelzonenzellen und interfollikulären Zellen).

Es wurde keine Proteinexpression von Syk, BLNK und CD52 in HRS-Zellen beobachtet. Für Lck, RP105 SIT und SWAP70 zeigte jeweils einer der Fälle ein positives Ergebnis in dem Sinne, dass einige wenige HRS-Zellen des Falles das entsprechende Protein exprimierten. Die Expression von BCMA schien stärker zu variieren: Drei von zwölf Fällen wiesen BCMA-Protein in einigen der HRS-Zellen auf.

Der EBV-Status wurde mittels einer EBER-in-situ-Hybridisierung analysiert.

ne = nicht auswertbar; nd = nicht durchgeführt; analys = analysiert; Exp. = Proteinexpression

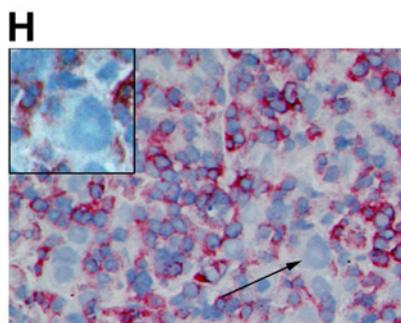
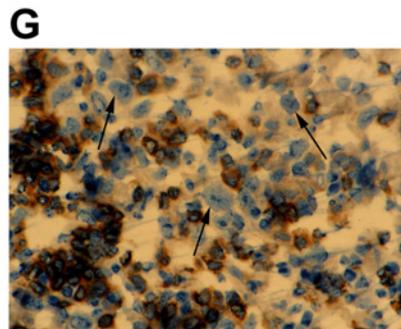
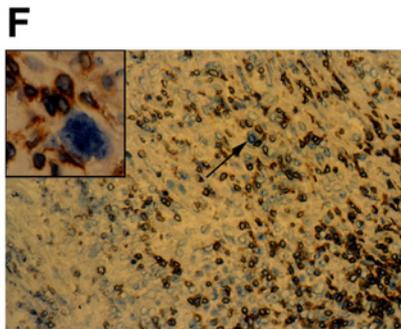
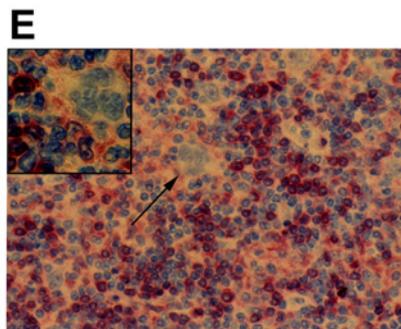
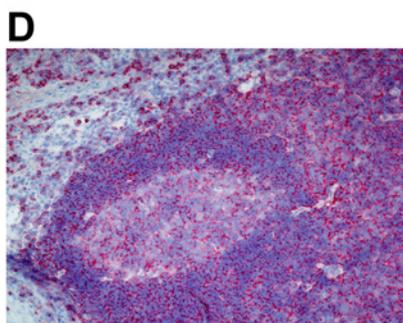
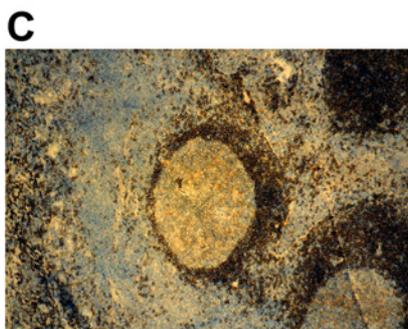
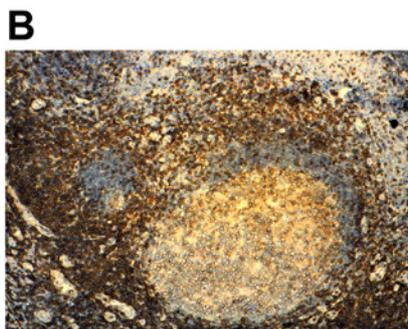
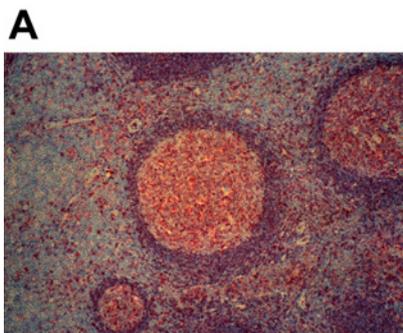


Abbildung 11: Verlust der Expression von Syk, Lck, CD52 und RP105 in primären HRS-Zellen.

Immunohistochemische Färbungen wurden auf Gewebeschnitten reaktiver Lymphknoten (A-D) und auf Gewebeschnitten von cHL-involvierten Lymphknoten (E-H) durchgeführt. Färbungen für Syk (A und E), Lck (B und F), RP105 (C und G) und CD52 (D und H) sind gezeigt.

Expression in Gewebeschnitten reaktiver Tonsillen: In Übereinstimmung mit früheren Publikationen zeigte sich eine hohe RP105-Expression vor allem in Mantelzonenzellen und eine niedrigere in KZ-Zellen. Zudem wiesen einige interfollikuläre Zellen RP105-Expression auf. Syk wurde in KZ-Zellen, Mantelzonenzellen und vielen interfollikulären Zellen nachgewiesen. Starke Expression von Lck konnte in interfollikulären Zellen, vermutlich T-Lymphozyten, KZ-Zellen und einigen Mantelzonenzellen beobachtet werden. CD52-Expression zeigte sich in vielen KZ-Zellen, in Mantelzonenzellen und in vielen interfollikulären Zellen.

Expression in primären HRS-Zellen: Konsekutive Gewebeschnitte der oben dargestellten Gewebeschnitte wurden mit anti-CD30 (HRS-Zellmarker) gefärbt und auf die Morphologie und die Häufigkeit der HRS-Zellen in den Lymphknoten hin untersucht (Daten nicht gezeigt). In den Färbungen für RP105, Syk, CD52 und Lck wurden die HRS-Zellen (angezeigt durch einen schwarzen Pfeil oder mit einer höheren Vergrößerung in einem Extrafenster dargestellt; E, F und H) anhand morphologischer Kriterien identifiziert. Eine Proteinexpression von Syk und CD52 in den HRS-Zellen konnte in keinem der Fälle beobachtet werden. Lck und RP105 wurden nur in einem der analysierten Fälle in wenigen der HRS-Zellen exprimiert (Tabelle 7). Gezeigt ist hier jeweils ein negativer Fall für beide Proteinfärbungen.

Syk und CD52 wurden mittels des Fast-Red-Substrats gefärbt (rot), Lck und RP105 wurden mittels DAB-Färbung nachgewiesen (braun).

3.4.4 Verbleibende Expression von B-Zellliniengenen in HRS-Zellen

Bei der Beobachtung des Verlusts der B-Zellidentität in HRS-Zellen stellt sich die Frage, ob noch Expression spezieller B-Zellliniengene beibehalten wird oder ob der Verlust der B-Zellidentität tatsächlich so umfassend ist, wie er sich in diesen Genexpressionsdaten darstellt. So war z.B. bereits bekannt, dass HRS-Zellen in einem Großteil der Fälle den B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor Pax-5 durchaus ausprägen (Foss et al., 1999; Krenacs et al., 1998).

Zu diesem Zweck suchten wir nach einer Methode, B-Zell-spezifisch exprimierte Gene zu identifizieren. Da keine Nicht-B-Zell-expressionsprofile zur Verfügung standen, um Gene zu identifizieren, die normalerweise in B-Zellen ausgeprägt werden, wurde manuell durch Datenbankrecherche nach B-Zell-spezifisch ausgeprägten Genen gesucht (siehe Material und Methoden). In dieser Recherche wurden nur unwesentlich mehr B-Zellmarker entdeckt, als in den hier durchgeführten Genexpressionsanalysen identifiziert wurden. Nur die mRNA-Moleküle für B7.1, B7.2, CD40 und verschiedene MHC Klasse II-Allele wurden in den cHL-Zelllinien in ähnlichem Maß oder stärker ausgeprägt als in normalen B-Zellpopulationen (Daten nicht gezeigt). Dieses war jedoch bereits bekannt (Küppers, 2002; Poppema, 1996). Die Expression dieser Moleküle wird

diskutiert als ein Zeichen für eine mögliche Antigen-präsentierende Funktion der HRS-Zellen (Cossman et al., 1998; Poppema, 1996).

3.4.5 Sequenzanalyse der Pax-5-cDNA

Pax-5 ist ein Masterregulatorgen in der Entwicklung und in der Beibehaltung der B-Zellidentität (Horcher et al., 2001; Urbanek et al., 1994). Paradoxerweise ist dieser Transkriptionsfaktor in den meisten Fällen von HL in den HRS-Zellen exprimiert (Foss et al., 1999; Krenacs et al., 1998). Viele Gene jedoch, die bekannt für eine positive Regulation durch Pax-5 sind (z.B. CD19, CD21, CD22, CD72, BLNK, CD79a; siehe Tabelle 6, Abbildung 10) (Horcher et al., 2001; Urbanek et al., 1994), sind herunterreguliert. Aus diesem Grunde analysierten wir vier cHL-Zelllinien mittels RT-PCR und konnten Pax-5-Ausprägung in Übereinstimmung mit früheren Daten (Foss et al., 1999) in den drei Zelllinien nachweisen, die von B-Lymphozyten abstammen. Die Sequenzanalyse der cDNA zeigte keine Mutationen in der kodierenden Sequenz von Pax-5 auf. Eine konservative Basensubstitution, die vermutlich einen Polymorphismus darstellt, konnte in zwei der Zelllinien beobachtet werden. Das Fehlen von Mutationen in der cDNA von Pax-5 spricht gegen einen intrinsischen Defekt dieses Transkriptionsfaktors als eine mögliche Erklärung für die verlorene B-Zellidentität der HRS-Zellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden genomweite Genexpressionsprofile von cHL-Zelllinien und Vergleichspopulationen generiert und unter verschiedenen Aspekten analysiert. Um cHL-Zelllinien mit ihrem nicht-malignen Gegenstück, KZ-B-Zellen, zu vergleichen, wurde die SAGE-Methode verwendet. Die differenziell ausgeprägten Gene sollten Einblicke in Mechanismen des Transformationsprozesses geben. Ein Chip-basierter Ansatz diente zum Vergleich von cHL-Zelllinien und normalen B-Zellen sowie B-Zell-NHL. In diesem Ansatz wurden Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Lymphomentitäten untereinander dargestellt und Gene identifiziert, die hochspezifisch in HRS-Zellen ausgeprägt sind.

Während beide Vergleiche potenziell Aufschlüsse über die Pathogenese des cHL liefern, ermöglicht der Vergleich mit diversen malignen und nicht-malignen Zellpopulationen zusätzlich die Identifizierung von prognostischen und/oder diagnostischen Markern.

4.1 Zelllinien versus Primärgewebe

Die Notwendigkeit der Verwendung von Zelllinien anstelle von Primärgewebe ist durch die Seltenheit der HRS-Zellen im Tumorgewebe (weniger als 1%) bzw. durch das Fehlen geeigneter Aufreinigungsmethoden derselben gegeben. Zur Zeit existiert noch kein Protokoll, um mit einer kleinen Menge (weniger als 2000) mikromanipulierter Zellen verlässlich Genchip- oder SAGE-Analysen durchzuführen.

Durch die Verwendung von Zelllinien ergeben sich jedoch Aspekte, die bei der Analyse der Expressionsdaten berücksichtigt werden müssen. Das Vermehren der Zellen unter Zellkulturbedingungen hat mit Sicherheit einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression. Durch den Vergleich mit diversen anderen Zelllinien sollten sich jedoch diese allgemeinen kulturbedingten Veränderungen gegenseitig aufheben und nicht zur Identifizierung von „falsch-positiven“ Genen führen. Des Weiteren wurde für alle Gene, die in primären HRS-Zellen mittels RT-PCR analysiert wurden, die Genexpressionsdaten, die mittels SAGE und Genchip generiert wurden an cHL-Zelllinien und primären HRS-Zellen verifiziert, was für die Verlässlichkeit der gewonnenen Daten in Bezug auf eine "Hodgkin-spezifische" Expression der cHL-Zelllinien spricht. Weitere kritische Punkte sind, wie in der Einleitung vorgestellt, dass

alle in dieser Studie verwendeten cHL-Zelllinien von Patienten, in einem späten Krankheitsstadium abstammen und zum Teil eine erhebliche Anzahl an Versuchen nötig war, um cHL-Zelllinien zu etablieren (Drexler, 1993; Wolf et al., 1996). Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass HRS-Zellen in hohem Maße von Signalen des umgebenden zellulären Infiltrats abhängig sind (Cossman et al., 1998), sodass die Entstehung von cHL-Zelllinien zwangsläufig mit zellulären Änderungen einhergehen muss, die die originalen HRS-Zellen von diesen Signalen autark werden lassen. Doch auch dieser Aspekt relativiert sich durch den Befund, dass zum einen mehrere Gene identifiziert werden konnten, die für ihre Expression in HRS-Zellen bekannt sind, und sich die mittels SAGE und Genchip gewonnenen Daten für alle analysierten Gene erstaunlich gut an primären HRS-Zellen verifizieren ließen (Tabelle 4 und 5).

4.2 SAGE oder Genchip: Die Methode der Wahl

In dieser Studie wurden zwei grundverschiedene Methoden der Genexpressionsanalyse verwendet, um Gene zu identifizieren, die potenziell eine Rolle in der Pathogenese des HL einnehmen. Zum einen SAGE, eine Methode der Generierung und Sequenzierung von kurzen cDNA-Fragmenten (Tags), zum anderen eine Genchip-Analyse, in der ein Oligonukleotid-basierter Genchip (Affymetrix) mit Fluoreszenz-markierter cRNA hybridisiert wird. Jede Methode hat Vorteile: SAGE generiert quantitative Daten; das Verhältnis der Expressionsstärke zweier Gene kann direkt abgelesen werden. Zudem beinhaltet SAGE die Möglichkeit, auch cDNAs, die bisher nicht in einer Datenbank vertreten sind, zu erfassen. Nachteile der Methode liegen im Finanziellen (ca. 15.000 €/Profil) sowie im Arbeitsaufwand, beides liegt beträchtlich höher als bei einer Genchip-Analyse. Aus diesem Grunde werden in einer SAGE-Analyse selten für eine Zellpopulation verschiedene Proben untersucht (wie bei der hier vorliegenden Genchip-Analyse). Dies ist jedoch eine Möglichkeit, biologische Varianz zu verdeutlichen und die Verlässlichkeit der als differenziell exprimiert identifizierten Gene zu erhöhen.

Somit liegen auch die Vor- und Nachteile einer Genchip-Analyse auf der Hand: Der U95A-Genchip repräsentiert nur ca. 9000 verschiedene Gene, und die Daten sind nicht gänzlich quantitativer Art: Der Unterschied in der Fluoreszenz liefert einen ungefähren Eindruck des Maßes der differenziellen Expression. Eine Genchip-Analyse ist jedoch wesentlich kostengünstiger und arbeitstechnisch deutlich weniger aufwändig als SAGE. Der Vorteil von mehreren Proben der gleichen Zellpopulation wird in dieser Studie

verdeutlicht: Die SAGE-Studie wurde nur mit der cHL-Zelllinie L1236 durchgeführt, Genchipdaten liegen jedoch von vier cHL-Zelllinien vor. So müssen alle SAGE-Daten zunächst in dem Licht betrachtet werden, dass sie nur die Genexpression in der L1236 widerspiegeln, und die Ergebnisse für andere cHL-Zelllinien verifiziert werden müssen.

Die Verlässlichkeit beider Methoden, differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, ist sehr hoch. So wurden mit beiden Methoden Gene identifiziert, die bereits als differenziell exprimiert bekannt waren, z.B. Fascin und TARC. Zudem ließ sich die Expression der mit beiden Methoden identifizierten Gene an Zelllinien (SAGE; Abbildungen 4 und 5) und an primären HRS-Zellen (SAGE und Genchip; Tabellen 4 und 5 und Abbildung 11) in nahezu jedem Fall verifizieren. Mit beiden Analysen wurden Gene identifiziert, die mit der jeweiligen anderen Methode nicht identifiziert wurden. So waren z.B. einige der mittels SAGE identifizierten Gene nicht auf dem U95A-Genchip vertreten.

4.3 Verlorene B-Zellidentität in HRS-Zellen

HRS-Zellen stammen in den allermeisten Fälle von B-Zellen ab, wie sich an den potentiell funktionellen V(D)J-Genumlagerungen der Ig-Loci aufzeigen lässt (siehe Einleitung). Trotz dieser unzweifelhaften Abstammung von B-Zellen zeigen früheren Studien das häufige Fehlen einiger B-Zelllinienmarker (in der vorliegenden Arbeit definiert als B-Zell-, Lymphozyten- und hämatopoetisch-spezifisch exprimierte Gene), wie z. B. CD19, CD20, CD45, CD79a/b, OBF-1 und PU.1 (Drexler, 1992; Kuzu et al., 1993; Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Torlakovic et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Um die phänotypische B-Zellidentität von HRS-Zellen zu analysieren, wurden genomweite Genexpressionsprofile von cHL-Zelllinien und von normalen B-Zellpopulationen verglichen. Die Herunterregulation der oben genannten Moleküle in cHL-Zelllinien konnte ebenfalls in diesem Genexpressionsvergleich beobachtet werden.

4.3.1 Systematische Herunterregulation von B-Zelllinien-spezifischen Genen in HRS-Zellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich in HRS-Zellen nicht um die Herunterregulation einzelner B-Zelllinienmarker handelt, sondern um einen generellen Defekt im Programm der B-Zelllinien-spezifischen Genexpression. Die RNA-Expression nahezu jedes B-Zell-, Lymphozyten- oder hämatopoetisch-spezifisch ausgeprägten Gens fehlt entweder vollständig oder zeigt eine deutliche Reduzierung in HRS-Zellen,

verglichen mit normalen B-Zellpopulationen (Abbildung 12). Tatsächlich fällt es schwierig eine verbliebene Ausprägung irgendwelcher B-Zelllinienspezifischer Gene nachzuweisen. So war die Expression von B7.1, B7.2, CD40 und MHC-Molekülen der Klasse II in HRS-Zellen bereits bekannt und konnte auch in dieser Analyse bestätigt werden. Neben diesen Molekülen, kann in HRS-Zellen noch das B-Zellspezifische Protein Pax-5 nachgewiesen werden (Foss et al., 1999; Krenacs et al., 1998), wird jedoch so niedrig ausgeprägt, daß es in unseren Profilen nicht vertreten ist.

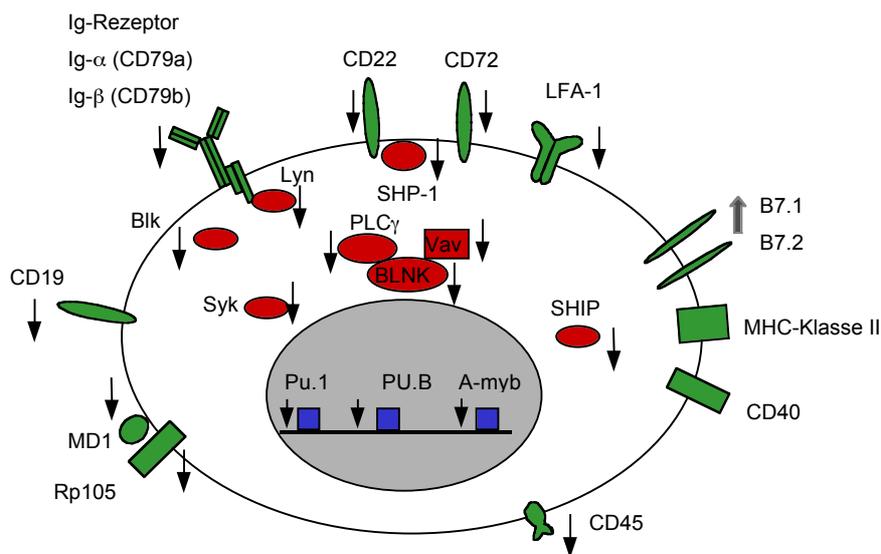


Abbildung 12: Verlust des B-Zelllinien-spezifischen Genexpressionsprogramms in HRS-Zellen.

Beispiele für Moleküle, die vom Differenzierungsdefekt betroffen sind: Membranproteine, Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren sind entweder herunterreguliert oder nicht mehr nachweisbar (dargestellt durch einen schwarzen Pfeil). Hochregulierte Gene (B7.1 und B7.2) sind durch einen grauen Pfeil gekennzeichnet. Obwohl Lyn in der Genchipanalyse nicht als konsistent herunterreguliert identifiziert wurde, wurde es in die Figur mit aufgenommen, da es in drei der cHL-Zelllinien (die Zelllinien, die von einem B-Lymphozyten abstammen) signifikant herunterreguliert war und auch die SAGE-Analyse reduzierte Expression von Lyn aufzeigte (Tabelle 6).

Für neun dieser 45 herunterregulierten Gene (Tabelle 6, Abbildung 10) wurde eine Herunterregulation des Proteins in primären HRS-Zellen bestätigt. Im Gegensatz zu diesen Daten steht eine EST-Analyse, die ein Genexpressionsprofil vorstellt, welches einen B-Zellurprung der HRS-Zellen unterstützen soll (Cossman et al., 1999). Diese Analyse basiert auf Daten, die von einer Mischung aus HRS-Zellen des cHL und Hodgkinzellen des LP-HL-Subtyps (L&H-Zellen) stammen. Für letztere ist jedoch bekannt, dass sie phänotypisch B-Lymphozyten ähneln (Hansmann et al., 1999), und

somit reflektiert das beobachtete B-Lymphozyten-ähnliche Genexpressionsprofil vermutlich die verwendeten L&H-Zellen.

