

**Die Charakterisierung der Rolle B-Zell-spezifischer
Transkriptionsfaktoren und des ID2
in der Dedifferenzierung und Pathogenese
der Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen im klassischen
Hodgkin Lymphom**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

eingereicht beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
(14)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Maren Eickernjäger
aus Kiel

Frankfurt am Main 2010

D30

Die Arbeit wurde am Senckenbergischen Institut für Pathologie des Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinikums Frankfurt am Main angefertigt und vom Fachbereich Biochemie, Chemie, Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek
Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Datum der Disputation: 26. Juli 2010

*„Nichts beflügelt die Wissenschaft so
wie ein Schwatz mit den Kollegen auf dem Flur“*

*(Arnold Allan Penzias, *1933,
Physiker und Nobelpreisträger, 1978)*

Meinen Eltern gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALCL	anaplastisch großzelliges T-Zell-Lymphom
ALK	anaplastische Lymphom-Kinase
AOD	Assays-on-Demand
BCR	B-Zell-Rezeptor
B2M	Beta-2 Microglobulin
(b)HLH	(basic) Helix-loop-Helix
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA
cHL	klassisches Hodgkin Lymphom
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CLP	lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CoIP	Ko-Immunopräzipitation
cRNA	komplementäre RNA
CSR	Klassenwechselrekombination
D	Diversitäts-Gen-Element des Immunglobulin-Lokus
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FC	Änderungsverhältnis (<i>fold change</i>)
FCS	fetales Kälberserum
FDC	follikulär dendritische Zellen
FL	Follikuläres Lymphom
FSC	Vorwärtslichtstreuung (<i>forward scatter</i>)
GC	Keimzentrum (<i>germinal center</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HL	Hodgkin Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

HRS	Hodgkin/Reed-Sternberg
Ig	Immunglobulin
IB	Immunblot
IHC	Immunhistochemie
J	verbindendes Gen-Element des Immunglobulin-Lokus
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LP	lymphozyten-prädominant
LB	Luria Bertani
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
miRNA	mikroRNA
MLBCL	mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom
MOI	Vielfachheit der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NK	natürliche Killerzellen
nIplHL	nodulär lymphozyten-prädominantes Hodgkin Lymphom
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
(q) RT-PCR	(quantitative) Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHM	somatische Hypermutation
shRNA	kurze Haarnadel-RNA (<i>short hairpin RNA</i>)
siRNA	kleine interferierende RNA (<i>short interfering RNA</i>)
SSC	Seitwärtslichtstreuung (<i>side scatter</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor
(T)TBS	(Tween) Tris-gepufferte Salzlösung
V	variables Gen-Element des Immunglobulin-Lokus
vs	versus

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 Die B-Zell-Entwicklung	2
1.1.1 Die frühe B-Zell-Entwicklung	2
1.1.2 Transkriptionelle Kontrolle der frühen B-Zell-Entwicklung	4
1.1.3 Keimzentrumsreaktion und B-Zell-Differenzierung	8
1.1.4 Transkriptionelle Kontrolle der Keimzentrumsreaktion und der B-Zell-Differenzierung	9
1.2 B-Zell-Lymphome	11
1.3 Das Hodgkin Lymphom	12
1.3.1 Ursprung der HRS Zellen und deren Klonalität	13
1.3.2 Pathogenese des klassischen Hodgkin Lymphoms	14
1.3.2.1 Deregulierte Signalwege im HL	14
1.3.2.2 Die Rolle des Epstein-Barr Virus (EBV)	16
1.3.2.3 Verlust der B-Zell-Identität der HRS Zellen	17
1.4 Das anaplastisch großzellige T-Zell-Lymphom (ALCL)	18
1.4.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von ALCL und HL	19
1.5 MikroRNA (miRNA), short interfering RNA (siRNA) und RNA-Interferenz	20
1.6 Ziel der Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Verbrauchsmaterial	24
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.3 Lösungen und Puffer	26
2.1.4 Zellkulturreagenzien und Zellkulturmedien	27
2.1.5 Zellen	28
2.1.6 Bakterienkulturmedien	28
2.1.7 Bakterien	28
2.1.8 Kits und Standards	29
2.1.9 Enzyme	29
2.1.10 TaqMan Gene Expression Assays (Assays-on-Demand, AOD)	29

2.1.11	Antikörper	30
2.1.12	Plasmide	31
2.1.13	Oligonukleotide	32
2.1.14	Geräte	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Zellkultur	34
2.2.1.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen	34
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau-Lösung	35
2.2.1.3	Transfektion von 293T-Zellen mittels Calciumphosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln	35
2.2.1.4	Titerbestimmung	36
2.2.1.5	FACS (Fluorescence-activated cell sorting)-Analyse	37
2.2.1.6	Transduktion von Zellen ohne und mit RetroNectin®	37
2.2.1.7	Transiente Transfektion mit RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz	38
2.2.1.8	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	39
2.2.1.9	Messung der Zellzyklusverteilung von Zellkulturen	39
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	40
2.2.2.1	Herstellung von Zell-Lysaten	40
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.2.3	Western Blot und Immundetektion	40
2.2.2.4	Ko-Immunopräzipitation mittels Profound Mammalian Co-IP Kit	41
2.2.2.5	Ko-Immunopräzipitation mittels Dynabeads, Invitrogen	42
2.2.3	DNA- und RNA-Arbeitstechniken	43
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.3.2	Fällung von DNA mit Natriumacetat	44
2.2.3.3	Agarosegel-Elektrophorese	44
2.2.3.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
2.2.3.5	Klonierungstechnik für shRNA-kodierende DNA-Oligonukleotide in den lentiviralen Vektor pVIG	45
2.2.3.6	Klonierung mittels BD In-Fusion Universal PCR cloning Kit	45
2.2.3.7	Transformation und Kultivierung von Bakterien	46
2.2.3.8	Plasmidisolierung (Mini-Präparation und Maxi-Präparation)	46
2.2.3.9	Sequenzierung	46
2.2.3.10	RNA-Isolierung	48
2.2.3.11	Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse der RNA	48
2.2.3.12	Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	48

2.2.3.13	Quantitative Real-Time PCR	49
2.2.3.14	Microarray-Analyse (Differenzielle Genexpressionsanalyse)	50
2.2.4	Immunhistochemie	51
2.2.4.1	Gewebe für Immunhistochemie und deren histologische Typisierung	51
2.2.4.2	Immunhistochemische Färbungen	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Die Bedeutung des ID2 für die Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL	53
3.1.1	Expression der Transkriptionsfaktoren E2A, HEB und PAX5 sowie des potentiellen Inhibitors ID2 im HL und NHL	53
3.1.2	Analyse der Interaktion des ID2 mit den Transkriptionsfaktoren E2A, HEB und PAX5 in HL-Zelllinien	58
3.2	Die Bedeutung des ID2 für die Dedifferenzierung im ALCL	60
3.2.1	Expression der Transkriptionsfaktoren E2A und HEB sowie des potentiellen Inhibitors ID2 in ALCL-Zelllinien	60
3.2.2	Analyse der Interaktion des ID2 mit den Transkriptionsfaktoren E2A und HEB in ALCL-Zelllinien	62
3.3	Etablierung eines retroviralen Transduktionssystems zur stabilen shRNA-Expression in HL- und ALCL-Zelllinien	63
3.4	Etablierung eines transienten Transfektionssystems für HL- und ALCL-Zelllinien	72
3.5	Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf die Proteinexpression verschiedener B- und nicht-B-Zell-Gene in HL-Linien bzw. T-Zell-Gene in ALCL-Zelllinien	76
3.6	Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf die globale Genexpression in ALCL-Zelllinien	78
3.7	Die weitere Bedeutung des ID2 für die Pathogenese des HL und des ALCL	89
3.7.1	Analyse der Interaktion des ID2 mit HEF1 in HL-Zelllinien	89

3.7.2	Die Rolle des ID2 in der Kontrolle des Zellzyklus	91
3.7.2.1	Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf die Expression negativer Regulatoren des Zellzyklus in HL- und ALCL-Zelllinien	91
3.7.2.2	Analyse der Interaktion des ID2 mit RB in HL-Zelllinien	93
3.8	Die Bedeutung des p21 ^{Cip1} als ID2-Target-Gen im HL	94
3.8.1	Expression und Lokalisation des p21 ^{Cip1} und dessen Phosphorylierungsstatus im HL	94
3.8.2	Analyse der Interaktion des ID2 mit p21 ^{Cip1} in HL-Zelllinien	96
3.8.3	Einfluss der reduzierten p21 ^{Cip1} -Proteinexpression auf die Zellzyklusverteilung in HL-Zelllinien	98
4	Diskussion	101
4.1	Die Bedeutung des ID2 für die Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL und ALCL	101
4.1.1	Etablierung einer siRNA-vermittelten Herunterregulation des ID2 in HL- und ALCL-Zelllinien	105
4.1.2	Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf den Phänotyp des HL	109
4.1.3	Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf den Phänotyp des ALCL	112
4.2	Einfluss des ID2 auf die Regulation des Zellzyklus im HL und ALCL	115
4.3	Die Bedeutung des p21 ^{Cip1} als ID2-Target-Gen im HL	119
5	Zusammenfassung	123
6	Literaturverzeichnis	125
	Anhang	140
	Danksagung	
	Teilpublikation	
	Lebenslauf	
	Erklärung	

1 Einleitung

Das Immunsystem dient der Abwehr gegen Pathogene wie Bakterien und Viren. Neben angeborener Immunität zur unspezifischen Eliminierung von Pathogenen durch beispielsweise phagozytierende Zellen, spielt die spezifische adaptive Immunität eine wesentliche Rolle bei der Abwehr gegen infektiöse Faktoren. Außer antigenpräsentierenden Zellen stellen zwei Gruppen von Zellen die wesentlichen Elemente des adaptiven Immunsystems dar: Die B- und T-Lymphozyten, oder auch B- und T-Zellen. Rezeptorproteine auf der Oberfläche von B-Zellen (*B cell receptor*, BCR) und T-Zellen (*T cell receptor*, TCR) interagieren jeweils spezifisch mit antigenen Agenzien. Die Vielfalt der Rezeptoren beruht auf somatischen Rekombinationsprozessen. Jede B- bzw. T-Zelle trägt also einen einzigartigen spezifischen Rezeptor. Nach der Interaktion eines Antigens mit einem spezifischen Rezeptor wird diese Zelle als Zellklon selektiert, vermehrt, aktiviert und differenziert. Die klonale Selektion antigenspezifischer Lymphozyten ist das Grundprinzip der adaptiven Immunität.

T-Zellen tragen an ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor, über den sie Antigene binden, die durch antigenpräsentierende Zellen in prozessierter Form mittels des Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden.

B-Zellen erkennen freie und membranständige Antigene direkt über von ihnen produzierte Immunglobuline (Ig), die entweder in Form von sezernierten Antikörpern existieren, oder eben als BCR auf der Oberfläche der Zellen. Die Aktivierung der B-Zellen erfolgt T-Zell-unabhängig oder T-Zell-abhängig. Letztere ist durch die antigen-spezifische Interaktion von B- und T-Zellen sowie antigenpräsentierenden Zellen gekennzeichnet. Trifft also eine B-Zelle mit ihrem BCR auf ein Antigen, wird sie durch Ko-Stimulation durch T-Helferzellen aktiviert. Die B-Zellen entwickeln sich dann entweder zu kurzlebigen Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder bilden durch intensive Proliferation Keimzentren (*germinal center*, GC). Hier finden Klassenwechsel (*class switch recombination*, CSR) des BCR statt, in deren Folge es zur Entwicklung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen sowie langlebigen Gedächtniszellen mit hoch affinem BCR kommt.

1.1 Die B-Zell-Entwicklung

Die B-Lymphozyten entwickeln sich während der Embryonalentwicklung in der fetalen Leber und später im adulten Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC), welche alle Blutzellarten durch Differenzierung zunächst zu multipotenten Vorläuferzellen regenerieren. Ein erster Schritt der Hämatopoese ist die Festlegung dieser Vorläuferzelle entweder zu erythro-myeloischen Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*, CMP), aus denen Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten oder Mastzellen differenzieren, oder zu frühen lymphozytären Vorläuferzellen (*earliest lymphocyte progenitors*, ELP) (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Aus ELP entwickeln sich zum einen die frühen T-Vorläuferzellen (*early T-lineage progenitors*, ETP) im Thymus, aus denen die meisten T-Zellen differenzieren (Allman et al., 2003). Diese Differenzierung wird durch den T-Zell-Transkriptionsfaktor Notch-1 reguliert. Notch-1 wird durch die Interaktion mit seinem Liganden Jagged1 aktiviert. Eine konstitutive Aktivierung von Notch-1 im Knochenmark hemmt die B-Zell-Entwicklung zugunsten der T-Zell-Entwicklung (Radtke et al., 1999).

Zum anderen entwickeln sich aus ELP die lymphoiden Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitor*, CLP) im Knochenmark, aus denen neben B-Zellen auch T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK Zellen) und dendritische Zellen (DC) differenzieren können (Traver et al., 2000).

B-Zellen durchlaufen, induziert durch verschiedene Differenzierungssignale, die frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung zu unreifen B-Zellen. Anschließend erfolgt die späte Phase der Entwicklung zu reifen B-Zellen in der Milz. Hierbei wird sowohl die Diversität der Antikörper als auch die Selektion der B-Zellen mit funktionellem, nicht autoreaktivem BCR gewährleistet. B-Zellen sind stets von einem tonischen Überlebenssignal durch den BCR abhängig und sterben ohne funktionellen BCR durch Apoptose (Rajewsky, 1996).

Die wichtigste Aufgabe der B-Zell-Entwicklung ist demzufolge die Generierung eines für jede einzelne B-Zelle einzigartigen, funktionellen BCR.

1.1.1 Die frühe B-Zell-Entwicklung

Ein funktioneller BCR setzt sich aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Immunglobulin-Ketten zusammen. Beide bestehen aus einer konstanten und einer variablen Region (V), welche die Spezifität des BCR ausmacht.

Lymphoide Vorläuferzellen differenzieren zunächst zu Prä-pro-B-Zellen, deren Immunglobulinsegmente V (*variabel*), D (*divers*) und J (*joining*) sich noch in der Keimbahnkonfiguration befinden. Im frühen Pro-B-Zell-Stadium erfolgt eine somatische Rekombination der D- und J-Segmente im Immunglobulin-Lokus (Ig-Lokus) der schweren Kette (IgH). Die Rekombination eines V_H-Segments an das umgelagerte DJ_H-Segment markiert den Übergang von der frühen Pro-B-Zelle zu der späten Pro-B-Zelle. Eingeleitet werden die Rekombinationsprozesse durch den Enzymkomplex RAG1/RAG2 (*recombination activating gene*), indem sie die Rekombinations-Signal-Sequenzen (RSS), von der jedes Gen der V-Region flankiert wird, erkennen (Grawunder et al., 1995; Janeway und Travers, 1997; Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

In der Prä-B-Zelle wird bereits eine vollständige schwere Kette (μ -Kette) synthetisiert und zusammen mit einer leichten Ersatzkette, bestehend aus λ_5 und V_{präB}, exprimiert (Brouns et al., 1993; Karasuyama et al., 1990). Zusammen mit der Signaltransduktionseinheit Ig α /Ig β (CD79A/CD79B) wird dieser Komplex als Prä-B-Zell-Rezeptor bezeichnet (Melchers, 1995). Während der Rekombination kann es an den Verknüpfungsstellen durch Exonukleaseaktivität zum Verlust einzelner Nukleotide und durch die Terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) zur Addition nicht-Keimbahn-kodierter Nukleotide, sogenannter N-Nukleotide, kommen, was die Antikörpervielfalt weiter erhöht. In ca. 2/3 der Fälle kommt es zur Verschiebung des Leserahmens oder zur Erzeugung eines Stop-Kodons, wodurch das Protein verkürzt werden kann und folglich nicht mehr funktionell ist. Eine Umlagerung auf dem zweiten Schwerekettenloкус kann erfolgen. Sollte die Gen-Umlagerung erneut unproduktiv sein, kann kein funktioneller BCR ausgeprägt werden. Es fehlen folglich die BCR-vermittelten Überlebenssignale, weshalb die Zelle durch Apoptose stirbt (Rajewsky, 1996). Im Falle eines erfolgreichen V_HD_HJ_H-Rearrangements mit dem Resultat eines funktionellen BCR stoppt die Prä-B-Zelle weitere Umlagerungsprozesse der Schwerekette, da jede Zelle nur Antigenrezeptoren einer Spezifität ausprägt, teilt sich und es kommt zu einer klonalen Expansion.

Daraufhin beginnen die Umlagerungen des Ig-Leichtkettenloкус durch Rekombination der V- und J-Segmente. Zunächst erfolgt die Umlagerung des κ -Lokus (Rajewsky, 1996). Sollten auf beiden κ -Allelen unproduktive Umlagerungen erfolgen, so wird der λ -Lokus umgelagert. Die Antikörperdiversität wird durch die Benutzung verschiedener V-, (D)- und J-Gensegmente erzeugt.

Nach erfolgreicher Umlagerung des Schwer- und Leichtkettenloкус prägt die Zelle auf der Oberfläche einen membranständigen BCR aus. Die danach als unreife B-

Zellen bezeichneten Zellen exprimieren funktionelles IgM an der Oberfläche. Hat die Zelle in diesem Stadium keinen Antigenkontakt, d.h. keinen autoreaktiven B-Zell-Rezeptor, exprimiert sie nach alternativen Polyadenylierungs- und Spleiß-Prozessen zusätzlich zu IgM auch IgD auf der Oberfläche. Sie wird als „naive“ B-Zelle bezeichnet und kann das Knochenmark verlassen und in die Peripherie auswandern (Rajewsky, 1996). Jede B-Zelle weist somit einen einzigartigen BCR auf, der als klonaler Marker benutzt werden kann.

1.1.2 Transkriptionelle Kontrolle der frühen B-Zell-Entwicklung

Die Entwicklung von B-Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Transkriptionsfaktoren Ikaros und PU.1 beeinflussen die Entwicklung lymphoider Vorläuferzellen, indem sie die Expression essentieller Signalrezeptoren wie Flt3, c-Kit und IL-7R α regulieren (Busslinger, 2004).

Aus den CLP entwickeln sich dann zu einer NK- und DC-Zellen, zu anderen B- und T-Zellen. Die Differenzierung zu NK-Zellen wird unter anderem durch ID2 (*inhibitor of DNA binding*) reguliert. Mäuse, denen das ID2-Gen fehlt, besitzen keine NK-Zellen (Yokota et al., 1999). Auch an der Differenzierung zu DC-Zellen ist ID2 regulatorisch beteiligt. ID2 begünstigt die Differenzierung der DC-Zellen auf Kosten der lymphoiden Differenzierung. Dabei inhibiert ID2 die B-Zell-Entwicklung und die Expression einiger B-Zell-spezifischer Gene vermutlich durch Inaktivierung der E2A-Expression (Hacker et al., 2003). Die Differenzierung von CLP zu Pro-B-Zellen ist von den drei Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und PAX5 abhängig (Busslinger, 2004) (Abbildung 1 und 2).

Das E2A-Gen kodiert für zwei alternative Splicevarianten E12 und E47 (Murre et al., 1989), die mit HEB und E2-2 eine Familie verwandter basic Helix-loop-Helix (bHLH)-Proteine, auch als E-Proteine bezeichnet, bilden. E2A kann als E-Protein an spezifische E-Box-Sequenzen (CANNTG) in DNA-Promotoren binden (Murre et al., 1989). E2A bildet spezifisch während der B-Zell-Entwicklung Homodimere (Shen und Kadesch, 1995), wobei dies sehr wahrscheinlich durch die verstärkte Expression des E2A zu Beginn der B-Zell-Entwicklung verursacht wird (Zhuang et al., 1996), und ein möglicher Grund für die Anfälligkeit der B-Zell-Entwicklung gegenüber Mutationen im E2A-Gen ist. So ist die B-Zell-Entwicklung von E2A^{-/-}-Mäusen auf der frühesten Ebene unterbrochen und durch fehlendes D_HJ_H-Rearrangement im IgH-Lokus gekennzeichnet (Zhuang et al., 1994). Die B-Zell-Entwicklung ist jedoch von der Kombination aller exprimierter E-Proteine abhängig,

denn sie wird in Mäusen, denen E2-2 oder HEB fehlt, ebenfalls beeinträchtigt (Zhuang et al., 1998). Die transkriptionelle Aktivität des E2A kann durch Notch-1 (Ordentlich et al., 1998) oder durch Mitglieder der ID-Proteinfamilie gehemmt werden (Sun et al., 1991) (Abbildung 1).

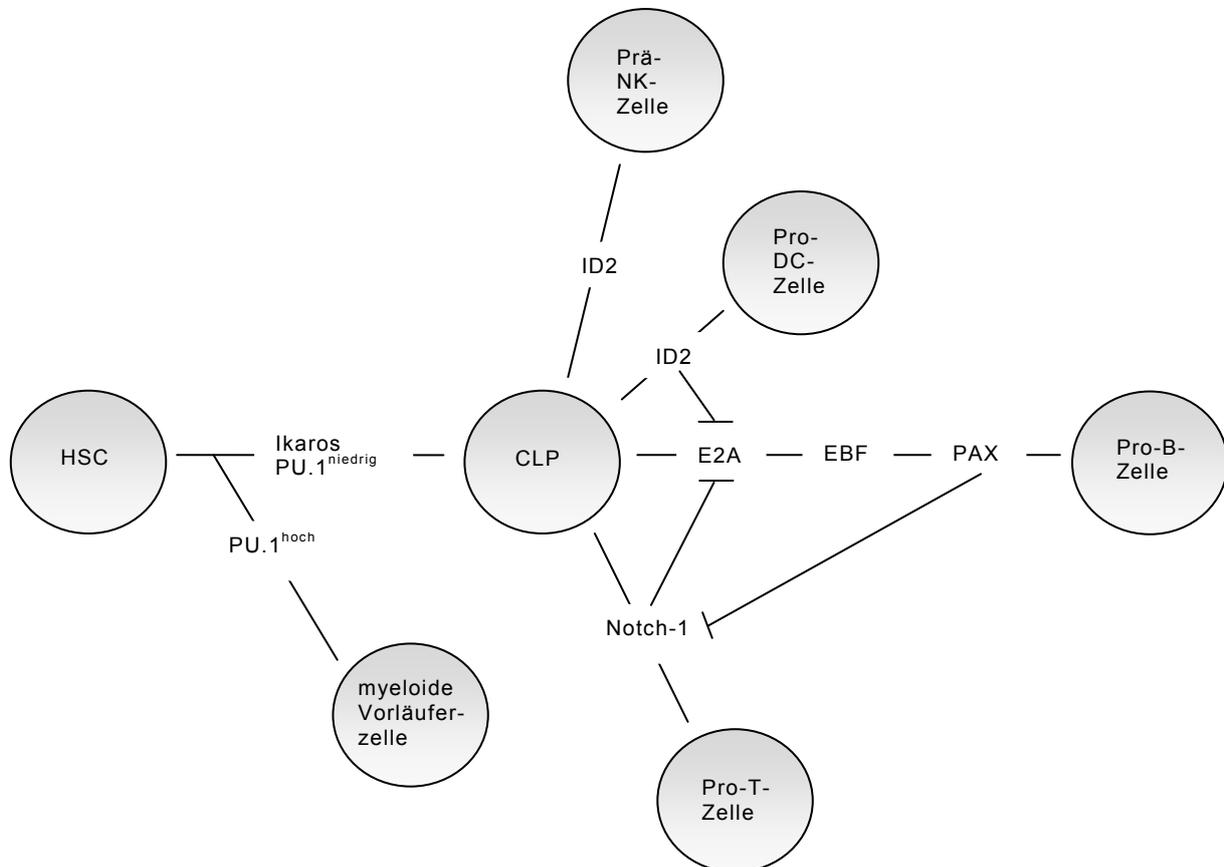


Abbildung 1: Transkriptionelle Kontrolle der frühen B-Zell-Entwicklung und Kreuzrepression lymphoider Signalwege (nach Buslinger, 2004). HSC, hämatopoetische Stammzelle; CLP, lymphoide Vorläuferzelle; NK, natürliche Killerzelle; DC, dendritische Zelle.

Der frühe B-Zell-Faktor (*early b cell factor*, EBF) bildet ebenfalls Homodimere und ist ebenso essentiell für die frühe B-Zell-Entwicklung wie E2A. EBF wird besonders in Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen und reifen B-Zellen exprimiert (Abbildung 2). Interessanterweise führt der Verlust des EBF-Gens zu einem ähnlichen Arrest der frühen B-Zell-Entwicklung wie in E2A-defizienten Mäusen (Lin und Grosschedl, 1995), sodass eine übereinstimmende Kontrolle der frühen Phase der B-Zell-Entwicklung durch diese beiden Transkriptionsfaktoren wahrscheinlich ist. Die Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass die Expression von E2A und EBF in nicht-B-Zelllinien die Expression von B-Zell-spezifischen Genen aktiviert (Choi et al., 1996). Zudem agieren E2A und EBF stark synergistisch bezüglich der Transkription von λ_5 - und $V_{\text{prä}}$ -B-Genen. Detaillierte molekulare Analysen bestätigen

die Bindung von E2A und EBF an die Promotoren der λ_5 - (Sigvardsson, 2000; Sigvardsson et al., 1997) und $V_{\text{pr}\alpha\text{B}}$ - sowie $Ig\alpha$ -Gene (Sigvardsson et al., 2002), gefolgt von deren Aktivierung. Bislang war einzig EBF auch in der Lage den Promotor des $Ig\beta$ -Gens zu regulieren (Akerblad und Sigvardsson, 1999). Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente bestätigten darüber hinaus auch eine direkte Interaktion des E2A mit allen vier Target-Genen (Greenbaum und Zhuang, 2002). Diese Resultate indizieren also eine kooperative Regulation der surrogaten Leichtkette (λ_5 und $V_{\text{pr}\alpha\text{B}}$) und Signalkomponenten $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ des Prä-B-Zell-Rezeptors sowie der Transkription der RAG1- und RAG2-Untereinheiten der V(D)J-Rekombinase (Busslinger, 2004).

Die frühe Phase der B-Zell-Entwicklung ist durch Rearrangements des IgH-Lokus charakterisiert, zuerst der D_HJ_H -Segmente, dann der $V_HD_HJ_H$ -Segmente. E2A und EBF kontrollieren die ersten Umlagerungen durch Regulation der Expression von RAG1/RAG2 (Lin und Grosschedl, 1995; Kee und Murre, 1998). Darüber hinaus spielen beide Transkriptionsfaktoren auch eine direkte Rolle in der V(D)J-Rekombination, indem sie zusammen mit RAG1 und RAG2 D_HJ_H -Rearrangements des endogenen IgH-Lokus in einer nicht-B-Zelllinie aktivieren können (Goebel et al., 2001; Romanow et al., 2000).

Es gibt Hinweise betreffend die genetische Hierarchie der Transkriptionsfaktoren E2A und EBF in der Regulation der frühen B-Zell-Entwicklung, dass EBF E2A nachgeschaltet ist. Beispielsweise exprimieren $EBF^{-/-}$ -Mäuse annähernd normale Mengen an E2A-mRNA (Lin und Grosschedl, 1995), E2A-defiziente Knochenmarkszellen zeigen hingegen deutlich reduzierte Mengen der EBF-Transkripte (Bain et al., 1997). Des Weiteren induziert die ektopische Expression von E2A die Expression von EBF in Makrophagen-Zelllinien im Gegensatz zu EBF, das nicht in der Lage ist, E2A-Transkripte in derselben Zelllinie zu induzieren (Kee und Murre, 1998). Letztendlich scheint auch die Aktivität des EBF-Promotors von einer funktionellen E2A-Bindungsstelle abhängig zu sein (Smith et al., 2002). Die Expression des EBF zusammen mit E2A spezifiziert den B-Zell-Phänotyp durch Koordination der Induktion der Genexpression während der frühen B-Zell-Entwicklung (Medina et al., 2004).

Die alleinige Aktivierung B-Zell-spezifischer Gene sowie die V(D)J-Rekombination reguliert durch E2A und EBF reicht nicht aus, um B-Zell-Vorläufer in die lymphoide Linie zu determinieren. Die Festlegung der Differenzierung erfolgt erst mit der Expression von PAX5. In PAX5-defizienten Mäusen arretiert die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark in einem sehr frühen Pro-B-Zell-Stadium (Urbanek et al., 1994).

Diesen Zellen bleibt ein breites lympho-myeloides Potential erhalten und sie sind unter der Stimulation durch Zytokine in der Lage, zu natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen oder Granulozyten zu differenzieren (Nutt et al., 1999a). PAX5 ist demnach der kritische Faktor der B-Zell-Entwicklung, der die Entwicklungsmöglichkeiten der frühen Vorläuferzellen begrenzt.

PAX5 (*paired box*) wird im hämatopoetischen System vom Pro-B-Zell-Stadium bis zum reifen B-Zell-Stadium exprimiert (Adams et al., 1992) (Abbildung 2). Der alleinige Verlust von PAX5 führt durch Umwandlung von Pro-B-Zellen mit begrenztem B-lymphoiden Potential in frühe Vorläuferzellen mit breitem Entwicklungsspektrum zur Umkehr der Festlegung der B-Zell-Differenzierung. Durch PAX5-Deletion in Pro-B-Zellen konnte gezeigt werden, dass zuvor festgelegte Pro-B-Zellen ihre Fähigkeit in Makrophagen zu differenzieren *in vitro* wiedererlangt haben (Mikkola et al., 2002).

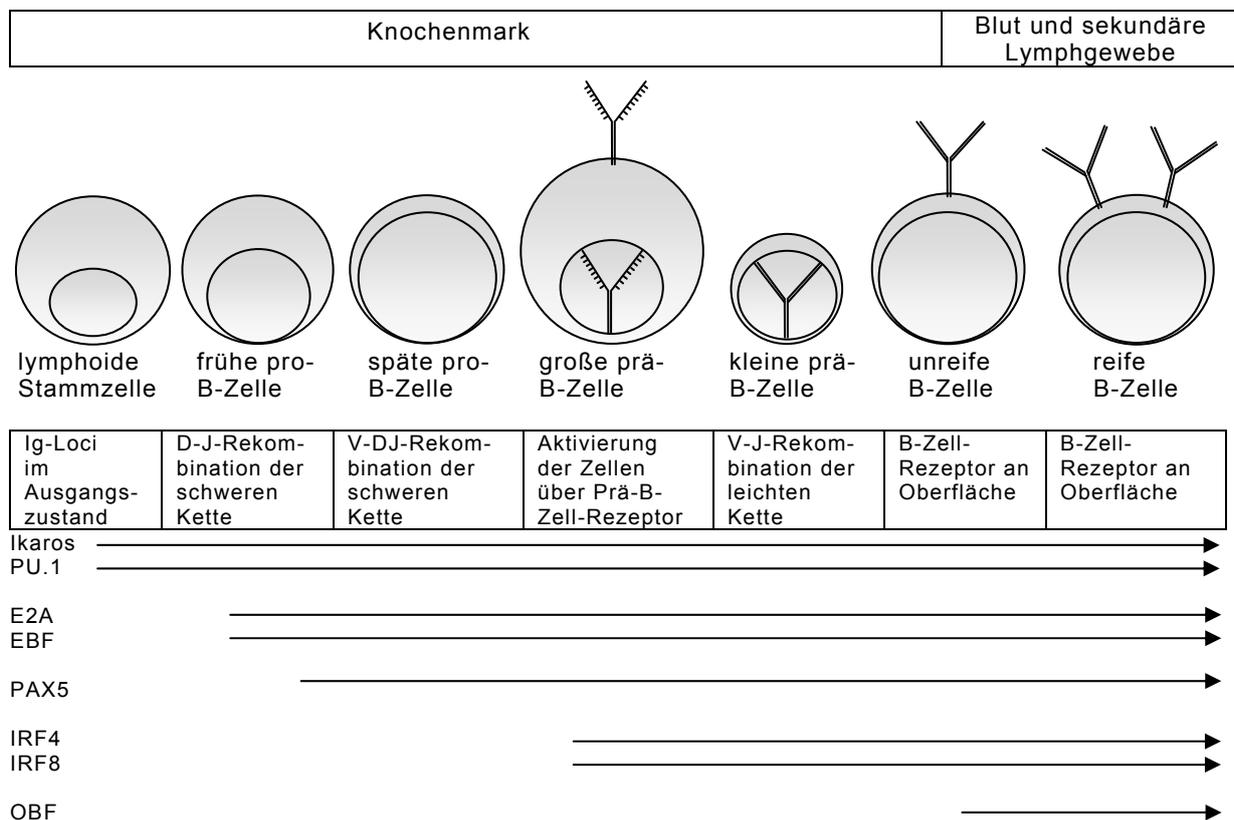


Abbildung 2: Schematische Darstellung der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark. Jeder Differenzierungsstatus wird durch die Darstellung einer Zelle repräsentiert. Die entsprechenden regulatorischen Transkriptionsfaktoren sind angegeben.

PAX5 spielt bei der Differenzierung eine duale Rolle, denn zum einen aktiviert es B-Zell-spezifische Gene wie BLNK, Igα und CD19 (Nutt et al., 1999b), zum anderen unterdrückt es die Gene anderer Linien, wie den T-lymphoide Linien begünstigenden

Faktor Notch-1 oder den myeloiden Zytokin-Rezeptor M-CSF-R (Souabni et al., 2002). Auch E2A und EBF werden durch eine Rückkopplungsschleife von PAX5 reguliert (Cobaleda et al., 2007). CD19 und BLNK sind kritische PAX5-Target-Gene, resultiert ihr Fehlen in Mäusen doch in einem Block der B-Zell-Entwicklung analog dem in PAX5-defizienten Mäusen (Hayashi et al., 2003). Des Weiteren spielt PAX5 auch eine Rolle in der Kontrolle der V_HDJ_H -Rekombination. So konnte gezeigt werden, dass PAX5 mit Chromatinregulatoren kooperiert, wodurch es zur Induktion einer Kontraktion des IgH-Lokus kommt. Dadurch wird eine weite Spanne von V_HDJ_H -Rekombinationen mittels Nebeneinanderstellung von distalen V_H -Genen neben proximalen D_HJ_H -rearrangierten Gensegmenten ermöglicht (Fuxa et al., 2004). Betreffend die Hierarchie der Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und PAX5 in der B-Zell-Entwicklung, so wird PAX5 durch E2A und EBF induziert (Kee und Murre, 1998). Demnach regulieren vermutlich beide das PAX5-Gen. Gesichert ist, dass PAX5 in der Hierarchie der B-Zell-Entwicklung den Transkriptionsfaktoren E2A und EBF nachgeschaltet ist (Nutt et al., 1998; Nutt et al., 1997).

Die frühen Regulatoren E2A, EBF und PAX5 kontrollieren die Synthese aller Prä-B-Zell-Rezeptorkomponenten (λ_5 , $Ig\alpha$, $Ig\beta$, $V_{pr\ddot{a}}B$, CD19) sowie die Expression des zentralen Adaptorproteins BLNK, sodass sie für den B-Zell-Phänotyp essentiell sind und die prä-BCR-Signaltransduktion induzieren. Die Terminierung der prä-BCR-Signaltransduktion wird durch IRF4 und IRF8 initiiert (Abbildung 2), die zur Familie der Interferon-regulierenden Faktoren gehören. Sie regulieren die Expression der Leichtkettengene λ_5 und $V_{pr\ddot{a}}B$ herunter, was in einer Differenzierung zu Prä-B-Zellen sowie Initiation von IgL-Gen-Rearrangements resultiert (Lu et al., 2003).

1.1.3 Keimzentrumsreaktion und B-Zell-Differenzierung

Treffen naive B-Zellen, die nach erfolgreicher V(D)J-Rekombination über einen funktionellen B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche verfügen, auf ein Antigen und werden von T-Zellen über die CD40/CD40L-Interaktion sowie durch Zytokine stimuliert, werden sie aktiviert. Einige wandern in die Follikel sekundärer lymphatischer Organe und bilden dort durch Proliferation Keimzentren (*germinal center*, GC) aus (MacLennan et al., 1992).