Unter den Genen, die hier erstmalig als herunterreguliert beschrieben wurden, sind Gene, die für Moleküle mit einer Rolle in LPS-induzierter B-Zellaktivierung (RP105, MD-1), für Oberflächenmarker (CD37, CD53), für den TNF-Rezeptor BCMA und für die Transkriptionsfaktoren Spi-B und Lyl-1 kodieren. Zahlreiche Moleküle, die in Signaltransduktionsprozessen involviert sind, zeigen eine verminderte oder fehlende Transkription. Im Besonderen scheinen Komponenten des B-Zellrezeptorsignalwegs betroffen zu sein. Dies beinhaltet I) die Tyrosinkinasen Syk, Lyn und Blk, die nach Ligandenbindung des BCR aktiviert werden (Hsueh 2000), II) das Gerüstprotein BLNK, welches durch Syk phosphoryliert wird und daraufhin Tyrosinkinasen und weitere Signalmediatoren rekrutiert (Fu et al., 1998), III) PLC- γ und Vav, Signalintermediate, die die Ca²⁺-Freisetzung sowie die Aktivierung von PKC und MAP-Kinase regulieren (Wienands und Engels, 2001) und IV) das CD72-Molekül und SHP-1; beide Moleküle sind involviert in die negative Regulation des BCR-Signalwegs (Cornall et al., 1999; Parnes und Pan, 2000). Daraus folgt, dass HRS-Zellen nicht nur die Expression des BCR als solchen (Küppers, 2002), sondern auch die korrespondierende Signaltransduktionsmaschinerie verloren haben. Dieser Befund macht es höchst unwahrscheinlich, dass ein anderer Faktor die Funktion des BCR durch Aktivierung des klassischen Signalwegs übernimmt. Eine solche Rolle war ursprünglich für das EBV-kodierte LMP2A-Protein in EBV⁺-HRS-Zellen vermutet worden (Merchant et al., 2001). Syk und BLNK sind jedoch essentiell für den LMP2A vermittelten Einfluss auf das Überleben und die Proliferation von B-Zellen (Engels et al., 2001; Merchant et al., 2000). Zwei Proteine, die, wie in dieser Studie gezeigt, im cHL nicht ausgeprägt werden.

Einige der oben genannten Moleküle nehmen auch eine wichtige Funktion in anderen Signalwegen neben dem BCR-Signal ein. Die Herunterregulation dieser Moleküle kann somit Einfluss auf diese Signalwege in HRS-Zellen nehmen. SHIP, SHP-1 und CD45 zum Beispiel inhibieren den JAK/STAT-Signalweg (Hanson et al., 2003; Irie-Sasaki et al., 2001; Kile et al., 2001), der normalerweise durch Zytokinsignale aktiviert wird. Interessanterweise wurde eine konstitutive Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT6 in HRS-Zellen aufgezeigt (Chen et al., 2001; Kube et al., 2001; Skinnider et al., 2002). Es ist denkbar, dass die Herunterregulation von SHIP und/oder CD45 zu dieser Aktivierung beiträgt.

4.3.2 Potenzielle Mechanismen für den Verlust der B-Zellidentität

Aufgrund der vorliegenden Daten wird gefolgert, dass der Verlust der B-Zelllinien-spezifischen Transkription in HRS-Zellen einen fundamentalen Defekt in der Aufrechterhaltung des Genexpressionsprogramms einer B-Zelle darstellt. Für das Phänomen der verlorenen B-Zellidentität in HRS-Zellen können verschiedene Erklärungen diskutiert werden.

4.3.2.1 Partieller Plasmazellphänotyp?

Die verminderte RNA-Menge verschiedener Gene, die hier in der Analyse identifiziert wurden (z.B. CD20, CD19, CD22, Blk und OBF), sowie die Expression von Markern wie Syndecan-1 (CD138) oder MUM-1 (IRF-4), die für HRS-Zellen beschrieben wurde, steht in Einklang mit einem Plasmazellphänotyp (Carbone et al., 1997; Falini et al., 2000; Liberg und Sigvardsson, 1999). Andere Aspekte stimmen jedoch nicht hiermit überein: So sind auch Marker, die normalerweise in Plasmazellen exprimiert sind, in HRS-Zellen herunterreguliert, z.B. BMCA, ein TNF-Rezeptor der in der terminalen Differenzierung stark heraufreguliert wird, sowie Oct-2 und Spi-B, zwei Transkriptionsfaktoren (Gras et al., 1995; Nagy et al., 2002; Stein et al., 2001). Vor allem das Fehlen der Ig-Expression (Marafioti et al., 2000), ein Grundcharakteristikum von Plasmazellen, in HRS-Zellen und die verbliebene Expression von Pax-5 in HRS-Zellen (Foss et al., 1999; Krenacs et al., 1998) sprechen gegen eine terminale B-Zelldifferenzierung. In-vitro-Daten sprechen sogar dafür, dass eine Ausprägung von Pax-5 inkompatibel mit einer Plasmazelldifferenzierung ist (Barberis et al., 1990; Usui et al., 1997).

Tatsächlich wird für ein anderes Lymphom, das primäre Effusionslymphom (PEL), eine solche beginnende terminale B-Zelldifferenzierung der Vorläuferzelle angenommen (Klein et al., 2003a). Auch in diesem Lymphom fehlen viele B-Zellmarker und B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren (Arguello et al., 2003). Zudem zeigen PEL Ähnlichkeiten in den Genexpressionsprofilen mit LCL und Multiplen-Myelom-Zelllinien (Klein et al., 2003a). Letzteres drückt sich vor allem in der Expression bekannter Plasmazellmarker wie BLIMP1 und CD138 aus. Die Autoren folgern daraus, dass das PEL von späten KZ-B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenzieren, abstammen. Gleiches postulieren sie auch für das cHL, basierend auf I) den fehlenden B-Zellmarkern, II) der Ähnlichkeit mit LCL und III) der Expression von Plasmazellmarkern wie CD138. Die Beobachtung, dass das cHL Pax5 (Foss et al., 1999; Krenacs et al., 1998) ausprägt, BLIMP1 hingegen „noch“ nicht (Klein et al., 2003a), deuten die Autoren

dahingehend, dass das cHL von einem früheren B-Zellstadium abstammt als PEL (Klein et al., 2003a). Dagegen spricht, dass I) diese Ähnlichkeit mit in-vivo-vorkommenden Immunoblasten im KZ, dem vermuteten nicht-malignen Gegenstück (Falini et al., 2000), nur auf wenigen Markern basiert (Bcl-6, IRF-4, pax-5, BLIMP1) und dass II) HRS-Zellen in fast allen Fällen zwar Syndecan, einen späten Plasmazellmarker, ausprägen, BLIMP1, einen frühen Plasmazellmarker, jedoch nicht (Carbone et al., 1997; Klein et al., 2003a; Zhan et al., 2003).

Das deutlichste Argument gegen die Theorie einer partiellen Plasmazelldifferenzierung ist hingegen die Expression etlicher Linien-fremder Marker (von T-Lymphozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen (siehe Einleitung)), ein Phänomen, das nicht mit dem Phänotyp einer terminalen B-Zelldifferenzierung zu erklären ist.

4.3.2.2 Pax-5-Aktivität?

Der Transkriptionsfaktor Pax-5 ist essenziell für die Etablierung und für die Aufrechterhaltung der B-Zellidentität (Horcher et al., 2001; Urbanek et al., 1994). Paradoxerweise ist dies nahezu das einzige B-Zell-spezifische Gen, welches in HRS-Zellen ausgeprägt wird. Das Protein ist, je nach Studie, in 70 – 90% der cHL-Fälle in unterschiedlichen Prozentsätzen der HRS-Zellen nachzuweisen (Foss et al., 1999; Krenacs et al., 1998). Aus diesem Grunde wurde hier die cDNA von drei cHL-Zelllinien mittels RT-PCR auf Mutationen hin analysiert, die mit der Proteinfunktion interferieren könnten. Das Fehlen von Mutationen spricht gegen einen funktionellen Defekt des Pax-5-Proteins. Da jedoch auch direkte Zielgene von Pax-5 (z.B. CD19 und BLNK (Kozmik et al., 1992; Schebesta et al., 2002)) in HRS-Zellen herunterreguliert sind, könnte ein funktioneller Defekt in einem Kofaktor von Pax-5 oder in einem zweiten unabhängigen Regulatorgen eine Rolle spielen. Dass nur eine verminderte oder fehlende Proteinexpression von Pax-5 (und anderen B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren) für den Verlust der B-Zelllinien-spezifischen Transkription verantwortlich sein soll, ist hochgradig unwahrscheinlich, da Transfektionsexperimente in cHL-Zelllinien mit Expressionskonstrukten, die für verschiedene B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren kodieren, keine Aktivierung der endogenen Promotoren, sondern nur von künstlichen Promotorkonstrukten ermöglichten (Hertel et al., 2002).

4.3.2.3 Dominant-negativer Regulator?

Eine andere Erklärung für den Verlust der B-Zellidentität könnte die Suppression durch einen dominanten Faktor sein. So reguliert das EBV-kodierte Protein LMP2A einige B-Zell-spezifische Gene herunter, die in dieser Studie ebenfalls als herunterreguliert identifiziert wurden, und eine Rolle von LMP2A in der verlorenen B-Zellidentität in HRS-Zellen wurde diskutiert (Portis et al., 2003). Es existieren jedoch Gründe, die gegen eine entscheidende Rolle von LMP2A in dem Verlust der B-Zellidentität in HRS-Zellen sprechen: i) die LMP2A-vermittelte Herunterregulation von B-Zell-spezifischen Genen scheint nicht so umfassend zu sein wie in HRS-Zellen (Portis et al., 2003), ii) wichtige Interaktionspartner für LMP2A wie die Proteine BLNK und Syk sind in HRS-Zellen nicht ausgeprägt, so daß der mögliche Mechanismus für die LMP2A vermittelte Genregulation unklar bleibt und iii) nur ca. 40% der cHL-Fälle und keine der hier verwendeten cHL-Zelllinien sind mit EBV assoziiert, so daß für die verbleibenden Fälle ein anderer Mechanismus für den Verlust der B-Zellidentität verantwortlich sein muß.

Ein Protein, das in einer Reihe von Zelldifferenzierungsschritten eine Rolle spielt, ist der Notch-Rezeptor. Er ist involviert in der Entscheidung zwischen B- und T-Lymphozytendifferenzierung (Pui et al., 1999; Radtke et al., 1999). Überexpression eines Transgens, welches für einen konstitutiv aktiven Notch-1-Rezeptor kodiert, resultiert in einem Block der B-Zellentwicklung und einer erhöhten Anzahl von T-Lymphozyten im Knochenmark (Pui et al., 1999). Interessanterweise wurde Überexpression von Notch-1 (und Notch-2, dessen Funktion in hämatopoetischen Zellen unklar ist) in HRS-Zellen und cHL-Zelllinien nachgewiesen (Jundt et al., 2002; Kapp et al., 1999). Da Notch 1 in den cHL-Zelllinien nicht aktiv zu sein scheint, da Hes-1 ein direktes Zielgen von Notch in vielen Zelltypen (Jarriault et al., 1995; Kuroda et al., 1999) nicht ausgeprägt wird (Jundt et al., 2002), verbleibt die Aktivität von Notch 1 in HRS-Zellen noch ungeklärt.

Neben Notch existieren weitere Kandidatenproteine, die die B-Zellidentität negativ beeinflussen können. Id-Proteine sind inhibitorische Mitglieder der bHLH-Proteinfamilie. So inhibiert die konstitutive Expression von Id1 die B-Zellentwicklung (Sun, 1994). Zudem wird vermutet, dass Id2 die Entwicklung von konventionellen B-Zellen negativ reguliert und für die Suppression von B-Zell-spezifischen Genen in der Differenzierung dendritischer Zellen zuständig ist (Becker-Herman et al., 2002; Hacker et al., 2003). ABF-1 ist ebenfalls ein inhibitorischer bHLH-Transkriptionsfaktor und ist spezifisch in

cHL-Zelllinien exprimiert. Die Rolle von ABF-1 in dem Verlust der B-Zellidentität ist noch unklar und bedarf weiterer Experimente.

4.3.3 Verlust der B-Zellidentität: Bedeutung für die Lymphomentstehung des cHL

Der Verlust von zellspezifischen Markern, auch Dedifferenzierung genannt, ist ein wohl bekanntes Phänomen, dass einige (hauptsächlich progressive) solide Tumorarten zeigen (Fusenig et al., 1995; Kojiro und Nakashima, 1999). Im Gegensatz dazu prägen maligne B-Lymphozyten normalerweise Marker aus oder behalten komplexe biologische Merkmale, die speziellen normalen B-Zelldifferenzierungsstadien zugeordnet werden können. So exprimierten z.B. BL üblicherweise die KZ-Marker CD10 und CD77 (Lipinski et al., 1982; Ritz et al., 1981), und FL behalten das KZ-spezifische folliculäre Wachstumsverhalten und die Expression von Bcl-6, als KZ-Marker, bei (Falini et al., 1997; Su et al., 2001). Dieses beibehaltene Differenzierungsmuster in B-Zell-NHL ist in der engen Verbindung der Transformationsereignisse und des Differenzierungsprogramms der B-Lymphozyten begründet („Differenzierungsgebundene Lymphomagenese“), so die Hypothese (Abelev, 2000; Greaves, 1986). Diese Theorie basiert hauptsächlich auf der Beobachtung, dass Translokationen von Onkogenen in die Ig-Loci eine wichtige Rolle in B-Zell-NHL spielen. Die Funktion dieser translozierten Onkogene hängt jedoch von einer aktiven transkriptionellen Kontrolle der Ig-Loci ab. Diese wird wiederum von B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren geleistet.

Die Hypothese der Differenzierungsgebundenen Lymphomentstehung ist nicht auf das cHL anwendbar, da die phänotypische B-Zellidentität entweder nicht essenziell für oder sogar inkompatibel mit der Pathogenese des cHL zu sein scheint. Folglich lässt sich spekulieren, dass sich zumindest ein transformierendes Ereignis in cHL fundamental von denen in B-Zell-NHL unterscheiden muss.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern eine potenzielle Erklärung für die verwirrende Beobachtung, dass HRS-Zellen, die von B-Lymphozyten abstammen, ohne funktionellen BCR überleben können (Küppers, 2002). In reifen B-Zellen spielt das BCR-Signal eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zellen (Lam et al., 1997). KZ-B-Zellen, die im Rahmen der somatischen Hypermutation die Expression eines affinen BCR verloren haben, begehen Apoptose aufgrund eines proapoptotischen Grundprogramms in KZ-B-Zellen (Liu et al., 1989). Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Abhängigkeit der B-Zellen von einem funktionellen BCR auf einem B-Zelllinien-

spezifischen Genexpressionsprogramm basiert, welches in HRS-Zellen defekt ist oder einfach fehlt. In Bezug auf die Hypothese, dass HRS-Zellen von prä-apoptotischen KZ-B-Zellen abstammen (Kanzler et al., 1996b; Küppers, 2002) lässt sich spekulieren, dass Ereignisse, die zum Verlust der B-Zellidentität in KZ-B-Zellen führen, möglicherweise die B-Zell-spezifische Apoptose in diesen Zellen verhindern (Abbildung 13).

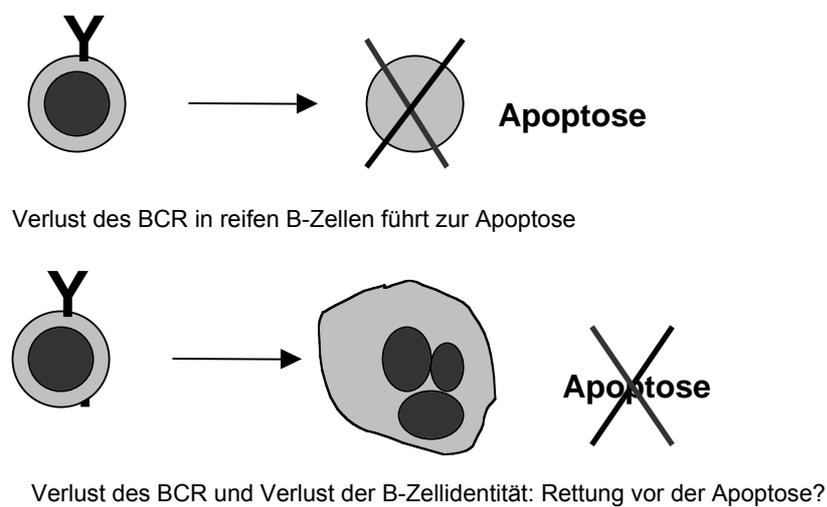


Abbildung 13: Rettet der Verlust der B-Zellidentität B-Zellen ohne funktionellen B-Zellrezeptor?

Reife B-Zellen ohne funktionellen BCR begehen Apoptose (Lam et al., 1997). Mindestens ein Viertel aller cHL-Fälle weist inaktivierende Mutationen in den V_H -Genumlagerungen auf, die die Ausprägung eines funktionellen BCR unmöglich machen (Küppers, 2002).

Folglich könnte der Verlust der B-Zellidentität es den HRS-Zellen (bzw. ihren Vorläufern) erlauben, ohne ein BCR-Signal zu überleben.

Der fundamentale Defekt in der Aufrechterhaltung eines B-Zelllinien-spezifischen Differenzierungsprogramms ist ein spezifisches Merkmal des cHL, steht im klaren Gegensatz zu anderen B-Zell-NHL und ist möglicherweise durch ein neues, bisher unbekanntes transformierendes Ereignis in der Pathogenese des cHL bedingt.

4.4 SAGE-Analyse

In der vorliegenden SAGE-Analyse wurden Genexpressionsprofile (30.000 Tags) der cHL-Zelllinie L1236 und von KZ-B-Zellen generiert. Mit dem Vergleich dieser Profile sollten Gene identifiziert werden, die zwischen HRS-Zellen und ihrem nicht-malignen Gegenstück, KZ-B-Zellen, differenziell exprimiert sind, um Einblicke in die Pathogenese des cHL zu bekommen.

Die Verlässlichkeit der SAGE-Analyse wurde überprüft, indem diverse Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR verifiziert wurden. Um auszuschließen, dass in dieser Arbeit Gene identifiziert wurden, die nur in der L1236-Zelllinie und nicht in anderen cHL-

Zelllinien ausgeprägt werden, wurde für zwölf der hochregulierten Gene (alle analysierten Gene) die Ausprägung in drei anderen cHL-Zelllinien bestätigt. Somit scheint die Ausprägung der identifizierten Gene in vielen Fällen ein allgemeines Merkmal von cHL-Zelllinien zu sein. Unglücklicherweise gab es für etliche der heraufregulierten Gene keine kommerziell erhältlichen Antikörper, und anti-RhoC bzw. anti-L-myc gaben keine verwertbaren Resultate im Immunoblot oder in der Immunhistochemie. Aus diesem Grunde wurden primäre HRS-Zellen mittels RT-PCR auf die Expression von RhoC, ATBF1 und p21^{SNFT} hin untersucht. Aufgrund der aufwändigen Methodik wurde nur die Expression dieser drei Gene analysiert. Für jedes der drei getesteten Gene konnte die Expression in primären HRS-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 4), sodass vermutet werden kann, dass ein veritabler Anteil der in dieser Studie als in cHL-Zelllinien heraufreguliert identifizierten Gene auch in primären HRS-Zellen ausgeprägt wird.

4.4.1 Herunterregulierte Transkripte in der cHL- Zelllinie L1236

Die Gruppe der herunterregulierten Gene umfasst unter anderen die B-Zelliniengene, deren Verlust in Punkt 4.3 diskutiert wird. Darüber hinaus ist die verminderte Expression von drei Inhibitoren der G-Protein-Signalwege von Interesse: die Regulatoren der G-Proteinsignale 5 und 13 sowie der G-Proteinsignal-Suppressor 1. (Ein anderer Inhibitor, der Regulator von G-Proteinsignalen 16 zeigt hingegen eine fast fünffache Heraufregulation.) Auch die Expression von Rho-GDP-Dissoziierungsinhibitor-(GDI) alpha und beta ist herunterreguliert, zwei Proteine, die den Übergang in die GTP-gebundene aktive Form des G-Proteins inhibieren. Rho GDI beta, auch LyGDI genannt, ist jedoch spezifisch in Lymphozyten ausgeprägt (Scherle et al., 1993), sodass die Herunterregulation dieses Proteins vermutlich ein Teil der verlorenen B-Zellsignatur ist. Die verminderte Expression der fünf Inhibitoren könnte die G-Proteinsignale in HRS-Zellen beeinflussen. Dieser Befund ist von besonderem Interesse, da RhoC, ein Mitglied der Ras-homologen Proteinfamilie, in dieser Studie als heraufreguliert in HRS-Zellen identifiziert wurde (siehe Punkt 4.4.2). Ob der Verlust der oben genannten Inhibitoren in verstärkter Aktivität von RhoC in HRS-Zellen resultiert, muss noch geklärt werden.

4.4.2 Heraufregulierte Transkripte in der cHL-Zelllinie L1236 und ihre potenzielle Relevanz für die Pathogenese des HL

In dem Vergleich der SAGE-Profile (L1236 versus KZ-B-Zellen) wurden 178 Transkripte als mindestens um den Faktor 5 in der cHL-Zelllinie L1236 heraufreguliert identifiziert. 46 dieser Gene, die als von größerem Interesse eingestuft wurden, sind in Tabelle 3 in funktionellen Klassen dargestellt. 12 Gene aus diesen funktionellen Klassen, für die eine Expression in allen vier cHL-Zelllinien nachgewiesen wurde, werden im Folgenden diskutiert.