Funktional sind GC die Orte intensiver B-Zell-Proliferation und der somatischen Hypermutationen (SHM). Hierbei werden Mutationen in die V-Region der Ig-Gene eingeführt. Die Rate dieser Mutationen ist mit 10^{-3} bis 10^{-4} Mutationen pro Basenpaar eine Million mal höher als die spontane Mutationsrate im menschlichen Genom (Rajewsky et al., 1987). Vorrangig finden Punktmutationen statt, aber auch

Deletionen und Insertionen sind zu beobachten (Goossens et al., 1998). Während der SHM werden bevorzugt in bestimmten Sequenzmotiven, sogenannten „hot spots“, Mutationen eingeführt (Rogozin und Diaz, 2004). Somatisch mutierte Zellen konkurrieren um die Bindung an das von follikulär dendritischen Zellen (FDC) präsentierte Antigen. Das von naiven B-Zellen exprimierte BCL2 wird während der Keimzentrumsreaktion herunterreguliert, wodurch die GC-Zellen gegenüber der Apoptose empfindlicher werden (Martinez-Valdez et al., 1996). GC-B-Zellen, die keinen oder nur einen gering affinen Kontakt zu einem Antigen herstellen können, werden durch Apoptose eliminiert (Rajewsky, 1996). Nur Zellen, die durch Antigenbindung positiv selektioniert werden, überleben die GC-Reaktion.

Basierend auf dem Prozess des Klassenwechsels kann die Effektorfunktion durch Austausch der konstanten Schwereketten-Region verändert werden, die variable Region und damit die Spezifität des B-Zell-Rezeptors bleiben hier erhalten. Schließlich differenzieren GC-B-Zellen mit hoch affinen, somatisch-mutierten BCR durch zusätzliche Stimulation durch Zytokine zu langlebigen Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen (MacLennan et al., 1992). Plasmazellen entsprechen einer terminal differenzierten B-Zelle, deren Aufgabe die Sezernierung von Antikörpern ist. Sie exprimieren das Glykoprotein CD38, jedoch ist die Expression der B-Zell-spezifischen Marker wie CD19, CD20 sowie die Expression der MHCII-Moleküle nur noch gering. Des Weiteren wird der BCR nicht mehr exprimiert (Calame, 2001).

1.1.4 Transkriptionelle Kontrolle der Keimzentrumsreaktion und der B-Zell-Differenzierung

Als repressiver Transkriptionsfaktor inhibiert BCL6 sowohl Gene, die in die B-Zellaktivierung involviert sind als auch Gene, die in der Kontrolle des Zellzyklus eine Rolle spielen, beispielsweise Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren p21 (Cip1/Waf1) und p27 (Kip1) (Shaffer et al., 2000). Dadurch wird die rasche Zellteilung, die insbesondere in der dunklen Zone des GC beobachtet werden kann, ermöglicht. Durch BCL6 wird die Expression von Blimp-1 inhibiert, wodurch die terminale Plasmazell-Differenzierung gehemmt wird (Reljic et al., 2000). Blimp-1 ist für die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen essentiell.

PAX5 spielt neben seiner wichtigen Rolle in der frühen B-Zell-Entwicklung auch eine Rolle in der Plasmazell-Differenzierung. Es unterdrückt die Expression von Genen in reifen B-Zellen, die für die Entwicklung von Plasmazellen benötigt werden (Reimold et al., 1996). Ferner führt die Überexpression von PAX5 in der späten B-Zell-Entwicklung *in vitro* zur erhöhten Proliferation und zur Unterdrückung der Ig-

Sekretion (Usui et al., 1997). Wie BCL6 wird auch PAX5 in den GC-B-Zellen stark exprimiert und inhibiert die Plasmazell-Entwicklung auch durch Repression des XBP-1, ein transkriptioneller Aktivator, der für die Plasmazell-Entwicklung sowie die Antikörper-Sekretion benötigt wird (Reimold et al., 2001). Darüber hinaus wird auch die Expression der J-Kette unterdrückt, die zur Sekretion der Immunglobuline IgM und IgA benötigt wird.

Sowohl BLIMP-1 als auch XBP-1 sind Schlüsselregulatoren in der Plasmazell-Entwicklung. Beide sind jeweils in der Lage, die Plasmazell-Entwicklung in B-Zelllinien auszulösen (Reimold et al., 2001; Turner et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass BLIMP-1 die Expression der Transkriptionsfaktoren wie E2A, EBF, PAX5, PU.1 und Oct2, die in reifen B-Zellen noch exprimiert werden, eliminieren kann (Shaffer et al., 2000). Folglich werden durch BLIMP-1 B-Zell-spezifische Gene in ihrer Expression vermindert. Dazu gehören Gene, die in die Kontrolle der Zellproliferation involviert sind, wie z.B. c-myc (Lin et al., 1997) sowie Gene, welche die B-Zell-Funktion und -Identität regulieren, wie CD19, BLNK oder CD79A. BLIMP-1 ist also ursächlich am Verlust des B-Zell-Phänotyps der Plasmazellen beteiligt.

Von der frühen B-Zell-Entwicklung ist bereits bekannt, dass die drei Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und PAX5 B-Zell-spezifische Gene, wie z.B. CD19 und CD79A regulieren (Bartholdy und Matthias, 2004). Alle drei Faktoren sind auch in reifen B-Zellen exprimiert mit Ausnahme der Plasmazellen, in denen EBF und PAX5 herunterreguliert sind (Bartholdy und Matthias, 2004; Underhill et al., 2003). Die Rolle des PAX5 in der B-Zell-spezifischen Genexpression in reifen B-Zellen ist durch konditionelle Inaktivierung des PAX5-Gens, die zum Verlust der Identität und der Funktion reifer B-Zellen führt, gut bekannt und einige direkte PAX5-Target-Gene wie CD19, CD79A und BLNK konnten identifiziert werden (Horcher et al., 2001; Nutt et al., 1998). PAX5 ist demnach für die Aufrechterhaltung des B-Zell-Phänotyps essentiell. Die Funktionen von EBF und E2A in reifen B-Zellen sind dagegen unklarer. Dennoch konnte eine wichtige Aufgabe in der Regulation des Klassenwechsels und der somatischen Hypermutation sowie in der Differenzierung von Marginalzonen-B-Zellen gezeigt werden (Quong et al., 2004; Sayegh et al., 2003). Des Weiteren wird E2A durch direkte Interaktion mit ID2 negativ reguliert. ID2 besitzt eine bHLH-Struktur und dimerisiert mit Transkriptionsfaktoren wie E2A. Da ID2 jedoch die DNA-bindende Domäne fehlt, wird die Bindung der Heterodimere an die DNA verhindert und die transkriptionelle Aktivität von E2A inhibiert (Engel und Murre, 2001). ID2 wird in reifen B-Zellen, in der Plasmazell-Differenzierung, hochreguliert, verbunden mit einem Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene

(Underhill et al., 2003). Auch EBF spielt eine Rolle in reifen B-Zellen. So ist die PAX5-vermittelte Aktivierung der B-Zell-spezifischen Gene wie CD19 und CD79A abhängig von EBF, wodurch EBF ebenfalls zur Aufrechterhaltung des B-Zell-Phänotyps beiträgt (Medina et al., 2004).

1.2 B-Zell-Lymphome

Maligne Erkrankungen lymphoider Zellen werden als Lymphome bezeichnet. Die World Health Organisation (WHO) teilt diese in Non-Hodgkin Lymphome (NHL) und in Hodgkin Lymphome (HL) ein. Innerhalb der NHL unterscheidet man zwischen T-Zell-, NK-Zell- und B-Zell-Lymphomen. Kriterien der Klassifikation sind morphologische Merkmale, der immunhistochemische Phänotyp und häufig vorkommende gemeinsame genetische Läsionen (Jaffe und World Health Organization., 2001). Der dominierende Teil aller Lymphome ist B-Zell-Ursprungs (Fisher, 2003). Zu den häufigsten B-Zell-NHL gehören das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL), das Follikuläre Lymphom (FL) sowie das Mantelzell-Lymphom (MCL). Eher selten ist das Burkitt Lymphom (BL).

Der Nachweis somatisch mutierter IgV-Gene konnte zeigen, dass die meisten dieser Lymphome von GC-B-Zellen oder Post-GC-B-Zellen abstammen (Klein et al., 1998). In einigen B-Zell-Lymphomen ist die somatische Hypermutation noch aktiv, was die Abstammung von GC-B-Zellen untermauert und zudem auf die Transformation ihrer Ursprungszellen im GC hinweist. Im Verlauf der Keimzentrumsreaktion finden genetische Umbauprozesse (somatische Hypermutation und Klassenwechsel) statt, deren Fehlschlagen zur Transformation einer GC-B-Zelle führen kann. Während dieser Prozesse werden DNA-Strangbrüche eingeführt, wodurch es zu Translokationen von Onkogenen in Immunglobulin-Switch-Regionen (Klassenwechsel) oder Immunglobulin-V-Regionen (somatische Hypermutation) kommen kann, wie z.B. die Translokation des c-myc-Onkogens im Burkitt Lymphom (Küppers und Dalla-Favera, 2001). Auch ist die somatische Hypermutation ursächlich an häufig auftretenden Translokationsbruchpunkten des BCL6-Gens, das entweder mit Ig-Genen oder nicht-Ig-Genen fusioniert ist, beteiligt (Akasaka et al., 2000). Vermutlich führt der Prozess der somatischen Hypermutation nicht nur zur Entstehung chromosomaler Translokationen, sondern auch zur Einführung von Punktmutationen in nicht-Ig-Gene. Ebenfalls im BCL6-Gen konnten solche Mutationen gefunden werden (Pasqualucci et al., 1998). Darüber hinaus birgt die im GC bestehende hohe Proliferationsrate der GC-B-Zellen ein Risiko für maligne Transformationen. Durch hohe Proliferationsraten bedingte DNA-Schädigungen, die

z.B. Deletionen oder chromosomale Amplifikationen verursachen können, leisten so ihren Beitrag zur Entstehung von Lymphomen.

Es lässt sich daher schließen, dass das Keimzentrum bei der Pathogenese der B-Zell-Lymphome eine entscheidende Rolle spielt, bedingt durch die starke Proliferation der B-Zellen während der Keimzentrumsreaktion sowie durch genetische Umbauprozesse, die während der Keimzentrumsreaktion stattfinden.

1.3 Das Hodgkin Lymphom

Im Jahr 1832 veröffentlichte Thomas Hodgkin eine Arbeit, in der er sieben Patienten mit Tumoren in Lymphknoten und Milz beschrieb. Über 60 Jahre später wurde das Hodgkin Lymphom von Dorothy Reed und Carl Sternberg weiter spezifiziert.

Das HL ist eines der am häufigsten auftretenden Lymphome in der westlichen Welt mit einer Inzidenz von zwei bis drei neu erkrankten Personen pro 100.000. Die WHO unterteilt das HL in zwei Entitäten, das klassische Hodgkin Lymphom (cHL, ca. 95%) und den nodulär lymphophozyten-prädominanten Typ (nlpHL, ca. 5%), die sich sowohl in der Morphologie als auch im Immunphänotyp voneinander unterscheiden (Harris, 1999). Das cHL ist wiederum in vier Subtypen unterteilt: nodulär sklerosierend (*nodular sclerosis* (ns), 60-80% des cHL), mischzellig (*mixed cellularity* (mc), 15-30% des cHL), lymphozytenarmer (*lymphocyte depleted* (ld), 1% des cHL) und lymphozytenreicher Typ (*lymphocyte-rich classical* (lrcHL), 6% des cHL) (Jaffe und World Health Organization., 2001).

Die Tumorzellen des cHL sind die mononukleären Hodgkin Zellen sowie die multinukleären Reed-Sternberg Zellen (Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) Zellen) (Abbildung 3). Die Tumorzellen des nlpHL werden als LP Zellen (*lymphocytic predominant*) bezeichnet.

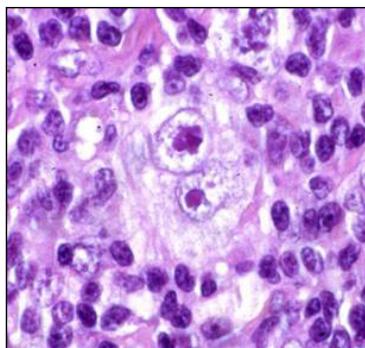


Abbildung 3: Morphologie der Hodgkin- und Reed/Sternberg Zellen. Hämalaun/Eosin-Färbung eines Falles des klassischen Hodgkin Lymphoms. HRS Zellen sind in der Mitte zu erkennen.

Dabei repräsentieren diese malignen Zellen nur etwa 1% der Gesamtzellen des infiltrierenden Gewebes, während sich die umgebenden Zellen aus CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen zusammensetzen.

1.3.1 Ursprung und Klonalität der HRS Zellen

Der Phänotyp des Hodgkin Lymphoms verursachte Schwierigkeiten, die Fragen nach dem zellulären Ursprung der HRS Zellen zu beantworten. HRS Zellen gleichen morphologisch und phänotypisch keinem der bekannten hämatopoetischen Zelltypen (Drexler, 1992; Trümper, 1993), weshalb die Zuordnung zu einer Linie lange Zeit schwer möglich war. So weisen HRS Zellen einen höchst variablen Immunphänotyp auf. CD30, ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR)-Superfamilie, ist in fast allen Fällen nachweisbar (Drexler, 1992). CD15, ein Granulozyten- und Monozytenmarker, wird in ca. 70% der Fälle exprimiert (Drexler, 1992). Demnach werden beide als diagnostische Marker eingesetzt. Der B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor PAX5 ist üblicherweise nachweisbar und daher ein geeigneter Marker zur Unterscheidung zwischen cHL und bestimmten T-Zell-Lymphomen. Die Expression einiger weiterer Marker ist unterschiedlich, wie z.B. die Expression des Markers dendritischer Zellen Fascin, des T-Zell-Markers Granzym B und des B-Zell-Markers CD20.

Des Weiteren fehlt HRS Zellen zum einen die Expression typischer lymphoider Marker (Drexler, 1992), wobei sie stattdessen Marker anderer hämatopoetischer Linien ausprägen (Trümper et al., 1993). Zum anderen erschwert die niedrige Tumorzellfrequenz die meisten Standard-Analysetechniken der Molekularbiologie wie Southern Blot Hybridisierung und konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), mit denen andere Lymphome normalerweise auf klonale Ig- oder TCR-Gen-Umlagerungen analysiert werden können.

Durch die Möglichkeit der Isolierung einzelner HRS Zellen aus Gewebeschnitten mittels Mikrodissektion und anschließender Einzelzell-PCR zur Amplifikation umgelagerter IgV-Gene konnten die B-Zellen als Vorläuferzellen der HRS Zellen identifiziert werden, da in den isolierten HRS Zellen klonale IgV-Gen-Umlagerungen gefunden wurden (Kanzler et al., 1996; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 2000). In nahezu allen Fällen zeigten die umgelagerten IgV-Gene somatische Hypermutation (Kanzler et al., 1996; Küppers et al., 1994), die normalerweise in reifen B-Zellen, die in Keimzentren proliferieren, auftritt. Demnach konnte gezeigt werden, dass HRS Zellen von GC-B-Zellen abstammen (Küppers et al., 1994). In

etwa einem Viertel der analysierten cHL-Fälle fanden sich inaktivierende Mutationen wie Punktmutationen, die Stop-Kodons generieren, oder Deletionen, die zur Verschiebung des Leserasters führen. Das Auftreten solcher destruktiver Mutationen führt in normalen GC-B-Zellen aufgrund fehlender Überlebenssignale durch einen funktionellen BCR zur Eliminierung dieser Zellen durch Apoptose. Da HRS Zellen trotz fehlendem BCR der regulären negativen Selektion entgehen, erhalten sie wahrscheinlich durch transformierende Ereignisse die Möglichkeit, der Apoptose zu entgehen. Die Identifikation der destruktiven Mutationen in HRS Zellen im Verlauf der somatischen Hypermutation deutet auf eine Abstammung von prä-apoptischen GC-Zellen hin (Kanzler et al., 1996).

1.3.2 Pathogenese des klassischen Hodgkin Lymphoms

1.3.2.1 Deregulierte Signalwege im HL

Während in nicht-malignen Zellen die Aktivierung der meisten Signalwege streng reguliert wird, sind in HRS Zellen zahlreiche Signalwege aberrant aktiviert. Die experimentelle Inhibition vieler Signalmoleküle konnte die Wichtigkeit dieser konstitutiven Aktivierung für die Proliferation und das Überleben der HRS Zellen deutlich machen.

NF- κ B-Transkriptionsfaktoren sind Homo- und Heterodimere fünf verschiedener Proteine: c-Rel, p50, p52, RelB und p65 (RelA). In unstimulierten Zellen sind die NF- κ B-Dimere durch Inhibitoren, I κ B, gebunden. Die I κ B demaskieren das NLS (*nuclear localisation signal*) der Dimere und verhindern so deren Translokation in den Zellkern und die Bindung an die Promotoren der Zielgene (Ghosh und Hayden, 2008). NF- κ B-Proteine werden von einer Fülle von Stimuli aktiviert, die den Abbau der I κ B und die Translokation von NF- κ B in den Zellkern induzieren. Die Aktivierung von NF- κ B verursacht Änderungen in der Expression einer großen Anzahl von Proteinen, die an der Immunantwort beteiligt sind, wie z.B. Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Enzyme. Ebenso werden antiapoptotische Proteine und durch eine negative Rückkopplungsschleife auch die I κ B selbst in ihrer Expression beeinflusst (Ghosh und Hayden, 2008). In HRS Zellen ist NF- κ B konstitutiv aktiviert. Dies spielt eine zentrale Rolle für das Überleben der Tumorzellen. Verschiedene Mechanismen führen in HRS Zellen zu einer NF- κ B-Aktivität. Rezeptoren wie CD30, CD40 und RANK, die mit TRAF (*TNF receptor associated factor*) assoziiert sind und den klassischen NF- κ B-Signalweg aktivieren, sind in HRS Zellen exprimiert. Die Liganden dieser Rezeptoren finden sich häufig in benachbarten Zellen des Infiltrats

(Carbone et al., 1995; Fiumara et al., 2001; Horie et al., 2002). Das hohe Maß an CD30-Expression erlaubt möglicherweise sogar eine vom Liganden unabhängige Signaltransduktion (Horie et al., 2002). Es konnte allerdings kürzlich gezeigt werden, dass die Stimulation von CD30 in HL-Zelllinien unter anderem keinen Einfluss auf die konstitutive NF- κ B-Aktivierung hat (Hirsch et al., 2008), die demzufolge durch andere Veränderungen im HL verursacht wird. Zwei weitere genetische Veränderungen, die zur NF- κ B-Aktivierung führen, wurden beschrieben. Zum einen umfassen die häufigen Zugewinne auf Chromosom 2p in den HRS Zellen das NF- κ B-Gen *c-Rel*, zum anderen sind in den *I κ B α* - und *I κ B ϵ* -Genen inaktivierende Mutationen gefunden worden (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 2003; Jungnickel et al., 2000). In EBV-positiven Fällen des cHL trägt das EBV-kodierende Gen LMP1 zur Aktivierung von NF- κ B bei, indem es einen aktivierten CD40-Rezeptor nachahmt (Kilger et al., 1998).

HRS Zellen rekrutieren reaktive Zellen ihres Mikromilieus und modulieren ihre eigene autokrine Selbststimulation durch die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine. Die Signale der meisten Zytokine werden durch den JAK/STAT-Signalweg vermittelt. Nach Aktivierung des Rezeptors werden JAK-Kinasen aktiviert, welche die Mitglieder der Familie der STAT-Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Diese Aktivierung erlaubt es den STAT zu dimerisieren, in den Kern zu wandern und ihre entsprechenden Zielgene zu induzieren. In HRS Zellen sind STAT3, STAT5 und STAT6 aktiviert (Kube et al., 2001; Skinnider et al., 2001). Die Aktivierung von STAT6 in HRS Zellen wird vermutlich über die autokrine IL13/IL13R-Rückkopplungsschleife vermittelt, wodurch die Proliferation der HRS Zellen verstärkt wird (Kapp et al., 1999). Die Expression und Aktivierung von STAT5 in HRS Zellen wird durch die Aktivierung von NF- κ B verstärkt (Hinz et al., 2002). Des Weiteren erfolgt die Aktivierung von STAT5 über die autokrine und auch parakrine IL21R-Signaltransduktion (Scheeren et al., 2008). STAT3 ist ebenfalls weitgehend in HRS Zellen aktiviert und scheint eine wichtige Rolle für deren Proliferation zu spielen. Die Hemmung der STAT3-Aktivität in HL-Zelllinien inhibiert die Proliferation der Zellen (Holtick et al., 2005).

Eine mechanistische Erklärung für den deregulierten JAK/STAT-Signalweg in HRS Zellen könnten destruktive Mutationen des SOCS1-Gens darstellen. Solche Mutationen sind sowohl im cHL als auch im nlpHL zu finden (Mottok et al., 2007; Weniger et al., 2006). SOCS1 kodiert für einen Inhibitor Zytokin-vermittelter Signale in der JAK/STAT-Signalkaskade. Es wird daher angenommen, dass inaktivierende

Mutationen in SOCS1 als Tumorsuppressor im HL wirken, die zur konstitutiven Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs beitragen.

1.3.2.2 Die Rolle des Epstein-Barr Virus (EBV)

In etwa 40% der cHL Fälle sind die HRS Zellen mit dem Epstein-Barr Virus infiziert. Es handelt sich dabei um ein humanpathogenes transformierendes γ -Herpesvirus, mit dem ca. 95% der weltweiten Bevölkerung infiziert sind. Es infiziert hauptsächlich B-Zellen (Rickinson et al., 1996). EBV-infizierte HRS Zellen exprimieren die drei latenten Gene EBNA1 (*EBV nuclear antigen 1*), LMP1 und LMP2 (*latent membrane proteins 1 und 2*) (Jarrett und MacKenzie, 1999). EBNA1 ist essentiell für die Replikation des viralen Genoms in proliferierenden Zellen. LMP1 ahmt einen aktivierten CD40-Rezeptor nach, der eine zentrale Rolle in der Wechselwirkung zwischen B- und T-Zellen spielt und ebenso am Überleben von GC-B-Zellen beteiligt ist, vor allem durch Aktivierung von NF- κ B (Kilger et al., 1998). LMP1 bindet an die Zellmembran und übermittelt ein konstitutives Signal ohne jegliche Liganden-Bindung. LMP1 agiert als ein Onkogen und führt zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in EBV-infizierten HRS Zellen. Das onkogene Potenzial konnte mit Hilfe von LMP1-transgenen Mäusen gezeigt werden, die B-Zell-Lymphome entwickeln. LMP2a enthält in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITAM-Motiv, das unter anderem in den Ko-Rezeptoren CD79A und CD79B des BCR vorkommt (Alber et al., 1993). Über das ITAM-Motiv kann LMP2a zytoplasmatische Tyrosinkinasen rekrutieren, die normalerweise an den BCR binden und so einen funktionellen BCR ersetzen (Alber et al., 1993; Casola et al., 2004). Die Fähigkeit des EBV, BCR-defiziente humane GC-B-Zellen vor Apoptose zu schützen, zeigte sich durch Infektion tonsillärer GC-B-Zellen mit EBV *in vitro* zur Etablierung lymphoblastoider Zelllinien, die dann vielfach „verkrüppelte“ BCR trugen (Bechtel et al., 2005; Chaganti et al., 2005; Souza et al., 2005). Die Annahme der Beteiligung von EBV an der Pathogenese des HL wird zusätzlich durch die Beobachtung fundiert, dass praktisch alle Fälle des cHL, in denen die HRS Zellklone destruktive somatische IgV-Genmutationen tragen und somit keinen funktionellen BCR exprimieren, EBV-infiziert sind (Bräuninger et al., 2006). Es scheint also, dass eine GC-B-Zelle, die eine unvorteilhafte, die Expression eines funktionellen BCR beeinträchtigende Mutation erwirbt, überleben kann und sich unter Umständen nur dann zu einem HRS Zellklon entwickeln kann, wenn die Zelle EBV-infiziert ist.

1.3.2.3 Verlust der B-Zell-Identität der HRS Zellen

In HRS Zellen konnte durch immunhistochemische Färbung die Herunterregulation von B-Zell-Markern wie CD79, Oct2, BOB1 und PU.1 gezeigt werden (Re et al., 2001; Stein et al., 2001; Torlakovic et al., 2001). Durch die fehlende Expression der Transkriptionsfaktoren, die die Ig-Gene regulieren (Oct2, BOB1 und PU.1), können vermutlich die niedrigen oder nicht vorhandenen Transkriptionslevel von Ig-Genen in HRS Zellen erklärt werden (Stein et al., 2001). Zudem finden sich Hinweise, dass die Ig-Loci durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierungen inaktiviert sind (Ushmorov et al., 2004). Neben Ig-Genen können auch B-Zell-spezifische Gene wie BCMA, LCK, SYK, CD19, CD79B und BOB1 von inaktivierenden Promotormethylierungen betroffen sein (Doerr et al., 2005; Ushmorov et al., 2006). Globale Genexpressionsanalysen von HL-Zelllinien und normalen B-Zellen zeigten, dass die Herunterregulation von B-Zell-spezifischen Genen weitaus umfassender ist als bis dato Analysen gezeigt hatten. Es handelt sich also nicht um die Herunterregulation einiger B-Zell-spezifischer Marker, sondern um einen generellen Defekt in der B-Zell-spezifischen Genexpression. Die Expression nahezu jedes B-Zell-, Lymphozyten-, oder hämatopoetisch-spezifischen Gens zeigt eine deutliche Reduktion in den HRS Zellen oder fehlt gänzlich im Vergleich zu normalen B-Zellpopulationen (Schwering et al., 2003). Interessanterweise sind in HRS Zellen CD40, CD80, CD86 sowie MHCII, die für die Interaktion mit T-Zellen sowie Antigenpräsentation wichtig sind, noch exprimiert, sodass die Fähigkeit zur Antigenpräsentation für HRS Zellen essentiell zu sein scheint (Poppema, 1996). Des Weiteren ist es bemerkenswert, dass trotz Herunterregulation der B-Zell-spezifischen Gene der wichtige Regulator der B-Zell-Spezifikation, PAX5, in HRS Zellen nachgewiesen werden kann (Foss et al., 1999). Da Mutationen im PAX5-Gen nicht gefunden wurden (Schwering et al., 2003), bleibt die Ursache für die Deregulation der PAX5-Zielgene in den HRS Zellen zunächst unklar, ebenso wie der Grund für den Verlust der B-Zell-Identität.

Es wurde diskutiert, dass der Phänotyp der HRS Zellen, wie verminderte Expression von beispielsweise CD19, CD20, Blk sowie die Expression von IRF4 (MUM1) und CD138 als Plasmazellmarker, möglicherweise einer Plasmazelldifferenzierung entspricht (Falini et al., 2000). Die Expression anderer Marker, wie z.B. Oct2 und BMCA, die normalerweise in Plasmazellen exprimiert werden, ist in HRS Zellen jedoch vermindert. Ferner sprechen die fehlende Ig-Expression (Marafioti et al., 2000) sowie die Expression des PAX5 gegen eine terminale B-Zelldifferenzierung. Ergebnisse von *in vitro*-Analysen schließen sogar eine Plasmazelldifferenzierung

unter Expression des PAX5 aus (Baberis et al., 1990; Usui et al., 1997). Auch die Ausprägung von Markern anderer Linien in HRS Zellen, wie Marker von T-Zellen z.B. GATA-3, ein T-Zell-Transkriptionsfaktor, oder der Makrophagen-Rezeptor CSF-R, ist mit dem Phänotyp der Plasmazelldifferenzierung nicht kompatibel.

Notch-1, ein T-Zell-Transkriptionsfaktor, ist in HRS Zellen aberrant ausgeprägt. Notch-1 wird durch die Interaktion mit seinem Liganden Jagged1, der in nicht-malignen Bystander-Zellen ausgeprägt wird, aktiviert, wodurch es zu einer massiven Stimulation der Proliferation und Apoptoseresistenz der Tumorzellen kommt (Jundt et al., 2002). Der genaue Einfluss von Notch-1 in HRS Zellen wird noch immer kontrovers diskutiert, dennoch trägt dessen aberrante Expression und Aktivierung sowohl zum Verlust des B-Zell-Phänotyps als auch zur Expression einiger T-Zell-Marker bei.

Unabhängig vom Mechanismus, der dem Verlust der B-Zell-Identität zugrunde liegt, könnte diese phänotypische Veränderung der HRS Zellen ein Selektionsfaktor sein, der für die Pathogenese des HL eine wichtige Rolle spielt: HRS Zellen finden ihren Ursprung in prä-apoptotischen GC-B-Zellen, die aufgrund unvorteilhafter V-Gen-Mutationen keinen funktionellen BCR ausprägen können. Da B-Zellen von einem Überlebenssignal durch einen funktionellen BCR abhängig sind, scheint der Verlust der B-Zell-Identität demnach vermutlich wichtiger Teil einer Strategie der HRS Zellen zu sein, der stringenten Selektion für einen hoch affinen BCR, und somit der Apoptose, zu entgehen.

1.4 Das anaplastisch großzellige T-Zell-Lymphom (ALCL)

1985 beschrieben Stein und Kollegen unter der Bezeichnung anaplastisch großzelliges T-Zell-Lymphom (*anaplastic large cell lymphoma*, ALCL) eine neue Lymphom-Entität (Stein et al., 1985). Man differenziert heute drei distinkte Entitäten: das primär systemische ALK-positive ALCL, das primär kutane ALCL und das primär systemische ALK-negative ALCL als provisorische Entität. Gemeinsame Merkmale aller drei Entitäten liegen in dem Auftreten großer atypischer (anaplastischer) blastärer Tumorzellen, in einer konstanten Expression von CD30 und einer fehlenden Expression von B-Zell-Antigenen. Anhand der Morphologie unterscheidet man weitere Subtypen des ALK-positiven ALCL, von denen der „common type“, die kleinzellige Variante und die lymphohistiozytische Form am besten charakterisiert sind.

Gemein ist allen Typen des ALCL das Fehlen von T-Zell-Rezeptor-Molekülen an der Zelloberfläche sowie Molekülen, die am TCR-Signalweg beteiligt sind. Trotz der vorhandenen Umlagerung des TCR β , exprimieren nur ca. 4% der ALCL das entsprechende Protein. Darüber hinaus fehlt der überwiegenden Zahl ALCL die Expression von TCR-assoziierten Molekülen wie CD3 und ZAP70 (Bonzheim et al., 2004). CD3 vermittelt das Signal der TCR-Bindung an ZAP70, einer Tyrosinkinase, die nachgeschaltete Zielgene phosphoryliert und aktiviert. Die reduzierte Expression des TCR führt möglicherweise zur Dysregulation intrazellulärer Signalwege, die T-Zellaktivierung und Überleben kontrollieren. Dieser „Verlust der T-Zell-Identität“ als molekulares Phänomen der ALCL ist partiell ähnlich zum Verlust der B-Zell-Identität im HL und kann möglicherweise entsprechend durch Mutationen in kodierenden oder regulatorischen Regionen des TCR, oder durch das Fehlen TCR-spezifischer Transkriptionsfaktoren bedingt sein (Bonzheim et al., 2004).

1.4.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von ALCL und HL

Biologisch gesehen differenziert sich das cHL von dem ALCL, doch die morphologische und immunphänotypische Grenze zwischen beiden Entitäten ist nicht immer scharf (Chittal und Delsol, 1997). Neoplasien, die sowohl Merkmale des HL als auch des ALCL aufweisen, wurden unter dem Begriff „ALCL-Hodgkin-related“ zusammengefasst und als vorläufige Kategorie klassifiziert, bedingt unter anderem durch das wohl augenscheinlichste gemeinsame Merkmal der CD30-Expression. Die meisten ALCL zeigen klonale Rearrangements der T-Zell-Rezeptor-Loci (Stein et al., 2000), was eine T-Zell-Abstammung zeigt. Ähnlich dazu stammen die HRS Zellen des cHL von GC-B-Zellen ab, zeigen sie doch analog klonale Rearrangements des B-Zell-Rezeptors. Ihnen fehlt allerdings die Expression der meisten B-Zell-Marker (siehe auch 1.3.2.3) ebenso wie der T-Null-Typ des ALCL durch den Verlust der Expression einiger T-Zell-Antigene definiert wird (Bonzheim et al., 2004; Foss et al., 1996). Die kontroversen Diskussionen über die Klassifizierung von Fällen, die sehr tumorzellreich sind, synzytiales Wachstum aufweisen oder in den Sinus wachsen, endeten durch Einführung neuer Markermoleküle, die eine Zuordnung zum cHL oder einem ALCL der meisten „ALCL-Hodgkin-related“-Fälle ermöglichen. Dazu gehört z.B. PAX5, das in 80%-90% der HL-Fälle positiv ist und in den ALCL immer negativ.

1.5 MikroRNA (miRNA), short interfering RNA (siRNA) und RNA-Interferenz

Kleine nicht-kodierende mikroRNA (miRNA) spielen in Eukaryoten eine wichtige Rolle in der Genexpressionsregulation. Die Biogenese der miRNA wird im Zellkern initiiert. Gene für miRNA wurden in Intron-Regionen gefunden und in bestimmten Transkriptionseinheiten in beiden Orientierungen (*sense und antisense*) (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Mourelatos et al., 2002). Transkribiert werden die miRNA-kodierenden Gene durch die RNA Polymerase II und bilden anschließend primäre miRNA (pri-miRNA)-Transkripte mit einem 33nt langen Stamm und einer Schleife, die am 5`Ende eine *cap*-Struktur sowie am 3`Ende einen polyA-Schwanz aufweisen. Diese pri-miRNA werden durch DROSCHA, eine RNase III, im Komplex mit dem Ko-Faktor DGCR8 in 70nt pre-miRNA geschnitten.

Pre-miRNA werden mit Hilfe des Exportin 5-Ran GTP aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert und dort prozessiert, indem sie durch das Enzym RNase III, DICER, (Abbildung 4) in kleinere 21-23nt lange Fragmente, reife miRNA, zerteilt werden (Rana, 2007). So entstehen RNA-Moleküle mit einem 2nt Überhang am 3`Ende und einer Phosphatgruppe am 5`Ende (Hannon und Rossi, 2004; Meister und Tuschl, 2004).

Die zwei Stränge der RNA-Moleküle besitzen Sequenzen mit Konfigurationen, die *sense* und *antisense* in Bezug auf die Ziel-mRNA sind. Der *antisense*-Strang, auch als Leitstrang (*guide strand*) bezeichnet, ist als Matrize für die Sequenz-spezifische Hemmung der Genexpression verantwortlich. Der Leitstrang wird in einen *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebracht. Dieser bindet anschließend mit spezifischer Sequenz an die Ziel-mRNA und unterdrückt die Genexpression, indem die Ziel-RNA degradiert.

Sollten miRNA und Ziel-mRNA in ihrer Sequenz nicht vollständig übereinstimmen, wird die Ziel-mRNA in ihrer nicht-translatierten Region (*untranslated region*, UTR) am 3`Ende gebunden und nicht degradiert, aber ihre Translation unterdrückt. Lange wurde den miRNA nur die Inhibition der Translation zugesprochen. Analysen zeigen jedoch, dass auch miRNA in der Lage sind, die Degradation der Ziel-mRNA zu verstärken (Bagga et al., 2005) bzw. selbst die mRNA zu degradieren, sollten ihre Sequenzen vollständig komplementär zueinander sein (Yekta et al., 2004; Zeng et al., 2003).