Einige der Transkripte mit erhöhter Expression in der L1236 repräsentieren (putative) Onkogene: RhoC ist ein Mitglied der Ras-homologen Proteinfamilie, die in Aktin-Umbauprozessen eine Rolle spielt. Rho-Proteine sind in der Progression des Zellzyklus, in Prozessen der Differenzierung und der Transformation involviert. Die Überexpression von RhoC steht in Zusammenhang mit der Tumorprogression von Melanomen und Eierstockkrebs (Clark et al., 2000; Horiuchi et al., 2003). Die erhöhte Expression von RhoC in primären HRS-Zellen (Tabelle 4) macht dieses Protein zu einem interessanten Kandidaten für weitere Studien. Für die Proteinphosphatase IVA (PTP4A oder Prl-3) wurde noch keine onkogene Wirkung nachgewiesen, für zwei homologe Verwandte jedoch, Prl-1 und Prl-2, wurde die Fähigkeit, Mausfibroblasten und epitheliale Pankreaszellen des Hamsters zu transformieren, aufgezeigt (Cates et al., 1996; Diamond et al., 1994). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass hohe Mengen an PTP4A mit einer erhöhten Metastasierung bei Darmkrebs korrelieren (Saha et al., 2001). Ein weiteres bekanntes Onkogen ist L-myc, ein Mitglied der Myc-Genfamilie.

Neben L-myc zeigen vier weitere Transkriptionsfaktoren eine erhöhte Expression in den cHL-Zelllinien, nämlich ATF-5, ATBF1, p21^{SNFT} und Jun-B. ATF-5 ist ein Mitglied der ATF/CREB-Proteinfamilie, reguliert vermutlich die cAMP induzierte Genexpression, und die Bindung von ATF-5 an cAMP-Antwort-DNA-Sequenzen (cAMP-responsive elements) konnte aufgezeigt werden (Peters et al., 2001). Ursprünglich wurde ATBF-1 als ein Repressor des Alpha-Fetoproteins isoliert (Morinaga et al., 1991); es reprimiert jedoch auch die transkriptionelle Aktivität von c-myc durch Protein-Protein-Interaktion (Kaspar et al., 1999). ATBF-1 spielt zudem eine Rolle in myogener und neuronaler Differenzierung (Berry et al., 2001; Miura et al., 1995). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der eine erhöhte Expression in der L1236 aufzeigt, ist p21^{SNFT}. Er reprimiert die Aktivität von AP-1, vermutlich durch die Bildung von Heterodimeren mit c-Jun (Iacobelli et al., 2000). Die Funktion von p21^{SNFT} in HRS-Zellen ist nicht klar, da zumindest einige

Zielgene von AP-1 in HRS-Zellen ausgeprägt werden und Inhibierung der AP-1-Funktion zu einer verminderten Proliferation von cHL-Zelllinien führt (Shaulian und Karin, 2001). Jun-B, ein Transkriptionsfaktor mit einer leicht erhöhten Expression in der L1236-Zelllinie im Vergleich zu KZ-B-Zellen, ist ein Mitglied der basischen Leucin-Zipper-Proteinfamilie. Im Gegensatz zu c-Jun konnte bisher keine Transformationskapazität nachgewiesen werden (Shaulian und Karin, 2001). Es wurde sogar gezeigt, daß Jun-B die Proliferation und Transformation von B-Zelllinien hemmen kann (Szremska et al., 2003).

IRAK-1 ist ein entscheidender Signalvermittler der IL-1-Rezeptor-Superfamilie (IL-1, IL-18 und die Toll-like-Rezeptoren). Das IL-1-Signal übernimmt eine wichtige Funktion in Immunreaktionen und inflammatorischen Prozessen und führt zu einer Aktivierung von NF- κ B und AP-1 (Li et al., 2001). Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Heraufregulierung von IRAK-1 einen Beitrag zu der konstitutiven Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren in HRS-Zellen leistet (Bargou et al., 1997; Mathas et al., 2002). PRAME, ein klassisches Tumorantigen, das in allen vier cHL-Zelllinien ausgeprägt wird, wurde ursprünglich als ein Antigen auf Melanomzellen identifiziert, das durch cytotoxische T-Zellen erkannt werden kann (Ikeda et al., 1997). Eine Funktion von PRAME ist nicht bekannt, aber die fehlende Expression in Normalgewebe (niedrig in Testis exprimiert) macht es zu einem wertvollen Kandidaten für einen immuntherapeutischen Ansatz im cHL.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der SAGE-Analyse viele Gene identifiziert wurden, die eine erhöhte Expression in der Zelllinie L1236 im Vergleich mit ihrem nicht malignen Gegenstück, KZ-B-Zellen, aufweisen. Von Bedeutung ist, dass für zwölf dieser Gene die konsistente Heraufregulierung in allen analysierten cHL-Zelllinien und für drei dieser Gene auch die konsistente Ausprägung in primären HRS-Zellen aufgezeigt werden konnte. Von besonderem Interesse ist die Hochregulation diverser Transkriptionsfaktoren und Onkogene, die möglicherweise in die Transformation der HRS-Zellen involviert sind. Die Inaktivierung dieser Faktoren oder ihre ektopische Expression in anderen Lymphomzelllinien wird Aufschluss über ihre Funktion im cHL und ihren Nutzen als potenzielle therapeutische Zielproteine geben.

4.5 Genchip-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsprofile von cHL-Zelllinien mittels Genchips (Affymetrix) generiert. Als Vergleichsdaten dienten einerseits normale B-Zellpopulationen (naïve B-Zellen, KZ-B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen) und andererseits LCL bzw. diverse B-Zell-NHL. Die Vergleichspopulationen wurden von U. Klein (Columbia University, New York) zur Verfügung gestellt. Mit dieser Analyse sollten drei Hauptfragen geklärt werden: a) Gibt es so starke phänotypische Gemeinsamkeiten in cHL-Zelllinien, dass sie als eigene Entität erkannt werden, obwohl die phänotypische Heterogenität dieser Tumoren wohlbekannt ist? b) Ähneln HRS-Zellen ihren Vorläufern, den B-Zellen, und mit welcher B-Zellpopulation ist die Ähnlichkeit am größten? c) Lassen sich Gene identifizieren, die spezifisch und konsistent in HRS-Zellen ausgeprägt werden? Diese Fragen werden im Folgenden diskutiert.

4.5.1 Genchipdaten identifizieren cHL-Zelllinien als eine distinkte Lymphomentität mit eigenem Genexpressionsprofil

Mittels einer unsupervised Clusteringanalyse, in die alle Expressionsprofile eingingen, wurde ein hierarchischer Stammbaum errichtet. In dieser Analyse zeigte sich, dass cHL-Zelllinien mehr Ähnlichkeiten miteinander zeigen als mit einer der anderen verwendeten B-Zelllinien (Abbildung 6). Von besonderem Interesse ist hier, dass eine der analysierten cHL-Zelllinien einen T-Zellursprung aufweist (HDLM2), jedoch im Stammbaum nicht abseits der drei anderen cHL-Zelllinien liegt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Entwicklung von HRS-Zellen in ein Genexpressionsprofil mündet, das in großen Teilen unabhängig von der zellulären Herkunft der HRS-Zelle zu sein scheint. Daraus ergibt sich die interessante Möglichkeit, dass der zelluläre Ursprung, im Gegensatz zu den meisten anderen B-Zell-NHL, nicht der bestimmende Faktor für den Phänotyp der HRS-Zelle ist. Denkbar wäre, dass HRS-Zellen, ob von B- oder T-Lymphozyten abstammend, (die gleichen?) transformierende Prozesse durchlaufen, die in einer HRS-Zell-typischen Genexpressionssignatur resultieren. Es ist gut denkbar, dass ein Teil dieser Signatur durch einen Verlust der Zelllinienidentität (diskutiert unter 4.3) verursacht wird. Auch wenn Letzteres für die cHL-Fälle mit T-Zellursprung bisher nicht gezeigt wurde, so ist doch beschrieben, dass HRS-Zellen, die von einer T-Zelle abstammen, ebenfalls Verluste einiger zellspezifischer Marker

aufweisen (Seitz et al., 2000; Willenbrock et al., 2002) und sogar linienfremde Marker wie Pax-5 ektopisch ausdrücken können (Willenbrock et al., 2002).

4.5.2 cHL-Zelllinien zeigen eine Genexpressionssignatur „in-vitro-aktivierter B-Zellen“ und ähneln in diesem Aspekt LCL und ABC-DLCL

Die hierarchische Clusteringanalyse der cHL-Zelllinien und der verschiedenen B-Zell-NHL-Lymphomzelllinien bzw. LCL ergab zwei Hauptgruppen. Im Dendrogramm (Abbildung 6) wird eine Gruppe aus den BL- und den KZ-DLCL-Zelllinien gebildet, die andere umfasst die LCL, die cHL- und die ABC-DLCL-Zelllinien. Für das BL und das KZ-DLCL wird eine Abstammung von KZ-B-Zellen angenommen. Diese Theorie wird durch die Beobachtung unterstützt, dass beide Lymphome einen aktiven somatischen Hypermutationsprozess aufweisen (Chapman et al., 1995; Lossos et al., 2000). Die Einteilung der verschiedenen Zellpopulationen in die oben genannten zwei Hauptarme deutet darauf hin, dass HRS-Zellen, auch wenn sie von KZ-B-Zellen abstammen, keinen KZ-Phänotyp mehr aufweisen. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da das Fehlen von KZ-spezifischen Markern (Bcl-6, CD10) (Carbone et al., 1998; Dogan et al., 2000) und das Fehlen eines aktiven somatischen Hypermutationsprozesses bereits bekannt waren (Bräuninger et al., 1999a; Kanzler et al., 1996b; Marafioti et al., 2000). Es ist möglich, dass das Fehlen dieses KZ-Phänotyps Teil des Verlusts der B-Zellidentität als solche ist (in Punkt 4.3 diskutiert).

Bei weitem der größte Teil der Gene, die HL-Zelllinien, LCL, ABC-DLCL-Linien von BL-Linien und GC-DLCL-Linien unterscheiden, ist heraufreguliert in der ersten Gruppe (Abbildung 7). Die ursprüngliche Unterscheidung zwischen KZ-DLCL und ABC-DLCL wurde aufgrund der Ähnlichkeit dieser Lymphomsubtypen mit den Genexpressionssignaturen von KZ-B-Zellen und von in-vitro-aktivierten B-Zellen getroffen (siehe Einleitung) (Alizadeh et al., 2000). Interessant bei dieser Unterscheidung sind die Gene, welche diese Signaturen ausmachen. Während die KZ-Signatur erwartungsgemäß etliche KZ-spezifische Gene enthält, besteht die Signatur in-vitro-aktivierter B-Zellen hauptsächlich aus (nicht-B-Zell-spezifischen) generellen Aktivierungsmarkern (Alizadeh et al., 2000). Acht der heraufregulierten Gene sind Teil der ABC-Signatur. So lässt sich folgern, dass HRS-Zellen einen aktivierten Phänotyp aufweisen, der keinerlei Beziehung zu einem KZ-Phänotyp aufweist. Ein Teil dieses aktivierten Phänotyps basiert auf NF- κ B regulierten Genen, die in cHL-Linien, LCL und ABC-DLCL ausgeprägt werden, nämlich Cyclin D2, IRF-4/MUM1, CCR7, I κ B α und

cFLIP. Tatsächlich weisen alle diese drei Zellarten eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B auf (Bargou et al., 1997; Davis et al., 2001; Izumi und Kieff, 1997).

4.5.3 Identifizierung HRS-Zell-spezifischer Gene und ihre potenzielle Relevanz für die Pathogenese des HL

Um cHL-spezifisch ausgeprägte Gene zu identifizieren wurden in der "supervised" Analyse die vier cHL-Zelllinien mit allen anderen normalen und malignen B-Zellpopulationen verglichen. 27 Gene wurden als signifikant heraufreguliert in den cHL-Zelllinien identifiziert (Abbildung 8), von denen vier für ihre Expression in HRS-Zellen bereits bekannt waren, nämlich Fascin, TARC, TIMP1 und RANK (Fiumara et al., 2001; Oelmann et al., 2002; Pinkus et al., 1997; van den Berg et al., 1999). Für die restlichen 23 Gene war die Expression in HRS-Zellen nicht beschrieben. Da für viele von diesen Genen kodierte Proteine keine Antikörper erhältlich waren, konnte die Proteinexpression nur für IL-1R2, GATA-3, ABF1, GAS1 und Neogenin untersucht und für alle Proteine nachgewiesen werden. Um die Ausprägung in primären HRS-Zellen zu analysieren, wurde für fünf der Gene (PRAME, IPL, Fer, Rab13, EAR3) RT-PCR in primären HRS-Zellen durchgeführt und eine differentielle Expression aller analysierten Gene nachgewiesen (Tabelle 5). Dass sich die Ergebnisse für EBV⁺- nicht von denen für EBV⁻-cHL-Fälle unterscheiden, deutet daraufhin, dass die Ausprägung dieser fünf Gene nicht vom EBV-Status der Zellen beeinflusst ist. Des Weiteren konnten Transkripte dieser vier Gene ebenfalls in L&H-Zellen des LP-HL nachgewiesen werden. Die spezifische und konsistente Expression dieser 23 Gene in cHL-Zelllinien im Vergleich zu einer solch großen Anzahl an normalen und malignen Vergleichspopulationen wirft die Frage nach der Bedeutung dieser Gene für die Pathogenese des cHL auf.

Unter den 23 cHL-spezifischen Genen finden sich vier Transkriptionsfaktoren: GATA-3, ABF1, Nrf3 und EAR-3. GATA-3 ist ein Protein, welches normalerweise spezifisch in T- und NK-Zellen ausgeprägt wird. Es ist essenziell für die T-Zellentwicklung und involviert in die T_H2 Zytokinexpression (Kuo und Leiden, 1999). Eine Studie zeigte zwar das Fehlen von GATA-3 in cHL-Zelllinien (Hsu et al., 1996); in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch Proteinexpression von GATA-3 in einer Immunoblotanalyse in drei der vier cHL-Zelllinien nachgewiesen werden. Die ektopische Expression dieses Proteins gerade in den drei cHL-Zelllinien, die einen B-zellulären Ursprung aufweisen, unterstützt den Befund des aberranten Phänotyps von HRS-Zellen in Bezug auf linienspezifische

Marker. Zudem wurde gezeigt, daß GATA-3 die Expression von IL-13 induzieren kann (Lee et al., 2000), ein Zytokin, daß in HRS-Zellen hoch exprimiert ist. ABF-1 ist ein inhibitorisches Mitglied der bHLH-Proteinfamilie und konnte bisher nur in LCL und in in-vitro-aktivierten B-Zellen nachgewiesen werden (Massari et al., 1998). Andere inhibitorische bHLH Proteine, die Id-Proteine, gelten als Protoonkogene und spielen eine wichtige Rolle in Differenzierungsprozessen und Tumorigenese (Sikder et al., 2003). ABF-1 kann mit beiden Produkten des E2A-Gens, E12 und E47, Heterodimere bilden, und ihre Funktion inhibieren (Massari et al., 1998). In der Genchip-Analyse konnte Expression von E2A, einem essenziellen Regulator der gesamten B-Zellentwicklung (Kee et al., 2000), in allen cHL-Zelllinien nachgewiesen werden, sodass ABF-1 in HRS-Zellen eine inhibierende Funktion auf E12/E47 einnehmen könnte. Nrf3 gehört zu der Familie von Transkriptionsfaktoren mit einer Cap'n-collar-Typ basischen Leucin-Zipperdomäne (Kobayashi et al., 1999). Eine schwache Expression von Nrf3 wurde in diversen Gewebetypen nachgewiesen, unter anderem in Thymus und Milz (Kobayashi et al., 1999). Es bildet Heterodimere mit Maf-Proteinen und bindet an Maf-Erkennungselemente (MARE) in der DNA (Kobayashi et al., 1999). Der vierte Transkriptionsfaktor der eine erhöhte Expression in cHL-Zelllinien aufweist ist EAR-3, ein transkriptioneller Repressor, der zu der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie gehört (Tsai und Tsai, 1997). Ear-3 ist während der Entwicklung im zentralen Nervensystem exprimiert und inhibiert dort die durch Hormone bedingte Genaktivierung (Tsai und Tsai, 1997). Die Funktion dieses Transkriptionsfaktors in cHL-Zelllinien ist unklar.

Die Tyrosinkinase Fer ist ubiquitär ausgeprägt, zeigt aber eine signifikante Heraufregulation in cHL-Zelllinien (Abbildung 8). Diese Kinase aktiviert den Transkriptionsfaktor STAT-3 (Priel-Halachmi et al., 2000), für den eine konstitutive Aktivität in HRS-Zellen nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 2001; Kube et al., 2001). Es wäre denkbar, dass die verstärkte Expression von Fer an dieser Aktivierung beteiligt ist.

Ein weiteres Gen, welches Deregulation in cHL-Zelllinien zeigt, ist IPL, ein genomisch geprägtes Gen, das normalerweise nur in der Plazenta stark ausgeprägt wird (Qian et al., 1997). Eine Funktion von IPL ist bis jetzt nicht bekannt; ein stark homologes Gen in der Maus ist jedoch essenziell für die Ausprägung von Fas/CD95 (Qian et al., 1997). Dies könnte auf eine Funktion von IPL in der Apoptose hindeuten. Rab13 ist eine Ras-assoziierte kleine GTPase, die eine Rolle in der Vesikelbewegung einnimmt (Novick und Zerial, 1997). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Herunterregulation

einiger Moleküle (in der cHL-Zelllinie L1236), die inhibitorisch auf die Aktivität kleiner GTPasen wirken (siehe Punkt 4.4.1). Das Tumorantigen PRAME, welches auch in der SAGE-Analyse identifiziert wurde, könnte möglicherweise ein immuntherapeutisches Ziel in der Therapie des cHL darstellen.

4.5.4 Implikationen für die Pathogenese, Diagnose und Behandlung des cHL

Durch den Vergleich der Genexpressionsprofile der cHL-Zelllinien mit normalen und malignen B-Zellpopulationen konnten Gene identifiziert werden, die eine spezifische Heraufregulation in cHL-Zelllinien aufweisen. Für alle analysierten Gene liess sich die Expression in primären Zellen nachweisen. Erstaunlicherweise konnten vier dieser Marker nicht nur in den HRS-Zellen des cHL, sondern auch in den L&H-Zellen des LP-HL nachgewiesen werden (Tabelle 5). Dies war keineswegs erwartet, da etliche Unterschiede in der Genexpression in der vermuteten zellulären Abstammung und in dem klinischen Verlauf zwischen den beiden Tumorentitäten bekannt sind (Hansmann et al., 1999; Küppers, 2002) Die hier vorliegenden RT-PCR-Daten, die die Expression von hochspezifischen Markern in beiden Subentitäten aufzeigt, sprechen für eine deutlich nähere Verwandtschaft des klassischen und des LP-HL, als vorher angenommen.

Von besonderem Interesse für die Pathogenese des cHL könnte die spezifische Expression von vier Transkriptionsfaktoren sein. Folgestudien, die die Inaktivierung dieser Transkriptionsfaktoren bzw. die Identifizierung der Zielgene ermöglichen, könnten wertvolle Einblicke in die Funktion dieser Transkriptionsfaktoren im HL geben. Die hier identifizierten HRS-Zellmarker könnten auch zur Differenzialdiagnose des HL dienen, welche in manchen Fällen immer noch Schwierigkeiten bereitet (Weiss 1999). Während 90% der Patienten, die an einem HL erkranken, mit den heutigen Behandlungen eine gute Prognose aufweisen, sprechen 10% der Patienten nicht auf die Therapie an (Mauch et al., 1999). Folglich besteht trotz der großen Behandlungserfolge ein Bedarf an prognostischen Markern, mit denen sich die Fälle mit einer schlechten Prognose identifizieren lassen. Die hier identifizierten HL-spezifischen Marker sind interessante Kandidaten für prognostische Marker, von denen einige, z.B. PRAME, zudem wertvolle immuntherapeutische Ziele im HL darstellen könnten .

Zusammenfassend hat die Genchip-Analyse aufgezeigt, dass a) HL-Zelllinien eine distinkte Entität repräsentieren und dass diese Ähnlichkeit der Genexpressionsprofile unabhängig von dem zellulären Ursprung der HRS-Zellen ist; b) cHL-Zelllinien

Ähnlichkeiten zu LCL und zu ABC-DLCL aufweisen. Dies weist auf einen aktivierten B-Zellphänotyp hin, und c) über 20 Gene wurden identifiziert, die spezifisch in HRS-Zellen heraufreguliert sind. Diese Gene nehmen vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese des HL ein.

4.6 Ausblick

In der SAGE und in der Genchipanalyse wurden Gene identifiziert, die potenziell eine wichtige Rolle in der Pathogenese des HL einnehmen. Die Relevanz dieser Marker als prognostische und diagnostische Marker konnte bisher aufgrund des Fehlens funktioneller Antikörper kaum evaluiert werden. Wir haben kürzlich polyklonale Antikörper gegen drei dieser Proteine (Fer, RhoC, ABF-1) herstellen lassen (Eurogentec) um immunhistochemische Färbungen zu etablieren. Die ersten Ergebnisse der Immunoblotanalysen sehen allerdings nicht ermutigend aus, sodass unklar ist, ob diese Erwartung erfüllt werden kann. Dennoch sollten für die restlichen der hier identifizierten cHL-spezifischen Marker Antikörper generiert werden, um prognostische/diagnostische Anwendungen dieser Marker aufzudecken. Dies ist jedoch ein kostenintensives Projekt, da die Antikörper von Firmen generiert werden müssen.

Um die Relevanz der Gene für die Pathogenese des HL zu klären, sind funktionelle Analysen notwendig. Zum einen kann die Genfunktion „Hodgkin-spezifischer“ Gene in cHL-Zelllinien inhibiert und so ihre Funktion aufgedeckt werden, zum anderen ließe die „ektopische“ Expression dieser Gene in NHL-Zelllinien (z.B. BL) Aufschlüsse über die Funktion dieser Gene im cHL zu.

Zur Inhibierung der Genfunktion wäre die siRNA-Technik geeignet. Um siRNA-Experimente über einige Tage durchführen zu können, wäre die Vektorexpression von siRNAs in HL-Zelllinien notwendig. Um diese Experimente vorzubereiten wurde zunächst eine erfolgreiche Transfektionsmethode der cHL-Zelllinien etabliert. Während klassische Elektroporation und Systeme die auf Lipofektion basierten keine zufriedenstellende Ergebnisse lieferten, wurden mittels Elektroporation mit dem Amaxa-System (Amaxa) für die Zelllinien L428, L1236 und HDLM2 gute Transfektionseffizienzen erzielt. Darüberhinaus sind bereits einige Experimente mit einem EBNA1/OriP-basierten Vektorsystem (zur Verfügung gestellt von B. Jungnickel, GSF, München) in cHL-Zelllinien durchgeführt worden. Dieser Vektor verbleibt als episomales DNA-Moleküle in der Zellen, wird repliziert und an die Tochterzellen

weitergegeben, so daß ohne Antibiotikaselektion Experimente bis zu einer Woche und mehr möglich sind. Es wurde jedoch ein unspezifischer toxischer Effekt der siRNA-Expression auf unterschiedliche Zelllinien beobachtet, der physiologische Tests zur Proliferation oder Apoptosesensitivität sehr erschwert. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine zu hohe Expression der siRNA-Moleküle zurückzuführen, sodass zunächst das Vektorsystem verändert werden muss. Nach Etablierung eines geeigneten Vektorsystems wäre zunächst die Analyse des Einflusses von ABF-1, als inhibitorischer bHLH Transkriptionsfaktor, auf den B-Zellphänotyp der cH-Zelllinien sehr interessant. Erstaunlicherweise zeigt auch Id-2, ebenfalls ein inhibitorischer bHLH-Transkriptionsfaktor, dessen inhibitorische Wirkung auf die B-Zellidentität bereits bekannt ist (siehe Diskussion), eine Heraufregulierung in cHL-Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Eine Hemmung dieser beiden Faktoren sollte Aufschluß darüber geben, ob sie Einfluss auf die B-Zellidentität in HRS-Zellen nehmen. Eine Inhibierung speziell der Hodgkin-spezifischen Transkriptionsfaktoren würde zudem die Identifizierung der Zielgene in cHL-Zelllinien mittels Genchipanalyse erlauben.

Als weiterer Ansatz wird die ektopische Expression einiger cHL-spezifischer Gene in LCL oder B-Zell-NHL angestrebt. So gäbe die ektopische Ausprägung der oben beschriebenen inhibitorischen bHLH Faktoren Aufschluß über ihre Auswirkung auf den B-Zell-Differenzierungsstatus von B-Zell-NHL. Weiterhin könnte generell die Expression der Hodgkin-spezifischen Marker in B-Zell-NHL Aufschluss über die Funktion dieser Moleküle im cHL geben.

Ein geeignetes Tiermodell für das cHL wäre von großem Wert für die weitere Forschung an diesem Lymphom. In den oben beschriebenen Studien sollen Kandidatengene identifiziert werden, die spezifisch zur Ausbildung des cHL beitragen. Mit dem Wissen um solche Kandidatengene wäre es möglich transgene Mäuse zu generieren, mit dem Ziel ein geeignetes Tiermodell für das cHL zu entwickeln.

Zurzeit wird zudem die Etablierung einer Methode betrieben, die es ermöglicht, die RNA primärer HRS-Zellen linear zu vermehren, um eine Genchip-Analyse zu ermöglichen (diese Arbeiten werden von V. Distler am Institut für Pathologie, Frankfurt am Main durchgeführt). Die Analyse primärer HRS-Zellen wird entscheidende Aufschlüsse über den Einfluss der zellulären Umgebung geben (welcher in den HL-Zelllinien naturgemäß fehlt) und Unterschiede zu den Genexpressionsprofilen der Zelllinien aufdecken. Zudem wäre es damit zum ersten Mal möglich die Genexpressionsprofile von cHL mit denen von LP-HL-Fällen zu vergleichen.

5 Zusammenfassung

Obwohl das klassische Hodgkin Lymphom (cHL) eines der häufigsten Lymphome in der westlichen Welt ist, stellt es immer noch eine maligne Erkrankung mit unverstandener Pathogenese dar. Da der Immunphänotyp der malignen Hodgkin/und Reed-Sternberg-(HRS)-Zellen keinen normalen hämatopoetischen Zellen ähnelt, war der zelluläre Ursprung dieses Lymphoms lange umstritten. Molekulare Analysen zeigten jedoch eine Abstammung von Keimzentrums (KZ)-B-Zellen (selten T-Zellen) auf. Neben der konstitutiven Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren und der autokrinen Stimulierung durch Zytokinrezeptoren sind die Mechanismen der malignen Transformation des cHL weitgehend unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden genomweite Genexpressionsprofile von cHL-Zelllinien und Vergleichspopulationen generiert und unter verschiedenen Aspekten analysiert. Um cHL-Zelllinien mit ihrem nicht-malignen Gegenstück, KZ-B-Zellen, zu vergleichen, wurde die Serielle Analyse der Genexpression (SAGE) verwendet. Die differenziell ausgeprägten Gene liefern Einblicke in potenzielle Mechanismen der Transformation. Eine Chip-basierte Analyse (Affymetrix) diente zum Vergleich von cHL-Zelllinien und normalen B-Zellen sowie B-Zell-Nicht-Hodgkin-Lymphomen. In diesem Ansatz wurden die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen B-Zelllinien dargestellt und Gene identifiziert, die hochspezifisch in HRS-Zellen ausgeprägt sind.

Es zeigte sich, dass HRS-Zellen, obwohl sie in der Regel von KZ-B-Zellen abstammen, ihre B-Zellidentität weitgehend verloren haben. Die Bedeutung der herunterregulierten B-Zell-spezifischen Signalmoleküle und die potenziellen Mechanismen für die verlorene B-Zellidentität werden diskutiert. Eine Verwandtschaftsanalyse der cHL-Zelllinien mit anderen B-Zelllinien zeigte Ähnlichkeiten zu aktivierten B-Zelllinien auf, die zum Teil auf einer konstitutiven Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B in diesen Zellen beruht. Desweiteren zeigten alle vier cHL-Zelllinien grössere Ähnlichkeit zu sich selbst, als zu anderen B-Zelllinien. Sie wurden aufgrund ihrer Genexpression als eigene Entität, unabhängig von ihrer zellulären Herkunft (B- oder T-Zelle), gruppiert. Mittels beider Methoden (SAGE und Chip) wurden Gene identifiziert, die spezifisch in cHL-Zelllinien ausgeprägt sind. Die spezifische Expression in primären HRS-Zellen wurde mit RT-PCR für alle analysierten Gene verifiziert. Die identifizierten HL-spezifischen Marker (z.B. Onkogene, Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren) vermögen interessante Einblicke in potenzielle Mechanismen der Pathogenese zu geben. Zudem stellen einige dieser Gene mögliche diagnostische und/oder prognostische Marker für das HL dar.

Abstract

Despite the fact that classical Hodgkin's lymphoma (cHL) is one of the most frequent lymphomas in the Western world, it is still a malignancy of unknown pathogenesis. Since the immunophenotype of the malignant Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells cannot be attributed to any normal cell of the hematopoietic lineage, the origin of these has been controversially discussed, but molecular studies established their derivation from germinal center B cells (or rarely T cells). Apart from recent findings of constitutive activation of some transcription factors and autocrine stimulation by cytokine receptors, the mechanisms of malignant transformation in cHL still remain poorly understood.

In the present study genomewide gene expression profiles were generated and analysed regarding different aspects. To compare cHL cell lines with their non-malignant counterpart, germinal center B cells, the serial analysis of gene expression (SAGE) method was used. Differentially expressed genes should give insights into the mechanisms of transformation. A chip-based approach (Affymetrix) was used to compare cHL cell lines with normal B cells and B cell Non-Hodgkin-Lymphoma. In this approach the relationship of different B cell lines was analysed and genes specifically expressed in cHL cell lines were identified.

It turned out that HRS cells, although derived from germinal center B cells in most cases, have largely lost their B cell identity. The importance of the loss of B cell-specific signaling molecules and potential mechanisms for the lost B cell identity are discussed. Comparison of cHL cell lines with other B cell lines showed similarities between HL and activated B cell lines, which are partially based on the constitutive activation of the transcription factor NF κ B in these cells. Furthermore, all four cHL cell lines showed more similarities in gene expression pattern to each other than to any other B cell line investigated. They were grouped as a single entity independent of their cellular origin (T or B cell derived). Both methods (SAGE and arrays) identified genes which are specifically expressed in cHL cells. Specific expression in primary HRS cells was confirmed using RT-PCR for all genes analysed. The identified HL-specific markers (e.g. oncogenes, signal transduction molecules, transcription factors) give valuable insights into potential mechanisms of the pathogenesis of cHL. In addition some of these genes may represent diagnostic and/or prognostic markers of cHL.

6 Literatur

- Abelev, G. I. (2000). Differentiation mechanisms and malignancy, *Biochemistry (Mosc)* *65*, 107-116.
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature* *403*, 503-11.
- Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Niedobitek, G., and Stein, H. (1989). Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1- positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization, *Blood* *74*, 810-816.
- Anwar, F., and Wood, B. L. (2000). CD44H and CD44V6 expression in different subtypes of Hodgkin lymphoma, *Mod Pathol* *13*, 1121-7.
- Arguello, M., Sgarbanti, M., Hernandez, E., Mamane, Y., Sharma, S., Servant, M., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Disruption of the B-cell specific transcriptional program in HHV-8 associated primary effusion lymphoma cell lines, *Oncogene* *22*, 964-73.
- Armstrong, A. A., Shield, L., Gallagher, A., and Jarrett, R. F. (1998). Lack of involvement of known oncogenic DNA viruses in Epstein-Barr virus-negative Hodgkin's disease, *Br J Cancer* *77*, 1045-7.
- Aryee, D. N., Simonitsch, I., Mosberger, I., Kos, K., Mann, G., Schlogl, E., Potschger, U., Gadner, H., Radaszkiewicz, T., and Kovar, H. (1996). Variability of nm23-H1/NDPK-A expression in human lymphomas and its relation to tumour aggressiveness, *Br J Cancer* *74*, 1693-8.
- Bahler, D. W., and Levy, R. (1992). Clonal evolution of a follicular lymphoma: evidence for antigen selection, *Proc Natl Acad Sci USA* *89*, 6770-6774.
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., and *et al.* (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements, *Cell* *79*, 885-92.
- H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., and Dörken, B. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, *J Clin Invest* *100*, 2961-2969.
- Barrett, J., Birrer, M. J., Kato, G. J., Dosaka-Akita, H., and Dang, C. V. (1992). Activation domains of L-Myc and c-Myc determine their transforming potencies in rat embryo cells, *Mol Cell Biol* *12*, 3130-7.
- Barrios, L., Caballin, M. R., Miro, R., Fuster, C., Berrozpe, G., Subias, A., Batlle, X., and Egozcue, J. (1988). Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from untreated Hodgkin's patients. A possible evidence for chromosome instability, *Hum Genet* *78*, 320-324.
- Barth, T. F., Martin-Subero, J. I., Joos, S., Menz, C. K., Hasel, C., Mechttersheimer, G., Parwaresch, R. M., Lichter, P., Siebert, R., and Moeller, P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma, *Blood* *101*, 3681-6.
- Bastion, Y., Sebban, C., Berger, F., Felman, P., Salles, G., Dumontet, C., Bryon, P. A., and Coiffier, B. (1997). Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients, *J Clin Oncol* *15*, 1587-94.
- Becker-Herman, S., Lantner, F., and Shachar, I. (2002). Id2 negatively regulates B cell differentiation in the spleen, *J Immunol* *168*, 5507-13.
- Benharroch, D., Shemer-Avni, Y., Levy, A., Myint, Y. Y., Ariad, S., Rager, B., Sacks, M., and Gopas, J. (2003). New candidate virus in association with Hodgkin's disease, *Leuk Lymphoma* *44*, 605-10.
- Berry, F. B., Miura, Y., Mihara, K., Kaspar, P., Sakata, N., Hashimoto-Tamaoki, T., and Tamaoki, T. (2001). Positive and negative regulation of myogenic differentiation of C2C12 cells by isoforms of the multiple homeodomain zinc finger transcription factor ATBF1, *J Biol Chem* *276*, 25057-65.
- Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses, *Mol Immunol* *37*, 1141-9.
- Bolin, L. M., McNeil, T., Lucian, L. A., DeVaux, B., Franz-Bacon, K., Gorman, D. M., Zurawski, S., Murray, R., and McClanahan, T. K. (1997). HNMP-1: a novel hematopoietic and neural membrane protein differentially regulated in neural development and injury, *J Neurosci* *17*, 5493-502.
- Boutros, M., and Mlodzik, M. (1999). Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways, *Mech Dev* *83*, 27-37.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis, *Oncogene* *19*, 2474-88.
- Braeuninger, A., Küppers, R., Strickler, J. G., Wacker, H. H., Rajewsky, K., and Hansmann, M. L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells, *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 9337-9342.

- Bräuninger, A., Hansmann, M. L., Strickler, J. G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1999a). 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.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Spieker, T., Siebert, R., Strickler, J. G., Schlegelberger, B., Rajewsky, K., and Hansmann, M. L. (1999b). Molecular analysis of single B cells from T cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells, *Blood* **93**, 2679-2687.
- Bross, L., Fukita, Y., McBlane, F., Demolliere, C., Rajewsky, K., and Jacobs, H. (2000). DNA double-strand breaks in immunoglobulin genes undergoing somatic hypermutation, *Immunity* **13**, 589-97.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R. F., and Hay, R. T. (1999). Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκBα, *Oncogene* **18**, 3063-3070.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals, *Immunity* **9**, 405-411.
- Califano, A. (2000). SPLASH: structural pattern localization analysis by sequential histograms, *Bioinformatics* **16**, 341-357.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15524-9.
- Costello, D., Drexler, H. G., Falini, B., and Dalla-Favera, R. (1998). Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease, *Blood* **92**, 2220-2228.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gattei, V., Degan, M., Improta, S., Aldinucci, D., Canzonieri, V., Perin, T., Volpe, R., Gaidano, G., *et al.* (1997). Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease react with the plasma cell-specific monoclonal antibody B-B4 and express human syndecan-1, *Blood* **89**, 3787-3794.
- Cates, C. A., Michael, R. L., Stayrook, K. R., Harvey, K. A., Burke, Y. D., Randall, S. K., Crowell, P. L., and Crowell, D. N. (1996). Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases, *Cancer Lett* **110**, 49-55.
- Chapman, C. J., Mockridge, C. I., Rowe, M., Rickinson, A. B., and Stevenson, F. K. (1995). Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intraclonal heterogeneity, *Blood* **85**, 2176-2181.
- Chen, H., Centola, M., Altschul, S. F., and Metzger, H. (1998). Characterization of gene expression in resting and activated mast cells, *J Exp Med* **188**, 1657-68.
- Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F., and Hayward, S. D. (2001). Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors, *J Virol* **75**, 2929-2937.
- Chu, W. S., Aguilera, N. S., Wei, M. Q., and Abbondanzo, S. L. (1999). Antiapoptotic marker Bcl-X(L), expression on Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using a novel monoclonal marker, YTH-2H12, *Hum Pathol* **30**, 1065-1070.
- Chui, D. T., Hammond, D., Baird, M., Shield, L., Jackson, R., and Jarrett, R. F. (2003). Classical Hodgkin lymphoma is associated with frequent gains of 17q, *Genes Chromosomes Cancer* **38**, 126-36.
- Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., and Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC, *Nature* **406**, 532-5.
- Corcoran, M. M., Rasool, O., Liu, Y., Iyengar, A., Grander, D., Ibbotson, R. E., Merup, M., Wu, X., Brodyansky, V., Gardiner, A. C., *et al.* (1998). Detailed molecular delineation of 13q14.3 loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **91**, 1382-90.
- Cornall, R. J., Goodnow, C. C., and Cyster, J. G. (1999). Regulation of B cell antigen receptor signaling by the Lyn/CD22/SHP1 pathway, *Curr Top Microbiol Immunol* **244**, 57-68.
- Cossman, J., Annunziata, C. M., Barash, S., Staudt, L., Dillon, P., He, W. W., Ricciardi-Castagnoli, P., Rosen, C. A., and Carter, K. C. (1999). Reed-Sternberg cell genome expression supports a B-cell lineage, *Blood* **94**, 411-416.
- Cossman, J., Messineo, C., and Bagg, A. (1998). Reed-Sternberg cell: Survival in a hostile sea, *Lab Invest* **78**, 229-235.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., *et al.* (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia, *Blood* **94**, 1840-7.
- Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U., and Staudt, L. M. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells, *J Exp Med* **194**, 1861-74.
- Delabie, J., Chan, W. C., Weisenburger, D. D., and De Wolf-Peeters, C. (1995). The antigen-presenting cell function of Reed-Sternberg cells, *Leuk Lymphoma* **18**, 35-40.

- Delabie, J., Shipman, R., Bruggen, J., De Strooper, B., van Leuven, F., Tarcsay, L., Cerletti, N., Odink, K., Diehl, V., Bilbe, G., and et al. (1992). Expression of the novel intermediate filament-associated protein restin in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell lymphoma, *Blood* 80, 2891-2896.
- Diamond, R. H., Cressman, D. E., Laz, T. M., Abrams, C. S., and Taub, R. (1994). PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth, *Mol Cell Biol* 14, 3752-62.
- Dogan, A., Bagdi, E., Munson, P., and Isaacson, P. G. (2000). CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas, *Am J Surg Pathol* 24, 846-852.
- Drexler, H. G. (1992). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material, *Leuk Lymphoma* 8, 283-313.
- Drexler, H. G. (1993). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines, *Leuk Lymphoma* 9, 1-25.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14863-8.
- Ellis, P. A., Hart, D. N., Colls, B. M., Nimmo, J. C., MacDonald, J. E., and Angus, H. B. (1992). Hodgkin's cells express a novel pattern of adhesion molecules, *Clin Exp Immunol* 90, 117-123.
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H. D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., and Dörken, B. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells, *Blood* 94, 3129-3134.
- Engels, N., Merchant, M., Pappu, R., Chan, A. C., Longnecker, R., and Wienands, J. (2001). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module, *J Exp Med* 194, 255-64.
- Fagarasan, S., and Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology, *Science* 290, 89-92.
- Falini, B., Fizzotti, M., Pileri, S., Liso, A., Pasqualucci, L., and Flenghi, L. (1997). Bcl-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissues, *Ann Oncol* 8, 101-104.
- Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., Gambacorta, M., Pacini, R., Alunni, C., Natali-Tanci, L., Ugolini, B., et al. (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells, *Blood* 95, 2084-2092.
- Falzetti, D., Crescenzi, B., Matteucci, C., Falini, B., Martelli, M. F., Van Den Berghe, H., and Mecucci, C. (1999). Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease, *Haematologica* 84, 298-305.
- Fisher, R. I. (2003). Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment, *Semin Oncol* 30, 3-9.
- Fitzsimmons, D., Hodsdon, W., Wheat, W., Maira, S. M., Wasylyk, B., and Hagman, J. (1996). Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter, *Genes Dev* 10, 2198-2211.
- Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A. M., Cabanillas, F., Aggarwal, B. B., and Younes, A. (2001). Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines, *Blood* 98, 2784-90.
- Fonatsch, C., Gradl, G., and Rademacher, J. (1989). Genetics of Hodgkin's lymphoma, *Recent Results Cancer Res* 117, 35-49.
- Foss, H. D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., and Stein, H. (1999). Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin, *Blood* 94, 3108-3113.
- Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., and Chan, A. C. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation, *Immunity* 9, 93-103.
- Fusenig, N. E., Breitmurtel, D., Boukamp, P., Tomakidi, P., and Stark, H. J. (1995). Differentiation and tumor progression, *Recent Results Cancer Res* 139, 1-19.
- Fyfe, G., Cebra-Thomas, J. A., Mustain, E., Davie, J. M., Alley, C. D., and Nahm, M. H. (1987). Subpopulations of B lymphocytes in germinal centers, *J Immunol* 139, 2187-94.
- Gaidano, G., Pasqualucci, L., Capello, D., Berra, E., Deambrogi, C., Rossi, D., Maria Larocca, L., Gloghini, A., Carbone, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma, *Blood* 102, 1833-41.
- Garcia, J. F., Camacho, F. I., Morente, M., Fraga, M., Montalban, C., Alvaro, T., Bellas, C., Castano, A., Diez, A., Flores, T., et al. (2003). Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays, *Blood* 101, 681-9.