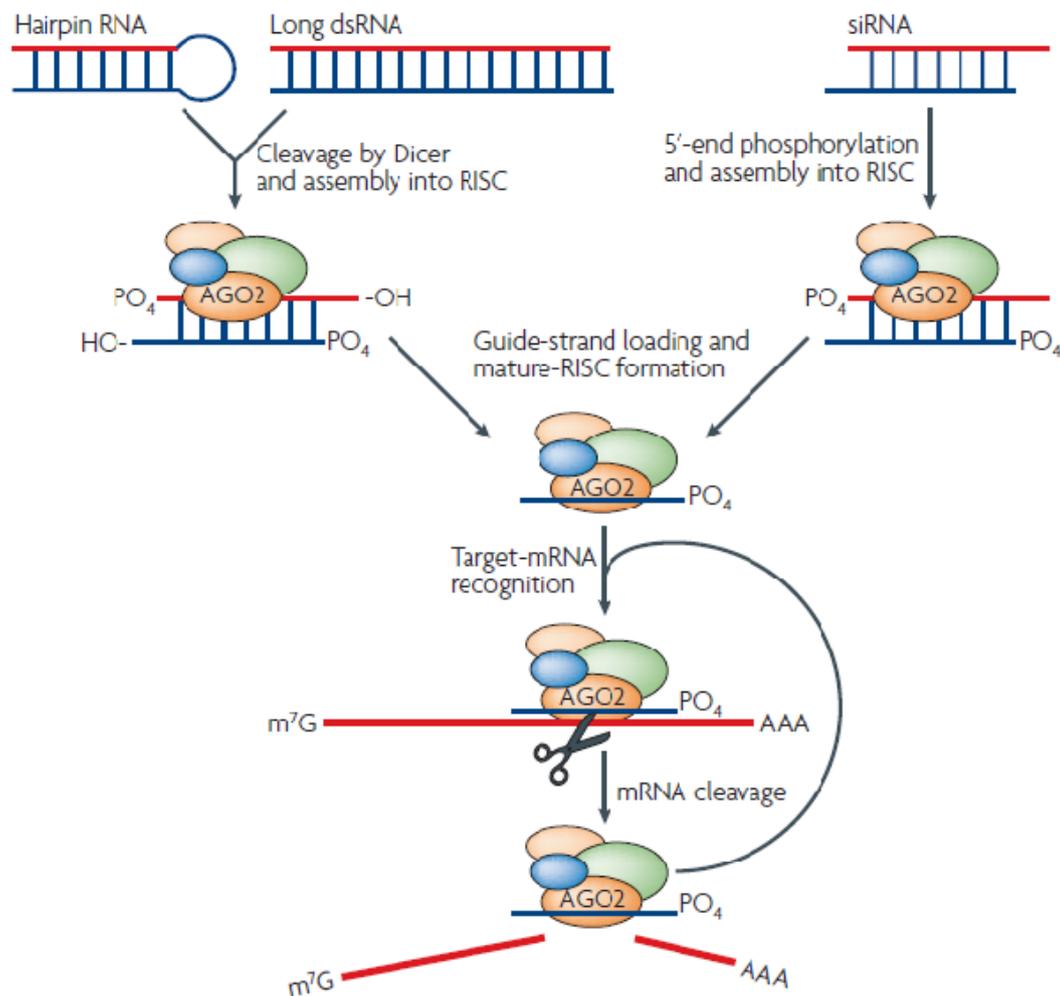


Abbildung 4: Mechanismus der RNA-Interferenz (aus Rana, Nature Reviews, Mol Cell Bio, 2007, Figure 1). Lange doppelsträngige RNA oder *hairpin*-RNA werden von DICER in kleine Fragmente (~21nt) mit 2nt Überhang am 3'Ende und Phosphatgruppen am 5'Ende. Alternativ können siRNA Duplexe (19-23nt) in die Zellen eingebracht werden, die durch zelluläre Kinasen am 5'Ende phosphoryliert werden. Diese kleinen dsRNA-Moleküle werden in den *RNA-induced silencing complex* (RISC), der AGO2, DICER und andere zelluläre Faktoren enthält, eingesetzt. Zur Vereinfachung ist nur AGO2 bezeichnet. RISC, der den *antisense*-Strang enthält, bindet dann an die Ziel-mRNA und leitet die Teilung der Ziel-mRNA. RISC wird regeneriert.

Craig Mello und Andrew Fire stellten 1998 fest, dass exogene doppelsträngige RNA (dsRNA) in dem Organismus *Caenorhabditis elegans* durch RNA-Interferenz (RNAi, Abbildung 4) eine Herunterregulation der Genexpression veranlassen kann (Fire et al., 1998). Infolgedessen hat sich der Mechanismus der RNA-Interferenz zur Unterdrückung der Genexpression auch als gentechnisches Verfahren zum experimentellen Ausschalten von Genen etabliert (Elbashir et al., 2001). Da DICER sowohl dsRNA als auch RNA-Moleküle mit einer Haarnadel (*hairpin*)-Struktur (Carmell und Hannon, 2004) schneidet, wurde zur Induktion von RNAi sowohl die Verwendung von DNA-Vektoren, die *hairpin*-RNA exprimieren, möglich (Hannon und

Rossi, 2004) als auch die direkte Transfektion der kurzen interferierenden RNA (*short interfering RNA*, siRNA).

1.6 Ziel der Arbeit

HRS Zellen tragen in der Mehrzahl der Fälle klonale V-Gen-Umlagerungen und stammen folglich von B-Zellen ab. Obwohl HRS Zellen die Transkriptionsfaktoren E2A und teils auch PAX5 exprimieren, die in reifen B-Zellen für die Aufrechterhaltung des B-Zell-Genexpressionsprogramms essentiell sind, prägen sie dennoch keine der von E2A und PAX5 regulierten B-Zell-spezifischen Zielgene aus, stattdessen ko-exprimieren sie typische Gene anderer hämatopoetischer Linien. Vor dem Hintergrund, dass HRS Zellen von prä-apoptischen GC-B-Zellen mit häufig destruktiven Mutationen in ihren V-Gen-Umlagerungen abstammen und keinen funktionellen B-Zell-Rezeptor ausprägen, spielt die Dedifferenzierung der HRS Zellen möglicherweise eine große Rolle für die Pathogenese des HL. Zellen, die keinen funktionellen BCR ausprägen, sollten normalerweise durch Apoptose eliminiert werden, denn das Überleben von B-Zellen ist von der Expression eines funktionsfähigen B-Zell-Rezeptors abhängig. Möglicherweise ist der Verlust der B-Zell-Identität der HRS Zellen sowie die Annahme eines Phänotyps anderer Linien eine Strategie, der stringenten negativen Selektion im GC zu entkommen (Schmitz et al., 2009).

B-Zell-Differenzierung wird zum einen durch die Expression der Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und PAX5 gefördert, zum anderen durch die Expression verschiedener Faktoren inhibiert, wie z.B. ABF-1, Notch-1 oder ID2. Ziel der Arbeit ist die Untersuchung von Faktoren, die zur Dedifferenzierung der HRS Zellen führen können.

Basierend auf Daten globaler Microarray-Genexpressionsanalysen, die zeigen, dass ID2 in HRS Zellen stark exprimiert wird, soll zunächst die Expression des ID2 in primären HL-Fällen und auch in HL-Zelllinien mittels IHC- und Western Blot-Analysen untersucht werden. Die Expression der Transkriptionsfaktoren E2A und PAX5 wurde bereits auf Proteinebene in primären HL-Fällen nachgewiesen, daher soll diese auch in den HL-Zelllinien bestätigt werden. E2A und auch PAX5 sollen dann als mögliche Bindungspartner von ID2 durch Ko-Immunopräzipitationsexperimente in HL-Zelllinien analysiert werden. Weitere potentielle neue Bindungspartner, wie z.B. HEB, auch ein Helix-loop-Helix-Protein, das in der B-Zell-Entwicklung eine Rolle spielt und dort mit E2A Dimere bildet,

sollen auf ihre Expression im HL und folglich auf die Bindung mit ID2 untersucht werden.

Die Funktion des ID2 für die Dedifferenzierung der HRS Zellen des HL soll in den HL-Zelllinien durch dessen Herunterregulation mittels RNA-Interferenz mit spezifischen siRNA untersucht werden. Die aberrante Expression von ID2 beeinflusst möglicherweise die Expression verschiedener B-Zell- und nicht-B-Zell-Gene sowie Regulatoren des Zellzyklus. Dementsprechend sollen HRS Zellen, in denen ID2 durch siRNA herunterreguliert wurde, bezüglich der Expression der B-Zell-Gene und Marker anderer Linien sowie der Regulatoren des Zellzyklus mittels Western Blot-Analyse untersucht werden.

Vergleichende globale Genexpressionsanalysen verschiedener T-Zell-Lymphome mit normalen T-Zell-Populationen indizieren, dass ID2 in T-Zell-Lymphomen, wie z.B. ALCL, ebenso stark überexprimiert wird wie im HL. Ferner exprimieren ALCL weder T-Zell-Rezeptormoleküle noch TCR-assoziierte Moleküle wie ZAP70 und CD3, wobei möglicherweise die Transkriptionsfaktoren HEB und E2A, die auch an der T-Zell-Entwicklung regulatorisch beteiligt sind, eine Rolle spielen. Daher soll ihre Expression auch im ALCL untersucht und ihre mögliche Heterodimerbildung mit ID2 analysiert werden. Des Weiteren soll ID2 auch in den ALCL-Zelllinien siRNA-vermittelt herunterreguliert werden, um anschließend den möglichen Einfluss auf die Ausprägung der T-Zell-Marker sowie auf die Expression der Regulatoren des Zellzyklus zu untersuchen. Von Bedeutung könnten auch Ergebnisse sein, die aus der Untersuchung des Einflusses einer verminderten ID2-Expression auf die globale Genexpression im ALCL resultieren. Dazu sollen mit Hilfe von GeneChip® Expressionsanalysen Genexpressionsprofile der ALCL-Zelllinien mit herunterreguliertem ID2 erstellt und mit denen von unbehandelten Kontrollzellen, die ID2 auf normalem Level ausprägen, verglichen werden. Bestätigungsexperimente schließen sich an.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
6-, 12-, 24-Loch-Zellkulturplatten	Nunc, DK
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Blotting Papier MN 218	Marcherey-Nagel, Düren
Deckgläschen (21 mm x 26 mm und 24 mm x 55 mm)	Knittel Gläser, Braunschweig
Dynabeads® M280 sheep anti-mouse IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Dynabeads® M280 sheep anti-rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Falcon FACS-Röhrchen (5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filterpapier, Cellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
GeneChip® HG U133 Plus 2.0 Arrays	Affymetrix, USA
Immun-Blot PVDF Membran 0,2 µm	BIO-RAD, München
Kryoröhrchen (2 ml)	Nunc, DK
MicrAmp optical 96 well reaction plates	Applied Biosystems, USA
Millex HV Filter (0,45 µm; 33 mm; 100 ml)	Millipore, Schwalbach
Neubauer-Zählkammer, C-Chip®	Peqlab, Erlangen
Objektträger SUPERFROST® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße Safe-Lock (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
SDS-PAGE Criterion Precast Tris-HCl Gele (7,5%; 10-20%; 18%)	BIO-RAD, München
Stripetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25; 50 und 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in reiner Qualität p.a. oder in Qualität für die Molekularbiologie verwendet.

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Amersham ECL plus Chemilumineszenzsystem	GE Healthcare, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aquatex® Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete mini Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
dNTP Mix (20 mM je ACTG)	GE Healthcare, München
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Riedel-de Haën, Seelze
Film-Entwickler	Kodak, Stuttgart
Film-Fixierer	Kodak, Stuttgart
Fluorescence Mounting Medium	Dako, DK
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Fluka, Neu-Ulm
Methanol	Malinckrodt Baker, NL
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka, Neu-Ulm
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid/RNase Staining Buffer	Becton Dickinson, Heidelberg
RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz	Novagen/Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sytox®Red dead Cell Stain	Invitrogen, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumphosphat	Fluka, Neu-Ulm

Tris Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X 100	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Westernblot Luminol Reagenz	Santa Cruz, USA
Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit destilliertem Wasser angesetzt.

Lösungen/Puffer	Hersteller/Herstellung
FACS clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS flow	Becton Dickinson, Heidelberg
1% Ethidiumbromid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin-Lösung nach Mayer	AppliChem, Darmstadt
25 mM MgCl ₂ -Lösung	Roche, Mannheim
2 M HCl-Lösung volumetrisch	AppliChem, Darmstadt
1 M HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2	AppliChem, Darmstadt
Dextran Blau Acetat-Lösung	Fluka, Neu-Ulm
0,5% Trypanblau-Lösung	Seromed Biochrom KG, Berlin
2 x Laemmli-Puffer	BIO-RAD, München
5 x Lane-buffer	Pierce, USA
10 x PCR-Puffer (+ 1,5 mM MgCl ₂)	Roche, Mannheim
10 x PCR-Puffer	Roche, Mannheim
50 x TAE (2 M Tris; 0,05 M EDTA; 1 M Essigsäure)	AppliChem, Darmstadt
10 x TGS (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 1% SDS; pH 8,3)	BIO-RAD, München
0,5 M Tris-Puffer pH 10,0	60,57 g Tris/l Aqua dest., pH 10,0 einstellen mit 2 M HCl
10% (m/v) Blockierlösung	10 g Blocking Reagenz mit Maleinsäurelösung pH 7,5 auf 100 ml auffüllen, autoklavieren
10 mM Citratpuffer pH 6,0	2,941 g Tri-Natriumcitratdihydrat/l Aqua dest., pH 6,0 einstellen mit Citronensäure
1 mM EDTA-Puffer pH 8,0	372 mg EDTA/l Aqua dest., pH 8,0 einstellen mit 1 N NaOH

CoIP-Puffer pH 7,5	50 mM HEPES, 1% Triton X 100, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 200 mM NaOV, 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail mini
Maleinsäurelösung pH 7,5	100 mM Maleinsäure, 150 mM Natriumchlorid, pH 7,5 einstellen mit konz. NaOH
SDS-PAGE Laufpuffer (1 x TGS)	100 ml 10 x TGS mit Wasser auf 1 l auffüllen
TBS pH 7,4	84 g NaCl, 12 g Tris-HCl mit Wasser auf 10 l auffüllen, pH 7,4 einstellen mit 2 M HCl
10 x Towbin-Puffer	250 mM Tris Base; 1,92 M Glycin; 0,025% SDS
TTBS	0,1% (v/v) Tween20 in TBS pH 7,4
Westernblot-Transfer-Puffer	100 ml 10 x Towbin-Puffer, 200 ml Methanol mit Wasser auf 1 l auffüllen
Zellysepuffer (2 x LB)	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 3% β-Mercaptoethanol; 17,5% Glycerol; 5 mM Natriumorthovanadat; 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Aprotinin; 0,0025% Bromphenolblau; 0,05 mM Natriumfluorid; 0,025 mM Tri-Natriumphosphat

2.1.4 Zellkulturreagenzien und Zellkulturmedien

Reagenzien und Medien	Hersteller
0,25% Trypsin/EDTA	GIBCO, Karlsruhe
1 x PBS pH 7,2	GIBCO, Karlsruhe
DMEM	GIBCO, Karlsruhe
Einfriermedium-DMSO	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO, Karlsruhe
L-Glutamin	GIBCO, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
RetroNectin®	Takara, Japan
RPMI 1640 + Glutamax-I	GIBCO, Karlsruhe

2.1.5 Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Referenz/ ATCC Nummer	Medium
293T	humane, embryonale Nierenzelllinie	DSMZ ACC 635	DMEM 10% FCS
L428	humane Hodgkin Lymphom-Zelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC197	RPMI1640 10% FCS
L1236	humane Hodgkin Lymphom-Zelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC 530	RPMI1640 10% FCS
KM-H2	humane Hodgkin Lymphom-Zelllinie, B-Zellursprung	DSMZ ACC 8	RPMI1640 10% FCS
HDLM-2	humane Hodgkin Lymphom-Zelllinie, T-Zellursprung	DSMZ ACC 17	RPMI1640 20% FCS
Karpas299	humane T-Zell-Lymphom-Zelllinie (ALCL)	DSMZ ACC 31	RPMI1640 10% FCS
SU-DHL-1	humane T-Zell-Lymphom-Zelllinie (ALCL)	DSMZ ACC 356	RPMI1640 10% FCS
SR786	humane T-Zell-Lymphom-Zelllinie (ALCL)	DSMZ ACC 369	RPMI1640 20% FCS
HELA	humane Zervixkarzinom-Zelllinie	DSMZ ACC 57	RPMI1640 10% FCS

2.1.6 Bakterienkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar (Lennox)	Hefeextrakt 5 g/l, Trypton 10 g/l, NaCl 5 g/l, Agar 15 g/l, pH 7,0 ± 0,2, Ansatz: 35 g Trockenmedium/l
LB Medium (Lennox)	Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l, Trypton 10 g/l, pH 7,0 ± 0,2, Ansatz: 20 g Trockenmedium/l
SOC Medium	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose

2.1.7 Bakterien

Bakterien: One Shot[®] MAX Efficiency[®] DH5 α [™]-T1^R Competent Cells
(Invitrogen, Karlsruhe)

Stamm: DH5 α

Genotyp: F- ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1*
hsdR17(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

2.1.8 Kits und Standards

Kit/Standard	Hersteller
BD In-Fusion Universal PCR cloning Kit	BD Biosciences, USA
BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, USA
CalPhos Mammalian Transfektionskit	Clontech, USA
DNA-Größenleiter ≥ 1 kb	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenleiter 100-2000 bp	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Leiter 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
First strand cDNA-Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim
GeneChip® One-Cycle Target Labeling Kit	Affymetrix, USA
LSAB 2 Single reagents, Peroxidase, Universal	Dako, DK
NE-PER Nuclear/Cytoplasmic Extraction Reagents	Pierce, USA
Profound Mammalian Co-IP Kit	Pierce, USA
Proteingrößenstandard (10-250 kD)	Fermentas, St. Leon-Rot
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
RNA 6000 Nano Assay Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNeasy Mini und Micro Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA

2.1.9 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Enzyme zur Restriktion der DNA	New England Biolabs (NEB), Frankfurt
Expand High Fidelity DNA-Polymerase Mix	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

2.1.10 TaqMan Gene Expression Assays (Assays-on-Demand, AOD)

Gensymbol	Assay-on-Demand (AOD)
ID2	Hs00747379_m1
ZAP70	Hs00896347_m1
CALR	Hs00189032_m1
CDC42	Hs00741586_mH
TFG	Hs00607175_m1
TGS1	Hs00227358_m1
FANCB	Hs00537483_m1
RRAD	Hs00188163_m1

PSMB4	Hs00160598_m1
RPL27A	Hs00741143_s1
RPL38	Hs00605263_g1
RPLP2	Hs01115130_g1
EPR1	Hs00977612_mH
UBE2B	Hs00163311_m1
WDR6	Hs00250592_g1
SFRS6	Hs00740177_g1
SRPRB	Hs00253639_m1

Alle verwendeten TaqMan Gene Expressions Assays wurden von der Firma Applied Biosystems entworfen und bereits validiert.

2.1.11 Antikörper

Spezifität	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
ID2 (C20)	IB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
ID2	IHC 1:100	polyklonal, Kaninchen	Zymed, Karlsruhe
E2A (E2A.E12)	IB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
E2A (E2A.YAE)	IB 1:1000 IHC 1:100	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Actin (C11)	IB 1:2000	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
PAX5 (N19)	IB 1:1000	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
HEB (A20)	IB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
HEB (D3)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
HEF1 (2G9)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Abcam, UK
ZAP70	IB 1:1000	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg
CD3 (PS1)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Novocstra, UK
GATA-3	IB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Abcam, UK
c-Fms/CSF-R (C20)	IB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz, Biotechnologie, Heidelberg
EBF (1C12)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Abnova, Heidelberg
CD19	IB 1:1000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt
CD79A (JCB117)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Dako, DK
p15 ^{INK4B}	IB 1:2000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt

p16 ^{INK4A} (F12)	IB 1:5000	monoklonal, Maus	Santa Cruz, Biotechnologie, Heidelberg
p21 ^{Cip1} (C19)	IB 1:250	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
p21 ^{Cip1} (187)	IHC 1:100	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
p21 ^{Cip1} (DCS60)	IHC 1:100	monoklonal, Maus	Cell Signaling, Frankfurt
phospho-p21 ^{Cip1} (Thr145)	IHC 1:100	polyklonal, Kaninchen	Novus Biologicals, Hiddenhausen
p57 ^{Kip2} (A120-1)	IB 1:2000	monoklonal, Maus	BD Biosciences, Heidelberg
Rad GTPase (D15)	IB 1:1000 IHC 1:50	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Rad GTPase (L80)	IB 1:1000 IHC 1:50	polyklonal, Kaninchen	Novus Biologicals, Hiddenhausen
Rad GTPase	IB 1:1000 IHC 1:50	polyklonal, Kaninchen	Abbotec, Köln
Rad GTPase	IB 1:1000 IHC 1:50	polyklonal, Kaninchen	Abcam, UK
GAPDH (14C10)	IB 1:10000	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling, Frankfurt
MAPK1 (Tag100)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Qiagen, Hilden
CDK2 (D12)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
ASK1 (F9)	IB 1:250	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
STAT3 (F2)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
PCNA (PC10)	IB 1:10000	monoklonal, Maus	Cell Signaling, Frankfurt
Caspase3 (E8)	IB 1:1000	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Maus Ig-HRP	IB 1:2000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Kaninchen Ig-HRP	IB 1:2000	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Ziege Ig-HRP	IB 1:2000	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg

2.1.12 Plasmide

Name	Verwendung	Referenz
pSUPER	Klonierungsvektor für shRNA	Oligoengine
pSUPER-shID2	Klonierungsvektor mit shID2	vorliegende Arbeit
pVIG	lentiviraler Expressionsvektor für shRNA	(Brocke-Heidrich et al., 2004)
pVIG-shID2	Expression einer shRNA gegen humanes ID2	vorliegende Arbeit

pVIG-scramble	Expression einer unspezifischen shRNA			Dr. rer. nat. Jens Stanelle, Uniklinik Essen
pHIT-G	Verpackungsplasmid Vektor	für	pVIG	(Fouchier et al., 1997)
delta sp2	Verpackungsplasmid Vektor	für	pVIG	(Schnell et al., 2000)
pGIPZ	lentiviraler Expressionsvektor für shRNA			Open Biosystems, USA shRNAmir Bibliothek
pGIPZ-shID2	Expression einer shRNA gegen humanes ID2			Open Biosystems, USA shRNAmir Bibliothek
pGIPZ-shGAPDH	Expression einer shRNA gegen humanes GAPDH			Open Biosystems, USA shRNAmir Bibliothek
pGIPZ non-silencing	Expression einer nonsense shRNA			Open Biosystems, USA shRNAmir Bibliothek
pMD2.G	Verpackungsplasmid Vektor	für	pGIPZ	Addgene, USA
psPAX.2	Verpackungsplasmid Vektor	für	pGIPZ	Addgene, USA

2.1.13 Oligonukleotide

shRNA-kodierende Oligonukleotide und siRNA-Oligonukleotide:

Name	Targetsequenz	Referenz
ID2 shRNA Oligo#L	5'-GGTGAGCAAGATGGAAAT TCTCTTGAA ATTTCCATCTTGCTCACC-3'	(Lasorella et al., 2005)
ID2 shRNA Oligo#C	5'-CAACATGAACGACTGCTAC TCTCTTGAA GTAGCAGTCGTTTCATGTTG-3'	(Buitenhuis et al., 2005)
ID2 shRNA in pGIPZ	5'-CGCAAAGCACTGTGTGGCTGAA TAGTGAAGCCACAGATGTA TTCAGCCACAVAGTGCTTTGCT-3'	Open Biosystems, USA
GAPDH shRNA in pGIPZ	5'-CGCTCATTTCTGGTATGACAA TAGTGAAGCCACAGATGTA TTGTCATACCAGGAAATGAGCG-3'	Open Biosystems, USA
ID2 siRNA Oligo#1	5'-CCCGATGAGCCTGCTATACAA-3'	Qiagen, Hilden
ID2 siRNA Oligo#3	5'-ACTGTATAAGATTATAATAAA-3'	Qiagen, Hilden
ID2 siRNA Oligo#5	5'-AAAGTTTAGTTGTAACTTAA-3'	Qiagen, Hilden
ID2 siRNA Oligo#6	5'-TTGGACTGTGATATTCGTTAT-3'	Qiagen, Hilden
ID2 siRNA Oligo#07	5'-CCACTATTGTCAGCCTGCA-3'	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt
ID2 siRNA Oligo#08	5'-CGATGAGCCTGCTATACAA-3'	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt
ID2 siRNA Oligo#09	5'-GAATTCCTTCTGAGTTAA-3'	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt

MAPK1 siRNA Oligo#10	5'-AAGTTCGAGTAGCTATCAAGA-3'	Qiagen, Hilden
p21 ^{Cip1} siRNA Oligo#15	5'-CAAGGAGTCAGACATTTTA-3'	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt
p21 ^{Cip1} siRNA Oligo#16	5'-GCACCCTAGTTCTACCTCA-3'	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt
p21 ^{Cip1} siRNA Oligo#17	5'-AGATTTCTACCACTCCAAA-3'	Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt
siSCR (scramble) AllStars Negative Control SiRNA AlexaFluor [®] 488	patentrechtlich geschützt	Qiagen, Hilden
shSCR (scramble) in pGIPZ	patentrechtlich geschützt	Open Biosystems, USA

Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung:

Name	Sequenz
pSUPER HindIII US	5'-CGACGGTATCGATAAGCTTTTCC-3'
pSUPER HindIII LS	5'-ATGAGACCACAGATCTAAGCTCC-3'
pSUPER LS N	5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTACG-3'
pSUPER US	5'-CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGG-3'
pVIG Xho SUPER US Pro	5'-AGCGACTGAATACTCGAATTCGAAC GCTGACGTCATCCAACC-3'
pVIG Sall SUPER LS Ter	5'-CTCGATCGAGGTCGACGGTATCGAT AAGCTTTTCC-3'
pSUPER HindIII US	5'-CGACGGTATCGATAAGCTTTTCC-3'
pVIG US1	5'-GTGCTGGTGAGAGTCTAGCAGG-3'
pSUPER HindIII LS	5'-ATGAGACCACAGATCTAAGCTCC-3'
pVIG LS1	5'-ATCACTCTCGGCATGGACGAGC-3'
pVIG US3	5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTCG-3'

2.1.14 Geräte

Geräte	Hersteller
ABI Prism 7900HT Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Agarosegel-Kammer	BIO-RAD, München
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav Tuttnauer 2540EL	Tuttnauer/VWR, Darmstadt
BD FACScan Flowcytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACSAria Cell-sorting Sytem	Becton Dickinson, Heidelberg
CO ₂ -Inkubator HERAcCell 150i	Heraeus, Hanau
Dounce-Glashomogenisator	VWR, Darmstadt

E-box Video-Dokumentationssystem (mit UV-Transilluminator)	Peqlab, Erlangen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioskop2	Carl Zeiss, Jena
Konfokal-Laser Scanning Mikroskop FV1000	Olympus, Hamburg
Labormikrowelle SHARP 800W	Sharp, Hamburg
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Multi-Rotator Multi Bio RS 24	Lab4you, Berlin
NanoDrop ND1000 UV/VIS Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
SDS-PAGE Kammer Criterion Cell	BIO-RAD, München
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS	Heraeus, Hanau
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermoschüttler Certomat IS	B.Braun Biotech Int., Göttingen
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Western Blot-Kammer Criterion Blotter	BIO-RAD, München
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Hettich Universal	Hettich, Tuttlingen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% (v/v) kultiviert.

2.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen in 50 ml vorgewärmtes Medium überführt, bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

Suspensionszellen wurden durch Verdünnen der Zellsuspension mit frischem Medium passagiert.

Adhärenz wachsende Zellen wurden passagiert, indem die Zellen zunächst mit 1 x PBS pH 7,2 gewaschen wurden, anschließend mit 0,25% Trypsin/EDTA abgelöst und direkt in frischem Medium suspendiert wurden, um die Wirkung des Trypsins zu

inhibieren. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 x g wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei 300 x g 5 Minuten zentrifugiert und in der entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert, sodass sich eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml ergab, in Kryoröhrchen überführt und bei -20°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen von -20°C auf -80°C überführt, um dann wiederum am folgenden Tag im Stickstofftank gelagert werden zu können.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau-Lösung

Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurden 90 μl Zellsuspension mit 10 μl 0,5% Trypanblau-Lösung gemischt und 10 μl dieser Mischung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese blau, während lebende Zellen unter dem Mikroskop hell erscheinen. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus vier Großquadraten. Diese sollen unter mikroskopischer Betrachtung bei zehnfacher Vergrößerung ausgezählt und aus der Zellzahl aller vier Quadrate der Mittelwert gebildet werden. Der Mittelwert wurde mit dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Die so erhaltene Zellzahl bezieht sich auf ein Volumen von 1 ml Zellsuspension.

2.2.1.3 Transfektion von 293T-Zellen mittels Calciumphosphat-Präzipitation zur Produktion von Viruspartikeln

Die Verwendung von viralen Vektoren zur Einbringung von genetischem Material erlaubt nicht nur die Transduktion von schwer zu transfizierende Zielzellen, sondern durch Integration ihrer DNA in das Genom der Zielzellen auch deren stabile Expression. Der zur Herstellung replikationsdefekter Virenpartikel verwendete lentivirale Vektor selbst ist durch deletierte Bereiche des viralen Genoms (z.B. regulatorische Sequenzen oder Gene für Enzyme, Kapsid- oder Hüllmembranproteine), die durch gewünschte Zielgene mit entsprechenden Promotoren und Selektionsmarkern ersetzt wurden, replikationsinkompetent und kann sich folglich selbst nicht vermehren. Allenfalls das Verpackungssignal ψ sowie die LTR (*long terminal repeats*) sind noch vorhanden. Infektiöse Partikel können nur dann hergestellt werden, wenn in der Zelllinie, die die viralen Partikel produziert, entsprechende Informationen für die fehlenden Bereiche des viralen Genoms getrennt zur Verfügung gestellt werden.

Die Lentiviren, die zur Transduktion der HL-Zelllinien und der ALCL-Zelllinien verwendet wurden, wurden durch Ko-Transfektion des Plasmids delta sp2 bzw.

psPAX.2 (kodierend für die viralen Proteine gag und pol), des Plasmids pHIT-G bzw. pMD2.G (kodierend für das virale env-Protein) zusammen mit dem lentiviralen Vektor pVIG bzw. pGIPZ (3-Plasmid-Ko-Transfektion) in der Zelllinie 293T mit dem Vorteil erzeugt, dass die Möglichkeit der Rekombination zu replikationskompetenten Viren minimiert wird.

Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des CalPhos Mammalian Transfektionskits: 293T-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen in 10 ml Medium auf einer 10 cm Platte ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte 3 Stunden vor der Transfektion. Der Transfektionsansatz bestand aus 21 µg Gesamt-DNA. Diese Gesamt-DNA bestand aus 10 µg lentiviralem Vektor und den Verpackungsplasmiden delta sp2 bzw. psPAX.2 (7 µg) und pHIT-G bzw. pMD2.G (4 µg). Die Gesamt-DNA wurde mit 86,8 µl 2 M Calcium-Lösung gemischt und mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 700 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde unter vortexen tropfenweise zu 700 µl 2 x HBS pipettiert. Der Transfektionsansatz wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, erneut gevortext und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann für 16 Stunden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert, das phosphathaltige Medium entfernt und die Zellen mit 1 x PBS pH 7,2 gewaschen. Nach Zugabe von 6ml frischem Medium und weiteren 24 Stunden Inkubationszeit wurde der Viruspartikel-enhaltende Zellkulturüberstand geerntet und durch einen mit 1 x PBS pH 7,2 gespülten 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Der Titer der Virensuspension wurde bestimmt und die Viren zur Transduktion eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

2.2.1.4 Titerbestimmung

Durch das Vorhandensein einer GFP-Expressionskassette als Selektionsmarker in den lentiviralen Vektoren ist die Bestimmung des Anteils GFP-positiver Zellen, und damit des Virentiters, per FACS möglich. Zur Bestimmung der Virustiter wurden 1×10^5 293T-Zellen in 500 µl Medium in einer 24-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Virensuspension in einer Verdünnung von 1:10 (50 µl) und 1:100 (5 µl) zugegeben. Nach 72 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ lässt sich der Virustiter (VT) aus dem Anteil GFP-positiver Zellen berechnen. Unter der Annahme, dass die verwendete Anzahl 293T-Zellen am Tag der Infektion doppelt so hoch ist, wie am Vortag ausgesät, gilt:

$$VT \left[\frac{\text{Viren}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl 293T - Zellen} \times \text{Anteil GFP - positiver Zellen}}{\text{verwendetes Volumen [ml]}}$$

2.2.1.5 FACS (Fluorescence-activated cell sorting)-Analyse

Die zugrunde liegende Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen. Ein Laser führt zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. GFP, die Licht emittieren. Die Zellen können aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften, aber auch nach morphologischen Parametern unterschieden werden. Die Vorwärtsstreuung (FSC = *forward scatter*) wird von der Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (SSC = *side scatter*) von der Granularität der Zelle bestimmt. Die Signale werden mittels Photomultiplier verstärkt und von Detektoren gemessen. Die Ausgabe der Daten erfolgte in Form eines Dot Plots SSC gegen FSC. Durch anschließende Definition eines bestimmten Bereiches („gaten“) wurden tote bzw. apoptotische Zellen von der Auswertung ausgeschlossen und nur die gewünschte Zellpopulation auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Während der Messungen wurden die FACS-Analysen zur Transduktionseffizienz mit Hilfe der BD CellQuest Software von Becton Dickinson dargestellt. Zur anschließenden Darstellung und Auswertung der FACS-Dateien wurde das Programm WinMDI Version 2.8, Joe Trotter, verwendet

Zur Bestimmung der Transduktionseffizienz wurde der Anteil an Zellen, die das GFP (*green fluorescent protein*) exprimieren, bestimmt. Dafür wurden die 1×10^5 transduzierten 293T-Zellen aus der 24-Lochplatte herauspipettiert, mit 1ml 1 x PBS pH 7,2 gewaschen und anschließend in 200 μ l 1 x PBS pH 7,2 resuspendiert. Analog erfolgte die Bestimmung der Transfektionseffizienzen der HL-Zelllinien und ALCL-Zelllinien Zellen, die mit der AlexaFluor[®]488 Fluoreszenzfarbstoff-markierten *scrambled* siRNA (siSCR) transient transfiziert wurden (siehe auch 2.2.1.7). Die Messungen erfolgten 24 Stunden nach der Transfektion.

2.2.1.6 Transduktion von Zellen ohne und mit RetroNectin[®]

In Testreihen wurde die optimale MOI (*multiplicity of infection*) der verschiedenen Viren und Zelllinien bestimmt. Sie ergibt sich aus dem Quotient des Virentiters zur Zahl der zu transduzierenden Zellen. Die Zellen wurden wie folgt transduziert:

Ohne Anwendung von RetroNectin[®] wurden die zu transduzierenden Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^5 pelletiert und in der Virensuspension mit einem VT von 1×10^6 Virenpartikel (MOI=10) resuspendiert, bei 2500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Für eine MOI von 20 wurden die Zellen nach 24 Stunden erneut pelletiert und ein zweites Mal in einer Virensuspension resuspendiert sowie zentrifugiert und inkubiert, für eine MOI von 40 wurde analog, aber unter Verwendung der doppelten Virenmenge verfahren. Nach der Kultivierung

über weitere 24 bzw. 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS.

Die Transduktion mit RetroNectin[®] erfolgte nach dem Protokoll der Herstellerfirma Takara, Japan. 12-Lochplatten wurden pro Loch mit 1 ml RetroNectin[®] (20 µg/ml) mittels Inkubation 2 Stunden bei Raumtemperatur gecoated. Anschließend wurde die Virensuspension (durchschnittlich 1×10^6 Virenpartikel) auf die gecoateden Platten gegeben und 4-6 Stunden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert, die Virensuspension abgenommen, die Platten mit 1% BSA in PBS gewaschen und die zu transduzierenden Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^5 in 500µl Medium pro Loch (MOI=10) auf die Platten gegeben. Die Inkubation erfolgte dann 2-3 Tage bei 37°C und 5% (v/v) CO₂. Die Transduktionseffizienz wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

2.2.1.7 Transiente Transfektion mit RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz

Die Transfektion der Zellen mit RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz erfolgte nach dem Protokoll der Herstellerfirma Merck, Darmstadt.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in einer 6-Lochplatte mit einer Zellzahl von je 8×10^5 in 1 ml Medium pro Loch ausgesät. 192 µl serumfreies Medium wurden mit 8 µl RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz gemischt, diese Lösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl synthetischer 20 µM siRNA-Oligonukleotide (Applied Biosystems oder Qiagen) erfolgte eine erneute Inkubation des Transfektionsansatzes für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben, die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert, dann mit einer Mischung aus frischem Medium (1:4) und konditioniertem Medium (1:1) verdünnt und weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Die Verwendung von Medium, das einen Anteil konditioniertes Medium enthielt, welches zuvor von unbehandelten proliferierenden Kulturen der entsprechenden Zelllinien gewonnen wurde, erwies sich für die weitere Proliferation der transfizierten Zellen als geeigneter als die ausschließliche Verwendung von frischem Medium. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz der Zellen, die mit AlexaFluor[®]488 Fluoreszenzfarbstoff-markierter *scrambled* siRNA (siSCR) transfizierten wurden, erfolgte mittels FACS-Analyse.

2.2.1.8 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Durch die Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS konnte die Möglichkeit, dass die siRNA-Oligonukleotide statt in das Zellinnere aufgenommen zu werden, möglicherweise nur an den Zellen haften, nicht ausgeschlossen werden. Die Analyse zur tatsächlichen Aufnahme der siRNA in die transfizierte Zelle erfolgte daher mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie. Dazu wurden 100 µl Zellsuspension, die mit AlexaFluor®488 Fluoreszenzfarbstoff-markierter, *scrambled* siRNA (siSCR) transfiziert wurden, 24 Stunden nach der Transfektion entnommen und bei 300 x g für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 µl PBS pH 7,4 resuspendiert, auf einem Objektträger unter Lichtschutz mit Sytox®Red in der Verdünnung 1:100 in 3% BSA in TBS für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen kurz in PBS pH 7,4 gewaschen, mit dem Fluorescence Mounting Medium eingedeckt und analysiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 633 nm (Sytox®Red) bzw. 488 nm (AlexaFluor®488 Fluoreszenzfarbstoff). Als Negativkontrollen dienten unbehandelte Zellen, die analog der transfizierten Zellen nur mit Sytox®Red inkubiert wurden.

2.2.1.9 Messung der Zellzyklusverteilung von Zellkulturen

Die Zellzyklusverteilung wurde anhand des DNA-Gehalts einzelner Zellen einer Zellsuspension mittels FACS-Analyse bestimmt. Während der Messungen der Zellzyklusprofile mittels FACS wurden diese mittels BD CellQuest Software von Becton Dickinson dargestellt. Die Auswertung der Histogramme erfolgte dann mittels der ModFit LT 3.0 Software, Verity Software House.

Die DNA der Zellen wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff Propidiumiodid, der in die DNA interkaliert, gefärbt. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zum DNA-Gehalt der Zellen, der wiederum von der Zellzyklusphase abhängt, in der sich die Zelle befindet. In der G1-Phase liegt ein einfacher DNA-Gehalt vor, im Verlauf der S-Phase nimmt der DNA-Gehalt aufgrund der Replikation zu, bis in der G2-Phase ein doppelter DNA-Gehalt vorliegt. Für die Auswertung der Messungen werden die Intensitätssignale für jeden Intensitätswert jeder Zelle aufsummiert, wodurch eine Häufigkeitsverteilung erhalten wurde. Mittels eines Algorithmus ermittelt die Software die einzelnen Flächen des Histogramms, die den jeweiligen Phasen des Zellzyklus entsprechen.

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 1 x PBS pH 7,2 gewaschen und anschließend mindestens 1 Stunde bei 4°C in 70% Ethanol fixiert. Nach erneutem Waschen der

Zellen mit 1 x PBS pH 7,2 wurden die Zellen mit 500 µl PI/RNase Staining Buffer versetzt und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur mittels FACS vermessen.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Die Lysate wurden für Immunblots (Western Blot-Analysen) verwendet. 1×10^6 Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert, mit 1 ml 1 x PBS pH 7,2 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 100 µl 1 x PBS pH 7,2 resuspendiert und mit 100 µl 2 x LB-Puffer gemischt. Die Lysate wurden 10 Minuten unter regelmäßigem Vortexen im Wasserbad gekocht. Die Lagerung der Zell-Lysate erfolgte bei -20°C in Aliquots von 20 µl und enthielten Gesamtprotein aus jeweils 1×10^5 Zellen.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches nach dem Molekulargewicht wurde das Criterion Precast Gel System von BIO-RAD, München verwendet. Es wurden Fertiggele mit 18 oder 26 Geltaschen verwendet. Als Laufpuffer diente 1 x TGS-Puffer. Die Zell-Lysate wurden vor der Verwendung für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 40 bzw. 80 mA.

2.2.2.3 Western Blot und Immundetektion

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine Trägermembran übertragen. Dazu wurde ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt und so wanderten die Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Trägermembran. Der Proteintransfer erfolgte mit einem Tank-Blot-System in einem Transfer-Puffer bei 750 mA über einen Zeitraum, der von dem Molekulargewicht der Proteine abhängig ist (z.B. 20 Minuten für 20 kD).

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese zunächst geblockt, um unspezifischen Bindungen auf der Membran zu verhindern. Das Blocken erfolgte auf einem Schüttler in 10% Blockierlösung 1:10 in TTBS verdünnt für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die einzelnen Proteine wurden über eine Immundetektion visualisiert. Die Membran wurde dazu mit Antikörper-Lösungen entsprechender Verdünnungen inkubiert, wobei die Antikörper spezifisch das Target-Protein auf der Membran erkennen. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Durch nachfolgende

Waschschritte (3 x 15 Minuten mit TTBS) wurden ungebundene Antikörper entfernt. Die Inkubation des mit HRP (horseradish peroxidase) gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in 10% Blockierlösung 1:10 in TTBS verdünnt. Nach erneuten Waschschritten (3 x 15 Minuten mit TTBS) erfolgte die Detektion mit Hilfe des ECL plus Western Blotting Detection System bzw. Luminol Reagenz. Die HRP katalysiert hierbei die Umsetzung von Luminol (bzw. dessen Derivate) in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz freigesetzt wird und detektiert werden kann. Die Signale wurden mittels Amersham Hyperfilm ECL detektiert.

2.2.2.4 Ko-Immunopräzipitation mittels Profound Mammalian CoIP Kit

Die Ko-Immunopräzipitation wurde zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Hierbei „ko-präzipitiert“ das von einem Antikörper präzipitierte Ziel-Antigen einen Bindungspartner/Proteinkomplex aus einem Zell-Lysat. Die Ko-Immunopräzipitation wurde nach dem Protokoll des Profound Mammalian Co-IP Kits durchgeführt. Der Vorteil des hier angewandten Prinzips der Immobilisierung des Antikörpers über dessen Amin-Bindungen durch ein Antikörper-Kopplungs-Gel liegt in der Minderung von Kontaminationen durch den IP-Antikörper im anschließenden Western Blot, bei dem unspezifische Banden mögliche Interaktionsbanden maskieren.

Einen Tag vor der Präzipitation erfolgte die Antikörperbindung von 200 µl Antikörper-Lösung (200 µg/ml) nach Protokoll an 100 µl Antikörper-Kopplungs-Gel, das zuvor in einer *Spin cup*-Säule gebunden wurde.

Am folgenden Tag wurden 1×10^7 Zellen bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert, in 1 ml 1x PBS pH 7,2 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml kaltem MPER-Lysepuffer des Profound Mammalian Co-IP Kits für eine milde Lysis, um mögliche bestehende Interaktionen nicht aufzulösen, resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 1 Stunde bei 4°C auf dem Multi-Rotator Multi Bio RS 24 inkubiert, des Weiteren im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und bei 16000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Ko-Immunopräzipitation verwendet, indem dieser mit dem zuvor immobilisierten Antikörper in der *Spin cup*-Säule 1-2 Stunden rotierend inkubiert wurde. Durch anschließende Zentrifugation wurde die Flüssigkeit entfernt. Die Elution des präzipitierten Proteinkomplexes erfolgte mit 150 µl Elutionspuffer. Die Eluate wurden mit 5 x Ladepuffer versetzt, im Wasserbad 10 Minuten aufgeköcht und zusammen

mit Kontrolllysaten (nach Protokoll) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert.

2.2.2.5 Ko-Immunopräzipitation mittels Dynabeads[®], Invitrogen

Das Prinzip beruht auf der Bindung des IP-Antikörpers an magnetische polymere Partikel, die sich in einer wässrigen Suspension befinden (Dynabeads[®]), sodass das entsprechende zu präzipitierende Protein mit möglichen Bindungspartnern mit Hilfe eines Magneten isoliert werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Es wurden 1×10^7 Zellen bei 300 x g 5 Minuten zentrifugiert, in 1 ml 1 x PBS pH 7,2 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1ml kaltem MPER-Lysepuffer (Profound Mammalian Co-IP Kit), versetzt mit 150 mM NaCl, resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 1 Stunde bei 4°C auf dem Multi-Rotator Multi Bio RS 24 inkubiert, des Weiteren im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und bei 16000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Ko-Immunopräzipitation verwendet, ein Aliquot von 40 µl wurde mit 40 µl 2 x LB-Puffer versetzt als Kontrollprobe vorbereitet.

Für die Untersuchung auf mögliche Bindungspartner des p21^{Cip1} in HL-Zelllinien wurde analog vorgegangen, jedoch unter der Verwendung eines milderen CoIP-Lysepuffers zur Herstellung der Lysate im Vergleich zum MPER-Lysepuffer und einer Inkubationszeit von nur 15 Minuten bei 4°C auf dem Multi-Rotator Multi Bio RS 24 sowie ohne Aufschluss der Lysate mittels Dounce-Homogenisator.

200 µl Antikörper-Lösung (200 µg/ml) wurden mit dem Lysat 2 Stunden bei 4°C auf dem Multi-Rotator Multi Bio RS 24 inkubiert. 300 µl Dynabeads[®]-Suspension wurde in der Zwischenzeit unter Verwendung eines Magneten zweimal mit jeweils 400 µl 1 x PBS pH 7,2 gewaschen und anschließend mit der Lysat-Antikörper-Mischung 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Multi-Rotator Multi Bio RS 24 inkubiert. Ein Aliquot von 40 µl wurde anschließend mit 40 µl 2 x LB-Puffer versetzt als weitere Kontrollprobe vorbereitet. Die Dynabeads[®] wurden erneut unter Verwendung des Magneten dreimal mit jeweils 400 µl 1 x PBS pH 7,2 gewaschen. Die Elution des präzipitierten Proteinkomplexes von den Magnetpartikeln erfolgte mit 60 µl Elutionspuffer (Profound Mammalian Co-IP Kit) im Magnetfeld. Die Eluate wurden mit 15 µl 5 x Ladepuffer versetzt, im Wasserbad 10 Minuten aufgekocht und zusammen mit den Kontrolllysaten mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert.

2.2.3 DNA- und RNA-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (Primer) binden am 5'- und 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz, bevor eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (z.B. von *Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase) oder ein Mix aus verschiedenen DNA-abhängigen DNA-Polymerasen (z.B. Expand High Fidelity DNA-Polymerase Mix) die Ausgangssequenz (Template) repliziert. Wiederholte Zyklen von Einzelstrangbildung (Denaturation), Primeranbindung (Annealing) und Neustrangsynthese (Elongation) führen zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Primern flankierten Bereichs der Proben-DNA (Template-DNA). Als Endprodukt wird in vielfacher Kopie doppelsträngige lineare DNA von spezifischer Sequenz gebildet.

Eine (Standard-) PCR wurde wie folgt angesetzt (Master Mix):

PCR-Puffer (+ 1,5 mM MgCl ₂)	5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Primer (2,5 pmol/µl)	2x2,5 µl
H ₂ O	<u>33 µl</u>
	48 µl

Die Template-DNA wurde mit 1 µl (1ng/µl) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem T3000 Thermocycler. Nach einer Denaturierung bei 95°C 2 Minuten wurde die Reaktion bei 65°C (4°C > Annealing-Temperatur) durch Zugabe von 1 µl (1 unit) Expand-Polymerase gestartet (hot start) (die genauen PCR-Bedingungen für die entsprechenden Primer sind in der Tabelle am Ende dieses Absatzes zu finden). Es folgten 19 Zyklen:

Denaturieren:	95°C 30 s
Annealing:	61°C 30 s
Elongation:	72°C 45 s

Nach einer finalen Elongation bei 72°C für 5 Minuten wurde der Reaktionsansatz auf 4°C gekühlt. Die weitere Amplifikation zu Vermehrung der PCR-Produkte erfolgte entsprechend unter analogen Bedingungen (Master Mix und PCR-Programm) für 12 Zyklen.

PCR-Bedingungen

Name	PCR-Parameter (Annealing-Temperatur, Zyklenzahl, Mg-Konz.)
pSUPER HindIII US pSUPER HindIII LS	65°C; 19 Zyklen; 1,5 mM MgCl ₂
pSUPER LS N pSUPER US	65°C; 35 Zyklen; 3 mM MgCl ₂
pVIG Xho SUPER US Pro pVIG Sall SUPER LS Ter	57°C; 30 Zyklen; 2 mM MgCl ₂
pSUPER HindIII US pVIG US1	61°C; 35 Zyklen; 2 mM MgCl ₂
pSUPER HindIII LS pVIG LS1	61°C; 35 Zyklen; 2 mM MgCl ₂

2.2.3.2 Fällung von DNA mit Natriumacetat

Die zu fällende DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt und gut gevortext. Nach Abzentrifugation (30 Minuten bei 4°C, 15000 rpm) der gefällten DNA, wurde diese mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und nach anschließender Trocknung des Pellets in 1 x TAE-Puffer bzw. in einer entsprechenden Menge Wasser gelöst.

2.2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse der Größe von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,7-2% (m/v) 1 x TAE-gepufferte Agarosegele verwendet, wodurch Fragmentgrößen von 0,1 bis 12 kb abgedeckt werden. Um die Detektion der DNA zu ermöglichen, wurden die Agarosegele bereits vor dem Gießen mit 1 µl einer 1% Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Agarosegel versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, welche dann mit Hilfe von UV-Licht (E-box Video-Dokumentationssystem mit UV-Transilluminator) visualisiert werden konnte. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 1 x TAE-Puffer/BP (9:1) versetzt und je nach Größe der DNA-Fragmente entsprechende Größenstandards verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 80-150 V.

2.2.3.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl Wasser.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte unverdünnt bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie bei 280 nm zur Detektion von Proteinverunreinigungen (siehe

dazu auch 2.2.3.11) im UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop ND 1000. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 1-2 µl.

2.2.3.5 Klonierungstechnik für shRNA-kodierende DNA-Oligonukleotide in den lentiviralen Vektor pVIG

Die für die shRNA-kodierenden DNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Primer pSUPER HindIII US und pSUPER HindIII LS amplifiziert und mit Hilfe des BD In-Fusion Universal PCR cloning Kits über die Schnittstelle HindIII in den Vektor pSUPER kloniert. Mittels der Primer pVIG Xho SUPER US Pro und pVIG Sall SUPER LS Ter wurde der für die shRNA-kodierende Region zusammen mit dem H1-Polymerase III-Promotor, der für die Expression der shRNA essentiell ist, aus pSUPER herausamplifiziert, aufgereinigt und über die Schnittstellen Sall und XbaI in den lentiviralen Vektor pVIG kloniert, ebenfalls mit Hilfe des BD In-Fusion Universal PCR cloning Kits. Die korrekten Platzierungen der shRNA-kodierenden Oligonukleotide in pSUPER bzw. in pVIG wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Der lentivirale Vektor wurde mit Hilfe der Verpackungsplasmide (pHIT-G und delta sp2) in 293T-Zellen verpackt. Durch die Ko-Expression von GFP (*green fluorescent protein*) unter der Kontrolle eines SFFV-Polymerase II-Promotors (*spleen focus forming virus*) in pVIG konnte die Transduktionseffizienz im FACS bestimmt werden.

2.2.3.6 Klonierung mittels BD In-Fusion Universal PCR cloning Kit

Die Klonierung der shRNA-Oligonukleotide in die Vektoren pSUPER und pVIG erfolgte nach dem Protokoll des BD In-Fusion Universal PCR cloning Kits. Dieses ermöglicht es, PCR-Produkte in jeden linearisierten Vektor zu klonieren ohne passende Schnittstellen und ohne die Anwendung von Ligasen oder Dephosphorylierungen. Einzige Voraussetzung ist die Verwendung von Primern in der PCR, die 15 Basenpaare homolog zu den Enden des verwendeten linearisierten Vektors sind. Das BD In-Fusion Enzym erzeugt einzelsträngige Regionen in den homologen Bereichen und fusioniert anschließend das PCR-Produkt in den Vektor. Die eingesetzten Vektoren pSUPER und pVIG wurden vor der Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und zugehörigen Puffern nach Herstellerangaben (Enzymunits, optimale Temperatur, Inkubationszeit) verdaut und somit linearisiert.

2.2.3.7 Transformation und Kultivierung von Bakterien

Die Transformation von 50 µl One Shot® MAX Efficiency® DH5α™-T1^R kompetenten Zellen erfolgte nach Protokoll des Herstellers:

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, die zu transformierende DNA (1 µl) zugegeben und der Ansatz gut vermischt 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Inkubation für 30 Sekunden im Wasserbad bei 42°C und Abkühlung auf Eis wurden 250 µl SOC Medium zugegeben und im Schüttler für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf LB-Agarplatten mit Ampicillin 100 µg/ml ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bebrütet.

Kolonien wurden abgeimpft und in 10 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml bei 37°C im Thermoschüttler über Nacht kultiviert. Anschließend wurden 4 ml der Flüssigkultur für die Mini-Präparation verwendet, die restlichen 6 ml in 300 ml LB-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml im Schikanekolben im Thermoschüttler bei 37°C über Nacht inkubiert und nachfolgend für die Maxi-Präparation verwendet. 1 ml jeder dieser Flüssigkulturen wurde 1:1 mit Glycerol versetzt und als Bakterienstock bei -20°C gelagert.

2.2.3.8 Plasmidisolierung (Mini-Präparation und Maxi-Präparation)

Zur analytischen und präparativen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α wurde das Plasmid Mini Kit sowie das EndoFree Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Gewinnung und Reinigung der DNA erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Das Protokoll basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse, die Elution der DNA erfolgt mit Puffer niedriger Salzkonzentration und anschließender Isopropanol-Reinigung.

2.2.3.9 Sequenzierung

Die korrekten Platzierungen der shRNA-kodierenden Oligonukleotide in pSUPER bzw. in pVIG wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Sie erfolgte mit dem ABIPrism 3100 Genetic Analyzer unter Verwendung des BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kits und beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchreaktion nach Sanger (Sanger et al., 1977). In einem ersten Schritt wird hierbei die zu untersuchende DNA einer modifizierten PCR unterzogen, der ein Sequenzierprimer zugesetzt wird und die neben den freien Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTPs) auch solche enthält, die aufgrund ihrer Struktur zu einer Beendigung der Polymerase-Reaktion am DNA-Strang führen. Zusätzlich sind diese Didesoxynucleosid-Trisphosphate (ddNTPs), oder auch Abbruch-Nukleotide,

fluoreszenzmarkiert, so dass sich durch die Sequenzreaktion verschieden lange DNA-Stränge bilden, die am Ende immer ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid tragen, wobei jedes der vier Nukleotide mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt ist. Nach der Sequenzreaktion werden die markierten Abbruchprodukte nach dem Prinzip der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Diese verschieden langen Fragmente können dann im Sequenzer ihrer Größe nach analysiert werden und aus der Abfolge der verschiedenen fluoreszierenden Nukleotide die DNA-Sequenz ermittelt werden. Zur ersten Darstellung der Sequenzen wurde die Data Collection Software des ABI Prism 3100 Genetic Analyzer verwendet, zur weiteren Bearbeitung und Auswertung der Sequenzen wurde das Programm FinchTV Version 1.4.0 von Geospiza Inc. oder alternativ das Programm CLC Sequence Viewer Version 6.0, CLC bio, verwendet.

Der Sequenzieransatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl setzte sich wie folgt zusammen:

DNA	variabel
BigDye-Reagenz	2,0 µl
Primer (2,5 pmol/µl)	0,75 µl
H ₂ O	<u>variabel</u>
	10 µl

Die Menge der einzusetzenden DNA richtet sich nach deren Länge und Konzentration (Handbuch BigDye Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit).

Die Reaktion erfolgte in einem T3000 Thermocycler bei einer Annealing- und gleichzeitigen Elongations-Temperatur von 60°C für 4 Minuten und 25 Zyklen. Während und nach der Zugabe des BigDye-Reagenzes wurde unter Lichtschutz gearbeitet.

Zum Fällen des Sequenzreaktionsproduktes wurde den Proben 80 µl destilliertes Wasser, 10 µl Dextran Blau Acetat-Lösung und 250 µl 100% Ethanol zugesetzt. Nach dem Vortexen wurden die Reaktionsgefäße dann 20 Minuten bei 20°C und 15000 rpm zentrifugiert. Nach Abheben des Ethanols wurden 200 µl 70% Ethanol zugesetzt und nochmals für 5 Minuten bei 20°C und 15000 rpm zentrifugiert. Nach nochmaligem Abziehen des Alkohols und Trockenzentrifugation wurden die Pellets unter Lichtausschluß 30 Minuten lang getrocknet, in 10 µl Formamid resuspendiert und in die Sequenzierplatten pipettiert.

2.2.3.10 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy micro oder mini Kits. Die Elution der RNA erfolgte mit RNase freiem Wasser. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C. Alle weiteren Arbeiten mit RNA wurden auf Eis durchgeführt.

2.2.3.11 Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse der RNA

Die Bestimmung der Konzentration der RNA und ihrer Reinheit erfolgte unverdünnt bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum RNA und DNA) sowie 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine) im UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop ND 1000. Die Ratio 260/280 nm ist ein Maß für die Proteinverunreinigung der RNA-Präparation. Idealerweise sollte sie zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 1-2 µl.

Die Bestimmung der Qualität der RNA erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyser. Verwendet wurde das Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit und die Qualität der Gesamt-RNA nach Protokoll analysiert. Als RNA-Qualitätsmerkmal dient der Quotient der Fluoreszenzintensitätssignale der 28S und 18S rRNA, der von der 2100 Expert Software des Bioanalyzers automatisch berechnet wird. Die Degradation der RNA ist ein stufenartiger Prozess und mit zunehmender Degradation steigt auch der Quotient der beiden rRNA.

2.2.3.12 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription der RNA wurde mit Hilfe des First strand cDNA-Synthesis Kits for RT-PCR durchgeführt. Zum Umschreiben von RNA in einzelsträngige cDNA-Moleküle wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

10 x Puffer pH 8,3	2,0 µl (1 x)
25 mM MgCl ₂	4,0 µl (5 mM)
dNTP Mix	2,0 µl (1 mM)
Random Primer (p(dN) ₆)	2,0 µl (0,08 units)
RNase Inhibitor	1,0 µl (50 units)
AMV (Reverse Transkriptase)	0,8 µl (≥20 units)

1 µg Gesamt-RNA wurde eingesetzt, das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 20 µl. Die Reaktion wurde bei 25°C für 10 Minuten inkubiert, gefolgt von einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 42°C. Während dieser ersten Inkubationsphasen erfolgt das Annealing der Primer an die RNA und deren

Transkription. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 99°C für 5 Minuten, um die AMV zu inaktivieren. Der Reaktionsansatz wurde abschließend auf 4°C gekühlt.

2.2.3.13 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, zusätzlich jedoch die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit (*real-time*) bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende oder während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was die Quantifizierung ermöglicht.

Die quantitative Real-Time PCR wurde verwendet, um die Expression verschiedener Gene quantitativ zu untersuchen. Die Ansätze liefen auf einem ABI Prism 7900HT. Verwendet wurden vom Hersteller entworfene und bereits validierte TaqMan Gene Expression Assays (Assays-on-Demand). Jeder Assay enthält eine FAM dye-labeled TaqMan[®] MGB Sonde (Endkonzentration 250 nM) und zwei PCR Primer (Endkonzentration jeweils 900 nM) abgefasst in einem einzigen Reaktionsgefäß. Die TaqMan[®] Sonde ist neben dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) am 5'-Ende auch mit einem internen Quencher am 3'-Ende markiert. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. Bei intakter Sonde wird die Reporter-Fluoreszenzemission durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die TaqMan[®] Sonde in kleine Fragmente, wodurch es zur Abspaltung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporter-Fluoreszenz freigesetzt und messbar wird.

Ein Ansatz bestand aus 1 µl TaqMan Gene Expression Assay und 10 µl TaqMan[®] Universal PCR Master Mix. Eingesetzt wurden 1-100 ng cDNA und das Volumen eines Reaktionsansatzes betrug 20 µl. Um Schwankungen zu kompensieren wurden alle Ansätze in Duplikaten durchgeführt. Die Ansätze wurden in 96-Lochplatten pipettiert und in den ABI Prism 7900HT geladen. Die Messung erfolgte mittels Standardprogramm 10 Minuten 95°C, und für 45 Zyklen 15 s 95°C, 1 Minute 60°C.

Die Auswertung der quantitativen Real-Time PCR erfolgte mittels relativer Quantifizierung. Als dessen Maß wird der ct-Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus) herangezogen. Er entspricht der PCR-Zyklenzahl, ab der die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz des Gerätes ansteigt. Im Falle einer 100%igen Effizienz verdoppelt sich ab diesem Zyklus die DNA-Menge sichtbar vor dem Hintergrundsignal des Gerätes mit jedem Zyklus und folglich auch das

Fluoreszenzsignal (exponentielle Phase). Die Expression der Zielgene wird mit der eines nicht-regulierten Referenz-Gens (*housekeeping* Gen) normalisiert. Als *housekeeping* Gen wurde Beta2 Microglobulin (B2M) verwendet. Nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode können die Expressionsunterschiede berechnet werden: Im ersten Schritt wird dazu der ct-Wert des Referenz-Gens vom ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{ct} = \text{ct}_{\text{Zielgen}} - \text{ct}_{\text{Referenz-Gen}}$). Gegebenenfalls wird nach dieser Normierung vom Δct -Wert der Kontrollprobe der Δct -Wert einer experimentell behandelten Probe abgezogen und man erhält den $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert.

2.2.3.14 Microarray-Analyse (Differenzielle Genexpressionsanalyse)

Gesamt-RNA aus 1×10^6 Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy mini Kits isoliert, die Konzentration bestimmt und die Qualität analysiert (siehe 2.2.3.10). Mittels GeneChip[®] One-Cycle Target Labeling and Control Reagents wurde 1 μg der isolierten Gesamt-RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben gefolgt von einer *in vitro* Transkription (IVT) um Biotin-markierte cRNA herzustellen, die noch vor der Hybridisierung fragmentiert wurde. Gehalt und Längenverteilung der cRNA wurden mittels Agilent 2100 Bioanalyser sowie RNA 6000 Nano Assays, Agilent Technologies, bestimmt. Microarray-Hybridisierung auf GeneChip[®] HG U133 Plus 2.0 Arrays, Waschschrte und Scannen erfolgten nach Protokoll des Herstellers Affymetrix.

Alle statistischen Analysen wurden mit Unterstützung von Frau Claudia Döring (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main und Institut für Informatik, Universität Frankfurt am Main) durchgeführt.

Die Datenanalyse zur Qualität der technischen Microarray-Durchführung wurde mit der GCOS 1.4 Software, Affymetrix, durchgeführt. Standard Algorithmen Parameter wurden verwendet und die gemessenen Signalintensitäten jedes *Probe sets* wurden auf einen Zielwert (*Target value*) von 2000 für 100 Kontroll-Transkripte, die auf jedem Microarray werksseitig vorhanden sind, skaliert (http://www.affymetrix.com/Auth/support/downloads/mask_files/hgu133_plus_2norm.zip). Zusätzlich wurden die „.DAT“-Dateien optisch auf mögliche Artefakte überprüft. Skalenfaktoren (*scaling factors*, SF), prozentuale Signalpräsenz (*Present calls*, %P) und Signalverhältnisse (*signal ratios*) von *Probe Sets*, die unterschiedliche Bereiche in Transkripten abdecken (3' und Mitte), wurden geprüft. Alle weiteren statistischen Analysen wurden mit der Statistik Software „R“ durchgeführt (R Development Core Team, 2005). Zusätzliche Software Pakete für „R“ wurden aus dem „Bioconductor“-Projekt übernommen (Gentleman et al., 2004).

Die Probelevel-Normalisierung wurde mit der Varianzstabilisierungsmethode nach Huber et al. durchgeführt (Huber et al., 2002). Diese Methode rechnet die Varianz eines *Probes* annähernd unabhängig von der erwarteten Expressionsstärke. Die Parameter (Offset und Skalenfaktor) wurden für jeden Microarray unter der Annahme abgeschätzt, dass die Mehrheit der Transkripte zwischen den analysierten Proben nicht differentiell ausgeprägt ist. Unter Berücksichtigung der rechenbetonten Komplexität des Algorithmus wurden die Parameter anhand einer randomisierten *Probe*-Auswahl abgeschätzt und dann auf den gesamten Microarray transformiert.

Die *Probe set* Summierung (*probe set summarization*) wurde mittels der robusten Medienglättungsmethode (Tukey, 1977) anhand der normalisierten Daten durchgeführt. Für jedes *Probe set* wurde ein additives Glättungsmodell mit einer logarithmischen Skala zur Basis 2 über den gesamten Microarray angepasst, das die verschiedenen Affinitäten der *Probes* über den *Probe*-Effekt berücksichtigt.

Viele der Gene, die auf dem Microarray repräsentiert sind, sind in den Proben nicht ausgeprägt oder zeigen nur eine geringe Variabilität unter den Proben. Für alle paarweisen Vergleich wurde zunächst ein globaler Filter angewandt, um die Dimension der Microarrays zu reduzieren. Weiterhin wurden ein Intensitätsfilter sowie ein Varianzfilter angewandt. Unter der Annahme, dass die Varianz in den Vergleichen gleich groß ist, wurden nach der globalen Vorfilterung p-Werte (*p-value*) mit einem Zwei-Proben t-Test (*two sample t test*) berechnet, um diejenigen Gene zu identifizieren, die zwischen den Vergleichen differentiell exprimiert sind. Um dem Multiplen-Testen-Problem Rechnung zu tragen, wurden auch Falschpositivraten (*False Discovery Rate*, FDR) nach Benjamini und Hochberg (Hochberg und Benjamini, 1990) berechnet. Änderungsverhältnis (*Fold Change*, FC) zwischen zwei Vergleichen wurde für jedes *Probe set* berechnet. Differentiell ausgeprägte Gene wurden unter den Kriterien des FC und p-Wertes ermittelt.

2.2.4 Immunhistochemie

2.2.4.1 Gewebe für Immunhistochemie und deren histologische Typisierung

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression verschiedener Proteine wurde an Schnitten formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter Gewebe durchgeführt. Deren Anfertigung und histologische Typisierung nach der internationalen Klassifikation der WHO wurden am Senckenbergischen Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main durchgeführt.

2.2.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte zur Entfernung des Paraffins in Xylol eingebracht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) rehydriert. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung durch Kochen in der Mikrowelle für 10 Minuten in Puffersystemen je nach verwendetem Primärantikörper. Waschschritte erfolgten mit TBS-Puffer pH 7,4. Um unspezifische Bindungen zu mindern, erfolgte eine Inkubation mit einem 1:100 verdünnten Serum von der Tierspezies stammend, in der der Sekundärantikörper hergestellt wurde. Sollte kein entsprechendes Serum zur Verfügung stehen, wurde das Blocken mit 3% BSA-Lösung durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnungen erfolgten in 3% BSA gelöst in TBS und sind der Tabelle 2.1.11 zu entnehmen) über Nacht bei 4°C und anschließender Inkubation mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper 30 Minuten bei Raumtemperatur, erfolgte die Inkubation mit einem SAB-Komplexes, bestehend aus Streptavidin konjugiert mit biotinylierter HRP (horseradish peroxidase, LSAB 2 Single reagents, Peroxidase, Universal) für 10 Minuten. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat appliziert (*Labelled Streptavidin-Biotin-Methode*, LSAB). Nach einer Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin-Lösung nach Mayer für 1 Minute bei Raumtemperatur und anschließendem Spülen für 5 Minuten unter fließendem lauwarmem Leitungswasser („Bläuen“) wurden die Gewebeschnitte mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung von ID2 für die Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL

3.1.1 Expression der Transkriptionsfaktoren E2A, HEB und PAX5 sowie des potentiellen Inhibitors ID2 im HL und NHL

Die HRS Zellen des cHL stammen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen ab. Obwohl sie die B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und PAX5 teils ausprägen, wenn gleich auch schwächer im Vergleich zu normalen B-Zellen, ist die Expression der entsprechenden Target-Gene wie CD19 und CD79A nicht nachweisbar.

Sowohl die Ausprägung der Transkriptionsfaktoren als auch der Verlust der Expression der B-Zell-spezifischen Gene konnte auf RNA-Ebene in HL-Linien bereits gezeigt werden (Küppers et al., 2003; Schwering et al., 2003). Bei der Durchsicht der Daten globaler Genexpressionsanalysen von HL-Zelllinien zeigte sich eine starke RNA-Expression des ID2 (Küppers et al., 2003). Da ID2 auch in der Plasmazelldifferenzierung überexprimiert wird und dort mit dem gleichzeitigen Verlust einiger B-Zell-Gene korreliert (Underhill et al., 2003), wird spekuliert, dass die Ausprägung von ID2 in HRS Zellen möglicherweise auch hier zum Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene beiträgt.

Die Expression der Transkriptionsfaktoren E2A, EBF sowie PAX5 wurde auch bereits auf Proteinebene in primären HL-Fällen nachgewiesen. Daher sollte zunächst auch in den HL-Zelllinien die Expression der Proteine E2A, EBF und PAX5 untersucht werden. Es wurden Gesamtzellextrakte der vier cHL-Zelllinien L1236, L428, KM-H2 und HDLM-2, der nIplHL-Linie DEV sowie von sechs NHL-Linien (eine Mantelzell-Lymphom-Zelllinie NCEB-1, zwei DLBCL-Zelllinien OCI-LY7 und SU-DHL-6, zwei Burkitt Lymphom-Zelllinien Raji und DG75 sowie eine B-lymphoblastoide Zelllinie NCNC) hergestellt, die mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot hinsichtlich der Expression von E2A und PAX5 analysiert wurden (Abbildung 5). Ein Antikörper für den Nachweis von EBF mittels Immunblot stand zu dieser Zeit nicht zur Verfügung, weshalb die Expression des EBF auf Proteinebene nicht untersucht wurde.

Die Expression des PAX5 war in den HL-Zelllinien KM-H2, L1236 und L428 im Vergleich zu den NHL-Zelllinien äußerst schwach, während sie in der HL-Zelllinie

HDLM-2 gänzlich fehlte. In eben dieser Zelllinie war die Expression des E2A auch am schwächsten, deutlicher wurde es in der HL-Linie L1236 ausgeprägt und noch stärker in den HL-Linien L428 und KM-H2. In den NHL-Zelllinien wurde E2A überwiegend ähnlich stark exprimiert, wobei die Burkitt Lymphom-Zelllinie DG75 die insgesamt deutlich stärkste Expression aufwies. Die DLBCL-Linie OCI-LY7 exprimiert das Protein E2A dagegen nicht (Abbildung 5).

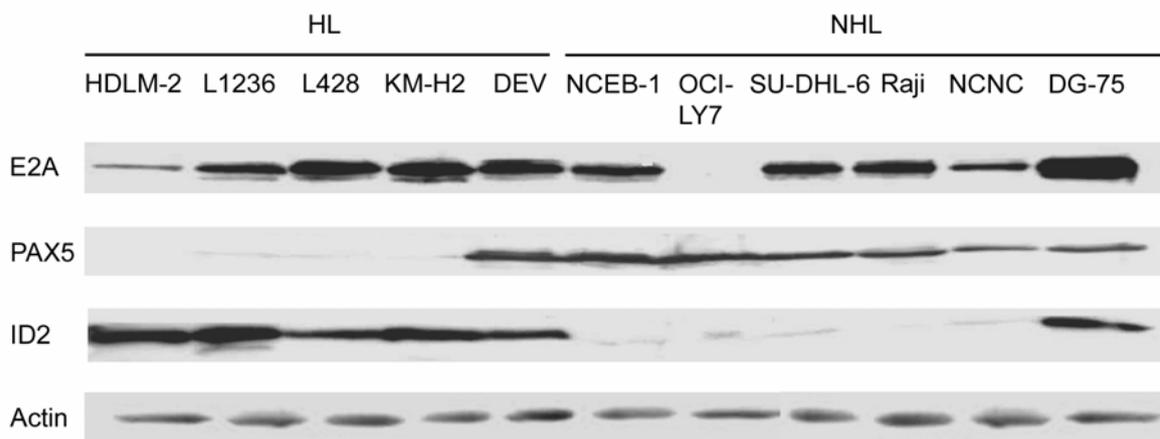


Abbildung 5: Analyse der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren E2A, PAX5 und des Inhibitors ID2 in HL- und NHL-Zelllinien im Western Blot. Gesamtzellextrakte von 1×10^5 Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurde Actin verwendet.

Normalerweise reguliert E2A zusammen mit EBF PAX5 (Kee und Murre, 1998). PAX5 wird jedoch erstaunlicherweise in den HL-Zelllinien trotz vorhandener Expression des E2A nur noch schwach exprimiert. Die Frage nach der Ursache hierfür könnte durch eine Inhibition des E2A beantwortet werden, denn E2A wird durch direkte Interaktion mit dem ID2 negativ reguliert (Engel und Murre, 2001). Ergebnisse von *in vitro*-Analysen zeigten auch eine direkte Interaktion mit PAX5 (Roberts et al., 2001).