- Garcia, J. F., Villuendas, R., Algara, P., Saez, A. I., Sanchez-Verde, L., Martinez-Montero, J. C., Martinez, P., and Piris, M. A. (1999). Loss of p16 protein expression associated with methylation of the p16INK4A gene is a frequent finding in Hodgkin's disease, *Lab Invest* 79, 1453-9.
- Garcia, J. F., Villuendas, R., Sanchez-Beato, M., Sanchez-Aguilera, A., Sanchez, L., Prieto, I., and Piris, M. A. (2002). Nucleolar p14(ARF) overexpression in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma: absence of p14(ARF)/Hdm2 complexes is associated with expression of alternatively spliced Hdm2 transcripts, *Am J Pathol* 160, 569-78.
- Garg, A., and Aggarwal, B. B. (2002). Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development, *Leukemia* 16, 1053-68.
- Gaulard, P., d'Agay, M. F., Peuchmaur, M., Brousse, N., Gisselbrecht, C., Solal-Celigny, P., Diebold, J., and Mason, D. Y. (1992). Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma, *Am J Pathol* 140, 1089-95.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins, *EMBO J* 18, 3064-3073.
- Gires, O., Zimber-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule, *Embo J* 16, 6131-40.
- Gisselsson, D. (2002). Tumour morphology--interplay between chromosome aberrations and founder cell differentiation, *Histol Histopathol* 17, 1207-12.
- Gold, M. R. (2002). To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor, *Trends Pharmacol Sci* 23, 316-24.
- Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules, *Mol Pathol* 52, 189-96.
- Goossens, T., Klein, U., and Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogene translocations and heavy chain disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2463-2468.
- Gras, M. P., Laabi, Y., Linares-Cruz, G., Blondel, M. O., Rigaut, J. P., Brouet, J. C., Leca, G., Haguenaer-Tsapis, R., and Tsapis, A. (1995). BCMAp: an integral membrane protein in the Golgi apparatus of human mature B lymphocytes, *Int Immunol* 7, 1093-106.
- Gravel, S., Delsol, G., and Al Saati, T. (1998). Single-cell analysis of the t(14;18)(q32;p21) chromosomal translocation in Hodgkin's disease demonstrates the absence of this transformation in neoplastic Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Blood* 91, 2866-2874.
- Greaves, M. F. (1986). Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes, *Science* 234, 697-704.
- Greenbaum, S., and Zhuang, Y. (2002). Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins, *Semin Immunol* 14, 405-14.
- Gregory, C. D., Tursz, T., Edwards, C. F., Tetaud, C., Talbot, M., Caillou, B., Rickinson, A. B., and Lipinski, M. (1987). Identification of a subset of normal B cells with a Burkitt's lymphoma (BL)-like phenotype, *J Immunol* 139, 313-8.
- Guzman-Rojas, L., Sims, J. C., Rangel, R., Guret, C., Sun, Y., Alcocer, J. M., and Martinez-Valdez, H. (2000). PRELI, the human homologue of the avian px19, is expressed by germinal center B lymphocytes, *Int Immunol* 12, 607-12.
- Guzman-Rojas, L., Sims-Mourtada, J. C., Rangel, R., and Martinez-Valdez, H. (2002). Life and death within germinal centres: a double-edged sword, *Immunology* 107, 167-75.
- Hacker, C., Kirsch, R. D., Ju, X. S., Hieronymus, T., Gust, T. C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S. M., Rose-John, S., Yokota, Y., and Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development, *Nat Immunol* 4, 380-6.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., and Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 94, 1848-54.
- Hansmann, M.-L., Weiss, L. M., Stein, H., Harris, N. L., and Jaffe, E. S. (1999). Pathology of lymphocyte
- Hanson, E. M., Dickensheets, H., Qu, C. K., Donnelly, R. P., and Keegan, A. D. (2003). Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor alpha, the tyrosine phosphatase SHP-1, and the proteasome, *J Biol Chem* 278, 3903-11.
- Harris, N. L. (1999). Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading, *Semin Hematol* 36, 220-232.
- Herbst, H., Foss, H. D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathangelou, A., Niedobitek, G., and Stein, H. (1996). Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease, *Blood* 87, 2918-2929.

- Hertel, C. B., Zhou, X. G., Hamilton-Dutoit, S. J., and Junker, S. (2002). Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma, *Oncogene* *21*, 4908-20.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H., and Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity, *J Exp Med* *196*, 605-17.
- Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Blood* *97*, 2798-2807.
- Hjalgrim, H., Askling, J., Sorensen, P., Madsen, M., Rosdahl, N., Storm, H. H., Hamilton-Dutoit, S., Eriksen, L. S., Frisch, M., Ekbo, A., and Melbye, M. (2000). Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis, *J Natl Cancer Inst* *92*, 1522-8.
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen, *Med Chir Trans* *17*, 68-114.
- Hopken, U. E., Foss, H. D., Meyer, D., Hinz, M., Leder, K., Stein, H., and Lipp, M. (2002). Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs, *Blood* *99*, 1109-16.
- Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis, *Immunity* *14*, 779-790.
- Horiuchi, A., Imai, T., Wang, C., Ohira, S., Feng, Y., Nikaido, T., and Konishi, I. (2003). Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma, *Lab Invest* *83*, 861-70.
- Hsu, P. L., Xie, S. S., and Hsu, S. M. (1996). Absence of T-cell- and B-cell-specific transcription factors TCF-1, GATA-3, and BSAP in Hodgkin's Reed-Sternberg cells, *Lab Invest* *74*, 395-405.
- Huang, G., Yan, Q., Wang, Z., Chen, X., Zhang, X., Guo, Y., and Li, J. J. (2002a). Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease, *Int J Oncol* *21*, 31-6.
- Huang, J. Z., Sanger, W. G., Greiner, T. C., Staudt, L. M., Weisenburger, D. D., Pickering, D. L., Lynch, J. C., Armitage, J. O., Warnke, R. A., Alizadeh, A. A., *et al.* (2002b). The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile, *Blood* *99*, 2285-90.
- Iacobelli, M., Wachsmann, W., and McGuire, K. L. (2000). Repression of IL-2 promoter activity by the novel basic leucine zipper p21SNFT protein, *J Immunol* *165*, 860-8.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor, *Immunity* *6*, 199-208.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C. D., Aitken, K., *et al.* (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling, *Nature* *409*, 349-354.
- Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature* *388*, 190-5.
- Islam, K. B., Rabbani, H., Larsson, C., Sanders, R., and Smith, C. I. (1995). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a human lymphoid tyrosine kinase related to murine Blk, *J Immunol* *154*, 1265-72.
- Izumi, K. M., and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12592-7.
- Jacob, J., and Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers, *J Exp Med* *176*, 679-87.
- Jaffe, E., Harris, N. L., Stein, H., and Vardiman, J. W. (2001). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. (Lyon, France, IARC press).
- Jarrett, R. F., and MacKenzie, J. (1999). Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease, *Semin Hematol* *36*, 260-269.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R., and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch, *Nature* *377*, 355-8.
- Joos, S., Küpper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Moller, P., Pfreundschuh, M., Trümper, L., and Lichter, P. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells, *Cancer Res* *60*, 549-552.

- Joos, S., Menz, C. K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trumper, L., Moller, P., Lichter, P., and Barth, T. F. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2, *Blood* 99, 1381-7.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H., and Dorken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma, *Blood* 99, 3398-3403.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.-L., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2000). Clonal deleterious mutations in the ikBa gene in the malignant cells in Hodgkin's disease, *J Exp Med* 191, 395-401.
- Kanavaros, P., Vlychou, M., Stefanaki, K., Rontogianni, D., Gaulard, P., Pantelidaki, E., Zois, M., Darivianaki, K., Georgoulas, V., Boulland, M. L., *et al.* (1999). Cytotoxic protein expression in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease, *Anticancer Res* 19, 1209-16.
- Kanzler, H., Hansmann, M. L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1996a). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient, *Blood* 87, 3429-3436.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M. L., and Rajewsky, K. (1996b). 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.
- Kapp, U., Wolf, J., Hummel, M., Pawlita, M., von Kalle, C., Dallenbach, F., Schwonzen, M., Krueger, G. R. F., Müller-Lantzsch, N., Fonatsch, C., *et al.* (1993). Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice, *Blood* 82, 1247-1256.
- Kapp, U., Yeh, W. C., Patterson, B., Elia, A. J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipsword, M., Williams, A., Mirtsos, C., *et al.* (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *J Exp Med* 189, 1939-1946.
- Kashkar, H., Kronke, M., and Jurgensmeier, J. M. (2002). Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis, *Cell Death Differ* 9, 750-7.
- Kaspar, P., Dvorakova, M., Kralova, J., Pajer, P., Kozmik, Z., and Dvorak, M. (1999). Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein, *J Biol Chem* 274, 14422-8.
- Kee, B. L., Quong, M. W., and Murre, C. (2000). E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development, *Immunol Rev* 175, 138-149.
- Kenzelmann, M., and Mühlemann, K. (1999). Substantially enhanced cloning efficiency of SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) by adding a heating step to the original protocol, *Nucleic Acids Res* 27, 917-918.
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1996). Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis?, *Immunity* 5, 173-179.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade, *Embo J* 16, 6478-85.
- Kile, B. T., Nicola, N. A., and Alexander, W. S. (2001). Negative regulators of cytokine signaling, *Int J Hematol* 73, 292-298.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor, *EMBO J* 17, 1700-9.
- Klein, U., Ghoghini, A., Gaidano, G., Chadburn, A., Cesarman, E., Dalla-Favera, R., and Carbone, A. (2003a). Gene expression profile analysis of AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL) suggests a plasmablastic derivation and identifies PEL-specific transcripts, *Blood* 101, 4115-21.
- Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Braeuninger, A., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells, *Immunol Rev* 162, 261-280.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Keller, J. L., Haddad, J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003b). Transcriptional analysis of the B-cell germinal center reaction, *ProcNatlAcadSci USA* *in press*.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Mattioli, M., Cattoretti, G., Husson, H., Freedman, A., Inghirami, G., Cro, L., Baldini, L., *et al.* (2001). Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells, *J Exp Med* 194, 1625-1638.
- Kobayashi, A., Ito, E., Toki, T., Kogame, K., Takahashi, S., Igarashi, K., Hayashi, N., and Yamamoto, M. (1999). Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3, *J Biol Chem* 274, 6443-6452.
- Kojiro, M., and Nakashima, O. (1999). Histopathologic evaluation of hepatocellular carcinoma with special reference to small early stage tumors, *Semin Liver Dis* 19, 287-296.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP, *Mol Cell Biol* 12, 2662-72.

- Krenacs, L., Himmelmann, A. W., Quintanilla-Martinez, L., Fest, T., Riva, A., Wellmann, A., Bagdi, E., Kehrl, J. H., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1998). Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas, *Blood* 92, 1308-1316.
- Krenacs, L., Wellmann, A., Sorbara, L., Himmelmann, A. W., Bagdi, E., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1997). Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin, *Blood* 89, 980-9.
- Kroese, F. G., Timens, W., and Nieuwenhuis, P. (1990). Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function, *Curr Top Pathol* 84 (Pt 1), 103-48.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P. C., Diehl, V., and Tesch, H. (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines, *Blood* 98, 762-770.
- Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998). Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11963-11968.
- Kuo, C. T., and Leiden, J. M. (1999). Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function, *Annu Rev Immunol* 17, 149-87.
- Küpper, M., Joos, S., Von Bonin, F., Daus, H., Pfreundschuh, M., Lichter, P., and Trümper, L. (2001). MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies, *Br J Haematol* 112, 768-75.
- Küppers, R. (2002). Molecular biology of Hodgkin's lymphoma, *Adv Cancer Res* 84, 277-312.
- Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas, *Oncogene* 20, 5580-94.
- Küppers, R., Hansmann, M. L., and Rajewsky, K. (1998). Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease, *Ann Oncol* 9, S17-20.
- Küppers, R., and Rajewsky, K. (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease, *Annu Rev Immunol* 16, 471-493.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L. (1994). 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 USA* 91, 10962-10966.
- Küppers, R., Sousa, A. B., Baur, A. S., Strickler, J. G., Rajewsky, K., and Hansmann, M. L. (2001). 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.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H., and Honjo, T. (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis, *J Biol Chem* 274, 7238-44.
- Kuzu, I., Delsol, G., Jones, M., Gatter, K. C., and Mason, D. Y. (1993). Expression of the Ig-associated heterodimer (mb-1 and B29) in Hodgkin's disease, *Histopathol* 22, 141-144.
- Lah, T. T., and Kos, J. (1998). Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis, *Biol Chem* 379, 125-30.
- Lam, K. P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death, *Cell* 90, 1073-1083.
- Lee, H. J., Takemoto, N., Kurata, H., Kamogawa, Y., Miyatake, S., O'Garra, A., and Arai, N. (2000). GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells, *J Exp Med* 192, 105-15.
- Li, X., Commune, M., Jiang, Z., and Stark, G. R. (2001). IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4461-5.
- Liberg, D., and Sigvardsson, M. (1999). Transcriptional regulation in B cell differentiation, *Crit Rev Immunol* 19, 127-153.
- Limpens, J., Stad, R., Vos, C., de Vlaam, C., de Jong, D., van Ommen, G. J., Schuurung, E., and Kluin, P. M. (1995). Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals, *Blood* 85, 2528-36.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF, *Nature* 376, 263-7.
- Lindstrom, M. S., and Wiman, K. G. (2002). Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma, *Semin Cancer Biol* 12, 381-7.

- Lipinski, M., Nudelman, E. D., Wiels, J., and Parsons, M. (1982). Monoclonal antibody defining a Burkitt's lymphoma-associated antigen detects carbohydrate on neutral glycolipid, *J Immunol* *129*, 2301-4.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., and Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nat Genet* *21*, 20-4.
- Liu, Y. J., Johnson, G. D., Gordon, J., and MacLennan, I. C. (1992). Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses, *Immunol Today* *13*, 17-21.
- Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., and MacLennan, I. C. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres, *Nature* *342*, 929-931.
- Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y., and MacLennan, I. C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens, *Eur J Immunol* *21*, 2951-2962.
- Lossos, I. S., Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Chan, W. C., Brown, P. O., Botstein, D., Staudt, L. M., and Levy, R. (2000). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10209-13.
- Loveys, D. A., Streiff, M. B., and Kato, G. J. (1996). E2A basic-helix-loop-helix transcription factors are negatively regulated by serum growth factors and by the Id3 protein, *Nucleic Acids Res* *24*, 2813-20.
- MacLennan, I. C., Liu, Y. J., and Johnson, G. D. (1992). Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses, *Immunol Rev* *126*, 143-161.
- Madry, C., Laabi, Y., Callebaut, I., Roussel, J., Hatzoglou, A., Le Coniat, M., Mornon, J. P., Berger, R., and Tsapis, A. (1998). The characterization of murine BCMA gene defines it as a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, *Int Immunol* *10*, 1693-702.
- Maggio, E. M., Stekelenburg, E., Van den Berg, A., and Poppema, S. (2001). TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus, *Int J Cancer* *94*, 60-66.
- Maggio, E. M., Van Den Berg, A., de Jong, D., Diepstra, A., and Poppema, S. (2003). Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma, *Am J Pathol* *162*, 29-35.
- Maier, H., and Hagman, J. (2002). Roles of EBF and Pax-5 in B lineage commitment and development, *Semin Immunol* *14*, 415-22.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P. G., Pileri, S., and Stein, H. (1997). Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells, *N Engl J Med* *337*, 453-458.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.-D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., and Stein, H. (2000). Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription, *Blood* *95*, 1443-1450.
- Marie-Cardine, A., Kirchgessner, H., Bruyins, E., Shevchenko, A., Mann, M., Autschbach, F., Ratnofsky, S., Meuer, S., and Schraven, B. (1999). SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation, *J Exp Med* *189*, 1181-94.
- Martin, F., and Kearney, J. F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets, *Curr Opin Immunol* *13*, 195-201.
- Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2, *J Exp Med* *183*, 971-977.
- Masat, L., Caldwell, J., Armstrong, R., Khoshnevisan, H., Jessberger, R., Herndier, B., Wabl, M., and Ferrick, D. (2000). Association of SWAP-70 with the B cell antigen receptor complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 2180-4.
- Massari, M. E., Rivera, R. R., Volland, J. R., Quong, M. W., Breit, T. M., van Dongen, J. J., de Smit, O., and Murre, C. (1998). Characterization of ABF-1, a novel basic helix-loop-helix transcription factor expressed in activated B lymphocytes, *Mol Cell Biol* *18*, 3130-3139.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mechta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., and Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappaB, *EMBO J* *21*, 4104-4113.
- Mauch, P. M., Connors, J. M., Pavlovsky, S., and Dühmke, E. (1999). Treatment of favorable prognosis stage I-II Hodgkin's disease. In *Hodgkin's disease*, P. M. Mauch, J. O. Armitage, V. Diehl, R. T. Hoppe, and L. M. Weiss, eds. (Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins), pp. 435-458.
- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M., and Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps, *Cell* *83*, 387-95.

- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities, *Embo J* 15, 5647-58.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M. C. (2000). Antibody regulation of B cell development, *Nat Immunol* 1, 379-85.
- Meggetto, F., Muller, C., Henry, S., Selves, J., Mariame, B., Brousset, P., Saati, T. A., and Delsol, G. (1996). Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in severe combined immunodeficient mice transplanted with Hodgkin's disease lymph nodes: implications of EBV-positive bystander B lymphocytes rather than EBV-infected Reed-Sternberg cells, *Blood* 87, 2435-2442.
- Merchant M, Swart R, Katzman RB, Ikeda M, Ikeda A, Longnecker R, Dykstra ML, Pierce SK.(2001). The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function, *Int Rev Immunol* 20, 805-35.
- Messineo, C., Jamerson, M. H., Hunter, E., Braziel, R., Bagg, A., Irving, S. G., and Cossman, J. (1998). Gene expression by single Reed-Sternberg cells: pathways of apoptosis and activation, *Blood* 91, 2443-2451.
- Metkar, S. S., Naresh, K. N., Redkar, A. A., Soman, C. S., Advani, S. H., and Nadkarni, J. J. (1999). Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease, *Leuk Lymphoma* 33, 521-530.
- Migliazza, A., Bosch, F., Komatsu, H., Cayanis, E., Martinotti, S., Toniato, E., Guccione, E., Qu, X., Chien, M., Murty, V. V., *et al.* (2001). Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 97, 2098-104.
- Miura, I., Tamura, A., Taniwaki, M., Nakamura, S., Nakamine, H., Yoshino, T., Ichinohasama, R., and Miura, A. B. (2000). Detection of t(14; 18)(q32;q21) in hyperdiploid cells by fluorescence in situ hybridization in a patient with Hodgkin disease, *Cancer Genet Cytogenet* 123, 97-101.
- Miura, Y., Tam, T., Ido, A., Morinaga, T., Miki, T., Hashimoto, T., and Tamaoki, T. (1995). Cloning and characterization of an ATBF1 isoform that expresses in a neuronal differentiation-dependent manner, *J Biol Chem* 270, 26840-8.
- Montesinos-Rongen, M., Roers, A., Küppers, R., Rajewsky, K., and Hansmann, M.-L. (1999). Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease, *Blood* 94, 1755-1760.
- Morinaga, T., Yasuda, H., Hashimoto, T., Higashio, K., and Tamaoki, T. (1991). A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers, *Mol Cell Biol* 11, 6041-9.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family, *Cell* 80, 389-399.
- Mueller, N. E., and Grufferman, S. (1999). The epidemiology of Hodgkin's Disease. In *Hodgkin's disease*, P. M. Mauch, J. O. Armitage, V. Diehl, R. T. Hoppe, and L. M. Weiss, eds. (Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins), pp. 61-78.
- Munoz, N., Davidson, R. J., Witthoff, B., Ericsson, J. E., and De-The, G. (1978). Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease, *Int J Cancer* 22, 10-13.
- Munro, J. M., Freedman, A. S., Aster, J. C., Gribben, J. G., Lee, N. C., Rhyhart, K. K., Banchereau, J., and Nadler, L. M. (1994). In vivo expression of the B7 costimulatory molecule by subsets of antigen-presenting cells and the malignant cells of Hodgkin's disease, *Blood* 83, 793-798.
- Müschen, M., Rajewsky, K., Bräuninger, A., Baur, A. S., Oudejans, J. J., Roers, A., Hansmann, M.-L., and Küppers, R. (2000a). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma, *J Exp Med* 191, 387-394.
- Müschen, M., Re, D., Bräuninger, A., Wolf, J., Hansmann, M. L., Diehl, V., Küppers, R., and Rajewsky, K. (2000b). Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Cancer Res* 60, 5640-5643.
- Nagy, M., Chapuis, B., and Matthes, T. (2002). Expression of transcription factors Pu.1, Spi-B, Blimp-1, BSAP and oct-2 in normal human plasma cells and in multiple myeloma cells, *Br J Haematol* 116, 429-35.
- Newcom, S. R., and Gu, L. (1995). Transforming growth factor beta 1 messenger RNA in Reed-Sternberg cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease, *J Clin Pathol* 48, 160-163.
- Niedobitek, G., Young, L. S., Lau, R., Brooks, L., Greenspan, D., Greenspan, J. S., and Rickinson, A. B. (1991). Epstein-Barr virus infection in oral hairy leukoplakia: virus replication in the absence of a detectable latent phase, *J Gen Virol* 72, 3035-3046.
- Novick, P., and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport, *Curr Opin Cell Biol* 9, 496-504.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5, *Nature* 401, 556-562.
- O'Grady, J. T., Stewart, S., Lowrey, J., Howie, S. E., and Krajewski, A. S. (1994). CD40 expression in Hodgkin's disease, *Am J Pathol* 144, 21-26.