Daher wurde die Expression des ID2 auf Proteinebene ebenfalls mittels Immunblot analysiert. Tatsächlich wurde in den HL-Zelllinien L1236, L428, KM-H2, HDLM-2 sowie DEV auch auf Proteinebene die starke Expression des ID2, die sich schon auf RNA-Ebene zeigte (Küppers et al., 2003), bestätigt. Im Vergleich dazu konnte keine ID2-Proteinexpression in den NHL-Zelllinien nachgewiesen werden, mit Ausnahme der Burkitt Lymphom-Linie DG75 (Abbildung 5), in der die Expression des ID2-Proteins gefunden wurde.

Demnach wird ID2 in den HL-Zelllinien aberrant exprimiert und spielt in der Dedifferenzierung des HL möglicherweise eine Rolle.

Als nächstes wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen an HL-Primärfällen untersucht, ob ID2 auch in primären HRS Zellen exprimiert wird. Zum Vergleich wurden sowohl weitere NHL-Entitäten als auch normales lymphatisches Gewebe analysiert (Abbildung 6 und Tabelle 1). In normalem lymphatischem Gewebe zeigte sich eine ID2-Expression lediglich in einigen Keimzentrums- und interfollikulären Zellen (Abbildung 6A-C). Bei den ID2-positiven Zellen handelte es sich vermutlich um dendritische Zellen und Makrophagen, erkennbar anhand der Morphologie. Die HL-Fälle zeigten starke Expression des ID2 in den HRS Zellen (Abbildung 6D) und die Mehrzahl der untersuchten nlpHL-Fälle zeigte, dass die LP Zellen positiv für ID2 sind (Abbildung 6E). Unter den analysierten NHL-Fällen fand sich Negativität im Hinblick auf die ID2-Expression in den Tumorzellen des Mantelzell-Lymphoms und des Follikulären Lymphoms sowie in den Fällen der chronisch lymphatischen Leukämie (Tabelle 1). Positiv für ID2 war ebenfalls die Mehrzahl der analysierten primären Fälle des mediastinalen B-Zell-Lymphoms (Abbildung 6F), des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (Abbildung 6G) sowie alle untersuchten Burkitt Lymphome (Abbildung 6H und Tabelle 1).

Tabelle 1: Analyse der Expression von ID2 in HL und NHL mittels Immunhistochemie

Lymphom	Anzahl der positiven Fälle/ Anzahl der untersuchten Fälle
CLL	0/10
FL	0/5
MCL	0/10
BL	3/3
DLBCL	12/16
nlpHL	8/10
MLBCL	15/16
cHL	42/42

In Fällen, die als positiv für ID2 bewertet wurden, zeigte die weitgehende Mehrheit der Tumorzellen (>80%) eine Expression von ID2.

Folglich wird ID2 tatsächlich in den Tumorzellen der primären HL-Fälle aberrant exprimiert.

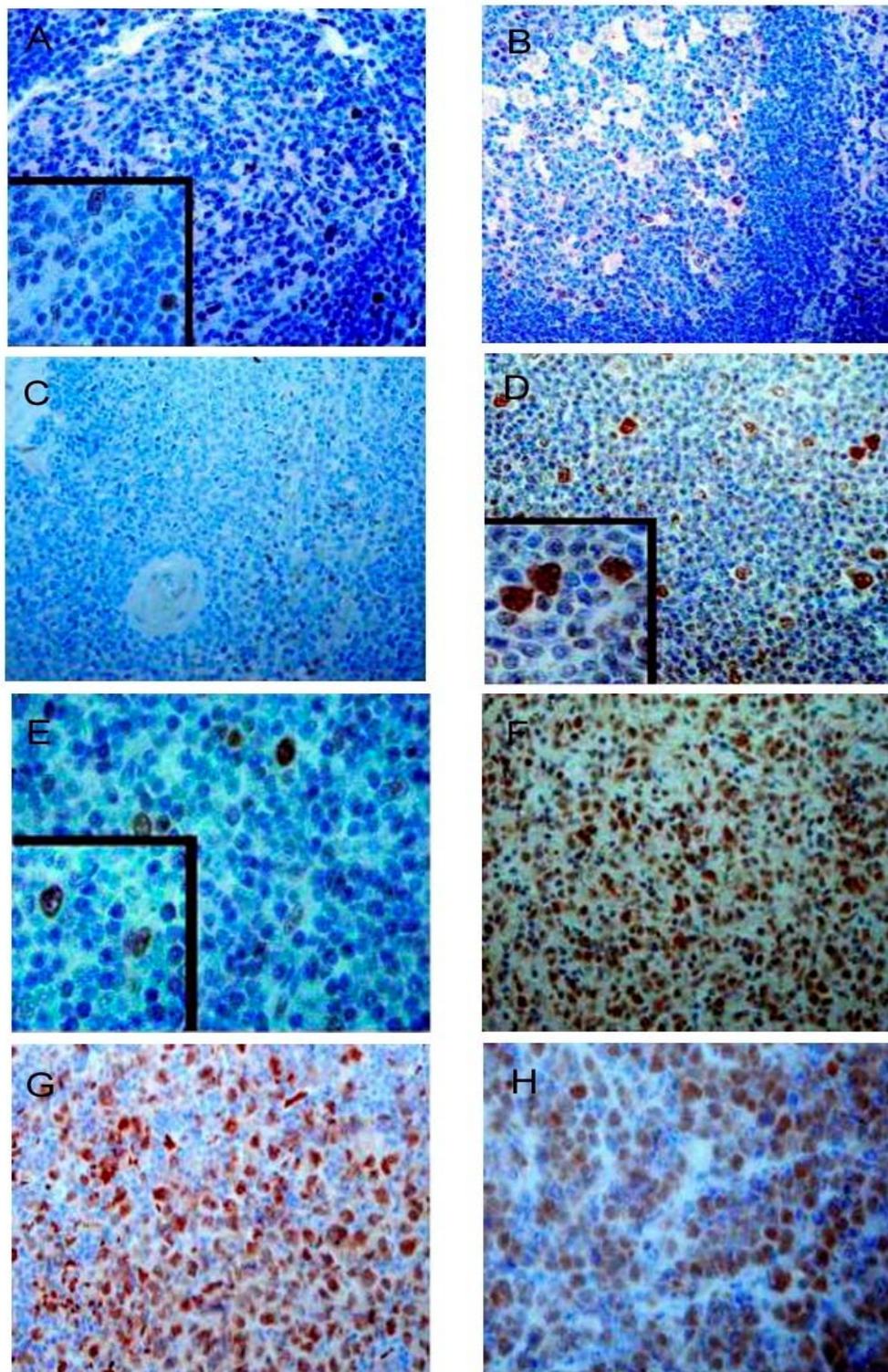


Abbildung 6: Analyse der Expression von ID2 in primären HL- und NHL-Fällen sowie normalem lymphatischem Gewebe mittels Immunhistochemie. Für alle Färbungen wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-ID2-Antikörper verwendet, die Detektion erfolgte mittels Horseradish-Peroxidase (HRP) und 3,3-Diaminobenzidin. **A-C:** Färbungen einer Lymphadenitis, einer Tonsille, und einer Milz. **D und E:** Färbungen eines cHL (**D**) und eines nlpHL (**E**). **F-H:** Färbungen jeweils eines MLBCL, DLBCL und BL. Die schwarzen Rechtecke in den Abbildungen A, D und E zeigen vergrößerte Ausschnitte der jeweiligen Abbildungen.

ID2 bindet im Allgemeinen E-Proteine mit einer Helix-loop-Helix-Struktur, wie beispielsweise E2A. Der Transkriptionsfaktor HEB gehört ebenfalls zu den E-Proteinen und ist durch Bildung von Heterodimeren mit E2A direkt an der B-Zell-spezifischen Gentranskription beteiligt (Hu et al., 1992). Er spielt somit eine wichtige Rolle in der B-Zell-Entwicklung und kommt im HL als möglicher Bindungspartner des ID2 in Frage.

Da die Analyse dieses Zusammenhangs möglicherweise weiteren Aufschluss über die Funktion des ID2, und auch des HEB, in der Dedifferenzierung der HRS Zellen geben könnte, wurde zunächst die Expression des HEB auf Proteinebene in den HL-Zelllinien im Vergleich zu NHL-Zelllinien im Western Blot analysiert. Es wurden Gesamtzellextrakte der vier HL-Linien und NHL-Zelllinien, wie die mediastinalen B-Zell-Lymphom-Zelllinien MEDB1 und Karpas1106P, die DLBCL-Linien Farage und Karpas422 sowie die Burkitt Lymphom-Linien Raji und BL2 hergestellt. Mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot wurden diese Zell-Lysate unter Verwendung spezifischer Antikörper auf die Expression des HEB-Proteins untersucht.

Es ließ sich erkennen, dass das HEB-Protein in allen Zelllinien überwiegend gleichmäßig ausgeprägt wurde (Abbildung 7). Ausnahmen stellten nur die nlpHL-Linie DEV sowie die mediastinale B-Zell-Lymphom-Linie MEDB1 dar, in denen HEB äußerst schwach bzw. gar nicht ausgeprägt wurde.

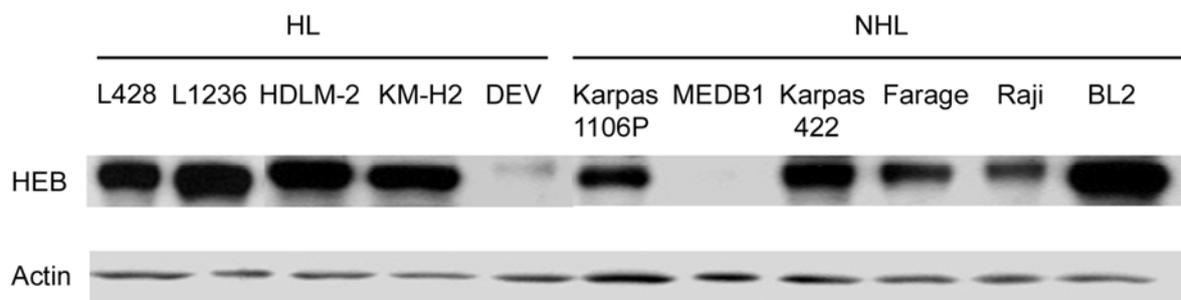


Abbildung 7: Analyse der Expression von HEB in HL- und NHL-Zelllinien im Western Blot. Gesamtzellextrakte von 1×10^5 Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurde Actin verwendet.

Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren E2A, HEB und PAX5, wenn auch schwach, in den HL-Zelllinien exprimiert werden. ID2 wird nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene in primären HL-Fällen sowie in den HL-Zelllinien aberrant exprimiert wird. Es scheint daher eine wichtige Rolle in der Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL zu spielen.

3.1.2 Analyse der Interaktion des ID2 mit den Transkriptionsfaktoren E2A, HEB und PAX5 in HL-Zelllinien

ID2 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Dedifferenzierung der HRS Zellen durch mögliche Bindung und somit Inhibition der regulatorischen Aktivität der Transkriptionsfaktoren E2A und HEB. Daher sollten die HL-Zelllinien auf die Interaktion mit den bHLH-Differenzierungsfaktoren E2A und HEB analysiert werden. Auch PAX5 wird möglicherweise durch ID2 in seiner Aktivität gehemmt. Obwohl es keine bHLH-Struktur aufweist, wurde eine Interaktion mit ID2 bereits gezeigt (Roberts et al., 2001). Demzufolge wurden die HL-Linien auch auf eine mögliche Bindung des ID2 an PAX5 untersucht.

Für diese Ko-Immünpräzipitationsanalysen wurde anfänglich das Profound Mammalian Co-IP Kit verwendet. Zellen der drei HL-Linien L428, L1236 und KM-H2 wurden mit dem MPER-Puffer des Kits mild lysiert, um mögliche, vor allem schwache Interaktionen nicht durch aggressive Lysis zu zerstören. Die HL-Zelllinie HDLM-2 wurde aufgrund ihrer T-Zell-Abstammung statt der B-Zell-Abstammung der übrigen HL-Linien nicht berücksichtigt. Aus den Gesamtzell-Lysaten wurde mithilfe eines entsprechenden polyklonalen Kaninchen anti-ID2-Antikörpers ID2 präzipitiert, indem zunächst der Antikörper durch Bindung an ein Harzgel immobilisiert wurde und anschließend mit dem Proteinlysate inkubiert wurde. Nach Entfernen der Flüssigkeiten durch Zentrifugation sowie einiger Waschschriffe wurde dann durch einen Elutionsschritt das Präzipitat erhalten, das ID2 möglicherweise an Interaktionspartner gebunden enthielt. In einer Western Blot-Analyse der Präzipitate konnte der möglicherweise im Komplex mit ID2 ko-immunopräzipitierte Partner unter Verwendung spezifischer Antikörper als Bindungspartner identifiziert werden. Als Negativkontrolle wurde statt des primären Antikörpers normales Kaninchen Serum IgG verwendet.

E2A konnte in den drei HL-Zelllinien als Bindungspartner nachgewiesen werden (Abbildung 8). Obwohl jedoch annähernd das gesamte ID2-Protein aus den Gesamtzell-Lysaten präzipitiert wurde (Abbildung 8, oberste Reihe), konnte im Lysat nach der Präzipitation noch E2A nachgewiesen werden. Demnach lag in keiner der drei HL-Zelllinien E2A vollständig an ID2 gebunden vor (Abbildung 8, zweite Reihe). Eine Interaktion zwischen PAX5 und ID2 konnte im Gegensatz zur bestehenden Literatur, nach der PAX5 als Bindungspartner von ID2 identifiziert wurde (Roberts et al., 2001), unter den hier verwendeten Bedingungen in keiner der drei HL-Zelllinien detektiert werden (Abbildung 8, dritte Reihe). Eine Interaktion zwischen ID2 und HEB konnte nur in der HL-Zelllinie KM-H2 nachgewiesen werden. Es zeigte sich

allerdings, dass diese Bindung nahezu vollständig war, denn im Lysat nach der Präzipitation ließ sich ID2 nicht mehr und HEB nur noch als schwach vorhanden nachweisen (Abbildung 8, unterste Reihe).

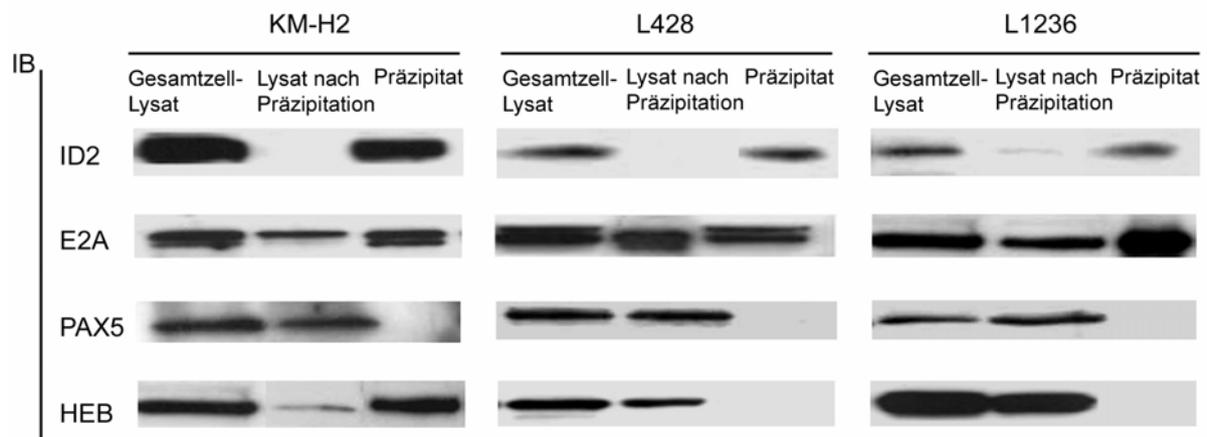


Abbildung 8: Ko-Immunopräzipitation von E2A, PAX5 und HEB mit ID2 aus HL-Zelllinien. Ein polyklonaler anti-ID2 Antikörper und normales Kaninchen Serum IgG als Kontrolle wurden für die Ko-Immunopräzipitation von Zell-Lysaten, hergestellt aus 1×10^7 Zellen, mittels Profound Mammalian Co-IP Kit, verwendet. Jeweils gleiche Mengen der Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunblot analysiert, wobei mit anti-ID2-, anti-E2A-, anti-PAX5- und anti-HEB-Antikörpern inkubiert wurde. E2A konnte unter der Verwendung des normalen Kaninchen Serum IgG als Kontrolle im Präzipitat nicht detektiert werden (nicht gezeigt).

E2A interagiert mit ID2 und wird letztlich in Teilen durch das im HL aberrant exprimierte ID2 inaktiviert. Eine Interaktion von ID2 mit PAX5 im HL lässt sich trotz hier nicht nachweisbarer Bindung nicht ausschließen, da die Lysebedingungen für den Nachweis der Interaktionen bei den Ko-Immunopräzipitationsexperimenten entscheidend sind. Möglicherweise wurde demnach die Bindung von ID2 mit PAX5 aus technischen Gründen nicht detektiert. Die bereits in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen ID2 und PAX5 konnte allerdings auch nur in Zelllinien mit überexprimierten Bindungspartnern gezeigt werden (Roberts et al., 2001). Mit endogenen Proteinmengen blieb der Nachweis bisher aus.

Auch wenn die Bindung von PAX5 mit ID2 unter den verwendeten Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte, so zeigten die gefundenen Interaktionen zwischen ID2 und E2A in allen analysierten HL-Linien sowie von ID2 mit HEB in einer der HL-Linien klar, dass ID2 durch die mögliche Inaktivierung der B-Zell-Transkriptionsfaktoren E2A und HEB sehr wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Dedifferenzierung der HRS Zellen hat.

3.2 Die Bedeutung von ID2 für die Dedifferenzierung im ALCL

3.2.1 Expression der Transkriptionsfaktoren E2A und HEB sowie des potentiellen Inhibitors ID2 im ALCL

Es gibt Hinweise, dass eine gewisse Ähnlichkeit zwischen ALCL und HL besteht, beispielsweise die Dedifferenzierung betreffend. So scheint bei dieser Entität ein vergleichbarer „Verlust der T-Zell-Identität“ stattzufinden (Bonzheim et al., 2004), bei dem womöglich in ähnlicher Weise die E-Protein-Transkriptionsfaktoren HEB und E2A eine Rolle spielen. Zum einen ist der Transkriptionsfaktor HEB an der T-Zell-Entwicklung beteiligt. So zeigen HEB-defiziente Mäuse einen Block in der T-Zell-Entwicklung auf der Stufe der doppelt negativen Thymozyten sowie einen Abfall der doppelt positiven Thymozyten (Barndt et al., 1999). Des Weiteren ist auch E2A an der T-Zell-Entwicklung regulatorisch beteiligt, so zeigen E2A-defiziente Mäuse ebenfalls einen Block in der T-Zell-Entwicklung (Bain et al., 1997).

Um zu analysieren, ob die Dedifferenzierung des ALCL womöglich in ähnlicher Weise wie beim HL durch die Transkriptionsfaktoren E2A und HEB bedingt ist, wurde zunächst deren Proteinexpression in den ALCL-Zelllinien SU-DHL-1, Karpas299 sowie SR786 mittels Immunblot-Analyse untersucht.

Tatsächlich konnte die Expression von E2A in allen drei ALCL-Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 9).

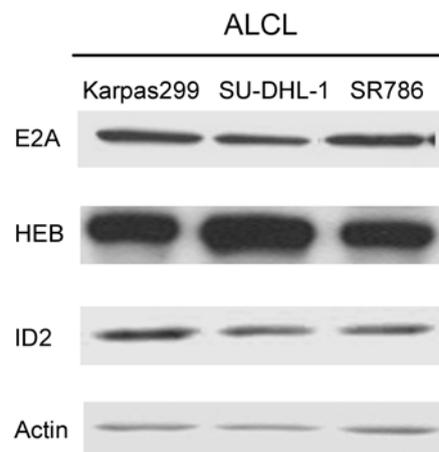


Abbildung 9: Analyse der Expression von E2A, HEB und ID2 in ALCL-Zelllinien im Western Blot. Gesamtzellextrakte von 1×10^5 Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurde Actin verwendet.

Die Expression von HEB zeigte sich ebenso ausgeprägt wie schon in den HL- und NHL-Linien (Abbildung 9 und Abbildung 5 zum Vergleich). ALK-positive ALCL sind

bekanntlich negativ für PAX5 (Barberis et al., 1990), was sich auch in der Proteinexpression des PAX5 in den ALCL-Zelllinien widerspiegelt (Daten nicht gezeigt).

Durch vergleichende globale Genexpressionsanalysen verschiedener T-Zell-Lymphome mit normalen T-Zell-Populationen wurde gefunden, dass ID2 in T-Zell-Lymphomen ebenso stark überexprimiert wird wie im HL. Ähnlich wie im HL könnte ID2 auch im ALCL an der Dedifferenzierung beteiligt sein. Folglich sollte zunächst die Expression des ID2 auf Proteinebene in den ALCL-Zelllinien Karpas299, SU-DHL-1 und SR786 mittels Western Blot bestätigt werden. Die Expression des ID2 konnte in allen drei Zelllinien als deutlich ausgeprägt nachgewiesen werden (Abbildung 9).

Um einen Vergleich der ID2-Proteinexpression zu anderen T-Zell-Lymphom-Entitäten zu erhalten und gleichzeitig den Bezug zu primärem Gewebe herzustellen, wurde als nächstes die ID2-Proteinexpression in primären ALCL-Fällen mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert.

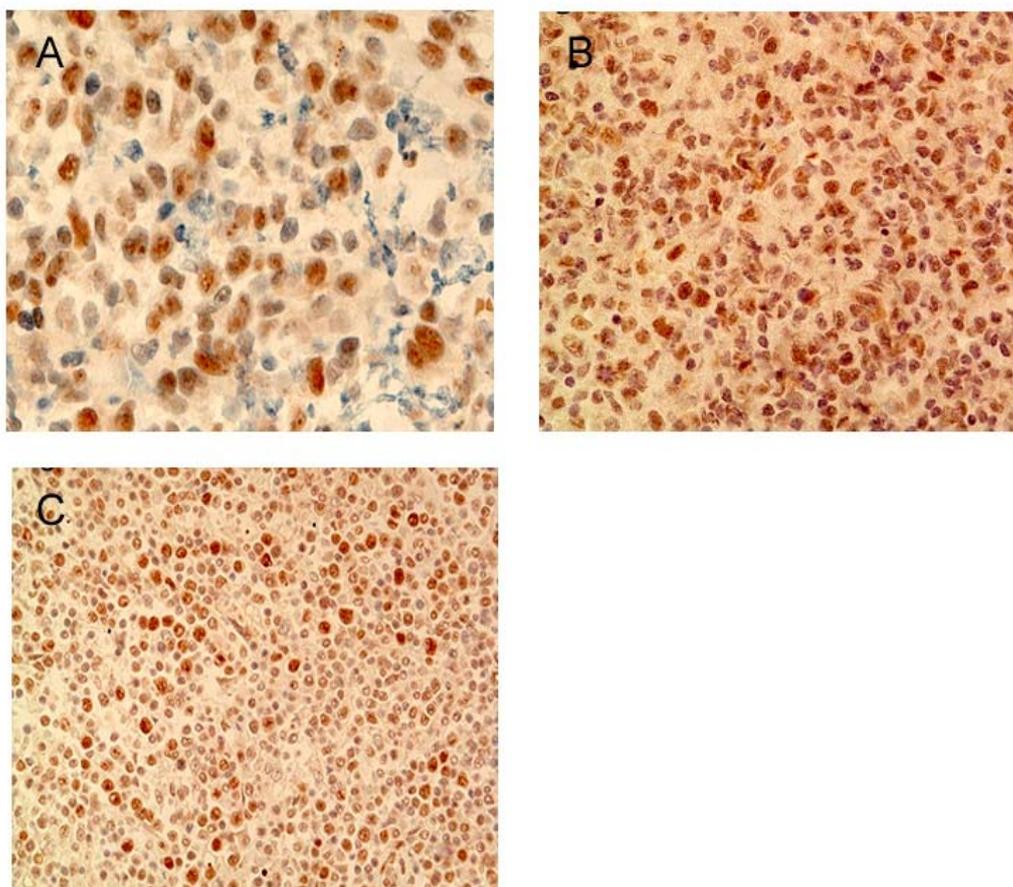


Abbildung 10: Analyse der Expression von ID2 in T-Zell-Lymphomen mittels Immunhistochemie. Für alle Färbungen wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-ID2-Antikörper verwendet, die Detektion erfolgte mittels Horseradish-Peroxidase (HRP) und 3,3-Diaminobenzidin. **A:** Färbungen eines ALCL, **B:** eines peripheren T-Zell-Lymphoms und **C:** eines angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphoms.

Im Vergleich zu normalen T-Zellen in sekundärem lymphatischem Gewebe, in dem keine Expression von ID2 beobachtet werden konnte, war ID2 in 14/17 untersuchten ALCL (Abbildung 10A), in 16/23 peripheren NOS (*not other specified*) T-Zell-Lymphomen (Abbildung 10B) und 5/8 angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphomen (Abbildung 10C) überexprimiert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Analyse der Expression von ID2 in ALCL mittels Immunhistochemie

Lymphom	Anzahl der positiven Fälle/ Anzahl der untersuchten Fälle
ALCL	14/17
Peripheres T-Zell-Lymphom NOS	16/23
Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom	5/8

In Fällen, die als positiv für ID2 bewertet wurden, zeigte die weitgehende Mehrheit der Tumorzellen (>80%) eine Expression von ID2

Folglich wurde ID2 auch in den Tumorzellen des ALCL aberrant exprimiert und spielt für die Pathogenese des ALCL möglicherweise eine wichtige Rolle.

3.2.2 Analyse der Interaktion des ID2 mit den Transkriptionsfaktoren E2A und HEB in ALCL-Zelllinien

Ähnlich wie im HL könnte auch in den ALCL die Aktivität der Transkriptionsfaktoren E2A und HEB möglicherweise durch die Interaktion mit ID2 inhibiert werden.

Daher sollten, ebenso wie für die HL-Zelllinien, die potentiellen Bindungspartner des ID2 in den ALCL-Linien mittels Ko-Immünpräzipitationsexperimente identifiziert werden. Zellen der drei ALCL-Linien Karpas299, SU-DHL-1 und SR786 wurden mit dem MPER-Lysepuffer mild lysiert, um mögliche Proteininteraktionen nicht durch harsche Lysis zu trennen. Das entstandene Lysat wurde zunächst mit dem primären polyklonalen Kaninchen anti-ID2-Antikörper inkubiert, um anschließend die Präzipitation des ID2 mitsamt möglichen Interaktionspartnern durchzuführen. Dazu wurden anti-Kaninchen-Ig-gekoppelte Magnetkügelchen (Dynabeads, Invitrogen) verwendet. Durch einen Elutionsschritt wurde dann das Präzipitat erhalten, das ID2 möglicherweise an Interaktionspartner gebunden enthielt. In einer Western Blot-Analyse der Präzipitate konnte der möglicherweise im Komplex mit ID2 ko-immunoprecipitierte Partner unter Verwendung spezifischer Antikörper als Bindungspartner identifiziert werden.

E2A konnte als Bindungspartner des ID2 in allen drei ALCL-Linien nachgewiesen werden, wenn auch teils nur in geringem Maß (Karpas299, SU-DHL-1), obwohl ID2 in den ALCL-Zelllinien vollständig präzipitiert wurde. Dies zeigte sich anhand der nicht vorhandenen ID2-Proteinbande sowie der starken E2A-Proteinbande in den

Lysaten nach der Präzipitation (Abbildung 11 obere und zweite Reihe). Die Interaktion des ID2 mit HEB konnte in allen drei Zelllinien detektiert werden, wenn auch schwach in der ALCL-Linie SR786. Wie auch schon bei der Interaktion mit E2A, so war auch die Bindung an HEB unvollständig, denn auch hier konnte das Protein HEB in den Lysaten nach der Präzipitation noch nachgewiesen werden (Abbildung 11, untere Reihe).

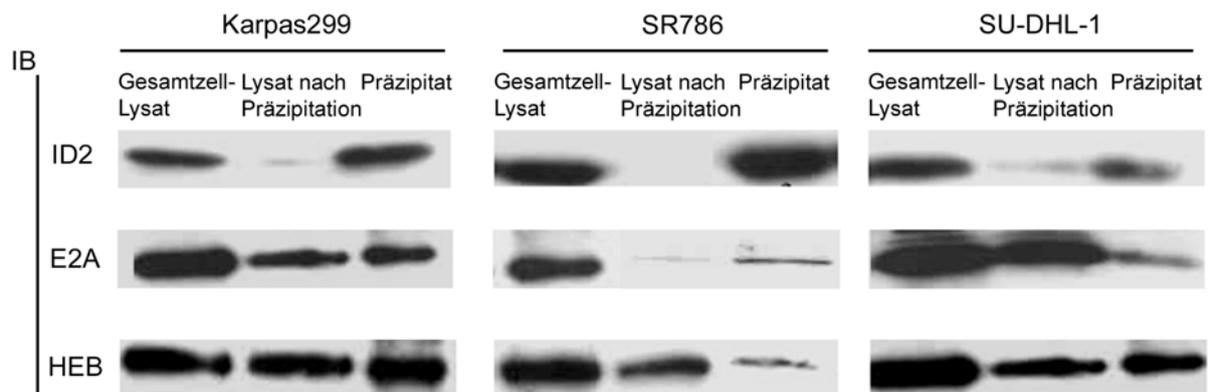


Abbildung 11: Ko-Immunopräzipitation von E2A und HEB mit ID2 aus ALCL-Zelllinien. Ein polyklonaler anti-ID2 Antikörper wurde für die Ko-Immunopräzipitation von Zell-Lysaten, hergestellt aus 1×10^7 Zellen, mittels Dynabeads[®] verwendet. Gleiche Mengen der Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Immunblot analysiert, wobei mit anti-ID2-, anti-E2A- und anti-HEB-Antikörpern inkubiert wurde. HEB konnte unter der Verwendung des normalen Kaninchen Serum IgG als Kontrolle im Präzipitat nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Die für den Immunblot verwendeten Antikörper waren monoklonale Maus-Antikörper.

Möglicherweise wird die Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren E2A und HEB durch die Interaktion mit dem aberrant exprimierten ID2 gehemmt, welches somit in der Dedifferenzierung der ALCL eine bedeutende Rolle spielen könnte.

3.3 Etablierung eines retroviralen Transduktionssystems zur stabilen shRNA-Expression in HL- und ALCL-Zelllinien

Durch die gezeigte Interaktion zwischen E2A und ID2 in den HL-Zelllinien, scheint nun die Inaktivierung des E2A durch ID2 bestätigt zu sein. E2A wird demnach exprimiert, dessen Aktivität jedoch unterdrückt. Somit kann es zur Herunterregulation der Transkription von Target-Genen, wie z.B. CD19 kommen. Die aberrante Expression des ID2 ist demnach wahrscheinlich ein wichtiger Faktor für die Dedifferenzierung der HRS Zellen.

Um dessen Funktion noch genauer zu untersuchen, sollte die Herunterregulation des ID2 in den HL-Zelllinien dessen Rolle im Deprogrammierungsprozess verdeutlichen. Dazu wurde sich des Mechanismus der RNA-Interferenz bedient (siehe hierzu auch 1.5). Da HL-Zelllinien mittels Elektroporation nur schwer zu

transfizieren sind, wurde die Technik des Gentransfers unter Verwendung lentiviraler Vektoren als Möglichkeit gewählt, siRNA-Vorläufer (*short hairpin RNA*, shRNA) in den HL-Zelllinien zu exprimieren. Darüber hinaus bot diese Methode den Vorteil der stabilen shRNA-Expression durch die Integration des für die shRNA kodierenden Vektors in das Genom der transduzierten Zelllinien. So können Effekte der Herunterregulation des Zielgens über einen längeren Zeitraum analysiert werden. Analog sollte die Rolle des ID2 für die Pathogenese des ALCL untersucht werden, weshalb die entsprechenden Zelllinien in diese Etablierungsexperimente einbezogen wurden.

Zum weitestgehenden Ausschluss des Erhalts unspezifischer Effekte wurden zum einen zwei shRNA-Sequenzen, die gegen ID2 gerichtet sind und sich bereits als funktional in humanen CD34-positiven Nabelschnurblut-Vorläuferzellen (Buitenhuis et al., 2005) sowie in Neuroblastomzellen (Lasorella et al., 2005) erwiesen haben, verwendet. Zum anderen diente eine nonsense-Sequenz (*scrambled shRNA*, shSCR) als Kontrolle der Spezifität der ID2-spezifischen shRNA.

Der verwendete lentivirale replikationsdefekte Vektor pVIG enthielt neben der shRNA-Expressionskassette unter der Kontrolle eines zur shRNA-Transkription benötigten Polymerase III H1-Promotors mit entsprechendem Stop-Kodon, zusätzlich einen *green fluorescence protein* (GFP)-Selektionsmarker unter der Kontrolle eines SFFV (*spleen focus forming virus*)-Polymerase II-Promotors.

Zusammen mit den Verpackungsplasmiden delta sp2 (kodiert für gag/pol) und pHIT-G (kodiert für env) wurden mittels Calciumphosphatpräzipitation in der embryonalen Nierenzelllinie 293T Viren erzeugt, die aus dem Zellkulturüberstand nach 48 Stunden geerntet und zur Transduktion der Zielzellen verwendet werden konnten (siehe dazu auch 2.2.1.3). Die erfolgreiche Klonierung, d.h. die korrekte Platzierung der vollständigen shRNA-kodierenden Oligonukleotide, wurde durch Sequenzierung verifiziert. Durch den GFP-Selektionsmarker konnte die Bestimmung der Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse erfolgen. Zelllinien, die mit dem lentiviralen shRNA-Expressionsvektor pVIG transduziert wurden, waren die HL-Zelllinien KM-H2, L1236 und L428, die mit einer aus Vorversuchen ermittelten optimalen MOI (*multiplicity of infection*, siehe auch 2.2.1.6) von 20 (durchschnittlicher Virentiter von 1×10^6 Viren/ml) transduziert wurden. Eine höhere MOI hatte einen negativen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Die Bestimmung der Transduktionseffizienzen erfolgte 48 Stunden nach der Infektion.

Es ergaben sich aus jeweils drei unabhängigen Experimenten durchschnittlich 13% transduzierte Zellen für die HL-Zelllinie L1236 (8%-17%), 33% transduzierte Zellen

für die HL-Zelllinie L428 (20%-40%) sowie nur 6% transduzierte Zellen für die HL-Zelllinie KM-H2 (4%-9%) (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der niedrigen Anzahl infizierter Zellen, wurde zu deren Erhöhung RetroNectin[®] eingesetzt, mit dem die Zellkulturplatten beschichtet wurden bevor die Zielzellen darauf mit dem Virus inkubiert wurden. RetroNectin[®] ist ein chimäres rekombinantes Peptid mit drei von humanem Fibronectin abgeleiteten Domänen, wodurch sowohl Zelloberflächenproteine als auch Viruspartikel gebunden werden können. So werden Viruspartikel und die zu transduzierenden Zellen durch RetroNectin[®] ko-lokalisiert und die Transduktionswahrscheinlichkeit erhöht. Beschichten der Zellkulturplatten mit RetroNectin[®] konnte eine signifikante Erhöhung der Transduktionseffizienzen in den HL-Linien auf bis zu 60% bewirken (L1236: 38%-55%, KM-H2: 45%-56%, L428: 50%-60%) (Abbildung 12, HL-Zelllinie L428 repräsentativ shSCR 55%, shID2#L 60%, shID2#C 53%).