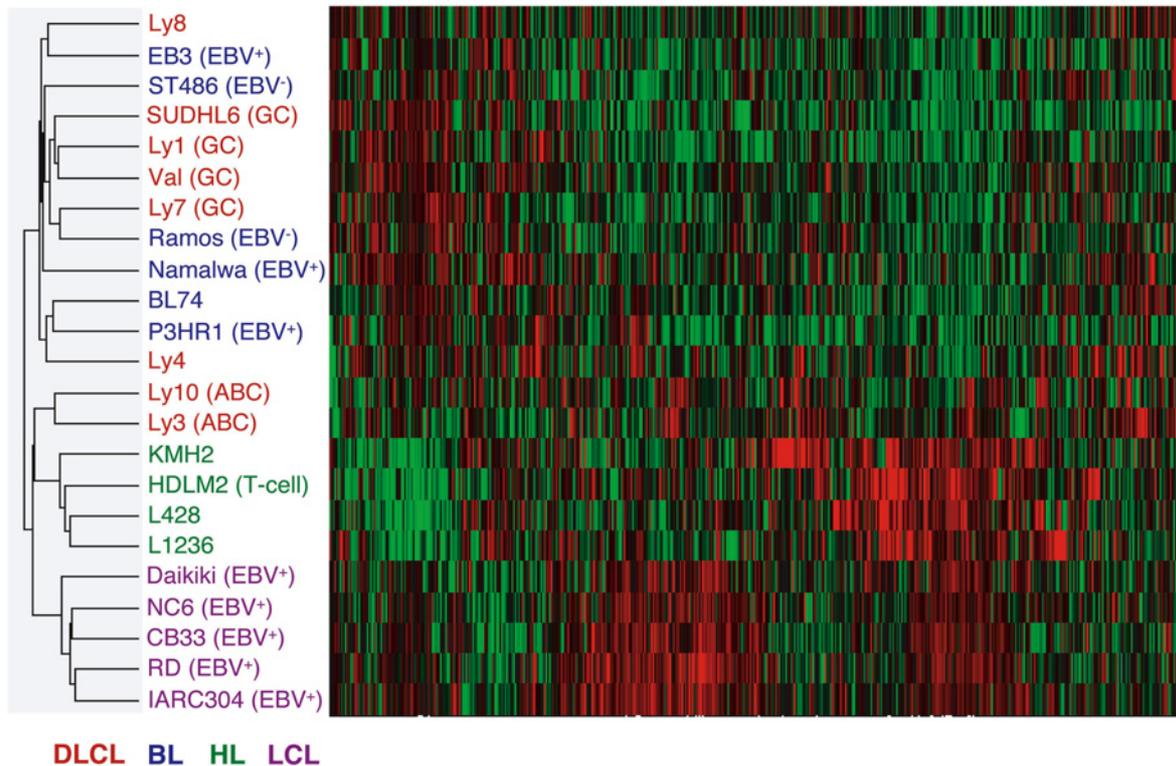
- Oelmann, E., Herbst, H., Zuhlsdorf, M., Albrecht, O., Nolte, A., Schmitmann, C., Manzke, O., Diehl, V., Stein, H., and Berdel, W. E. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells, *Blood* 99, 258-67.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination, *Science* 248, 1517-23.
- Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M., and Tarakhovskiy, A. (2000). The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells, *J Exp Med* 192, 23-29.
- Ohno, T., Stribley, J. A., Wu, G., Hinrichs, S. H., Weisenburger, D. D., and Chan, W. C. (1997). Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease, *N Engl J Med* 337, 459-465.
- Ohshima, K., Suzumiya, J., Akamatu, M., Takeshita, M., and Kikuchi, M. (1995). Human and viral interleukin-10 in Hodgkin's disease, and its influence on CD4+ and CD8+ T lymphocytes, *Int J Cancer* 62, 5-10.
- Oikawa, T., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Yamamoto, H., Kondoh, N., Hitomi, Y., and Hashimoto, Y. (1999). The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis, *Cell Death Differ* 6, 599-608.
- Oka, K., Mori, N., Haimoto, H., and Kato, K. (1990). Expression of enolases in T cell tumors and Hodgkin's disease, *Lab Invest* 63, 792-7.
- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C. P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway, *Mol Cell Biol* 18, 2230-9.
- Oscier, D. G., Thompsett, A., Zhu, D., and Stevenson, F. K. (1997). Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities, *Blood* 89, 4153-4160.
- Oshima, Y., and Puri, R. K. (2001). Suppression of an IL-13 autocrine growth loop in a human Hodgkin/Reed-Sternberg tumor cell line by a novel IL-13 antagonist, *Cell Immunol* 211, 37-42.
- Oudejans, J. J., Kummer, J. A., Jiwa, M., van der Valk, P., Ossenkoppele, G. J., Kluin, P. M., Kluin-Nelemans, J. C., and Meijer, C. J. (1996). Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease, *Am J Pathol* 148, 233-240.
- Papavasiliou, F. N., and Schatz, D. G. (2000). Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes, *Nature* 408, 216-21.
- Parnes, J. R., and Pan, C. (2000). CD72, a negative regulator of B-cell responsiveness, *Immunol Rev* 176, 75-85.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S. K., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11816-11821.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas, *Nature* 412, 341-6.
- Peattie, D. A., Harding, M. W., Fleming, M. A., DeCenzo, M. T., Lippke, J. A., Livingston, D. J., and Benasutti, M. (1992). Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10974-8.
- Peters, C. S., Liang, X., Li, S., Kannan, S., Peng, Y., Taub, R., and Diamond, R. H. (2001). ATF-7, a novel bZIP protein, interacts with the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase, *J Biol Chem* 276, 13718-26.
- Pinkus, G. S., Pinkus, J. L., Langhoff, E., Matsumura, F., Yamashiro, S., Mosialos, G., and Said, J. W. (1997). Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation?, *Am J Pathol* 150, 543-562.
- Pinkus, G. S., and Said, J. W. (1988). Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular - further evidence for a B cell derivation. L&H variants of Reed-Sternberg cells express L26, a pan B cell marker, *Am J Pathol* 133, 211-217.
- Poppema, S. (1996). Immunology of Hodgkin's disease, *Baillieres Clin Haematol* 9, 447-457.
- Poppema, S., Kaleta, J., and Hepperle, B. (1992). Chromosomal abnormalities in patients with Hodgkin's disease: evidence for frequent involvement of the 14q chromosomal region but infrequent bcl-2 gene rearrangement in Reed-Sternberg cells, *J Natl Cancer Inst* 84, 1789-1793.
- Portis, T., Dyck, P., and Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma, *Blood*.
- Powell, J. (1998). Enhanced concatemer cloning-a modification to the SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) technique, *Nucleic Acids Res* 26, 3445-3446.

- Priel-Halachmi, S., Ben-Dor, I., Shpungin, S., Tennenbaum, T., Molavani, H., Bachrach, M., Salzberg, S., and Nir, U. (2000). FER kinase activation of Stat3 is determined by the N-terminal sequence, *J Biol Chem* 275, 28902-10.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., and Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination, *Immunity* 11, 299-308.
- Qian, N., Frank, D., O'Keefe, D., Dao, D., Zhao, L., Yuan, L., Wang, Q., Keating, M., Walsh, C., and Tycko, B. (1997). The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis, *Hum Mol Genet* 6, 2021-2029.
- Radic, M. Z., Erikson, J., Litwin, S., and Weigert, M. (1993). B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors, *J Exp Med* 177, 1165-73.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1, *Immunity* 10, 547-558.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system, *Nature* 381, 751-758.
- Rassidakis, G. Z., Medeiros, L. J., McDonnell, T. J., Viviani, S., Bonfante, V., Nadali, G., Vassilakopoulos, T. P., Giardini, R., Chilosi, M., Kittas, C., *et al.* (2002). BAX expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: correlation with clinical outcome, *Clin Cancer Res* 8, 488-93.
- Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer, *Oncogene* 18, 6938-47.
- Re, D., Hofmann, A., Wolf, J., Diehl, V., and Staratschek-Jox, A. (2000). Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95, *Exp Hematol* 28, 31-35.
- Re, D., Mutschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V., and Wolf, J. (2001). Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells, *Cancer Res* 61, 2080-2084.
- Ritz, J., Nadler, L. M., Bhan, A. K., Notis-McConarty, J., Pesando, J. M., and Schlossman, S. F. (1981). Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) by lymphomas of B-cell and T-cell lineage, *Blood* 58, 648-652.
- Roberts, E. C., Deed, R. W., Inoue, T., Norton, J. D., and Sharrocks, A. D. (2001). Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding, *Mol Cell Biol* 21, 524-33.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors, *Nature* 401, 603-606.
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltnane, J. M., *et al.* (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma, *N Engl J Med* 346, 1937-47.
- Rowan, W. C., Hale, G., Tite, J. P., and Brett, S. J. (1995). Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) triggers activation of normal human T lymphocytes, *Int Immunol* 7, 69-77.
- Saha, S., Bardelli, A., Buckhaults, P., Velculescu, V. E., Rago, C., St Croix, B., Romans, K. E., Choti, M. A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer, *Science* 294, 1343-6.
- Sanz, I. (1991). Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions, *J Immunol* 147, 1720-9.
- Schebesta, M., Pfeffer, P. L., and Busslinger, M. (2002). Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene, *Immunity* 17, 473-85.
- Scherle, P., Behrens, T., and Staudt, L. M. (1993). Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7568-72.
- Schroeder, H. W., and Dighiero, G. (1994). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire, *Immunol Today* 15, 288-294.
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M., and Diehl, V. (1982). Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells, *Nature* 299, 65-7.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages, *Science* 265, 1573-7.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C., and Stein, H. (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease, *Blood* 95, 3020-3024.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene* 20, 2390-400.
- Sikder, H. A., Devlin, M. K., Dunlap, S., Ryu, B., and Alani, R. M. (2003). Id proteins in cell growth and tumorigenesis, *Cancer Cell* 3, 525-30.

- Skinninger, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U., and Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood* 99, 618-26.
- Skinninger, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Trumper, L. H., von Bonin, F., Kapp, U., Patterson, B., Snow, B. E., and Mak, T. W. (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma, *Blood* 97, 250-255.
- Skinninger, B. F., and Mak, T. W. (2002). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma, *Blood* 99, 4283-97.
- Staudt, L. M. (2003). Molecular diagnosis of the hematologic cancers, *N Engl J Med* 348, 1777-85.
- Staudt, L. M., Dent, A. L., Shaffer, A. L., and Yu, X. (1999). Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6, *Int Rev Immunol* 18, 381-403.
- Stein, H., Diehl, V., Marafioti, T., Jox, A., Wolf, J., and Hummel, M. (1999). The Nature of Reed-Sternberg Cells, Lymphocytic and Histiocytic Cells and Their Molecular Biology in Hodgkin's Disease. In Hodgkin's disease, P. M. Mauch, J. O. Armitage, V. Diehl, R. T. Hoppe, and L. M. Weiss, eds. (Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins), pp. 121-138.
- Stein, H., Gerdes, J., and Mason, D. Y. (1982). The normal and malignant germinal centre, *Clin Haematol* 11, 531-59.
- Stein, H., Marafioti, T., Foss, H. D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G., and Falini, B. (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription, *Blood* 97, 496-501.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2, *Nature* 348, 331-3.
- Su, W., Spencer, J., and Wotherspoon, A. C. (2001). Relative distribution of tumour cells and reactive cells in follicular lymphoma, *J Pathol* 193, 498-504.
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., and Greene, W. C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway, *Science* 259, 1912-5.
- Sun, X. H. (1994). Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development, *Cell* 79, 893-900.
- Sun, X. H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Baltimore, D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins, *Mol Cell Biol* 11, 5603-11.
- Szremska, A. P., Kenner, L., Weisz, E., Ott, R. G., Passegue, E., Artwohl, M., Freissmuth, M., Stoxreiter, R., Theussl, H. C., Baumgartner Parzer, S., *et al.* (2003). JunB inhibits proliferation and transformation in B lymphoid cells, *Blood* lymphocytes, *J Biol Chem* 268, 9169-9171.
- Thomas, R. K., Kallenborn, A., Wickenhauser, C., Schultze, J. L., Draube, A., Vockerodt, M., Re, D., Diehl, V., and Wolf, J. (2002). Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells, *Am J Pathol* 160, 1521-8.
- Tiegs, S. L., Russell, D. M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells, *J Exp Med* 177, 1009-20.
- Tondravi, M. M., McKercher, S. R., Anderson, K., Erdmann, J. M., Quiroz, M., Maki, R., and Teitelbaum, S. L. (1997). Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1, *Nature* 386, 81-4.
- Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H. D., and Delabie, J. (2001). The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's Disease, *Am J Pathol* 159, 1807-1814.
- Trümper, L., Pfreundschuh, M., Jacobs, G., von Bonin, F., Loftin, U., Moller, P., and Daus, H. (1996). N-ras genes are not mutated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single cell polymerase chain-reaction examinations, *Leukemia* 10, 727-730.
- Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age, *Endocr Rev* 18, 229-240.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science* 228, 1440-3.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP, *Cell* 79, 901-912.
- Usui, T., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Kaneko, S., Koseki, H., Kita, T., and Koseki, H. (1997). Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype, *J Immunol* 158, 3197-204.

- van den Berg, A., Visser, L., and Poppema, S. (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltration Hodgkin's lymphoma, *Am J Pathol* *154*, 1685-1691.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression, *Science* *270*, 484-487.
- Verbeke, C. S., Wenthe, U., Grobholz, R., and Zentgraf, H. (2001). Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma, *Am J Surg Pathol* *25*, 388-394.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells, *Cell* *43*, 831-840.
- Watanabe, K., Yamashita, Y., Nakayama, A., Hasegawa, Y., Kojima, H., Nagasawa, T., and Mori, N. (2000). Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease, *Histopathol* *36*, 353-361.
- Weber-Matthiesen, K., Deerberg, J., Poetsch, M., Grote, W., and Schlegelberger, B. (1995). 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.
- Weber-Matthiesen, K., Deerberg-Wittram, J., Rosenwald, A., Poetsch, M., Grote, W., and Schlegelberger, B. (1996). Translocation t(2;5) is not a primary event in Hodgkin's disease. Simultaneous immunophenotyping and interphase cytogenetics, *Am J Pathol* *149*, 463-468.
- Weiss, L. M., Chan, J. K. C., MacLennan, K., and Warnke, R. A. (1999). Pathology of classical Hodgkin's disease. In *Hodgkin's disease*, P. M. Mauch, J. O. Armitage, V. Diehl, R. T. Hoppe, and L. M. Weiss, eds. (Philadelphia, Lippencott Williams & Wilkins), pp. 101-120.
- Weiss, L. M., Lopategui, J. R., Sun, L. H., Kamel, O. W., Koo, C. H., and Glackin, C. (1995). Absence of the t(2;5) in Hodgkin's disease, *Blood* *85*, 2845-7.
- Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A., and Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease, *N Engl J Med* *320*, 502-506.
- Welle, S., Bhatt, K., and Thornton, C. A. (1999). Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men, *Genome Res* *9*, 506-13.
- Wellmann, A., Otsuki, T., Vogelbruch, M., Clark, H. M., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1995). Analysis of the t(2;5)(p23;q35) translocation by reverse transcription- polymerase chain reaction in CD30+ anaplastic large-cell lymphomas, in other non-Hodgkin's lymphomas of T-cell phenotype, and in Hodgkin's disease, *Blood* *86*, 2321-2328.
- Wienands, J., and Engels, N. (2001). Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function, *Int Rev Immunol* *20*, 679-96.
- Wienands, J., Schweikert, J., Wollscheid, B., Jumaa, H., Nielsen, P. J., and Reth, M. (1998). SLP-65: a new signaling component in B lymphocytes which requires expression of the antigen receptor for phosphorylation, *J Exp Med* *188*, 791-795.
- Willenbrock, K., Ichinohasama, R., Kadin, M. E., Miura, I., Terui, T., Meguro, K., Fukuhara, O., DeCoteau, J. F., and Hansmann, M. L. (2002). T-cell variant of classical Hodgkin's lymphoma with nodal and cutaneous manifestations demonstrated by single-cell polymerase chain reaction, *Lab Invest* *82*, 1103-9.
- Wolf, J., Kapp, U., Bohlen, H., Kornacker, M., Schoch, C., Stahl, B., Mücke, S., von Kalle, C., Fonatsch, C., Schaefer, H. E., *et al.* (1996). Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells, *Blood* *87*, 3418-3428.
- Yung, L., and Linch, D. (2003). Hodgkin's lymphoma, *Lancet* *361*, 943-51.
- Zhan, F., Tian, E., Bumm, K., Smith, R., Barlogie, B., and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development, *Blood* *101*, 1128-40.
- Zheng, B., Fiumara, P., Li, Y. V., Georgakis, G., Snell, V., Younes, M., Vauthey, J. N., Carbone, A., and Younes, A. (2003). MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival, *Blood* *102*, 1019-27.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation, *Cell* *79*, 875-84.

7 Anhang



Zusätzliche Abbildung 1: Das Genexpressionsprofil der cHL-Zelllinien ist ähnlich dem der LCL und der ABC-Typ-DLCL.

Das Dendrogramm zeigt das hierarchische Clustering mit Matrix, basierend auf der „average-linkage“-Methode der Genexpression (siehe Material und Methoden) von insgesamt 23 malignen B-Zelllinien. Das Genexpressionsprofil der cHL-Zelllinien ist ähnlich dem der LCLs und der ABC-Typ-DLCL. Die Zelllinien sind farblich, abhängig vom Zelltyp, markiert: DLCL = rot, BL = blau, cHL = grün, LCL = lila. Soweit bekannt, ist der EBV-Status in Klammern hinter dem Namen der Zelllinie aufgeführt. Auch der Subtyp der DLCL-Zelllinien ist, soweit bekannt, in Klammern hinter dem Namen der Zelllinie aufgeführt (GC = KZ-Typ). Der Farbbalken gibt die relative Genexpressionsänderung/Standardabweichung an. 0 bezeichnet den Mittelwert der Expressionsstärke eines Gens (einer Reihe).

Tag sequence	CB	L1236N	Gene function
GTCCCTGCCT	1	73,70	glutathione S-transferase subunit 4
AAATGTTTGG	1	46,19	AB021663 leucine-zipper protein
CCCTGGGTTT	7	266,31	ferritin light subunit
TACAGCACGG	0	36,36	glutathione S-transferase 3
TCACTCCTGG	1	35,38	activating TF 5
TGGGGTTCTT	0	29,48	EST
GAGGCCACCC	0	25,55	p21SNFT or like protein LSM7
ACTGCAGCCA	0	19,65	macrophage receptor MARCO
GTGCCATATT	1	17,69	isocitrate dehydrogenase
TTCTGCTTTC	0	17,69	G protein-coupled receptor (EBI 1) = CCR7
GATACAGCCA	1	17,69	Fc-epsilon receptor CD23 antigen (IgE receptor)
GCAAACGTTG	0	17,69	EST
TGCAGGCCTG	1	17,69	IFN-inducible gamma2 protein
GCCCCAATA	1	16,71	HL14=beta-galactoside binding protein
ATAGTAGCTT	0	16,71	actin bundling protein (HSN) Fascin
GTGACCACGG	1	16,71	Glutamate receptor
CTCAACCCCC	0	15,72	lipoprotein receptor-related protein
CCCCCGTGAA	0	15,72	interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK
CCTGGAAGAG	1	15,72	disulfide isomerase = Human thyroid hormone binding protein (p55)
TTTTCTGAAA	0	14,74	thioredoxin (TXN)
ACCTGGCAAA	0	14,74	EST similar to FIG-1 protein
GCCCAAGGAC	1	13,76	actin-binding protein (filamin)
TAGGTCAGGA	0	13,76	potentially prenylated protein tyrosine phosphatase AF041434
GGTTGAAAAA	0	13,76	no match
GGCACAAAGG	0	13,76	D43767 Human mRNA for chemokine TARC
CGACGAGGAG	1	13,76	hematopoietic neural membrane protein (HNMP-1) YMP mRNA, epithelial membrane protein-3.
TTTCAGATTG	0	13,76	mRNA for PC4 and p15
TCCGAGACTG	1	12,77	histone H1
GGCCTTTTTT	1	11,79	histone H1
CCCAAGCTAG	0	11,79	heat shock protein HSP27
ATGTACTCTG	1	11,79	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMP)
GGGACGGGTG	0	11,79	Alu transcript
GTGCCTAGGA	1	10,81	inducible nitric oxide synthase gene
AATAAAGGCT	0	10,81	GTPase (rhoC) or myosin alkali light chain (ventricular)
AGCCACCGCA	1	10,81	fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) or glucose-6-phosphatase and cDNAs
GCTTGTTAAG	1	10,81	S-adenosyl homocysteine hydrolase homolog (XPVkona)
GTGGAGGTGC	0	9,83	Matk=megakaryocyte-associated tyrosine kinase = CHK or 100 kDa coactivator mRNA
CCTTGAGTAC	1	9,83	gene for fructose-1,6-bisphosphate aldolase.
AATCTGCGCC	0	9,83	interferon-induced 15-Kd protein (ISG)
ATGCGAAAGG	0	9,83	delta2-CoA-isomerase
AAGATCCAGC	0	9,83	no match
AACACAGCCT	0	9,83	complement component C4A
CCCACGGTTA	0	9,83	yeast methionyl-tRNA synthetase homologue.
GATCCCAACT	0	9,83	metallothionein II
ACGATTGATG	0	9,83	BAP31/BAP29
TGGAATGCTG	2	18,67	NADH:ubiquinone dehydrogenase
TGTGAGGGAA	0	8,84	cDNA
TGATGTCTCC	0	8,84	no match
GGTCAGTCGG	0	8,84	r-RNA
TAGGAGTTAA	0	8,84	Opa-interacting protein OIP4 preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME)
CCTCCCTGCT	0	8,84	cDNA
ACTGGCGAAG	0	8,84	LON protease (LON)
CTTGATTCCC	0	8,84	quiescin (Q6) or bone-derived growth factor (BPGF-1)
CTTACCACTG	0	8,84	hypothetical protein FLJ10540
GTGGTTCACA	0	8,4	gene for BCNT
CTGGATGCCG	1	8,84	RD protein (RD) mRNA