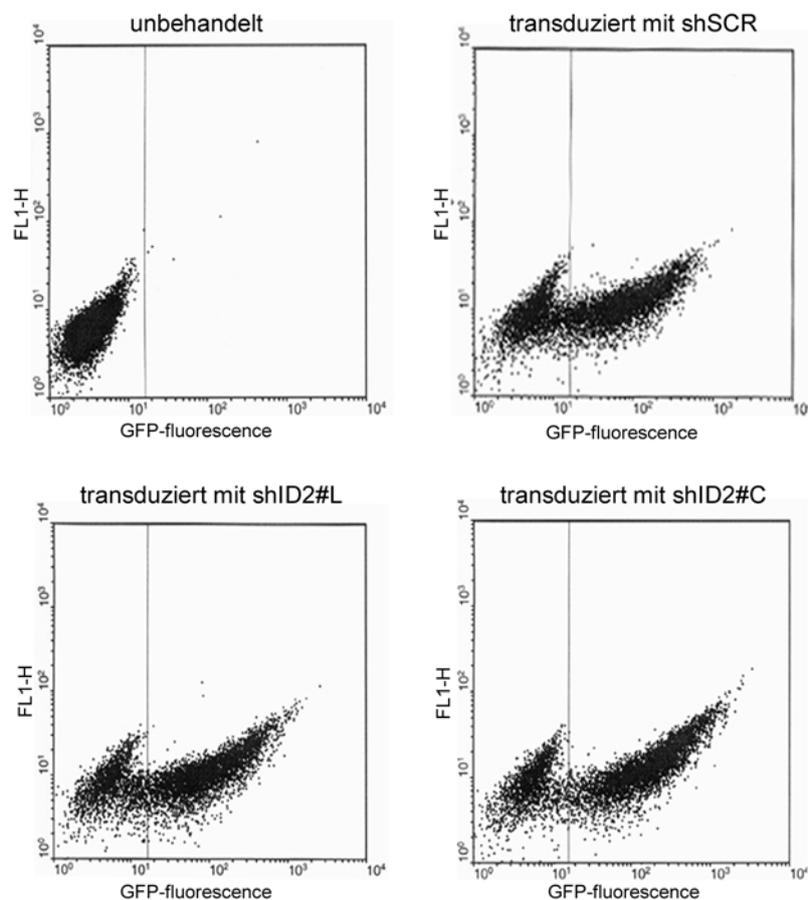


Abbildung 12: Transduktionseffizienzen mit dem pVIG-System unter Verwendung von RetroNectin[®]. FACS-Analyse der HL-Zelllinie L428. Gezeigt sind repräsentative Transduktionseffizienzen unbehandelter Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Virus infiziert wurden, der einen shID2-exprimierenden pVIG Vektor enthielt (MOI=20). SiDI2#L und siID2#C bezeichnen die zwei verschiedenen Sequenzen der verwendeten shRNA, shSCR bezeichnet die verwendete nonsense-shRNA als Negativkontrolle.

RetroNectin[®] wurde für alle weiteren Transduktionsversuche verwendet.

Da ID2 vermutlich auch in der Dedifferenzierung des ALCL eine Rolle spielt, lag es nahe, die entsprechenden Zelllinien in die Versuche zur Herunterregulation des ID2 einzubeziehen. So sollte die Bedeutung der aberranten ID2-Proteinexpression genauer untersucht werden. Die ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 wurden entsprechend den HL-Linien unter der Verwendung von RetroNectin[®] retroviral transduziert.

Auch hier wurden hohe Transduktionseffizienzen von bis zu 80% für die ALCL-Linien erreicht (SU-DHL-1: 70%-80%, Karpas299: 65%-78%) (Abbildung 13, ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 repräsentativ shSCR 75%, shID2#L 80%, shID2#C 78%).

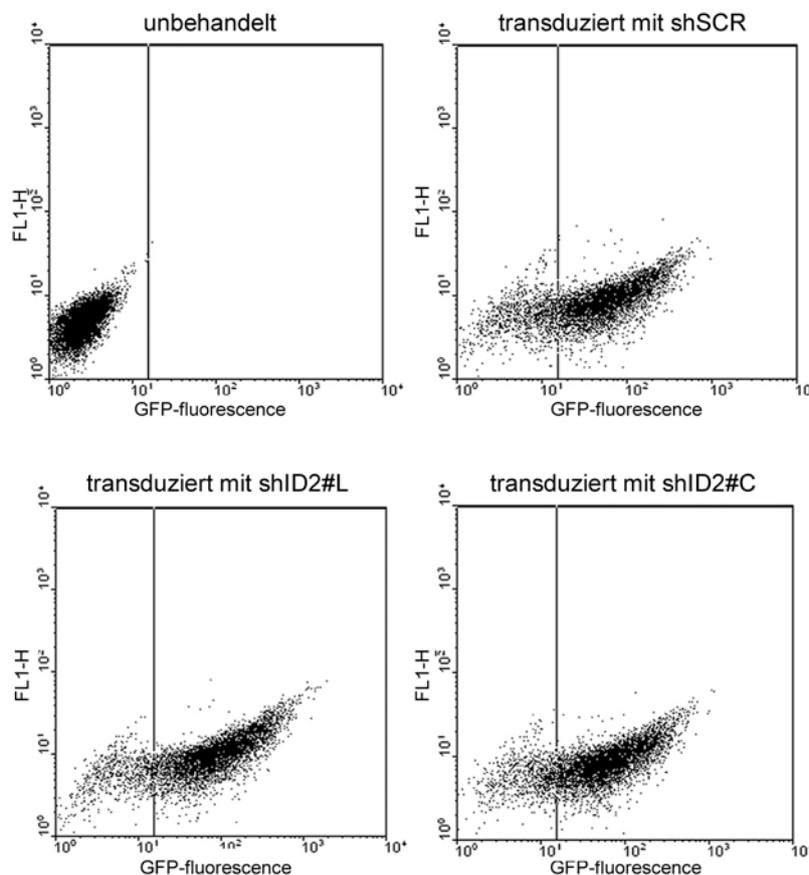


Abbildung 13: Transduktionseffizienzen mit dem pVIG-System unter Verwendung von RetroNectin[®]. FACS-Analyse der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1. Gezeigt sind repräsentative Transduktionseffizienzen unbehandelter Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Virus infiziert worden sind, der einen shID2-exprimierenden pVIG Vektor enthielt (MOI=20). SiD2#L und siD2#C bezeichnen die zwei verschiedenen Sequenzen der verwendeten shRNA, shSCR bezeichnet die verwendete nonsense-shRNA als Negativkontrolle.

Der Nachweis der Effektivität der shRNA-Sequenz erfolgte durch Analysen des ID2-Protein- sowie mRNA-Gehalts nach 48 Stunden. Hierzu wurden zunächst Gesamtzell-Lysate von transduzierten Zellen der HL-Zelllinien L428 und KM-H2

hergestellt und mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot auf die Expression des ID2-Proteins untersucht. Zur Bestimmung des ID2-mRNA-Gehalts wurde aus den transduzierten Zellen RNA extrahiert und mittels qRT-PCR unter Verwendung von TaqMan Genexpressions-Assays analysiert. Die relative Quantifizierung der ID2-mRNA-Expression erfolgte auf das Referenz-Gen Beta-2 Microglobulin (B2M) bezogen.

Es konnte in den HL-Zelllinien L428 und KM-H2 keine Reduktion des ID2-Proteingehalts im Vergleich zu Kontrollzellen (transduziert mit der shSCR) festgestellt werden. Auch der Gehalt der ID2-mRNA änderte sich in den transduzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht (Abbildung 14, L428 exemplarisch).

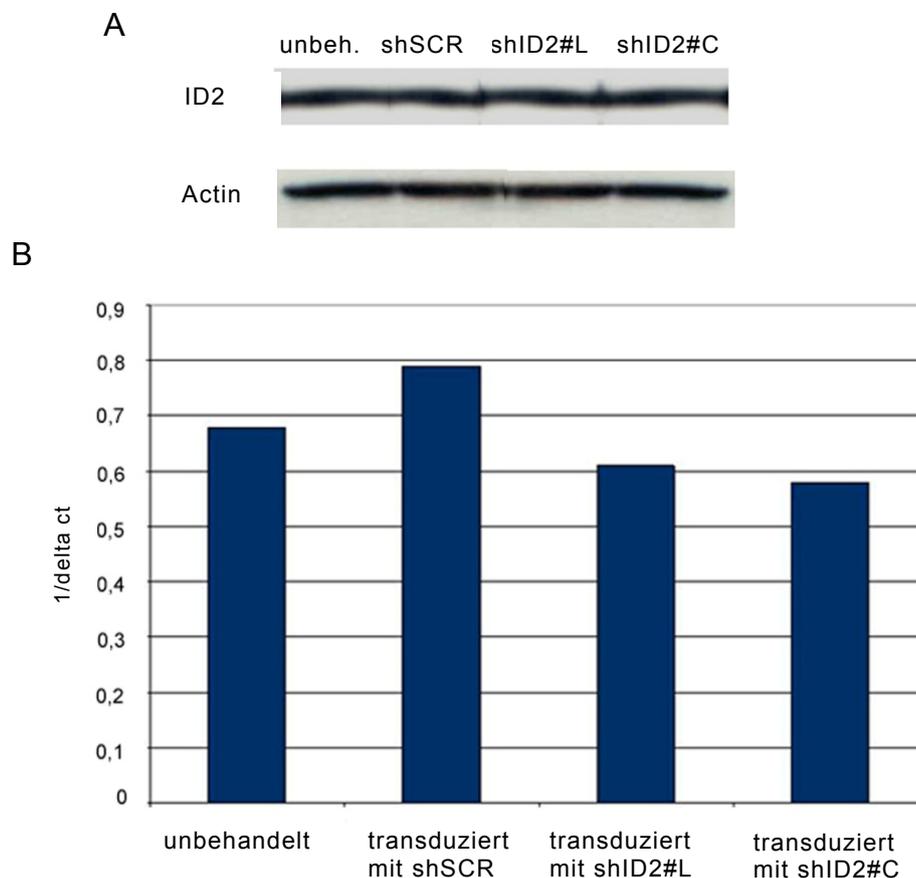


Abbildung 14: Analyse der Expression des ID2 in der HL-Zelllinie L428 nach Transduktion mit ID2-spezifischen shRNA. Analyse der HL-Zelllinie L428. Gezeigt sind ID2-Expressionen un behandelter Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Virus infiziert worden sind, der einen shID2-exprimierenden pVIG Vektor enthielt (MOI=20). **(A)** Analyse der Expression des ID2-Proteins mittels Western Blot. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein ID2 mit einem spezifischen anti-ID2 Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots. **(B)** Analyse der ID2-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR. Es wurden für alle PCR von der Firma ABI entworfene TaqMan Genexpressions-Assays (Assays-on-Demand) verwendet. Dargestellt sind Δ ct-Werte in Bezug auf B2M.

Ebenso wurden auch die transduzierten ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 auf gegebenenfalls reduzierte ID2-Proteinexpression sowie ID2-mRNA-Reduktion untersucht.

Auch hier erwiesen sich als Ergebnis der Analyse des Immunblots und der qRT-PCR nach erfolgreicher Infektion weder shID2#L noch shID2#C als effektiv in den transduzierten Zelllinien. Beide konnten in den Zelllinien weder die Menge an ID2-Protein noch die Menge an ID2-mRNA beeinflussen (Abbildung 15, SU-DHL-1 exemplarisch).

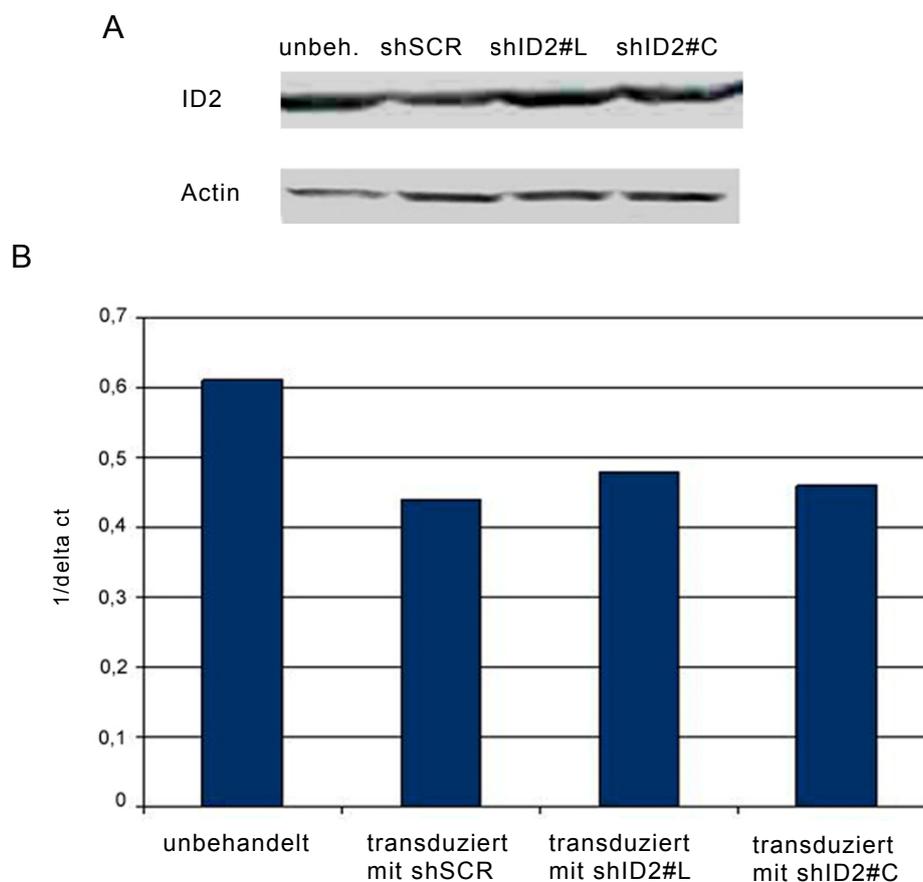


Abbildung 15: Analyse der Expression des ID2 in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 nach Transduktion mit ID2-spezifischen shRNA. Analyse der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1. Gezeigt sind ID2-Expressionen un behandelter Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Virus infiziert worden sind, der einen shID2-exprimierenden pVIG Vektor enthielt (MOI=20). **(A)** Analyse der Expression des ID2-Proteins mittels Western Blot. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein ID2 mit einem spezifischen anti-ID2 Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots. **(B)** Analyse der ID2-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR des ID2. Es wurden für alle PCR von der Firma ABI entworfenen TaqMan Genexpressions-Assays (Assays-on-Demand) verwendet. Dargestellt sind Δ ct-Werte in Bezug auf B2M.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch keine der beiden gegen ID2 gerichteten shRNA-Sequenzen (shID2#L und shID2#C) weder die Expression des

2005). Der Vektor pGIPZ enthält eine tGFP-Expressionskassette als Selektionsmarker, der unter der Kontrolle eines CMV-Polymerase II-Promotors transkribiert wird. Die shRNA-Sequenz kann durch Einbettung in die miRNA30 ebenfalls durch den CMV-Promotor transkribiert werden.

Zur Herstellung viraler Partikel wurden die 239T-Zellen zunächst mit einem pGIPZ Vektor transfiziert, der eine shRNA gegen GAPDH exprimiert. Diese Sequenz wurde als Positivkontrolle als Empfehlung der den pGIPZ Vektor vertreibenden Firma verwendet. Eine Herunterregulation des GAPDH mit dieser Sequenz konnte demzufolge in anderen Zelllinien bereits gezeigt werden. Die Produktion der Lentiviren sollte wie bei der Anwendung des pVIG-Transduktionssystems unter Verwendung der Verpackungsplasmide delta sp2 bzw. pHIT-G erfolgen (siehe dazu auch 2.2.1.3). Hierbei wies der Virentiter allerdings einen Wert von Null auf. Die Ursache der fehlenden Virenproduktion lag möglicherweise in der fehlenden Expressionskassette für das TAT-Protein auf dem delta sp2-Plasmid, welches für die virale Replikation unter dem CMV-Promotor in pGIPZ essentiell ist. Das TAT-Protein erhöht durch eine verstärkte Initiation und Prolongation der Transkription die Konzentration viraler RNA (Frankel, 1992).

So wurden im Folgenden die Verpackungsplasmide pMD2.G, das für env für kodiert, und psPAX.2, das für gag/pol sowie TAT kodiert und auch als Verpackungsplasmid der zweiten Generation von der den pGIPZ Vektor vertreibenden Firma zur Verwendung mit pGIPZ empfohlen wird, eingesetzt.

Die 293T-Zellen konnten zur Bestimmung des Virentiters erfolgreich transduziert werden, d.h. die Virenproduktion war erfolgreich. Dennoch waren die Transduktionseffizienzen für alle mit dem Vektor pGIPZ transduzierten HL- und ALCL-Zelllinien niedrig, im Falle der hier repräsentativ abgebildeten HL-Linie L428 < 8% (MOI 20) (Abbildung 17).

Möglicherweise war die Wirtsspezifität des für die Virenhülle kodierenden Gens *env* für die zu transduzierenden HL- und ALCL-Zelllinien nicht ausreichend gegeben, sodass diese mit dem Virus unzureichend infiziert werden konnten.

Demzufolge sollte durch Kombination der beiden Verpackungsplasmide psPAX.2 mit pHIT-G, unter dessen Verwendung bereits eine Anzahl transduzierter Zellen der HL- und ALCL-Zelllinien von 60%-80% erhalten werden konnte, die Transduktionseffizienz in den Wirtszellen erhöht werden. Dies konnte sowohl in den HL- als auch ALCL-Linien nur auf bis zu durchschnittlich 30% (21%-35%) erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

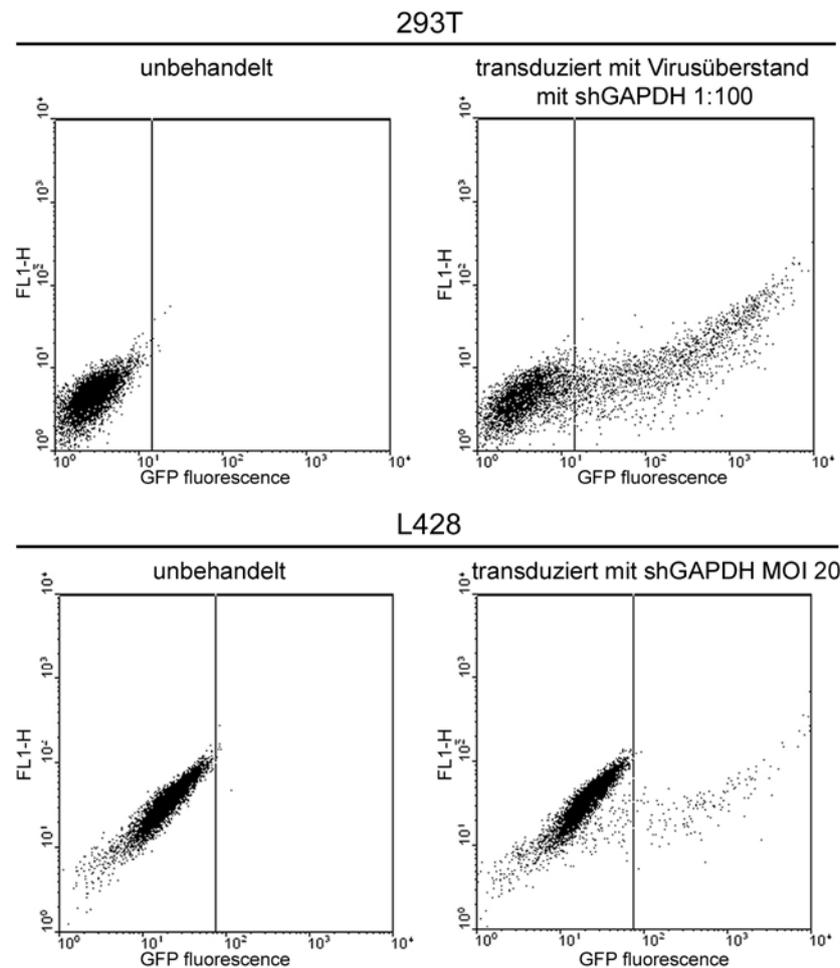


Abbildung 17: Transduktionseffizienzen mit dem pGIPZ-System. FACS-Analyse der embryonalen Nierenzelllinie 293T (obere Reihe) und der HL-Zelllinie L428 (unterer Reihe). Gezeigt sind repräsentative Transduktionseffizienzen unbehandelter Zellen und Zellen, die mit einem Virus infiziert worden sind, der einen shGAPDH-exprimierenden pGIPZ Vektor enthält (293T-Zellen obere Reihe: im Rahmen der Titerbestimmung Virus 1:100 verdünnt, HL-Linie L428 untere Reihe: MOI=20).

Um dennoch den Effekt einer eventuellen Herunterregulation nachweisen und untersuchen zu können, wurden die transduzierten Zellen im FACSaria Cell-sorting System bezüglich GFP-positiver und somit infizierter Zellen sortiert. So wurde eine reine Zellpopulation aus annähernd 100% Zellen erhalten, die einen shRNA-exprimierenden Vektor enthielten.

Für die ALCL-Zelllinie SU-DHL-1, die mit dem pGIPZ Vektor, der eine shRNA gegen die Positivkontrolle GAPDH ausprägt, transduziert und anschließend durch das FACSaria sortiert wurde, konnte 48 Stunden nach der Transduktion eine verminderte Expression des GAPDH-Proteins erzielt werden (Abbildung 18).

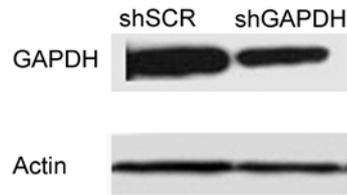


Abbildung 18: Herunterregulation von GAPDH in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 durch pGIPZ-GAPDH. Western Blot-Analyse eines Zell-Lysats der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1, die mit einem Virus transduziert wurde, der einen shGAPDH-exprimierenden pGIPZ-Vektor enthielt (MOI=20) und anschließend mittels des FACSria Cell-sorting Systems sortiert wurde. Das Zell-Lysat enthielt Gesamtprotein aus 1×10^5 sortierten Zellen, wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein GAPDH mit einem spezifischen anti-GAPDH Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots. Als Kontrolle für die Spezifität der Herunterregulation diente ein Zell-Lysat der SU-DHL-1-Zelllinie, die ein *scrambled* shRNA (shSCR)-exprimierendes Konstrukt enthielt und ebenfalls sortiert wurde.

Auch von den Zellen der transduzierten HL-Linien wurden Lysate für die Western Blot-Analyse zum Nachweis einer möglichen GAPDH-Proteinreduktion hergestellt. Wie üblich erfolgte für die Lysis zunächst die Bestimmung der Lebend-Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Zellen nach dem Sortier-Prozess apoptotisch waren. Darüber hinaus konnte im durchgeführten Western Blot keine Expression des Actin-Proteins detektiert werden, obwohl die zur Herstellung der Zell-Lysate verwendete Zellzahl ausreichend hätte sein müssen.

Das Fazit war demnach, dass eine Sortierung der Zellen für den Erhalt einer effizient transduzierten Zellpopulation in Bezug auf die ALCL-Zelllinien durchaus eine Möglichkeit darstellt, den tatsächlichen spezifischen Effekt einer Gen-Herunterregulation auf Proteinebene zu zeigen. Für die HL-Zelllinien erwies sich das Sortieren als Methode, die zu starker Beschädigung der Zellen führte. Vermutlich waren Scher- und Reibungskräfte, die durch einen zu geringen Durchmesser der Düse des FACS-Gerätes bedingt sein könnten, die Ursache für die Schädigung der Zellen. Unter den gegebenen technischen Bedingungen war demzufolge das Sortieren der HL-Zelllinien für weiterführende Analysen nicht geeignet.

3.4 Etablierung eines transienten Transfektionssystems für HL- und ALCL-Zelllinien

Durch die vorangegangenen Schwierigkeiten mit der lentiviralen Infektion und aufgrund einer Publikation von Flavell und Kollegen, in der die Herunterregulation des Protein Tyrosinphosphatase-Rezeptors K in der HL-Zelllinie KM-H2 nun doch durch transiente Transfektion unter Verwendung des RiboJuice siRNA Transfektionsreagenzes gezeigt wurde (Flavell et al., 2008), sollte auch für die HL-

und ALCL-Linien ein transientes Transfektionssystem zur Herunterregulation des ID2 etabliert werden. Im Gegensatz zur stabilen lentiviralen Transfektion ist eine Beobachtung transient transfizierter Zellen über einen längeren Zeitraum jedoch nicht möglich, da eine siRNA als RNA-Molekül nicht wie ein DNA-Vektor, der eine shRNA exprimiert, ins Genom der Zellen aufgenommen werden kann. Bei einer transienten Transfektion unterbleibt eine Weitergabe der siRNA an Tochterzellen bei der Zellteilung. So geht die siRNA, und somit dessen Effekt, durch Abbau und Zellteilung schneller verloren.

Das Prinzip der transienten Transfektion mit dem RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz beruht auf nicht-liposomalem siRNA-Transfer in die Zielzellen. Es besteht aus einem Polyamin/Lipid-Gemisch.

Der erste Abschnitt der Etablierung der transienten Transfektion mittels RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz bestand in der Kontrolle der Transfektionseffizienz unter Verwendung einer *scrambled* siRNA (siSCR), die mit dem Alexa Fluor®488-Farbstoff markiert war, sodass die Transfektionseffizienz im FACScan gemessen werden konnte. Verwendet wurden finale siRNA-Oligonukleotid-Konzentrationen von 100 nM. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die als Kontrollproben für die Messungen im FACS dienten, wurden 24 Stunden nach der Transfektion folgende prozentuale Transfektionseffizienzen erhalten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Prozentualer Anteil transfizierter Zellen nach Transfektion mit siSCR AlexaFluor® 488 100 nM

Zelllinie	Transfektionseffizienz (%)
L1236	99
L428	87
KM-H2	91
SU-DHL-1	99
Karpas299	100

Die erhaltenen, aufgelisteten Werte stellen repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Transfektionsversuchen dar. Transfizierte Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend im FACScan gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollzellen.

Angesichts dieser vielversprechenden Transfektionseffizienzen sollte als nächstes die tatsächliche Aufnahme der siRNA in die Zelle analysiert werden, um die Möglichkeit der nur äußeren Anhaftung der siRNA an die Zellen auszuschließen. Zu diesem Zweck wurde sich konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie bedient. Sie ermöglicht aufgrund der Technik, Bilder in vielen Schärfenebenen definierter Schichtdicke nacheinander aufzunehmen, die Darstellung von dreidimensionalen Bildern. Somit lässt sich erkennen und darstellen, ob die siRNA in die Zelle aufgenommen wurde oder ob sie lediglich außen an der Zelle haftet (siehe dazu auch 2.2.1.8). Anhand der exemplarisch gewählten HL-Zelllinie KM-H2 ließ sich

durch Darstellung der Zellkerne mittels Sytox[®]Red-Färbung erkennen, dass die siRNA in die deutlich überwiegende Zahl der Zellen aufgenommen wurde (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Aufnahme der siRNA in die Zellen sichergestellt war, wurde als initialer Versuch zur Herunterregulation von Genen mittels transienter Transfektion aus einer siRNA-Bibliothek eine synthetische siRNA ausgewählt, die gegen MAPK1 gerichtet ist. MAPK1 ist ein Gen, das für das Zellüberleben nicht essentiell ist. Diese siRNA ist als Positivkontrolle von der herstellenden Firma empfohlen worden. Die Herunterregulation des MAPK1 mit dieser Sequenz konnte demnach in anderen Zelllinien bereits erfolgreich gezeigt werden. In L1236-Zellen konnte schon mit einer Konzentration von siMAPK1 50 nM eine Herunterregulation von MAPK1 auf Proteinebene durch Immunblot-Analyse nachgewiesen werden, deutlicher mit einer Konzentration von 300 nM (Abbildung 19). In den anderen beiden HL-Zelllinien L428 und KM-H2 konnte diese Herunterregulation nur mit einer Konzentration von 300 nM siMAPK1 erreicht werden. Die ALCL-Zelllinien SU-DHL-1 und Karpas299 wurden bei diesen Etablierungsansätzen nicht berücksichtigt.

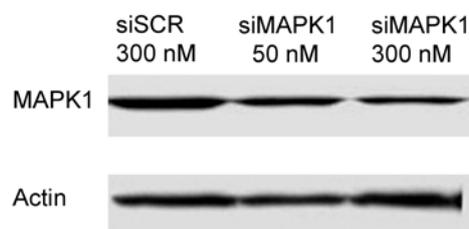


Abbildung 19: Herunterregulation von MAPK1 in der HL-Zelllinie L1236 mittels spezifischer siRNA gegen MAPK1. Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transienter Transfektion mit siMAPK1 50 nM bzw. 300 nM bzw. einer *scrambled* siRNA (siSCR) 300 nM unter der Verwendung des RiboJuice Transfektionsreagenzes. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein MAPK1 mit einem spezifischen anti-MAPK1 (Tag-100) Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots.

Nach diesen ersten positiven Ergebnissen in Bezug auf die Gen-Herunterregulation wurden insgesamt sieben Oligonukleotide bezogen, die von den Firmen Qiagen sowie Ambion entworfen und synthetisiert wurden und gegen verschiedene Sequenzen des ID2-Gens gerichtet sind.

Um die optimalsten Transfektionsbedingungen zur Herunterregulation des ID2 systematisch zu etablieren, wurden zu Beginn verschiedene Konzentrationen aller zur Verfügung stehenden siRNA-Oligonukleotide angewandt, und zwar Endkonzentrationen von 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM sowie 300 nM. Transfiziert wurden die HL-Zelllinien L1236, L428, KM-H2 sowie die ALCL-Zelllinien SU-DHL-1

und Karpas299. Des Weiteren wurden für die HL-Zelllinien verschiedene Inkubationszeiten berücksichtigt. Die Expression des ID2 auf Proteinebene wurde demnach nach 24 Stunden, 36 Stunden, 48 Stunden sowie 72 Stunden mittels Immunblot-Analyse überprüft.

Aus diesen Etablierungsexperimenten ergab sich zusammenfassend, dass die effektivste und reproduzierbarste Herunterregulation des ID2-Proteins mit den siRNA-Oligonukleotiden der Firma Ambion (siID2#07, siID2#08 und siID2#09) erzielt wurde. Die Konzentrationen, die für die deutliche Herunterregulation notwendig waren, differenzierten je nach Zelllinie: für die HL-Linie L1236 sowie für die ALCL-Linie Karpas299 erwiesen sich Endkonzentrationen von 100 nM als ausreichend, das ID2 der HL-Zelllinie KM-H2 konnte mit 200 nM siRNA-Konzentration erfolgreich herunterreguliert werden, während für die HL-Zelllinie L428 und die ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 eine Konzentration von 300 nM benötigt wurde, um eine effektive Herunterregulation des ID2 zu erhalten (Abbildung 20).

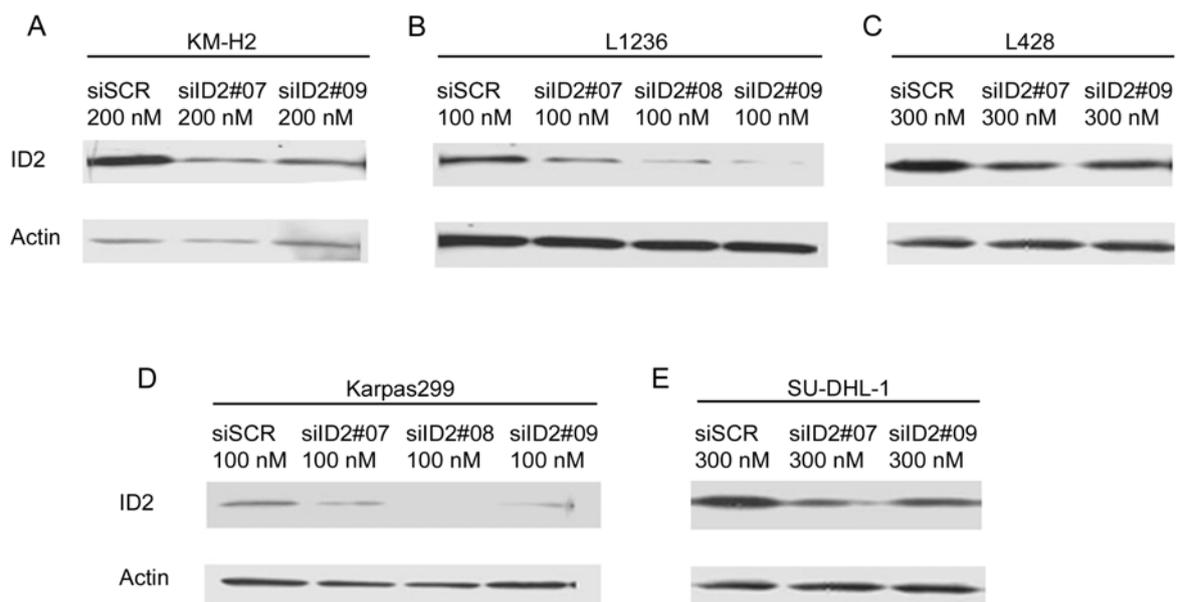


Abbildung 20: Herunterregulation von ID2 in den HL- und ALCL-Zelllinien mittels siRNA spezifisch gegen ID2. Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transienter Transfektion mit siID2 bzw. einer siSCR 200 nM in der HL-Linie KM-H2 (A), 100 nM in der HL-Linie L1236 (B), 300 nM in der HL-Linie L428 (C), 100 nM in der ALCL-Linie Karpas299 (D) und 300 nM in der ALCL-Linie SU-DHL-1 (E) unter der Verwendung des RiboJuice Transfektionsreagenzes. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein ID2 mit einem spezifischen anti-ID2-Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots.

Eine Reduzierung des ID2-Proteingehalts ließ sich bei der HL-Zelllinie KM-H2 bereits nach 24 Stunden feststellen, bei den beiden anderen HL-Zelllinien L428 und L1236 dagegen erst nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden konnten bei den HL-

Zelllinien L428 und KM-H2 bereits wieder ursprüngliche Proteinmengen festgestellt werden, die L1236-Zelllinien zeigten indes noch immer verminderten ID2-Proteingehalt (Daten nicht gezeigt). Insgesamt bleibt in Bezug auf die Inkubationszeit festzustellen, dass der Effekt der reduzierten ID2-Proteinexpression nach 48 Stunden post Transfektion am signifikantesten ausgeprägt ist (Abbildung 20).

3.5 Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf die Proteinexpression verschiedener B- und nicht-B-Zell-Gene in HL-Linien bzw. T-Zell-Gene in ALCL-Linien

Sehr wahrscheinlich spielt ID2 eine wichtige Rolle in der Unterdrückung des B-Zell-Phänotyps, denn die gezeigte Interaktion mit E2A und demzufolge dessen Inaktivierung kann zur Herunterregulation der Transkription von B-Zell-Markern, wie z.B. CD19 und CD79A führen. Die aberrante Expression des ID2 beeinflusst also möglicherweise sowohl die Expression verschiedener B-Zell-Gene wie CD19, CD79A als auch die Expression der Transkriptionsfaktoren EBF und E2A. Darüber hinaus können E2A-defiziente lymphoide Vorläuferzellen in mannigfaltige Linien differenzieren (Ikawa et al., 2004). Unter Umständen verursacht die Expression des ID2 in HL-Zelllinien via E2A-Inaktivierung die Ausprägung spezifischer Marker anderer Linien, beispielsweise des T-Zell-Transkriptionsfaktors GATA-3 oder des in Makrophagen exprimierten Markers M-CSF-R, in ähnlicher Weise. Eine direkte Interaktion zwischen ID2 und PAX5 konnte in den HL-Zelllinien nicht detektiert werden. Durch die Inaktivierung des E2A, das zusammen mit EBF PAX5 reguliert wird, kann die schwache Expression des PAX5 dennoch indirekt durch ID2 bedingt sein.

Die HL-Zelllinien KM-H2 und L1236, in denen ID2 siRNA-vermittelt herunterreguliert wurde, wurden daraufhin auf die Proteinexpression von CD19, CD79A, EBF, E2A, PAX5 sowie GATA-3 und M-CSF-R durch eine Immunblot-Analyse 48 Stunden nach der Transfektion untersucht.

Die Proteinexpression aller untersuchten Gene blieb unverändert, trotz deutlicher Herunterregulation des ID2 um annähernd 50% (optisch abgeschätzt) im Vergleich zu den Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) (Abbildung 21).