TGAAAAAAAA	0	8,84	MAGOH or AF035940
TGGCTAAAAA	2	16,71	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)
GCTGGAGCTA	0	7,86	lipoamide dehydrogenase
TCCTCCCTCC	1	7,86	proteasome subunit HsC7-1
AGCCCCCTGA	1	7,86	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23) or anaplastic lymphoma kinase (ALK)
GCGGACGAGG	1	7,86	TFAR19 mRNA
ATCACAGTGT	3	23,58	nuclear-encoded mitochondrial serine hydroxymethyltransferase
GCCCCTGCCT	0	7,86	UEV-1 (UBE2V) or glutathione transferase
TCACACCCTA	0	7,86	KIAA0913 protein
TGGCTTAAAT	0	7,86	hypoxia-inducible protein 2 (HIG2)
CAGCGCGCCC	1	7,86	EST
CCACGTTCCA	1	7,86	neuron-specific gamma-2 enolase,
CCTTCCAAT	1	7,86	malate dehydrogenase precursor (MDH)
GAAACCGGGC	0	7,86	protein disulfide isomerase-related protein
TCCCTTAAGC	1	7,86	no match
TTGAAGGGCC	1	7,86	TSC-22 related protein
TAATAGTAAG	0	7,86	Fc fragment of IgE HS897
TGGGTGAGCC	0	7,86	cathepsin B
GGCAGAGGAC	1	7,86	Nm23 protein, involved in developmental regulation
ACCATTGGAT	1	7,86	interferon-inducible protein or interferon-inducible mRNA
GTAATCCTGC	1	7,86	28S ribosomal RNA or hypothetical protein FLJ10700
GGCGCCTCCT	0	7,86	transaldolase
TAACTTAAGC	1	7,86	CGI-127 protein
AACGAGGAAT	0	7,86	18S ribosomal RNA
TTAGTTAAGC	0	7,86	mRNA (clone p5) for archain = COP delta
TTCTCACCAC	1	7,86	myosin light chain
AGATGTGTGG	1	7,86	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein)
TAGCCCCCTG	1	7,86	tumor necrosis factor (TNF)
TGCATCTGGT	5	38,32	BiP
GCGACCGTCA	7	51,10	fructose 1,6-diphosphate aldolaseA
AAGAGCTAAT	0	6,88	glutaminyl-tRNA synthetase
CCTTGAAAGG	0	6,88	no match
CGGATAACCA	1	6,88	erbB3 binding protein EBP1 p38-2G4 homolog (hG4-1)
TTTCCTTCCT	1	6,88	lymphocyte clathrin light-chain A
AAACTCTGTG	0	6,88	CGI-31 protein
CGGCTGAATT	1	6,88	phosphogluconate dehydrogenase
AACCCCTGGG	0	6,88	no match
TGGAATGAGC	0	6,88	sarcomeric mitochondrial creatine kinase (MtCK)
AAGGAATCGG	1	6,88	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4
CAGCACCTCA	0	6,88	zinc finger homeodomain protein (ATBF1-A) or pot. pseudo-keratin K16 type I
CAAATAAAAT	1	6,88	squalene epoxidase
AATGCTGGAG	2	13,76	clone 23815
ATTACAAACC	1	6,88	Hs.30376 : hypothetical protein
AATTTCTATT	1	6,88	G protein gamma 5 subunit
ATTAAATTCA	1	6,88	Hs.218329 : hypothetical protein Hs.27092 : ESTs
ATCCGGGGAG	1	6,88	Hs.109752 : putative c-Myc-responsive (RCL)
CGGTTTGCAG	1	6,88	Nit protein 2
ACTACCTTCA	1	6,88	Hs.279529 : px19-like protein
CCACACACCG	1	6,88	CGI-51 protein
GCCCCGAGCC	1	6,88	single copy probe LNS-CAI/LNS-CAII
GTGCTGGACC	1	6,88	proteasome activator hPA28 subunit beta,
TAGGTTCTGT	1	6,88	cysteinyl-tRNA synthetase
GCCCGCAGGG	0	6,88	dishevelled 1 (DVL1)
GAAATACAGT	1	6,88	cathepsin D
GGCCAGGAAG	1	6,88	Hs.93832 : putative membrane protein (LOC54499)
GGCAGGCACA	0	6,88	phenylalkylamine binding protein.
GAAGGCATCT	1	6,88	dual oxidase-like domains 2

GGGGGCCCG	0	6,88	54TMp (54tm)
GTCTGGGGCT	5	33,41	KIAA0120 gene,
GCAAGCCAAC	2	12,77	mitochondrial DNA for loop attachment sequence
GGATGGCAAT	0	5,90	Hs.181357 : laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)
TGGGCCTGTG	1	5,90	no match
GGAGAAGATG	0	5,90	prefoldin subunit 2
ACTTTCCAAA	0	5,90	mitochondrial DANN
TATCCAGAA	1	5,90	cDNA DKFZp
GCTGGGAACC	0	5,90	dipeptidylpeptidase IV
GCTGCTCCCT	0	5,90	DKFZP564C1940 protein
AGGAGCTGCT	1	5,90	NADH dehydrogenase
AGGGGATTCC	1	5,90	arginine-rich protein (ARP)
AGCACTGCAG	0	5,90	N-myristoyltransferase 1
ACCCACCCA	0	5,90	lysophospholipid acyltransferase
TGATCTCAA	0	5,90	Hs.11050 : F-box only protein 9 Hs.83190 : fatty acid synthase
ACCAAGCTGG	1	5,90	tyrosyl-tRNA synthetase
ATCTTGCTCA	1	5,90	RNA, U17D small nucleolar
ACAAAACTA	0	5,90	MITOCHONDRIAL DNS
TAAACTCTA	0	5,90	cytochrome P450
GGCCAATAA	1	5,90	DKFZP566I1024 protein
AAGATTGGGG	0	5,90	CD44 isoform RC (CD44)
TACATTTGAA	1	5,90	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
AAGAGTTACG	0	5,90	CGI-22 protein
GTCTTTCTTG	0	5,90	RAB13, member RAS oncogene family
GTGCAAAATG	0	5,90	HBV associated factor
GTTGGTCTGT	0	5,90	cDNA FLJ14105 fis
GTGTCTCATC	0	5,90	nuclear receptor co-repressor or 2-phosphopyruvate-hydratase-alpha-enolase
ACCCACGTCA	1	5,90	Human transactivator (jun-B) gene
CCTGGCTAAT	1	5,90	zyxin-related protein 1 or cellular apoptosis susceptibility protein (CSE1) or 28S ribosomal RNA or Rhesus blood group antigen
CCCCACCTA	2	11,79	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)
GCCTGCAGTC	1	5,90	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2
CCCTGGCTG	0	5,90	modulator recognition factor I
CCCGCATAGA	0	5,90	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
CCCTCCTGGG	1	5,90	cDNA FLJ12823 fis
GCCGCCCTGC	0	5,90	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
TGCACCTTGG	1	5,90	cyclin-dependent kinase 2
TCTGAAGTTT	0	5,90	monoamine oxidase A
CTTGAGCAAT	0	5,90	FK506-binding protein 4 (59kD)
CTGGGTCTCC	1	5,90	BBC1
CTGGGGTCAA	0	5,90	l-myc gene exons 1-2
CTGAATGCC	0	5,90	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
CGGTGTTGAG	0	5,90	ribosomal protein S18
TGAGTGGTAG	0	5,90	lamin A/C
GAACCTGGATT	0	5,90	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like; H105e3
GCACCTCAGC	2	11,79	over-expressed breast tumor protein L34839
CGTGGGTGGG	0	5,90	heme oxygenase (decycling) 1
TGGCCAGCAG	0	5,90	EST
ATTCTTGCC	0	5,90	cDNA FLJ13996 fis, clone Y79AA1002211, weakly similar to PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEIN HOMOLOG F40A3.3
GCCCAGCTCA	0	5,90	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit
GAGCCGCCTC	1	5,90	HSPC182 protein
GCCAAGTTTG	1	5,90	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1
TGGAGAGCAA	0	5,90	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1
CAGGCCCTTT	0	5,90	glutathione S-transferase M1 or glutathione S-transferase M2 (muscle)
CAGTTCATA	0	5,90	HSPC030 protein
TCGTGCAGAGA	2	11,79	NADH-ubiquinone oxidoreductase B14.5A subunit
AAACCTCTTC	1	5,90	cyclin B2
CAACTCTATG	0	5,90	topoisomerase (DNA) II alpha (170kD)
AATGCAGGCA	2	10,81	S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY)
GGCTGATGTG	2	10,81	glycyl tRNA synthetase
GGCTCCTCGA	2	10,81	TAP binding protein (tapasin)
GCGGGGTACC	2	10,81	Hs.227823 : pM5 protein

TGGCCCCACC	10	52,08	pyruvate kinase, muscle
ATTGTCCCA	10	50,12	high-mobility group (nonhistone chromosomal) protein isoforms I and Y

Anhangstabelle 1: Liste der mittels SAGE identifizierten in der L1236 heraufregulierten Gene.

Gegeben sind die Tagsequenzen, Taganzahl für ZB und die cHL-Zelllinie L1236 (zu runden auf ganze Zahl) und der korrespondierende Genname. Für einige Tags wird mehr als ein Datenbankeintrag identifiziert, sodass nicht immer eine sichere Identifizierung des korrespondierenden Transkripts möglich ist. no match bezeichnet hier, daß kein Unigene-Eintrag identifiziert wurde. Einige von diesen Einträgen können jedoch unbestätigten seltenen cDNA zugeordnet werden.

Tag sequence	CB	L1236	Gene function
AAGGGAGCAC	92	0	Ig germline lambda-chain
ATGAGTGCTG	52	0	<i>EST</i>
GACCCAACCTG	45	1	immunoglobulin superfamily member B cell receptor complex
GCGGTTGTGG	44	1	lysosomal-associated multitransmembrane protein (LAPtm5)
TGTACCCCGC	41	0	for LPAP protein X81422
AAACCCCAAT	38	0	omega light chain protein 14.1 (Ig lambda chain related
GGGGCAACAG	36	0	CAMPATH-1 (CDw52) antigen
TTGGTGAAGG	196	6	thymosin beta-4 interferon-inducible mRNA
GCAGTGGGAA	32	0	lymphotoxin-beta mRNA
GCAGTTCTGA	25	0	MHC class II HLA-DR-beta
TCTCTCAAAG	25	0	cell surface antigen (CD53)
GGGCATCTCT	73	3	HLA-DR alpha-chain
GGACCAGGCT	24	0	<i>cDNA</i>
TTTCAATAGA	23	0	<i>EST</i>
CTGACTGTCC	21	1	major histocompatibility class II antigen gamma chain
TATGAGGACA	21	0	mb-1=membrane-bound immunoglobulin associated protein = Ig alpha
ACGCTCTCGA	19	1	leukocyte antigen CD37
ACTTCCTTCC	19	1	ionotropic ATP receptor
GACTTTTCTG	19	0	oct-binding factor
CCTCCTTCTG	19	0	immunoglobulin C(mu) and C(delta) heavy chain genes
ACTTTTTCAA	179	10	<i>Transcription factor II</i>
GGATGTTGCT	18	0	<i>EST</i>
TAATTTTGGGA	18	0	<i>BAP31/BAP29</i>
TAAAACATTT	17	1	<i>regulator of G-Protein signaling 13</i>
AAGGCAGAAG	17	0	ORF chr. 11
CCTGTGGAGG	17	0	<i>FN consensus binding protein</i>
AAACCAGAGG	33	2	lymphoid-restricted membrane protein (Jaw1)
CCTTACCCAG	16	1	DC12 protein
TAATTTTGAA	16	0	<i>BAP31/BAP29 regul. of G-protein signaling</i>
AGGAAAAGAT	16	0	7.1 kb mRNA upregulated in retinoic acid treated HL-60, U09196
TCTCCATACC	16	0	<i>sevin in absentia/homolog 1</i>
CACACCTCCC	16	0	B cell membrane protein CD22
AGGACACCGC	15	1	C-SRC-kinase
TTAAACTTAA	15	1	orphan G protein-coupled receptor mRNA
AAACATCCTA	14	1	<i>EST</i>
GGGTGGAAGC	14	1	no match
CCTTCCAGGT	14	0	Hs.76053 : DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 5 (RNA helicase, 68kD)
AAGGATGTAG	14	0	Chromosome 16 BAC clone AC002400
GCTTTTTAGA	39	3	HMG-14
TTCCCTTCTT	13	1	MHC class II lymphocyte antigen beta-chain (HLA-DPB1)
TGATGTTTGA	13	0	KIAA0058 gene, D31767
TTCCAAACCT	12	1	phospholipase C
TGGCTGGGAA	12	0	<i>vesicle assoc. membrane protein 8 (endobrevin)</i>
GTGCGCTGAG	12	0	MHC class I HLA-C.1
CTGCTAAGGT	12	0	mRNA for KIAA0746 protein, AB018289
CTGTTGGCAT	12	0	Hs.23971 DKFZP547N043 hypothetical protein DKFZp547N043 Hs.356482 - Homo sapiens transcribed sequence with strong similarity to protein prf:2113200B (H.sapiens) 2113200B ribosomal protein L21
TGAAATACTG	11	1	Hs.18585 - Sapiens cDNA FLJ32643 fis, clone SYNOV2001212. Hs.154545 PDZGEF1 PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1

TGTATATCGT	11	1	mRNA for KIAA0084 gene, D42043,
GGAAAGTGAC	11	0	ATPase
TATGAGAACC	11	0	EST similar to IgG-R
GAAATAAAGC	11	0	gene for immunoglobulin heavy chain
ATTATCCAGG	11	0	Hs.301404 : RNA binding motif protein 3
ATTGATCAAT	11	0	Hs.342655 LOC201895 hypothetical protein LOC201895
TGGCCGCTGC	11	0	Hs.300697 : immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker)
TTTGAATCCA	11	0	Hs.20132 : stromal antigen 3
ACCAGCTCCC	11	0	no match
GTGTGTCTGA	10	1	Hs.279930 : major histocompatibility complex, class II, DR beta 3 Hs.308026 : major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
CCTTTCAAGT	10	1	Hs.235422 RPL14 ribosomal protein L14
TGCATATCAT	10	1	Hs.79090 XPO1 exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)
ACTTTAGCCT	10	1	Hs.86575 : mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
TGTAGCCTAT	10	0	Hs.201675 : RNA binding motif protein 5
CGGCACCTTA	10	0	cDNA DKFZp434C171
CAGTGCTCTA	10	0	Hs.123296 : Fc receptor-like protein 3
GTACGTATTC	10	0	cDNA
GAGGCCATCC	10	0	Hs.70830 : U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm7
TAAATAGCAG	10	0	Hs.13256 na hypothetical gene supported by AK095177
CCCGTCTGGA	10	0	no match
TTTCATTGCC	10	0	Hs.173159 : transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
TCTGACAAAC	10	0	Hs.75968 : thymosin, beta 4, X chromosome
CCTTGACCAA	10	0	Hs.8148 : selenoprotein T
AATACTTTTT	10	0	Hs.2484 : T-cell leukemia/lymphoma 1A Hs.48504 : ESTs, Weakly similar to I38022 hypothetical protein (H.sapiens)
GTTACATTA	284	29	HLA-DR antigens associated invariant chain (p33)
TTAAATCCCA	19	2	leukocyte common antigen (CD45, LC-A)
GGTAGAACTA	9	1	Hs.61469 : likely ortholog of mouse SH3 gene SLY
AATTTGCAAC	9	1	Hs.75258 H2AFY H2A histone family, member Y
CTTTCCTTTT	9	1	Hs.80658 UCP2 uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
GTTGCAGATA	9	1	Hs.100293 : O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)
AAACTTCA	9	1	Hs.42915 : ARP2 (actin-related protein 2, yeast) homolog
CCTCTCCAAC	9	0	Hs.1162 : major histocompatibility complex, class II, DM beta
TGGACCTTGA	9	0	Hs.153026 : SWAP-70 protein
TGAAAAATGC	9	0	Hs.28355 NEIL1 nei endonuclease VIII-like 1 (E. coli)
CAAATAACC	9	0	Hs.293441 : immunoglobulin heavy constant mu
AGAGGAAACT	9	0	Hs.153026 : SWAP-70 protein
AGCACATTTG	9	0	Hs.289092 COTL1 coactosin-like 1 (Dictyostelium)
CACCACGGTG	9	0	Hs.241471 : RNB6
TTCTGTAGCC	17	2	Hs.5541 ATP2A3 ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous
ATCTCCAAAG	8	1	Hs.1802 HLA-DOB major histocompatibility complex, class II, DO beta
AGGCCAGTAT	8	1	Hs.15301 : NY-REN-25 antigen
AGCGGCTACA	8	1	Hs.183487 : interferon stimulated gene (20kD)
GTTGAAACTC	16	2	cDNA DKFZp586K2322 AL080113
GCCTGGGACT	8	1	Hs.239894 MGC2803 hypothetical protein MGC2803 Hs.8882 - Homo sapiens transcribed sequences
AAGCTTTGAG	8	1	Hs.406283 - Sapiens mRNA expressed only in placental villi, clone SMAP83. Hs.422118 EEF1A1 eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
CCAGTGACAC	8	1	Hs.96023 : CD19 antigen
GTAGAATGGG	8	1	Hs.116481 : CD72 antigen
CTTAATCTTG	8	0	Hs.75462 : BTG family, member 2
GGCGTCTGG	8	0	Hs.44017 : sirtuin (silent mating type information regulation 2, S.cerevisiae, homolog) 2
TGTTTGATA	8	0	Hs.20313 : protein tyrosine kinase 2 beta
GACATACTTA	8	0	Hs.89751 : membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
TAGCCAGTTA	8	0	Hs.74101 : spleen tyrosine kinase
GCTCAGCTGG	8	0	Hs.432848 EEF1D eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)
TGGAAGAGTG	8	0	Hs.338207 : FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 Hs.87205 : lymphocyte antigen 64 (mouse) homolog, radioprotective, 105kD
TAGCAAGTGT	8	0	Hs.155546 GGA2 golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2
GTCCTTCTCT	8	0	Hs.56237 : breast carcinoma amplified sequence 4
TCAACAACAA	8	0	Hs.136713 : pre-B lymphocyte gene 3 Hs.173081 : KIAA0530 protein
GGAGGCTGAG	15	2	Hs.185973 DEGS degenerative spermatocyte homolog, lipid desaturase (Drosophila) Hs.306189 DKFZP434F1735 DKFZP434F1735 protein
TACATCCGAA	7	1	Hs.21321 MTPN myotrophin