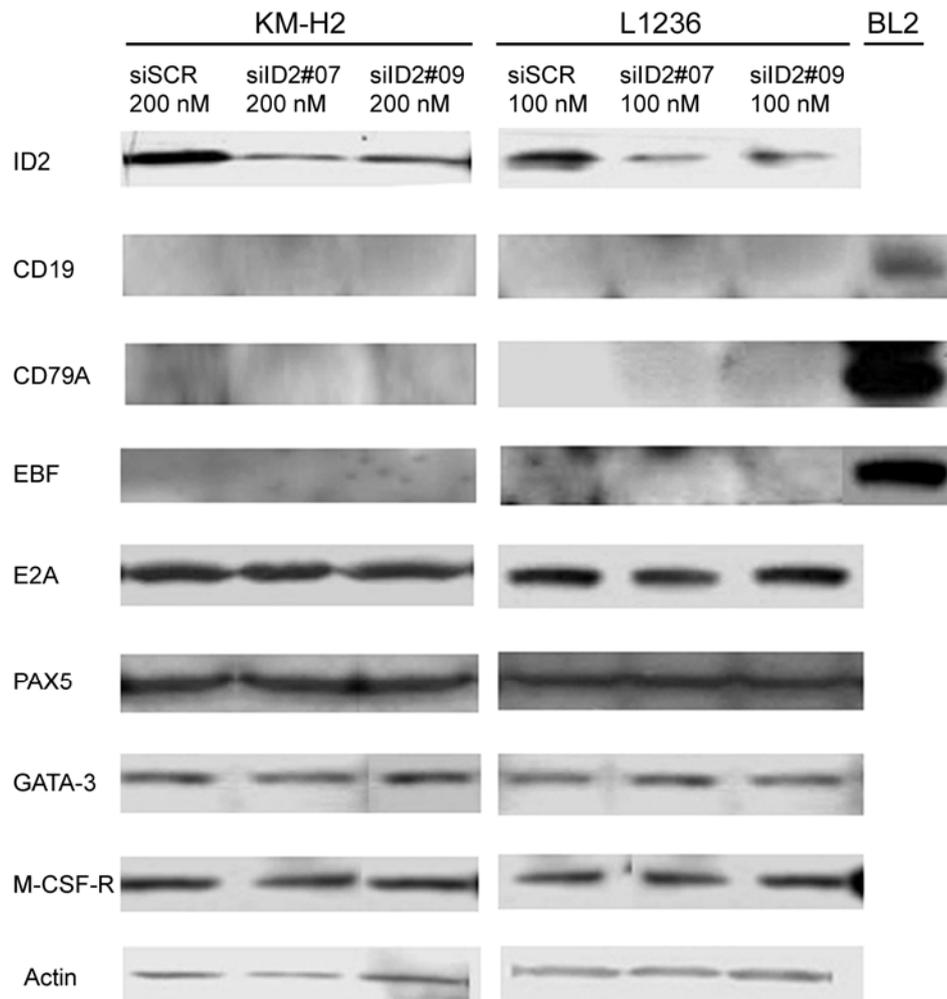


Abbildung 21: Kein Einfluss der Herunterregulation von ID2 auf die Proteinexpression der B-Zell-Gene CD19, CD79A, EBF, E2A und PAX5 sowie nicht-B-Zell-Gene GATA-3 und M-CSF-R in den HL-Zelllinien L1236 und KM-H2. Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transients Transfektion mit siID2#07 und siID2#09 bzw. einer *scrambled* siRNA (siSCR) unter der Verwendung des RiboJuice Transfektionsreagenzes. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die gezeigten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots, die Burkitt Lymphom-Zelllinie BL2 als Positivkontrolle für den Nachweis von CD19, CD79A und EBF.

Der in den HL-Linien mittels siRNA herunterregulierte ID2-Proteingehalt hatte demnach 48 Stunden nach transients Transfektion keinerlei Einfluss auf die Expression der analysierten Proteine. Möglicherweise liegen weitere inaktivierende Mechanismen, wie z.B. Methylierungen der B-Zell-spezifischen Gene zugrunde.

Da die aberrante ID2-Expression möglicherweise auch in der Dedifferenzierung der ALCL eine Rolle spielt, wurde der Einfluss der Herunterregulation des ID2 auf die Proteinexpression der T-Zell-Marker CD3 und ZAP70 ebenfalls durch Immunblot-Analyse der ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 48 Stunden nach der

Transfektion untersucht. Im Falle einer möglichen Regulation der Gene durch ID2 wären eine Re-Expression des CD3 bzw. eine verstärkte Expression des ZAP70 in den Zellen gegenüber den Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) zu erwarten.

Der reduzierte Proteinanteil des ID2 in den ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 wirkte sich in keiner Weise auf die Proteinexpression der T-Zell-Gene CD3 und ZAP70 (Abbildung 22) aus.

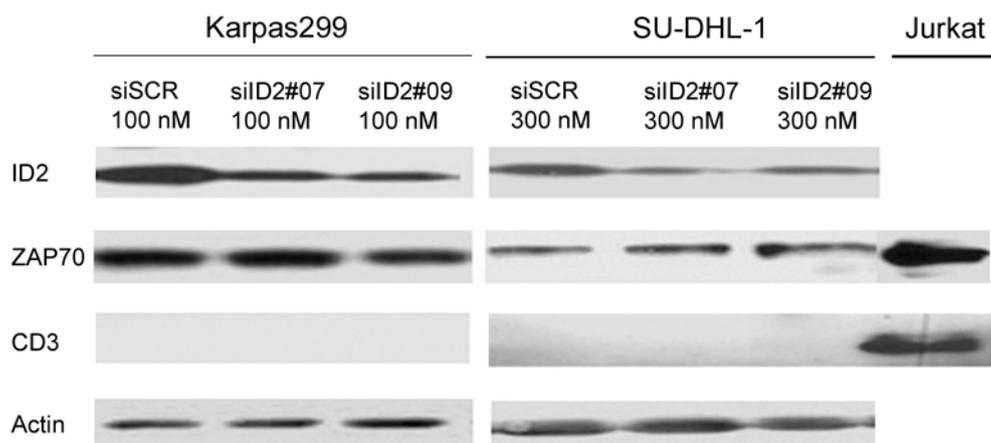


Abbildung 22: Kein Einfluss der Herunterregulation von ID2 auf die Proteinexpression der T-Zell-Gene CD3 und ZAP70 in den ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1. Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transienter Transfektion mit siID2#07 und siID2#09 bzw. einer *scrambled* siRNA (siSCR) unter der Verwendung des RiboJuice Transfektionsreagenzes. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine ID2, CD3 und ZAP70 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots, die T-Zell Leukämie-Zelllinie Jurkat als Positivkontrolle für den Nachweis von CD3 und ZAP70.

3.6 Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf die globale Genexpression in ALCL-Zelllinien

Der durch RNAi verringerte Proteingehalt von ID2 zeigte in den ALCL-Zelllinien keinen Einfluss auf die Ausprägung der beiden T-Zell-Marker CD3 und ZAP70. Da der mögliche Einfluss von ID2 bzw. dessen Herunterregulation auf die Expression weiterer Gene weitestgehend unbekannt ist, sollte der Einfluss dieser Herunterregulation auf die genomweite Genexpression in den ALCL-Zelllinien untersucht werden.

Zur Erstellung von Genexpressionsprofilen wurden Affymetrix U133 Plus2.0 Microarrays verwendet, die ca. 47.000 humane Transkripte repräsentieren. Profile wurden von Zellen der ALCL-Linien Karpas299 und SU-DHL-1 generiert, in denen ID2 auf Proteinebene durch Transfektion mit gegen ID2 gerichteten siRNA-Oligonukleotiden herunterreguliert war. Als Vergleichszellen dienten jeweils Zellen der beiden Linien, die mit einer *scrambled* siRNA (siSCR) transfiziert worden waren.

Die Transfektionen wurden transient mittels RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz unter den etablierten Bedingungen (Konzentrationen der Oligonukleotide sowie Inkubationszeit) durchgeführt. Es wurden für beide Zelllinien Duplikate angefertigt, d.h. jede Zelllinie wurde zweimal in voneinander unabhängigen Experimenten mit jedem der beiden siID2-Oligonukleotide (siID2#07 und siID2#09) sowie der siSCR transfiziert. Die Herunterregulation des ID2 auf Proteinebene wurde mit Hilfe einer Immunblot-Analyse kontrolliert (siehe Abbildung 22). Mittelwerte der erhaltenen *Fold changes* wurden für jedes Gen gebildet. Die Qualität der technischen Ausführung wurde überprüft, die statistischen Auswertungen mit der „R“-Software durchgeführt (siehe dazu auch 2.2.3.14). Die *Present calls* der Versuche lagen durchschnittlich bei 35% (33%-38%). Ein Versuch der Zellen der Linie Karpas299, die mit dem siRNA-Oligonukleotid siID2#07 transfiziert wurden, stellte die einzige Ausnahme dar. Die *Present calls* dieses Versuchs lagen nur bei 26,5%.

Die erhaltenen Genexpressionsprofile wurden dann verglichen, sodass sich folgende vier Vergleiche ergaben: SU-DHL-1 Zellen transfiziert mit siID2#07 verglichen mit Kontrollzellen, SU-DHL-1 Zellen transfiziert mit siID2#09 verglichen mit Kontrollzellen, Karpas299 Zellen transfiziert mit siID2#07 verglichen mit Kontrollzellen und Karpas299 Zellen transfiziert mit siID2#09 verglichen mit Kontrollzellen. Differentiell ausgeprägte Gene wurden unter den Kriterien des FC und p-Wertes ermittelt (siehe dazu auch 2.2.3.14).

Unter den Standardbedingungen $-5 \leq FC \leq 5$, $p\text{-Wert} \leq 0,05$ wurden vier annotierte Gene gefunden, die in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#09 herunterreguliert sind (Tabelle 4). In den anderen drei Vergleichen fanden sich unter diesen Bedingungen keinerlei differentiell exprimierte Gene.

Tabelle 4: Differentiell ausgeprägte Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 mit reduzierter ID2-Proteinexpression

Fold change (FC)	p-value	Affymetrix Probe set ID	Gensymbol	Genfunktion
-20,9	0,00036071	213350_at	RPS11	Ribosomales Protein S11
-9,2	0,01819531	228204_at	PSMB4	Proteasom Untereinheit 4
-8,4	0,00680267	200908_s_at	RPLP2	Ribosomales Protein P2
-7,8	0,00907184	222968_at	---	
-7,2	0,00480451	213642_at	---	
-5,7	0,03390766	213826_s_at	LOC100133109	
-5,5	0,00034717	212044_s_at	RPL27A	Ribosomales Protein 27A
-5,1	0,00101504	202648_at	---	

Die acht herunterregulierten Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#09 im Vergleich zu Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) wurden anhand der Kriterien $-5 \leq FC \leq 5$ sowie dem t-Test $p\text{-Wert} \leq 0,05$ identifiziert. Bekannte Genfunktionen sind angegeben.

Aufgrund der nur geringen Anzahl differentiell regulierter Gene unter den gewählten Bedingungen wurden diese im Folgenden verändert.

Unter den Kriterien $-2 \leq FC \leq 2$, $p\text{-Wert} \leq 0,05$ konnten in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siLD2#07 fünf annotierte Gene als herunterreguliert (in der Tabelle 5 mit Kreuz markiert) sowie 26 annotierte Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siLD2#09 als herunterreguliert identifiziert werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Differentiell ausgeprägte Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 mit reduzierter ID2-Proteinexpression

Fold change (FC)	p-value	Affymetrix Probe set ID	Gensymbol	Genfunktion
-20,9	0,00036071	213350_at	RPS11	Ribosomales Protein S11
-9,2	0,01819531	228204_at	PSMB4	Proteasom Untereinheit 4
-8,4	0,00680267	200908_s_at	RPLP2	Ribosomales Protein P2
-7,8	0,00907184	222968_at	---	
-7,2	0,00480451	213642_at	---	
-5,7	0,03390766	213826_s_at	LOC100133109	
-5,5	0,00034717	212044_s_at	RPL27A	Ribosomales Protein 27A
-5,1	0,00101504	202648_at	---	
*-4,9	0,03567612	226928_x_at	SLC25A37	Mitochondrientransporter
*-4,5	0,01615446	209765_at	ADAM19	Metallopeptidase
-4,0	0,01584688	214001_x_at	---	
-3,7	0,00691754	1556316_s_at	LOC284889	
-3,5	0,00055561	213875_x_at	C6orf62	
-3,5	0,00757537	216246_at	---	
-3,5	0,02058049	221943_x_at	RPL38	Ribosomales Protein 38
*-3,2	0,03770981	216609_at	TXN	
-3,1	0,00084355	212952_at	---	
-3,1	0,000556	214315_x_at	CALR	Calciumbindung
-3,1	0,00201621	219599_at	EIF4B	
-2,9	0,01126973	214041_x_at	RPL37A	Ribosomales Protein 37A
-2,9	0,04726038	227064_at	ANKRD40	Phosphatase
*-2,8	0,02833899	201883_s_at	B4GALT1	Galactosyltransferase
-2,8	0,04552785	226014_at	LOC100133577	
-2,8	0,00105298	224321_at	TMEFF2	
-2,7	0,04542927	205463_s_at	PDGFA	Wachstumsfaktor
-2,6	0,04046199	216554_s_at	---	
-2,5	0,02813697	224023_s_at	C3orf10	
-2,5	0,00083008	210231_x_at	SET	Onkogen
-2,4	0,04861567	229420_at	---	
-2,4	0,01215363	224936_at	EIF2S3	
-2,4	0,02291194	1555826_at	EPR1	
*-2,4	0,04707598	226675_s_at	MALAT1	
-2,3	0,0215794	228588_s_at	UBE2B	Ubiquitinierung
-2,2	0,01490227	225160_x_at	MGC5370	
-2,1	0,02121924	213753_x_at	EIF5A	
-2,1	0,0413531	213708_s_at	MLX	bHLH-Transkriptionsfaktor

-2,1	0,00360035	218513_at	FLJ11184	
-2,1	0,02713731	224914_s_at	CIP29	
-2,0	0,011901402	217839_at	TFG	Methyltransferase
-2,0	0,045168874	1557218_s_a	FANCB	DNA Reparatur
-2,0	0,02420238	222487_s_at	RPS27L	Ribosomales Protein 27L
-2,0	0,02918814	225958_at	PHC1	
-2,0	0,04220822	208952_s_at	LARP5	
-2,0	0,04011079	201304_at	NDUFA5	NADH-Dehydrogenase

Die insgesamt acht herunterregulierten Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#07 im Vergleich zu Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) sowie die insgesamt 36 herunterregulierten Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#09 im Vergleich zu Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) wurden anhand der Kriterien $-2 \leq FC \leq 2$ sowie dem t-Test p-Wert $\leq 0,05$ identifiziert. Bekannte Genfunktionen sind angegeben.

Da in der ALCL-Zelllinie Karpas299 auch bei diesen Filterkonditionen keinerlei Gene als differentiell reguliert gefunden worden sind, wurden die Filterkriterien erneut verändert, nun in Bezug auf den p-Wert. Da der Versuch mit Zellen der Linie Karpas299 transfiziert mit siID2#07 jedoch niedrigere *Present calls* (26,5%) aufwies als das entsprechende Duplikat (35,5%), ist der p-Wert für diesen Fall wenig aussagekräftig und kann vernachlässigt werden. Bei $-2 \leq FC \leq 2$, p-Wert $\leq 0,1$ wurden in der ALCL-Linie Karpas299 im Vergleich zu den Vergleichszellen jedoch noch immer keine differentiell exprimierten Gene gefunden. Acht annotierte Gene waren in der ALCL-Linie SU-DHL-1, die mit siID2#07 transfiziert wurde, herunterreguliert (in Tabelle 6 mit einem Kreuz markiert, wobei der Übersichtlichkeit halber nur drei Gene aufgelistet wurden, die zusätzlich zu den bereits in Tabelle 5 gelisteten Genen herunterreguliert sind). In der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1, die mit siID#09 transfiziert wurde, waren 36 annotierte Gene differentiell reguliert, ebenfalls ausschließlich herunterreguliert (Tabelle 6, wobei nur die zehn Gene gelistet wurden, die zusätzlich zu den schon in Tabelle 5 gelisteten Genen herunterreguliert sind).

Tabelle 6: Differentiell ausgeprägte Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 mit reduzierter ID2-Proteinexpression

Fold change (FC)	p-value	Affymetrix Probe set ID	Gensymbol	Genfunktion
*-3,0	0,05287337	224680_at	TMED4	
-3,0	0,05614956	213550_s_at	TMCO6	
-2,9	0,0650362	224346_at	---	
*-2,9	0,05639712	219138_at	RPL14	Ribosomales Protein 14
-2,7	0,05387872	213789_at	---	
-2,6	0,05457713	213705_at	---	
-2,6	0,07018185	213951_s_at	PSMC3IP	
-2,6	0,08736742	213813_x_at	---	
-2,4	0,09054791	202984_s_at	BAG5	Antiapoptotisches Protein
-2,4	0,07578227	214395_x_at	---	

-2,4	0,0675048	231561_s_at	APOC2	Apolioprotein C2
-2,4	0,09417125	221915_s_at	RANBP1	
-2,2	0,08861946	217734_s_at	WDR6	
*-2,1	0,05605091	226400_at	CDC42	Zellzyklusprogression
-2,1	0,08057119	231819_at	---	
-2,1	0,07255004	225002_s_at	SUMF2	
-2,1	0,06522932	213736_at	COX5B	Cyclooxygenase 5B
-2,1	0,06210534	218565_at	C9orf114	
-2,0	0,08948996	201163_s_at	IGFBP7	
-2,0	0,06210602	229076_s_at	---	
-2,0	0,07543823	225695_at	C2orf18	
-2,0	0,096928123	206108_s_at	SFRS6	

Die insgesamt elf herunterregulierten Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siD2#07 im Vergleich zu Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) sowie die insgesamt 55 herunterregulierten Gene in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siD2#09 im Vergleich zu Kontrollzellen (transfiziert mit siSCR) wurden anhand der Kriterien $-2 \leq FC \leq 2$ sowie dem t-Test p-Wert $\leq 0,1$ identifiziert. Aufgelistet wurden hier nur Gene, die zusätzlich zu den in Tabelle 5 gelisteten Genen herunterreguliert sind. Bekannte Genfunktionen sind angegeben.

Da in der ALCL-Zelllinie Karpas299 noch immer keine nachweisbar differentiell regulierten Gene gefunden werden konnten, wurde der Filter auf $-1,5 \leq FC \leq 1,5$ verändert. Der p-Wert $\leq 0,1$ wurde beibehalten (Daten nicht gezeigt). In der ALCL-Zelllinie Karpas299, die mit siD2#07 transfiziert wurde, fanden sich trotz der geringen Stringenz bei der Auswahl der Filterkriterien nur fünf annotierte Gene differentiell reguliert, darunter nur ein Gen hochreguliert. Elf differentiell regulierte annotierte Gene fanden sich in der ALCL-Linie Karpas299, die mit der siD2#09 transfiziert worden war, darunter nur eines, das herunterreguliert wurde. 371 annotierte Gene wurden in der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siD2#09 insgesamt reguliert, davon 289 Gene hochreguliert und 82 Gene herunterreguliert. In der ALCL-Linie SU-DHL-1 transfiziert mit siD2#07 waren insgesamt sechs annotierte Gene hochreguliert, 202 annotierte Gene herunterreguliert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unerwartet wenige Gene in den Zellen mit herunterregulierter ID2-Proteinexpression in Bezug auf die Vergleichszellen (transfiziert mit siSCR) differentielle Expression zeigten, obwohl wenig stringente Bedingungen bezüglich FC sowie p-Wert für die Analyse gewählt wurden. Des Weiteren waren diese Gene insgesamt nur mit relativ niedrigen *Fold changes* differentiell reguliert.

Um dennoch die differentiell exprimierten Gene in den Vergleichen insgesamt nachzuweisen, wurden zunächst solche ausgewählt, die unter den Filterkonditionen $-1,5 \leq FC \leq 1,5$ (p-Wert $\leq 0,1$ für die ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 transfiziert mit siD2#07 bzw. transfiziert mit siD2#09) in mindestens zwei der vier Vergleiche differentielle Regulation aufwiesen, wobei die Gene entweder zwischen den beiden

Zelllinien variierten oder zwischen den beiden verwendeten Oligonukleotiden (siID2#07 und siID2#09). Es fanden sich 21 solcher Gene (Tabelle 7). Aufgrund der geringen Anzahl an Genen, die in der ALCL-Zelllinie Karpas299, sowohl transfiziert mit siID2#07 als auch mit siID2#09, selbst unter den gering stringenten Kriterien $-1,5 \leq FC \leq 1,5$, p-Wert $\leq 0,1$ differentiell ausgeprägt waren, wurde für die Auswahl der Gene der p-Wert betreffend die ALCL-Zelllinie Karpas299 nicht berücksichtigt. Allerdings konnte durch diese globale Genexpressionsanalyse die zuvor gezeigte Herunterregulation des ID2-Proteins in den ALCL-Zelllinien nun auch auf RNA-Ebene zumindest in drei Vergleichen detektiert werden (Tabelle 7). Dies zeigt, dass die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse trotz der unerwartet geringen Gesamtzahl an differentiell exprimierten Genen als valide angesehen werden können.

Tabelle 7: Gene, die in mindestens zwei Vergleichen differentiell exprimiert sind

Gensymbol/	SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#07 FC (p-value)	SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#09 FC (p-value)	Karpas299 transfiziert mit siID2#07 FC (p-value)	Karpas299 transfiziert mit siID2#09 FC (p-value)
CALR		-3,1 (0,0005)	-1,7 (0,34)	-1,8 (0,18)
CDC42	-2,2 (0,06)	-1,6 (0,06)	-1,8 (0,2)	
TFG	-1,7 (0,06)	-2,0 (0,012)		
TGS1	-1,8 (0,05)	-1,7 (0,03)		
FANCB	-1,8 (0,05)	-2,0 (0,05)		
ABCA		1,8 (0,09)		1,5 (0,55)
MALAT1	-1,9 (0,05)		-1,7 (0,39)	
RRAD			1,8 (0,03)	1,8 (0,07)
STS			1,7 (0,37)	2,0 (0,29)
EPR1		-2,4 (0,023)	-1,6 (0,21)	
ID2	-1,7 (0,05)		-1,8 (0,3)	-1,9 (0,028)
LARP5		-2,0 (0,04)	-1,7 (0,4)	
PSMB4		-5,6 (0,04)	-1,5 (0,04)	
RPL27A		-5,5 (0,0003)	-1,6 (0,11)	
RPL38		-3,5 (0,02)	-1,7 (0,13)	
RPS27L		-2,0 (0,024)	-1,9 (0,2)	
UBE2B		-2,3 (0,02)	-1,6 (0,49)	
WDR6		-2,2 (0,08)	-1,9 (0,16)	
RPLP2		-8,4 (0,006)	-1,8 (0,16)	
SFRS6		-2,0 (0,097)	-1,8 (0,48)	
SRPRB		-1,7 (0,07)	-1,5 (0,5)	

Die 21 differentiell exprimierten Gene in den ALCL-Zelllinien SU-DHL-1 und Karpas299 transfiziert mit siID2#07 bzw. siID2#09 im Vergleich zu Vergleichszellen (transfiziert mit siSCR) wurden anhand der Kriterien $-1,5 \leq FC \leq 1,5$ sowie dem t-Test p-Wert $\leq 0,1$ für die ALCL-Zelllinie SU-DHL-1 identifiziert. Der FC ist angegeben, der genaue p-Wert findet sich in Klammern.

Als nächstes wurden aus den 21 Genen (Tabelle 7) zehn Gene für eine erste Validierung ausgewählt: Calreticulin CALR und das GTP-bindende Protein CDC42, da sie in drei Vergleichen reguliert waren. Das Gen TFG, das zur Superfamilie der

Methyltransferasen gehörende TGS1 und das DNA Reparatur-Protein FANCB wurden zur Validierung ausgewählt, weil sie in zwei Vergleichen mit verschiedenen siRNA-Oligonukleotide reguliert waren. RRAD, das zur Superfamilie der kleinen GTPasen gehört und an Signaltransduktionen beteiligt ist, wurde als das Gen ausgewählt, das in der ALCL-Zelllinie Karpas299, in der ID2 durch Transfektion mit beiden siRNA-Oligonukleotide reduziert war, reguliert wurde ($p\text{-Wert} \leq 0,1$). Des Weiteren handelt es sich um eines der drei hochregulierten Gene. Die Gene PSMB4, beteiligt am Ubiquitin-abhängigen Protein-katabolischen Prozess und die ribosomalen Proteine RPL27A, RPL38 und RPLP2 wurden aufgrund der höchsten differentiellen und signifikanten ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) Regulation in zumindest einer der beiden Vergleiche (ALCL-Linie SU-DHL-1 transfiziert mit siID2#09) für die Validierung ausgewählt. In die Bestätigungsexperimente wurde auch ZAP70 als T-Zell-Marker einbezogen, der schon im Immunblot auf veränderte Proteinexpression nach Herunterregulation von ID2 in den ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 untersucht wurde.

Diese insgesamt elf ausgewählten Gene sollten hinsichtlich ihrer vermutlich differentiellen Expression durch qRT-PCR-Analyse bestätigt werden. Der Analyse diente die RNA der gleichen Zellen, die bereits für die Microarray-Analyse verwendet wurde. Für die qRT-PCR standen TaqMan Genexpressions-Assays zur Verfügung. Die relative Quantifizierung der ID2-mRNA-Expression erfolgte auf das Referenz-Gen B2M bezogen (Δct). Nach dieser Normierung wurde vom Δct -Wert der Kontrollprobe (Zellen, die mit siSCR transfiziert wurden) der Δct -Wert der experimentell behandelten Probe (Zellen, die mit siID2 transfiziert wurden) abgezogen und der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert erhalten.

Die Gene CDC42, CALR, TFG, TGS1, FANCB, PSMB4, RPL38 sowie RPRL2 zeigten bei einem reduzierten ID2-Proteingehalt in den ALCL-Linien keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression, d.h. es konnten keine RNA-Expressionsunterschiede in den mit siID2 transfizierten Zelllinien im Vergleich zu den Zellen transfiziert mit siSCR nachgewiesen werden (Abbildung 23). Es fand sich in der ALCL-Linie SU-DHL-1 mit herunterregulierter ID2-Proteinmenge eine einfach verringerte Expression des ZAP70 im Vergleich zu den mit der siSCR transfizierten Zellen. In der ALCL-Zelllinie Karpas299 zeigte sich dagegen eine Erhöhung der Expression um das Doppelte verglichen mit den siSCR transfizierten Vergleichszellen (Abbildung 23).

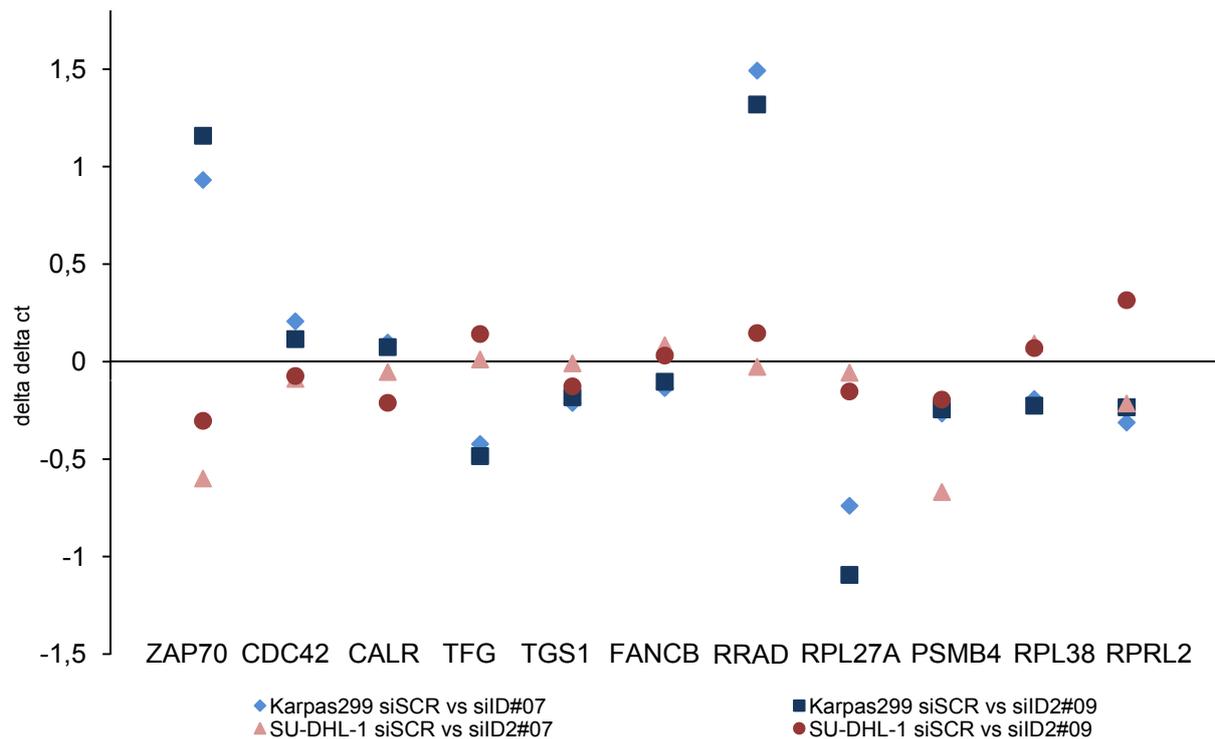


Abbildung 23: Quantitative RT-PCR für ZAP70, CDC42, CALR, TFG, TGS1, FANCB, RRAD, RPL27A, PSMB4, RPL38 und RPRL2 in ALCL-Zelllinien mit reduzierter ID2-Proteinexpression. Es wurden für alle PCR von der Firma ABI entworfene Assays (Assays-on-Demand) verwendet. Dargestellt sind $\Delta\Delta ct$ -Werte in Bezug auf B2M sowie auf Vergleichszellen transfiziert mit siSCR.

Die Expression des Gens RRAD ist in der Karpas299-Zelllinie mit herunterreguliertem ID2-Proteingehalt in Bezug auf die Vergleichszellen erhöht. Dies lässt sich bei der SU-DHL-1-Zelllinie jedoch nicht beobachten. Des Weiteren konnte RPL27A als differentiell ausgeprägt bestätigt werden. Hier zeigt sich allerdings nur in der ALCL-Zelllinie Karpas299 nach Herunterregulation des ID2-Proteins eine verminderte Expression des RPL27A im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Resümierend ließ sich zum Einfluss des ID2 auf die Expression des ZAP70 auf RNA-Ebene in den ALCL-Linien keine Aussage treffen. Das Gen RPL27A konnte in der Zelllinie Karpas299 als herunterreguliert bestätigt werden. In der Zelllinie SU-DHL-1 blieb, trotz stärkerer Herunterregulation des RPL27A laut der Microarray-Genexpressionsdaten, die Bestätigung durch die qRT-PCR-Analyse dagegen aus. Die differentielle Expression aller anderen Gene konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht bestätigt werden. Die Hochregulation des RRAD konnte in der ALCL-Linie Karpas299 bestätigt werden, hier stimmen die Daten der Microarray-Genexpressionsanalyse mit den qRT-PCR-Validierungsdaten überein.

Als nächstes wurden aus der Liste der Gene, die in mindestens zwei Vergleichen differentiell ausgeprägt sind (Tabelle 7), zusätzliche fünf Gene zur weiteren Untersuchung der Daten aus der Microarray-Genexpressionsanalyse ausgewählt. Wie zuvor wurde RNA der Zellen analysiert, die bereits für die globale Genexpressionsanalyse verwendet wurde, und wieder erfolgte die Validierung mittels qRT-PCR unter Verwendung entsprechender TaqMan Genexpressions-Assays. Die relative Quantifizierung erfolgte in Bezug auf das Referenz-Gen B2M. Nach dieser Normierung wurde der Δct -Wert der experimentell behandelten Probe (Zellen, die mit siID2 transfiziert wurden) vom Δct -Wert der Kontrollprobe (Zellen, die mit siSCR transfiziert wurden) abgezogen und der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Wert erhalten. ID2 wurde als weiteres Gen der Analyse zugefügt.

Eine moderate Herunterregulation der ID2-mRNA konnte in beiden ALCL-Zelllinien mit herunterreguliertem ID2-Proteingehalt beobachtet werden, in diesem Fall konnten also die Daten aus der Microarray-Genexpressionsanalyse bestätigt werden. Die differentiellen Regulationen der fünf weiteren zur Validierung ausgewählten Gene aus der Microarray-Analyse konnten indes nicht verifiziert werden (Abbildung 24).

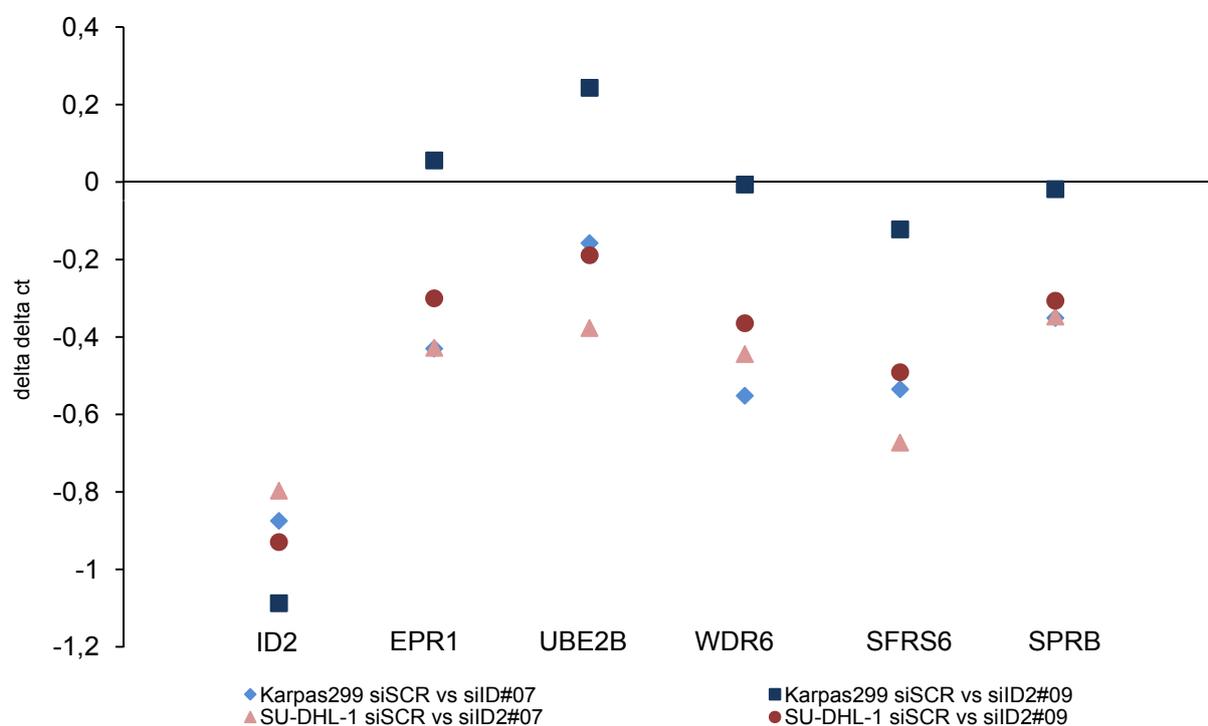


Abbildung 24: Quantitative RT-PCR für ID2, EPR1, UBE2B, WDR6, SFRS6 und SPRB in ALCL-Zelllinien mit reduzierter ID2-Proteinexpression. Es wurden für alle PCR von der Firma ABI entworfene Assays (Assays-on-Demand) verwendet. Dargestellt sind $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte in Bezug auf B2M sowie auf Vergleichszellen transfiziert mit siSCR.

Insgesamt konnte nur eine überraschend geringe Anzahl von Genen durch qRT-PCR-Analyse in ihrer durch Herunterregulation des ID2-Proteins veränderten Genexpression, bezogen auf die Vergleichszellen, bestätigt werden.

Um diese Gene (ZAP70, RPL27A, RRAD) in ihrer differentiellen Expression zu verifizieren, wurde eine der beiden ALCL-Zelllinien, Karpas299, erneut mit beiden siID2-Oligonukleotiden transfiziert. Die Herunterregulation des Proteins ID2 wurde mittels Immunblot überprüft. Zellen, die mit der siSCR transfiziert wurden, dienten erneut als Vergleichszellen (Abbildung 25).

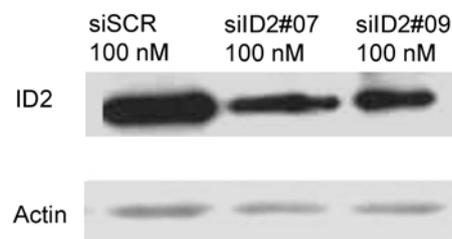


Abbildung 25: Herunterregulation von ID2 in der ALCL-Zelllinie Karpas299 mittels siRNA-Oligonukleotide spezifisch gegen ID2. Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transients Transfektion mit siID2#07 und siID2#09 je 100 nM bzw. einer *scrambled* siRNA (siSCR) unter der Verwendung des RiboJuice Transfektionsreagenzes. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein ID2 mit einem spezifischen anti-ID2-Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots.

RNA dieser Zellen wurde auf die Expression der bereits in den bisherigen qRT-PCR-Analysen zumindest teilweise bestätigten differentiell exprimierten Gene, RPL27A, RRAD, ZAP70 und ID2, mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 26). Die Auswertung der quantitativen RT-PCR erfolgte wie zuvor durch relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

Gemessen an den Kontrollzellen war die Menge an ID2-mRNA auch bei dem Bestätigungsansatz herunterreguliert. Die differentielle Regulation der Expression des ZAP70-Gens ließ sich ebenso wenig bestätigen wie die des Gens RPL27A. Die Hochregulation des RRAD wurde durch eine erneut deutliche Hochregulation in der qRT-PCR-Analyse bestätigt (Abbildung 26).