CTGGCGCGAG	14	2	Hs.83656 : Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
CTTGATTA	7	1	Hs.284265 C6orf83 chromosome 6 open reading frame 83 Hs.98288 FLJ90650 hypothetical protein FLJ90650
ATCCTGAGTT	14	2	Hs.73931 : major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
AAGAATCTGA	7	1	Hs.184335 NDUFB1 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa Hs.184352 PCNT1 pericentrin 1
TACAAAACCA	7	1	Hs.79110 : nucleolin
ATCAAGAATC	7	1	Hs.14623 : interferon, gamma-inducible protein 30
GTAGGTGAGG	7	1	Hs.274428 : TRF2-interacting telomeric RAP1 protein
GTGGTGTGTG	7	1	Hs.172674 NFATC3 nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 Hs.334834 CDAN1 congenital dyserythropoietic anemia, type I
AGGACCAGCA	7	1	Hs.240770 : nuclear cap binding protein subunit 2, 20kD
AAGTGATAG	7	1	Hs.180610 : splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract-binding protein-associated)
TGAAGTCACT	7	1	Hs.136470 RPLP0 ribosomal protein, large, P0 Hs.436405 IDH3B isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
TCTACCTACT	7	0	Hs.89751 : membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
CTGTTTATGA	7	0	Hs.110713 : DEK oncogene (DNA binding) Hs.42644 : thioredoxin-like 2
TCCATTGTGA	7	0	no match
GAAACTGACT	7	0	Hs.159637 : valyl-tRNA synthetase 2
AGGTGAGAGG	7	0	Hs.236361 : seb4D
GAAGCCCCAG	7	0	Hs.159637 : valyl-tRNA synthetase 2
GACTTCACTT	7	0	Hs.77356 : transferrin receptor (p90, CD71)
CTTGTGTTAT	7	0	Hs.155024 : B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
TTATGTATAT	7	0	Hs.356501 PHF6 PHD finger protein 6 Hs.75260 PLEKHC1 pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1
TGTATTCAGC	7	0	Hs.21765 FADS3 fatty acid desaturase 3
ACCCTGTCTC	7	0	Hs.300765 - Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_060312.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ20489 Hs.310853 - Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_060265.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ20378
GGAAGAGCTG	7	0	Hs.56607 : Williams-Beuren syndrome chromosome region 5
TACATTTCTG	7	0	Hs.170121 : protein tyrosine phosphatase, receptor type, C Hs.209886 : ESTs
CAATGCCTCT	7	0	no match
ACAGGGTGAC	7	0	Hs.174050 EDF1 endothelial differentiation-related factor 1
ACAGCGCTGA	7	0	Hs.308026 : major histocompatibility complex, class II, DR beta 5 Hs.349123 : major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
TGCAGATGGT	7	0	Hs.3628 : mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 Hs.6631 : hypothetical protein FLJ20373
GGATACAACC	7	0	Hs.173993 RBM6 RNA binding motif protein 6
CTGGTGGTGC	7	0	Hs.49427 GMIP Gem-interacting protein
GGACCCTCTC	7	0	Hs.2554 SIAT1 sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)
TGAAAACCTAC	13	2	Hs.914 HLA-DPA1 major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
AGTATGCCAC	6	1	Hs.26912 FLJ35630 hypothetical protein FLJ35630
AGTGAACCTAC	6	1	no match
AATACACATC	6	1	Hs.86948 SNRPD1 small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa
CGTTTTCTGA	6	1	Hs.82911 PTP4A2 protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2
AGACTTGGCA	6	1	Hs.380096 ACTR3 ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)
CCCCGCCAAG	6	1	Hs.169718 CNN2 calponin 2
GAATAACAAC	6	1	Hs.99603 ASB13 ankyrin repeat and SOCS box-containing 13
AAATACAGCA	6	1	Hs.112482 - Sapiens cDNA FLJ12786 fis, clone NT2RP2001936. Hs.372429 ATP6V1C2 ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C isoform 2
GAAAACCAAG	6	1	Hs.37892 KIAA0922 KIAA0922 protein Hs.94631 BIG1 brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1
GATGAGTCTC	6	1	Hs.233952 PSMA7 proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7
TTTGCCTCAG	6	1	no match
TTGTAAACTT	6	1	Hs.379557 FKBP3 FK506 binding protein 3, 25kDa
TATATTGATT	6	1	Hs.77054 BTG1 B-cell translocation gene 1, anti-proliferative Hs.7879 IFRD1 interferon-related developmental regulator 1
GAGAGCCTGC	6	1	Hs.9275 CGI-152 cation-transporting ATPase Hs.291902 FLJ32771 IIIG9 protein
GTGAAACCTT	6	1	Hs.264636 FKBP14 FK506 binding protein 14, 22 kDa Hs.193914 GREB1 GREB1 protein
TTCTCTACAA	6	1	Hs.20157 CDK5RAP3 CDK5 regulatory subunit associated protein 3
GCAAGACCCC	6	1	Hs.200595 KIAA0562 KIAA0562 gene product Hs.453018 - Homo sapiens transcribed sequence with moderate similarity to

			protein pir:T42650 (H.sapiens) T42650 hypothetical protein DKFZp434D0215.1 - human (fragment)
GCTGTAGACA	6	1	Hs.10362 - Sapiens cDNA: FLJ20944 fis, clone ADSE01780. Hs.184582 RPL24 ribosomal protein L24
TGCTGTGTGC	12	2	Hs.90606 SEP15 15 kDa selenoprotein Hs.299148 RAI16 retinoic acid induced 16
TGTCGCTGGG	6	1	Hs.433267 MGC2198 hypothetical protein MGC2198
TCTTAATGAA	6	1	Hs.173912 EIF4A2 eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2 Hs.16578 - Homo sapiens transcribed sequences
GCAAAACCTC	6	1	Hs.189507 PLA2G2D phospholipase A2, group IID Hs.37617 MYO1G myosin IG
AAGGACAGCA	6	0	Hs.157441 SPI1 spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1 Hs.179852 DC-UbP dendritic cell-derived ubiquitin-like protein
TAAAGAGTGG	6	0	Hs.432741 LKAP limkain b1
TAACITTTAT	6	0	Hs.3781 LRRN3 leucine rich repeat neuronal 3 Hs.9195 GRF2 guanine nucleotide-releasing factor 2 (specific for crk proto-oncogene)
TACCCTGGCA	6	0	no match
GTAAAGCCTA	6	0	Hs.374836 PIK3AP1 phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
TATGTCTTGG	6	0	no match
CGCACCGGGT	6	0	Hs.104433 NAP1L napsin B pseudogene
TAGTTGTTTA	6	0	Hs.1098 ERdj5 ER-resident protein ERdj5 Hs.330741 MGC12466 hypothetical protein MGC12466
GAGGAGGGTG	6	0	Hs.75318 TUBA1 tubulin, alpha 1 (testis specific) Hs.54558 FLJ22222 hypothetical protein FLJ22222
CCGCTGGTCC	6	0	no match
CCTTATGATA	6	0	Hs.288708 C13orf18 chromosome 13 open reading frame 18
CAAGAGATGC	6	0	Hs.388456 SEPT1 septin 1
CCTAGGACCT	6	0	Hs.323342 ARPC4 actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa
TGAGGGGTGA	6	0	Hs.268530 GPS1 G protein pathway suppressor 1
CGCCCAGCTC	6	0	Hs.88417 MGC26847 hypothetical protein MGC26847
GAAATGGTGG	6	0	Hs.355719 NPM1 nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) Hs.356250 - Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein pir:A32915 (H.sapiens) A32915 nucleophosmin - human
GAGAGCACCC	6	0	Hs.349256 PILRB paired immunoglobulin-like receptor beta Hs.152717 FLJ13725 hypothetical protein FLJ13725
GAGACGCATT	6	0	Hs.184585 LMO2 LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
GAGCTGTTGG	6	0	Hs.851 ITGAE integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)
GACTGAATGT	6	0	Hs.350465 - Sapiens, clone IMAGE:4838556, mRNA, partial cds
TGCAAGAGAG	6	0	Hs.238954 LOC257106 hypothetical protein LOC257106
GACAGCCTTA	6	0	Hs.153221 SS18 synovial sarcoma translocation, chromosome 18
CATACCAGGC	6	0	Hs.27410 PBF papillomavirus regulatory factor PRF-1
AAGCCTTGCT	6	0	Hs.457909 FLJ20886 hypothetical protein FLJ20886 Hs.107382 DDX37 DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 37
GAACCGTCCT	6	0	Hs.123164 - Sapiens mRNA for FLJ00332 protein
ATCACACCAC	6	0	Hs.367960 MGC34032 hypothetical protein MGC34032 Hs.119830 - Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_071385.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ20958
CCACTGCACC	6	0	Hs.6853 FLJ22167 hypothetical protein FLJ22167 Hs.146844 na similar to hypothetical protein FLJ10891
AAATGACTTA	6	0	Hs.225977 NCOA3 nuclear receptor coactivator 3 Hs.162808 PIK3CD phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide
AACATTTCTC	6	0	Hs.14601 HCLS1 hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
TCCACCCGAC	6	0	Hs.11135 - Sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1964662
GCGGGTGTGG	6	0	Hs.78935 METAP2 methionyl aminopeptidase 2
TCACGGCAAG	6	0	Hs.90693 RIP60 replication initiation region protein (60kD)
TTCAGTTCGC	6	0	Hs.184325 UBE2J1 ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)
TTCATTATAA	29	5	prothymosin-alpha
GCCTTCCAAT	46	8	Hs.76053 : DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 5 (RNA helicase, 68kD)
CCTCAGGATA	46	8	Hs.170009 TGFA transforming growth factor, alpha
TTGAAGTGGT	11	2	EST
ATGAAACCTC	11	2	Hs.187991 WSB1 SOCS box-containing WD protein SWIP-1 Hs.393 PTGIR prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP) Hs.326757 KIAA1660 KIAA1660 protein Hs.375757 - Sapiens, clone IMAGE:4396276, mRNA, partial cds
TCTGCCTGGG	11	2	Hs.24379 MUM2 MUM2 protein
TTTGTTAATT	11	2	hnRNP, BTK region
GTTTGGCAGT	27	5	Hs.283690 H41 hypothetical protein H41
TTAAACCTCA	16	3	Hs.372673 HNRPD heterogenous nuclear ribonucleoprotein D-like

			Hs.347810 - Homo sapiens transcribed sequences
CTCATAGCAG	16	3	<i>tumour protein</i>
CATCCAAAAC	16	3	no match
TTAATAAAAG	5	1	Hs.11522 FAM11A family with sequence similarity 11 member A Hs.406590 PGR1 T-cell activation protein
AGAATTGCTT	10	2	Hs.78060 PHKB phosphorylase kinase, beta Hs.190311 NPHS1 nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)
AGGAGGGTGG	5	1	Hs.89497 LMNB1 lamin B1 Hs.109445 HIC2 hypermethylated in cancer 2
TGAAGAGAAT	5	1	Hs.26719 PRDM2 PR domain containing 2, with ZNF domain Hs.408576 DSTN destrin (actin depolymerizing factor)
ACTTGATTCA	5	1	Hs.80905 RASSF2 Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2
GAAACTTGGG	5	1	Hs.456232 E2F5 E2F transcription factor 5, p130-binding
GGAGCTCTTG	5	1	Hs.177766 ADPRT ADP-ribosyltransferase (NAD ⁺ ; poly (ADP-ribose) polymerase) Hs.75393 ACP1 acid phosphatase 1, soluble
AATAAAGTTG	10	2	poly(A) binding protein II (PABP2) gene
CTGACAGTGA	10	2	Hs.77522 HLA-DMA major histocompatibility complex, class II, DM alpha Hs.302003 FANCE Fanconi anemia, complementation group E
AAGCGCTCTC	5	1	Hs.168913 STK24 serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast)
GTAGACTCAC	5	1	Hs.25911 BAT2 HLA-B associated transcript 2
GGCTATGCCA	5	1	no match
TTGGCCAGAG	10	2	Hs.75545 IL4R interleukin 4 receptor
TTTGTGTAT	5	1	Hs.186776 na similar to RIKEN cDNA 4933417L02
AAGTGGGTGC	10	2	Hs.119475 CIRBP cold inducible RNA binding protein
GAGGACCCAA	5	1	Hs.77313 CDK10 cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10
TTCTGTGTAT	5	1	Hs.3530 FUSIP1 FUS interacting protein (serine-arginine rich) 1 Hs.457973 FUSIP1 FUS interacting protein (serine-arginine rich) 1
ACAAGAATTG	10	2	Hs.80919 SYPL synaptophysin-like protein
AAAGCAAAAA	5	0	Hs.73826 PTPN4 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 (megakaryocyte) Hs.193807 na hypothetical gene LOC126167
TTTTGAGATT	5	0	Hs.35947 MBD4 methyl-CpG binding domain protein 4
TTTGGGACCC	5	0	Hs.270 PSCDBP pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein
AACTCGGTGG	5	0	Hs.79356 LAPT5 Lysosomal-associated multispinning membrane protein-5
TTTGACAATA	5	0	Hs.155596 BNIP2 BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
TGGCCACTGC	5	0	Hs.413826 IGHG3 immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker) Hs.143235 - Homo sapiens transcribed sequences
TGCATTACTC	5	0	Hs.86682 - Sapiens cDNA: FLJ21578 fis, clone COL06726.
TGTACCTAAC	5	0	Hs.18272 SLC38A1 solute carrier family 38, member 1
TTTAGTGACG	5	0	Hs.433788 - Sapiens mRNA; cDNA DKFZp761P06121 (from clone DKFZp761P06121)
ACACAGCAAG	5	0	no match
TGTAGCTGCA	5	0	Hs.356079 - Homo sapiens transcribed sequences
TTTAAAAAAG	5	0	Hs.78935 METAP2 methionyl aminopeptidase 2 Hs.119 WTAP Wilms tumor 1 associated protein
ACTAAGTGCT	5	0	Hs.132739 HIC I-mfa domain-containing protein
ACGCTGCGGC	5	0	Hs.74647 TRA@ T cell receptor alpha locus
AAGTATGTCT	5	0	Hs.154978 FOE friend of EBNA2
TTGATTTCTT	5	0	Hs.198253 HLA-DQA1 major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 Hs.239681 FLJ20275 hypothetical protein FLJ20275
ACCCTGGGCA	5	0	Hs.220324 FLJ13052 NAD kinase Hs.164476 FLJ20626 hypothetical protein FLJ20626
TTGACCAGGC	5	0	Hs.193384 LOC56902 putative 28 kDa protein Hs.194351 F2RL2 coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
AAGCTGTTGT	5	0	Hs.77462 DNMT1 DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 Hs.31931 RTTN rotatin
GCGTGGCTCA	5	0	Hs.108106 UHRF1 ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 Hs.374325 - Sapiens, Similar to ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1, clone
GTGATTATGA	5	0	Hs.170318 ESRRBL1 estrogen-related receptor beta like 1
GTCAAGACCA	5	0	Hs.331602 AP1B1 adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit
GTATTGGCCT	5	0	Hs.28757 TM9SF2 transmembrane 9 superfamily member 2
GGTATGTTGT	5	0	no match
CTACAGTGCC	5	0	Hs.105115 AIM2 absent in melanoma 2 Hs.155530 IFI16 interferon, gamma-inducible protein 16
CTCGATTATT	5	0	Hs.170121 PTPRC protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
GGGTGTGTAT	5	0	Hs.83347 AAMP angio-associated, migratory cell protein Hs.225160 DHDDS dehydrololichyl diphosphate synthase
GGCCTGTGTG	5	0	Hs.4973 CGI-57 hypothetical protein CGI-57
TAGATTTCAA	5	0	Hs.197540 HIF1A hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-

			helix transcription factor) Hs.77613 ATR ataxia telangiectasia and Rad3 related
GCTCTAAAAA	5	0	Hs.73792 CR2 complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2 Hs.200360 - Sapiens cDNA FLJ13027 fis, clone NT2RP3001007
CCGCGCCCCG	5	0	Hs.2243 BLK B lymphoid tyrosine kinase
GCGGGGTGGA	5	0	Hs.85155 ZFP36L1 zinc finger protein 36, C3H type-like 1
CTTTGATCAG	5	0	Hs.118249 ARFGEF2 ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)
CTTTGCCAAG	5	0	Hs.89751 MS4A1 membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
GCCGCTTCCA	5	0	Hs.458064 na similar to ribosomal protein L3; 60S ribosomal protein L3; HIV-1 TAR RNA-binding protein B Hs.457496 - Homo sapiens transcribed sequence with moderate similarity to protein pir:S34195 (H.sapiens) S34195 ribosomal protein L3, cytosolic
GCAGAGCAGT	5	0	Hs.46446 LYL1 lymphoblastic leukemia derived sequence 1 Hs.216958 KIAA0194 KIAA0194 protein
GAAGTGGAAG	5	0	Hs.9061 MGC2477 hypothetical protein MGC2477 Hs.343211 MRPS9 mitochondrial ribosomal protein S9
TTTTGGGTGA	5	0	Hs.192861 SPIB Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
GAATTTTATA	5	0	Hs.202 BZRP benzodiazepine receptor (peripheral) Hs.196550 LOC163590 AF464140
AAAAGTTTAT	5	0	Hs.75283 SNX1 sorting nexin 1
CTGTATTGGA	5	0	Hs.130829 TRA2A transformer-2 alpha Hs.53565 PIGM phosphatidylinositol glycan, class M
CACACAATGT	5	0	Hs.285005 TOMM22 translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast) Hs.172887 PHYH phytanoyl-CoA hydroxylase (Refsum disease)
AGGGGCTGCC	5	0	Hs.77961 HLA-B major histocompatibility complex, class I, B
AGGGTCCCCG	5	0	Hs.406565 IGKC immunoglobulin kappa constant
AGTGCCGTGT	5	0	Hs.76391 MX1 myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) Hs.154654 CYP1B1 cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
ATAAATGCAG	5	0	Hs.76391 MX1 myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) Hs.154654 CYP1B1 cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
TATTTATCCA	5	0	Hs.174103 ITGAL integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide) Hs.116774 ITGA1 integrin, alpha 1
ATGAACTTC	5	0	no match
TATAAAATAT	5	0	no match
ATGTAGTCAG	5	0	no match
TAGTGTACGT	5	0	Hs.251064 HMG1 high-mobility group nucleosome binding domain 1
CCTGGGGTAA	5	0	Hs.198253 HLA-DQA1 major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 Hs.154751 - Sapiens cDNA FLJ13792 fis, clone THYRO1000072, weakly similar to MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE, SMOOTH MUSCLE AND NON-MUSCLE ISOZYMES (EC 2.7.1.117).
TACTTGGTCT	5	0	Hs.406660 TMPO thymopoietin
GTGTGTGTGT	5	0	Hs.2549 ADRB3 adrenergic, beta-3-, receptor Hs.21766 - Homo sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_071385.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ20958
TACCTGCAAA	5	0	Hs.1583 NCF1 neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)
CACCCAATGG	5	0	Hs.110121 TIC SEC7 homolog Hs.144527 PGBD1 piggyBac transposable element derived 1
CACTATGTAA	5	0	Hs.24143 - Sapiens, clone IMAGE:5264268, mRNA Hs.321622 OSBPL10 oxysterol binding protein-like 10
CAGGCCAGAA	5	0	no match
CAGTAGGATA	5	0	Hs.88414 BACH2 BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2
TACATAGTCC	5	0	Hs.115907 DGKD diacylglycerol kinase, delta 130kDa Hs.335786 - Homo sapiens transcribed sequence
CATTGCCTTC	5	0	no match
TAATTAGTTT	5	0	Hs.20191 SIAH2 seven in absentia homolog 2 (Drosophila)
TGAAAAGCTT	5	0	Hs.2384 TPD52 tumor protein D52 Hs.54877 GAS8 growth arrest-specific 8
ATTTCCTAGC	5	0	Hs.198253 HLA-DQA1 major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1

Anhangstabelle 2: Liste der mittels SAGE identifizierten in der L1236 herunterregulierten Gene.

Gegeben sind die Tagsequenzen, Taganzahl für ZB und die cHL-Zelllinie L1236 (jeweils auf ganze Zahl gerundet) und die korrespondierende Gennamen. Für einige Tags wird mehr als ein Datenbankeintrag identifiziert, sodass nicht immer eine sichere Identifizierung des korrespondierenden Transkripts möglich ist. no match bezeichnet hier, daß kein Unigene-Eintrag identifiziert wurde. Einige von diesen Einträgen können jedoch unbestätigten seltenen cDNA zugeordnet werden.

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde vom Januar 2000 bis September 2003 unter der Anleitung von PD. Dr. R. Küppers am Institut für Genetik der Universität zu Köln angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. R. Küppers und Prof. Dr. Klaus Rajewsky für die intensive Betreuung und die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann danke ich für die anregenden Diskussionen und die Identifizierung der HRS-Zellen.

Herrn Prof. Dr. Volker Diehl danke ich für die Bereitstellung der Laborräume der Medizinischen Klinik I für Innere Medizin.

Für ein tolles Arbeitsklima, tatkräftige Unterstützung, erfolgreiche Kooperationen und die vielen hilfreichen Diskussionen danke ich Berit Jungnickel, Andreas Bräuninger, Verena Distler, Michaela Fahrig, Julia Jesdinsky, Julia Kurth, Roland Schmitz, Mirela Stecki, Dörte Bechtel, und Tina Goossens.

Vielen Dank an meine Eltern, die mich all die Jahre auf vielfältige Weise gerne und bereitwillig unterstützt haben.

Meinem Freund, Tom Pfeil, und meinen Freunden danke ich für die mir sehr wichtige ständige, vielseitige Ermutigung.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation wurde von PD Dr. R. Küppers betreut.

Köln, September 2003

Teilpublikationen

Schwering I, Bräuninger A, Distler V, Jesdinsky J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K, Küppers R.

Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes.

Mol Med. 2003, 9, 85-95.

Küppers R, Klein U, Schwering I, Distler V, Bräuninger A, Cattoretti G, Tu Y, Stolovitzky GA, Califano A, Hansmann ML, Dalla-Favera R.

Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling.

J Clin Invest. 2003;111, 529-37.

*gemeinsame Koerstautorschaft von Küppers R, Klein U, Schwering I

Schwering I, Bräuninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Küppers R.

Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma.

Blood. 2003;101, 1505-12.

Feldhahn N, Schwering I, Lee S, Wartenberg M, Klein F, Wang H, Zhou G, Wang SM, Rowley JD, Hescheler J, Krönke M, Rajewsky K, Küppers R, Müschen M.

Silencing of B cell receptor signals in human naive B cells.

J Exp Med. 2002;196, 1291-305.

Küppers R, Schwering I, Bräuninger A, Rajewsky K, Hansmann ML.

Biology of Hodgkin's lymphoma.

Ann Oncol. 2002;13 Suppl 1:11-8. Review.

Lebenslauf

Köln, im September 2003

Persönliche Daten

Ines Schwering

geb. 17.07.1973 in Köln

Schulbildung

1979-1983:

Grundschule in der Stenzelbergstraße, Köln

1983-1992:

Schiller-Gymnasium, Köln

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

1994-1996:

Grundstudium der Biologie an der Gutenberg-Universität, Mainz

April 1996:

Vordiplom im Fach Biologie an der Gutenberg-Universität, Mainz

1996-1999:

Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln

Dezember 1999:

Diplomabschluß am Institut für Genetik der Universität zu Köln
(AG PD Dr. R. Küppers/Prof. Dr. K. Rajewsky)

Januar 2000:

Beginn des Promotionsstudiums an der Universität zu Köln
(AG PD Dr. R. Küppers/Prof. Dr. K. Rajewsky)