RRAD geht demnach als einziges validiertes differentiell ausgeprägtes Gen aus der globalen Microarray-Genexpressionsanalyse der ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 mit herunterreguliertem ID2-Proteingehalt im Vergleich zu den entsprechenden Vergleichszellen hervor.

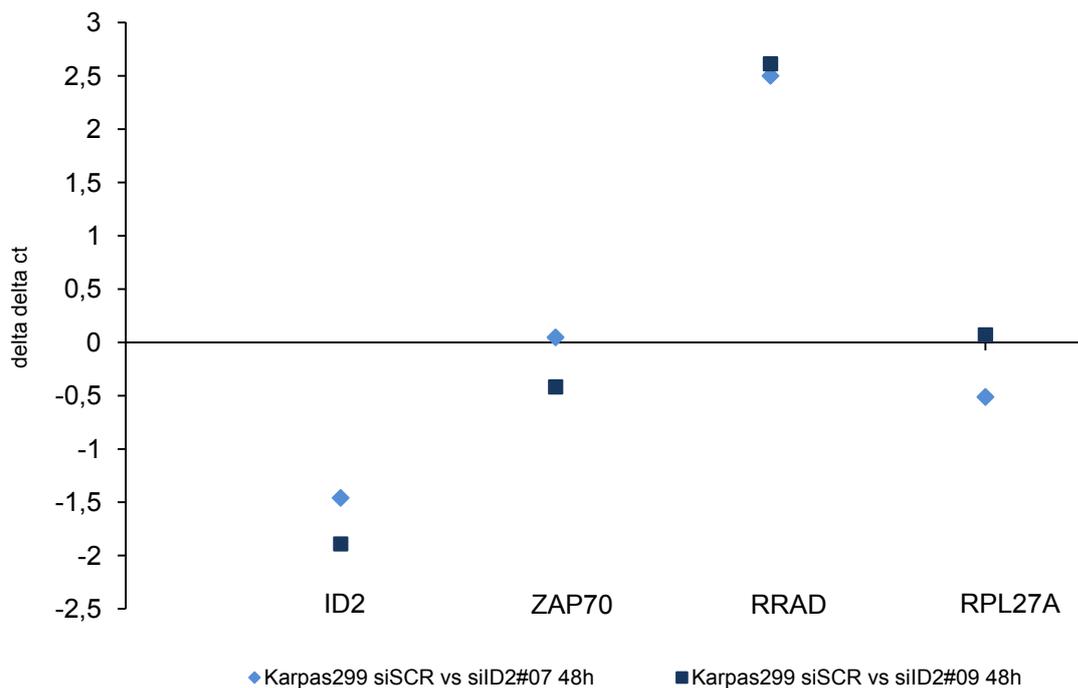


Abbildung 26: Quantitative RT-PCR für ID2, ZAP70, RRAD und RPL27A in der ALCL-Zelllinie Karpas299 mit reduzierter ID2-Proteinexpression. Es wurden für alle PCR von der Firma ABI entworfene Assays (Assays-on-Demand) verwendet. Dargestellt sind $\Delta\Delta ct$ -Werte in Bezug auf B2M sowie auf Vergleichszellen transfiziert mit siSCR.

Daher sollte die Expression des RRAD in den ALCL-Zelllinien im Vergleich zu anderen Lymphom-Entitäten auf Proteinebene mit Hilfe von Immunblot-Analysen bestätigt werden. Es wurden vier kommerziell erhältliche Antikörper für die Immunblot-Analyse verwendet und auf ihre Spezifität unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, Block-Reagenzien, Antikörperkonzentration) getestet. Trotz der Verwendung der Proteinlysate vom Muskelgewebe diabetischer Patienten, in dem das RRAD überexprimiert vorliegen soll (Reynet und Kahn, 1993), als Positivkontrolle, konnte keine spezifische Bande im Immunblot detektiert werden. Des Weiteren sollte die Expression in ALCL-Primärfällen, ebenfalls verglichen mit anderen Lymphom-Entitäten sowie Normalgewebe, durch immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern, die schon in der Immunblot-Analyse verwendet wurden, verifiziert werden. Da die Antikörper für die Immunhistochemie nicht als bereits etabliert beschrieben worden waren, wurden auch hier verschiedene Bedingungen (Puffer mit verschiedenen pH-Werten, Vorbehandlung der Gewebeschnitte, Antikörperkonzentration, Detektionssysteme) getestet. Als Positivkontrolle wurde erneut Muskelgewebe diabetischer Patienten verwendet. Dennoch konnte keine spezifische immunhistochemische Färbung etabliert werden.

Es bleibt zusammenfassend festzustellen, dass aufgrund fehlender Reagenzien eine weitere Analyse der Expression des RRAD im ALCL nicht möglich war.

3.7 Die weitere Bedeutung des ID2 für die Pathogenese des HL und des ALCL

3.7.1 Analyse der Interaktion des ID2 mit HEF1 in HL-Zelllinien

ID2 ist im HL aberrant exprimiert. Die Analysen dieser Arbeit fokussierten sich bisher auf die mögliche Bedeutung des ID2 für die Dedifferenzierung der HRS Zellen des HL.

Zusätzlich sind noch Interaktionen des ID2 mit anderen Partnern möglich, die keine Bedeutung für die Dedifferenzierung der HRS Zellen haben, dennoch für die Pathogenese des HL vielleicht eine Rolle spielen. Aufgrund seiner HLH-Struktur könnte ein solcher Partner HEF1 (auch NEED9) sein (Law et al., 1999). HEF1 ist ein Multidomänen-Protein, das eine zentrale Rolle in der Tyrosinkinase-basierenden Signalgebung spielt, welche die Zelladhäsion betrifft. Ein Teil des HEF1 interagiert und kontrolliert die Aurora Kinase1-Aktivität, die für den Ablauf der Mitose essentiell ist (Zheng und McKeown-Longo, 2002).

Es sollte analysiert werden, ob die starke Expression von ID2 durch die Bindung des HEF1 zur Beeinflussung der Aurora Kinase1-Funktion beiträgt, und so womöglich zu einem gestörten Mitoseverlauf in HRS Zellen führen könnte. Dazu wurde zunächst die Proteinexpression des HEF1 in den HL-Zelllinien im Vergleich zu NHL-Zelllinien mittels Immunblot-Analyse untersucht.

In allen analysierten HL-Zelllinien wurde das HEF1-Protein exprimiert. Die nlpHL-Linie DEV exprimiert das HEF1-Protein jedoch nur sehr schwach (Abbildung 27).

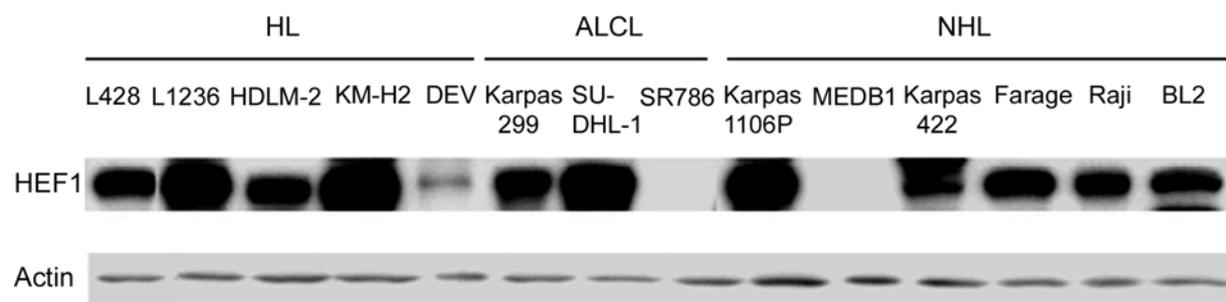


Abbildung 27: Analyse der Expression des HEF1 in HL- und NHL-Zelllinien im Western Blot. Gesamtzellextrakte von 1×10^5 Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Ladekontrolle wurde Actin verwendet.

Auffällig war die deutlich stärkere Expression in den HL-Linien L1236 und KM-H2 sowie in den ALCL-Linien SU-DHL-1 und Karpas299 im Vergleich zu den HL-Linien L428, HDLM-2 und zu den NHL-Linien. Die ALCL-Linie SR786 zeigte dagegen keine Expression des HEF1. Auch in einer der beiden mediastinalen B-Zell-Linien, MEDB1, ließ sich das HEF1-Protein nicht detektieren.

Als nächstes sollte durch das bereits etablierte Ko-Immunopräzipitationssystem mittels Dynabeads die mögliche Bindung zwischen ID2 und HEF1 in den HL-Linien analysiert werden (Abbildung 28).

Eine Interaktion von ID2 mit HEF1 zeigte sich in der Zelllinie KM-H2. Obwohl die Präzipitation des ID2 beinahe vollständig war, erkennbar an der fehlenden Proteinbande des ID2 in dem KM-H2-Lysat nach der Präzipitation (Abbildung 28, obere Reihe), war die Interaktion mit HEF1 nicht vollständig, erkennbar an der Proteinbande des HEF1 im KM-H2-Lysat nach der Präzipitation (Abbildung 28, untere Reihe). Eine Bindung von ID2 an HEF1 konnte weder in der HL-Linie L1236 noch in der HL-Linie L428 nachgewiesen werden.

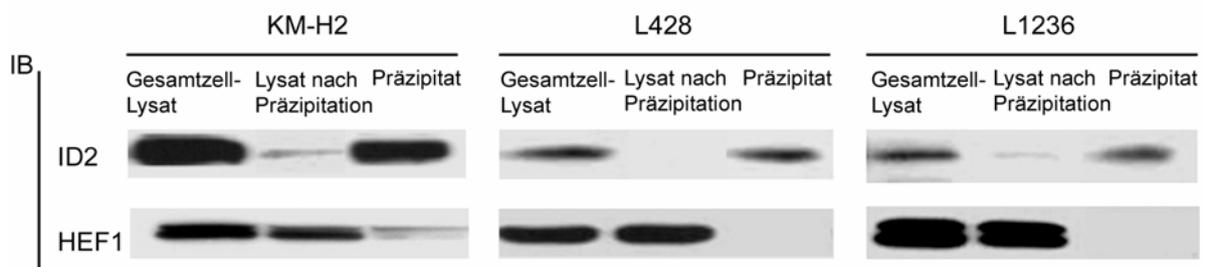


Abbildung 28: Ko-Immunopräzipitation von HEF1 mit ID2 aus HL-Zelllinien. Ein polyklonaler anti-ID2 Antikörper wurde für die Ko-Immunopräzipitation von Zell-Lysaten aus einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen unter Anwendung der Dynabeads[®] verwendet. Gleiche Mengen der Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Immunblot analysiert, wobei mit anti-ID2- und anti-HEF1-Antikörpern inkubiert wurde. HEF1 konnte unter der Verwendung des normalen Kaninchen Serum IgG als Kontrolle nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Die für den Immunblot verwendeten waren monoklonale Maus-Antikörper.

Es lässt sich also feststellen, dass eine Interaktion zwischen ID2 und HEF1 im HL besteht. Demnach spielt ID2 durch mögliche Inaktivierung des HEF1 wahrscheinlich eine weitere Rolle in der Pathogenese des HL unabhängig der Dedifferenzierung der HRS Zellen.

3.7.2 Die Rolle des ID2 in der Kontrolle des Zellzyklus

3.7.2.1 Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf die Expression negativer Regulatoren des Zellzyklus in HL- und ALCL-Zelllinien

ID2 kann die Regulation des Zellzyklus durch Interaktion mit E2A beeinflussen. Beispielsweise blockiert das E-Protein E2A den Übergang von der G₀-Phase zur S-Phase *in vitro* letztlich durch Aktivierung des p21^{Cip1}-Gens, die durch Bindung des E2A an die E-Box-Sequenzen in dem Promotor des p21^{Cip1}-Gens bedingt ist. Demnach folgt einer Überexpression des ID2, eine Hemmung der E2A-vermittelten Induktion der CDK-Inhibitoren (CDKI) durch Inaktivierung des E2A, was das Fortschreiten des Zellzyklus nach sich zieht (Prabhu et al., 1997). Auch p16^{INK4a} wird durch ID-Proteine, die mit E2A interagieren und so die E2A-vermittelte Gentranskription verhindern, inhibiert (Zheng et al., 2004). In den Promotorsequenzen von p15^{INK4b} wurden E-Box-Sequenzen als Target-Sequenzen unter anderem für den Transkriptionsfaktor E2A gefunden (Pagliuca et al., 2000). In Neuroblastomzellen konnte p57^{Kip2}, das für den Zellzyklusarrest essentiell ist, als Target von E2A identifiziert werden und in Übereinstimmung mit der E2A-inaktivierenden Rolle des ID2 konnte belegt werden, dass ID2 die Expression des p57^{Kip2} verhindert (Rothschild et al., 2006).

Hat ID2 also möglicherweise auch im HL sowie im ALCL Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Zellen der HL- und ALCL-Zelllinien mit gegen ID2 gerichteten siRNA-Oligonukleotiden unter Verwendung des RiboJuice siRNA Transfektionsreagenzes transient transfiziert (es wurden die zuvor etablierten Transfektionsbedingungen angewandt). Nach erfolgreicher Herunterregulation des ID2-Proteins wurde die Expression negativer Regulatoren des Zellzyklus durch Immunblots analysiert (Abbildung 29). Die Herunterregulation des ID2-Proteins veränderte die Proteinexpression der Zellzyklusinhibitoren p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p57^{Kip2} und p21^{Cip1} in den ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL1 nicht (Abbildung 29A). ID2 hat demnach keinen Einfluss auf die Proteinexpression der untersuchten negativen Regulatoren des Zellzyklus im ALCL.

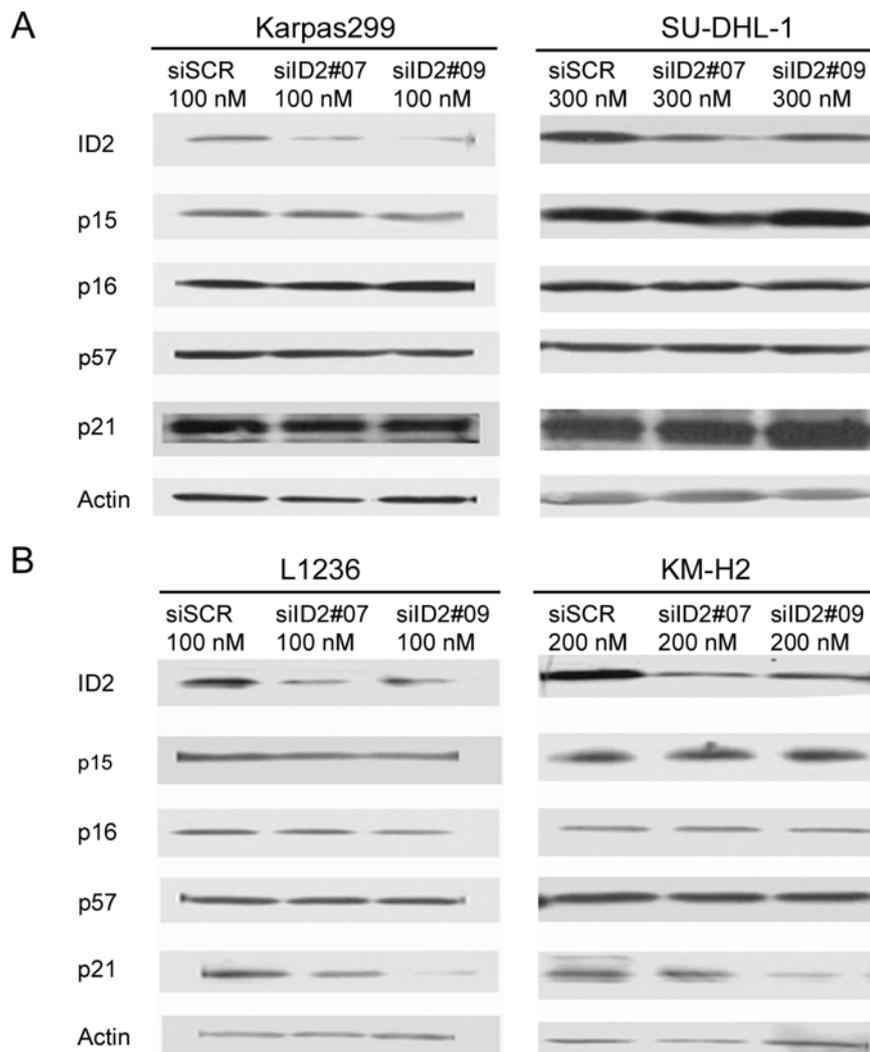


Abbildung 29: Einfluss der Herunterregulation von ID2 in den ALCL- (A) und HL-Zelllinien (B) auf die Expression der negativen Regulatoren des Zellzyklus. Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transienter Transfektion mit siID2#07 und siID2#09 bzw. einer *scrambled* siRNA (siSCR). Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine ID2, p15, p16, p21 und p57 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots.

Sowohl in der HL-Zelllinie KM-H2 als auch in der HL-Linie L1236 führte die Herunterregulation des ID2 auf Proteinebene, entgegen der Erwartung einer E2A-vermittelten Hochregulation, zu einer Herunterregulation des $p21^{Cip1}$ (Abbildung 29B). Aufgrund dieses überraschenden Ergebnisses wurden Duplikate der Transfektionsversuche von beiden HL-Zelllinien durchgeführt. Durch das Anfertigen dieser Duplikate wurde der Effekt validiert. Die anderen CDKI blieben hinsichtlich ihrer Proteinexpression unbeeinflusst.

Es lässt sich feststellen, dass der Zellzyklusinhibitor $p21^{Cip1}$ als Target von ID2 gefunden wurde und so möglicherweise durch ID2 reguliert wird.

3.7.2.2 Analyse der Interaktion des ID2 mit RB in HL-Zelllinien

ID-Proteine sind nicht nur in der Lage Mitglieder der bHLH-Familie zu binden. Sie können auch mit anderen Faktoren, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind, interagieren. Die Gruppe um Iavarone, Lasorella und Kollegen konnte zeigen, dass ID2, jedoch weder ID1 noch ID3, in der Lage ist, RB in ID2-exprimierenden Osteosarkom-Zelllinien sowie Gliom-Zelllinien zu binden und somit dessen wachstumshemmende Aktivität zu verringern (Iavarone et al., 1994; Lasorella et al., 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ID2 ein transkriptionales Zielgen von N-myc und c-myc (Lasorella et al., 2000) darstellt. Es wird deshalb vermutet, dass myc-Transkriptionsfaktoren die Expression des ID2 erhöhen, somit den Block des RB umgehen und den Übergang der G0- zur S-Phase einleiten.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen RB und ID2 auch im HL besteht und dadurch möglicherweise einen Einfluss auf den Zellzyklus hat, sollte mittels der bereits etablierten Ko-Immunopräzipitationsmethode die Bindung von ID2 an RB in den HL-Zelllinien L1236, L428 und KM-H2 analysiert werden.

Trotz der aberranten Expression des ID2 in den untersuchten HL-Linien und der erfolgreichen Präzipitation des ID2 (Abbildung 30, obere Reihe), konnte RB als Bindungspartner in keiner der drei HL-Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 30, untere Reihe).

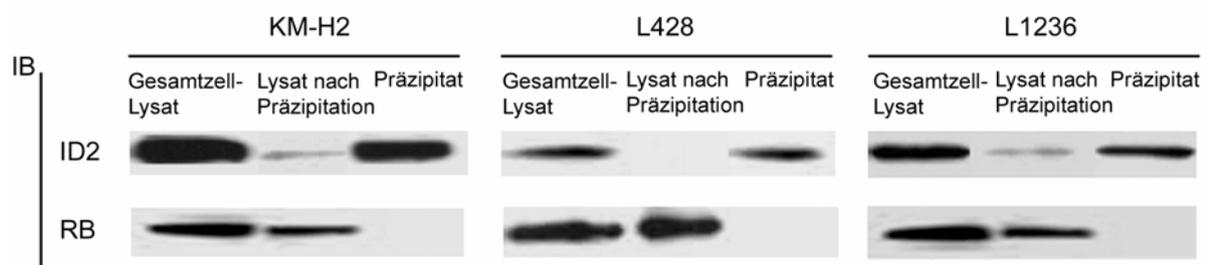


Abbildung 30: Ko-Immunopräzipitation von RB mit ID2 aus HL-Zelllinien. Ein polyklonaler anti-ID2 Antikörper wurde für die Ko-Immunopräzipitation von Zell-Lysaten hergestellt aus 1×10^7 Zellen unter Anwendung der Dynabeads[®] verwendet. Gleiche Mengen der Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunblot analysiert, wobei mit anti-ID2- und anti-RB-Antikörpern inkubiert wurde. RB konnte unter der Verwendung des normalen Kaninchen Serum IgG als Kontrolle nicht detektiert werden (nicht gezeigt).

Demnach konnte die Interaktion zwischen RB und ID2 entgegen der Literatur nicht bestätigt werden.

3.8 Die Bedeutung des p21^{Cip1} als ID2-Target-Gen im HL

Da p21^{Cip1} als einziges Target, das im HL scheinbar durch ID2 reguliert wird, gefunden werden konnte, sollte seine Bedeutung genauer untersucht werden. Vergleicht man den eingangs beschriebenen und durch Prabhu und Kollegen publizierten Zusammenhang der Überexpression des ID2 und der Hemmung des p21^{Cip1} durch E2A-Inaktivierung, war die Herunterregulation des p21^{Cip1} als Folge einer verminderten ID2-Proteinexpression unerwartet. Es stellte sich daher die Frage nach weiteren Funktionen des p21^{Cip1} im HL, die möglicherweise durch ID2 beeinflusst werden und unabhängig von der Funktion bzw. zusätzlich zu der Funktion als Zellzyklusinhibitor sind.

Sowohl neue Interaktionspartner als auch zytoplasmatische Lokalisation deuten auf weitere Funktionen des p21^{Cip1} in der CDK-Aktivierung sowie der Apoptose-Regulation und transkriptionellen Aktivität hin (Coqueret, 2003). Coqueret und Gascan beschrieben eine Rolle des p21^{Cip1} in der Regulation der Gentranskription (Coqueret und Gascan, 2000). Demnach bindet p21^{Cip1} den Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) und hemmt dadurch die Zytokin-stimulierte und STAT3-abhängige Gentranskription.

Des Weiteren wurde p21^{Cip1} trotz der wachstumshemmenden Funktion als Inhibitor der Apoptose ermittelt. Zytoplasmatisch lokalisiert bindet p21^{Cip1} an Proteine, die direkt an der Induktion der Apoptose beteiligt sind und vermindert so deren Aktivität. Suzuki und Kollegen evaluierte Caspase3 als ein solches Protein (Suzuki et al., 1998). Ferner wurde die den apoptotischen Zelltod induzierende Kinase1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*, ASK1) als Teil eines Komplexes mit p21^{Cip1} durch Asada und Kollegen detektiert (Asada et al., 1999). Eine mögliche Phosphorylierung von p21^{Cip1} bewahrt zudem die anti-apoptotische Funktion, bewirkt aber den Verlust der Zellzyklus-hemmenden Funktion (Child und Mann, 2006).

Durch Interferenz mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) spielt p21^{Cip1} eine Rolle in der DNA-Reparatur, denn PCNA wird nicht nur für die DNA-Synthese, sondern auch für die Reparatur der DNA benötigt.

3.8.1 Expression und Lokalisation des p21^{Cip1} und dessen Phosphorylierungsstatus im HL

Um zu untersuchen, ob die neuen Funktionen des p21^{Cip1} möglicherweise auch im HL eine Rolle spielen, sollte zunächst die Lokalisation des p21^{Cip1} analysiert werden.

Die Expression von p21^{Cip1} im Zellkern der HRS Zellen des HL wurde bereits beschrieben (Sanchez-Beato et al., 1996). Die Frage nach der zytoplasmatischen Lokalisation und dem Phosphorylierungsstatus von p21^{Cip1} konnte durch immunhistochemische Färbungen primärer HL-Fälle beantwortet werden (Abbildung 31).

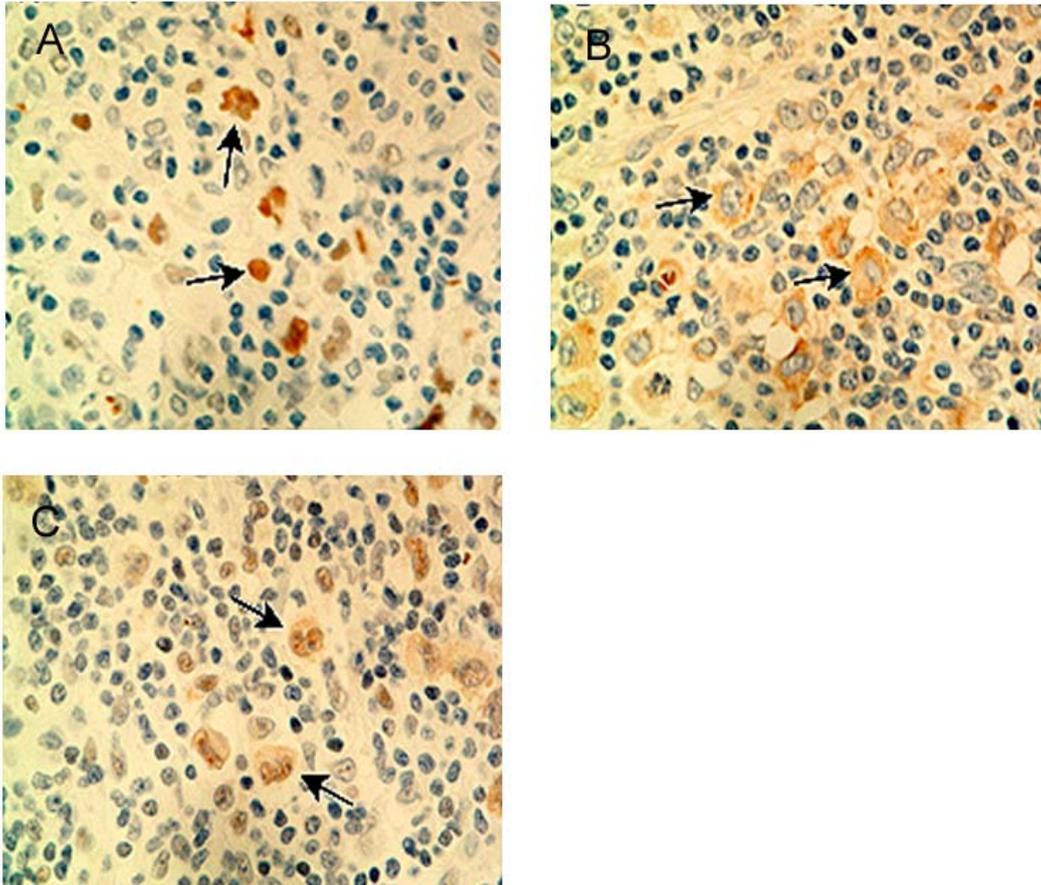


Abbildung 31: Analyse der Expression von p21^{Cip1} im cHL vom nsSubtyp mittels Immunhistochemie. Für die Färbungen wurde ein monoklonaler Maus anti-p21^{Cip1}-Antikörper von Cell Signaling verwendet (**A**), ein monoklonaler Maus anti-p21^{Cip1}-Antikörper von Santa Cruz (**B**) und ein polyklonaler Kaninchen anti-phospho p21^{Cip1}-Antikörper (**C**). Die Pfeile weisen auf einzelne HRS Zellen. Die Detektion erfolgt mittels Horseradish-Peroxidase (HRP) und 3,3-Diaminobenzidin. Pfeile indizieren p21^{Cip1}- bzw. phospho-p21^{Cip1}-positive HRS-Zellen.

Dafür wurden verschiedene Antikörper verwendet. Zwei Antikörper, die jeweils für die Erkennung sowohl der Lokalisation im Kern als auch für die zytoplasmatische Lokalisation als etabliert beschrieben worden waren, und ein Antikörper für die Erkennung der Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 145 des p21^{Cip1}. Zwei anti-p21^{Cip1}-Antikörper wurden verwendet, da sich jeweils einer dem anderen in der Erkennung der Lokalisation als überlegen erwies. Insgesamt wurden 21 primäre HL-

Fälle des klassischen Typs untersucht, davon elf Fälle des nsSubtyps und zehn Fälle des mcSubtyps.

19/21 Fälle zeigten Expression von p21^{Cip1} im Kern (Abbildung 31A), 12/21 zeigten Expression von p21^{Cip1} im Zytoplasma (Abbildung 31B), wobei in 10/21 Fällen sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Expression detektiert wurde. Die Intensität der Kern-Färbungen war moderat bis stark, die der zytoplasmatischen Färbung schwach bis moderat. 8/21 Fälle waren positiv für phospho-p21^{Cip1} (Abbildung 31C). Für vier dieser Fälle konnte die Phosphorylierung sowohl im Kern als auch im Zytoplasma gezeigt werden, einer zeigte phospho-p21^{Cip1} ausschließlich im Kern und drei Fälle nur im Zytoplasma. Die Intensität der Färbung des phospho-p21^{Cip1} war eher schwach. In nur wenigen die HRS Zellen umgebenden Lymphozyten konnte p21^{Cip1} bzw. phospho-p21^{Cip1} nachgewiesen werden.

Die Lokalisation des p21^{Cip1} im Zytoplasma sowie dessen Phosphorylierung lassen vermuten, dass p21^{Cip1} im HL weitere Funktionen über die des negativen Regulators des Zellzyklus hinaus innehat. Es lag also nahe, die HL-Zelllinien dahingehend weiter zu untersuchen.

3.8.2 Analyse der Interaktion des ID2 mit p21^{Cip1} in HL-Zelllinien

Es sollte als nächstes untersucht werden, ob die beschriebenen Proteine STAT3, Caspase3, ASK1 sowie PCNA mit ihren vielfältigen Funktionen (siehe dazu auch 3.8) auch im HL als ID2-Interaktionspartner nachzuweisen sind und die Funktion des p21^{Cip1} demnach auch im HL über die negative Regulation des Zellzyklus hinausgeht. Mittels des bereits verwendeten etablierten Ko-Immunopräzipitationssystems (Dynabeads, Invitrogen) sollte zunächst die beschriebene Interaktion zwischen p21^{Cip1} und CDK2 in der Zervixkarzinom-Zelllinie HELA sowie in den HL-Linien untersucht werden, um die Lysis-Bedingungen der CoIP-Methode zu überprüfen (Zhu et al., 2005). Interessanterweise konnte diese Interaktion zunächst nur in der HELA-Linie bestätigt werden (Abbildung 32A und 32B, zweite Reihe).

Möglicherweise bestehen Unterschiede im Vorhandensein bzw. in der Intensität der Interaktionen von p21^{Cip1} mit CDK2 in Abhängigkeit zur Phase des Zellzyklus, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Analyse befinden. Die Zelllinien L1236 und HELA wurden demnach erneut auf die CDK2-p21^{Cip1}-Wechselwirkung untersucht, um nun den Proliferationsstatus der Zellen zum Zeitpunkt der CoIP zu berücksichtigen. Dazu wurden von jeder Zelllinie einmal Zellen verwendet, die sich in der optimalen Wachstumsphase befinden, im Vergleich zu Zellen, die nicht mehr proliferieren. Das Resultat blieb trotz dieser Maßnahme jedoch unverändert (Daten nicht gezeigt).

Da der nicht erbrachte Nachweis der Bindung des p21^{Cip1} an CDK2 keine Aussage über den möglichen Nachweis der Interaktion mit den anderen potentiellen Bindungspartnern zuließ, sollte als nächstes die mögliche Interaktion zwischen p21^{Cip1} und STAT3 in den HL-Zelllinien KM-H2 und L1236 gezeigt werden. In keiner der beiden Zelllinien konnte diese Bindung nachgewiesen werden (Abbildung 32). Auch die Interaktionen mit PCNA, Caspase3 und ASK1 konnten in den HL-Zelllinien KM-H2 und L1236 nicht detektiert werden (Abbildung 32).

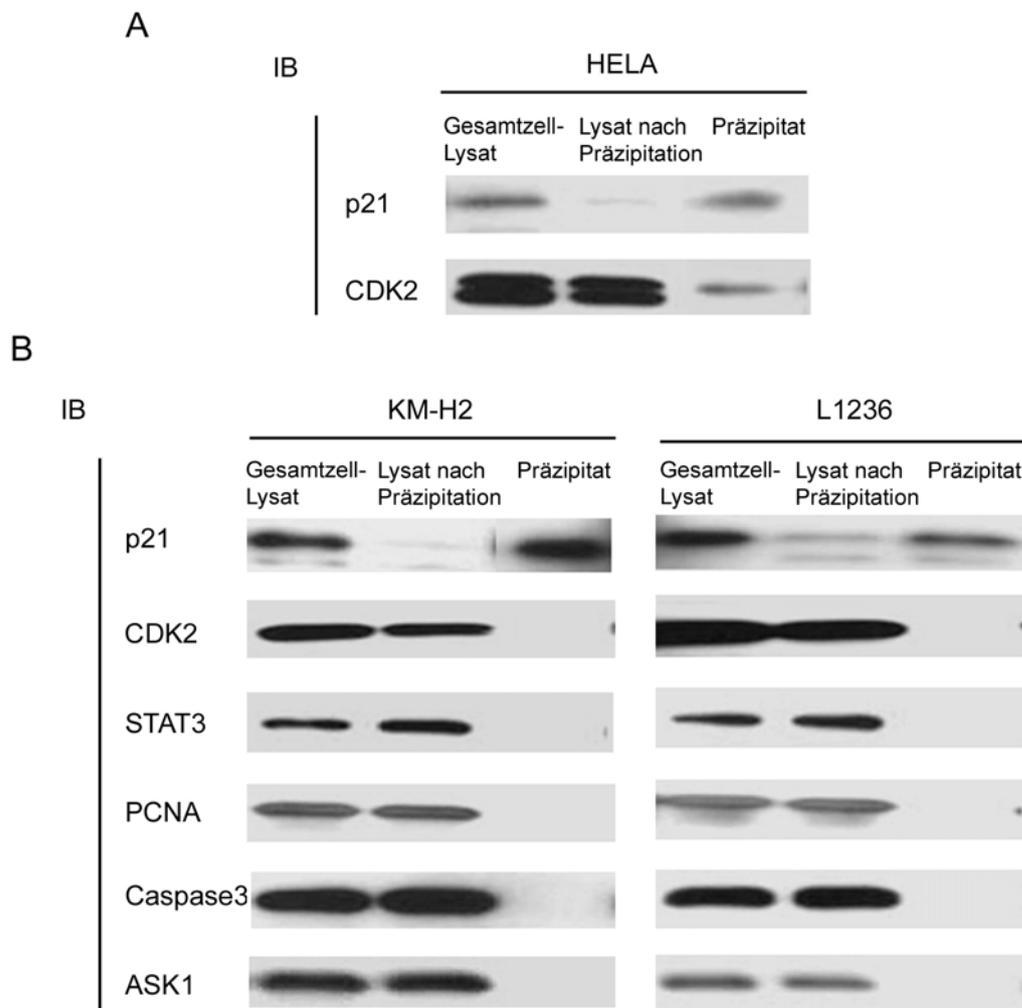


Abbildung 32: Ko-Immunpräzipitation von CDK2 mit p21^{Cip1} aus der Zervixkarzinom-Zelllinie HELA (A) sowie von CDK2, STAT3, PCNA, ASK1 und Caspase3 mit p21^{Cip1} aus HL-Zelllinien (B). Ein polyklonaler anti-p21^{Cip1} Antikörper wurde für die Ko-Immunpräzipitation von Zell-Lysaten hergestellt aus 1×10^7 Zellen unter Anwendung von Dynabeads[®] verwendet. Gleiche Mengen der Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Immunblot analysiert, wobei mit anti-p21^{Cip1}-, anti-CDK2, anti-STAT3, anti-PCNA, anti-ASK1- und anti-Caspase3-Antikörpern inkubiert wurde. Alle Antikörper für den Immunblot waren monoklonale Maus-Antikörper.

Da der Nachweis der Protein-Interaktionen ausblieb, lässt sich demnach keine Aussage bezüglich der Funktionen des p21^{Cip1}, die es im HL möglicherweise neben der negativen Regulation des Zellzyklus hat, treffen.

3.8.3 Einfluss der reduzierten p21^{Cip1}-Proteinexpression auf die Zellzyklusverteilung in HL-Zelllinien

Weiteren Aufschluss über die Funktion des p21^{Cip1} in den HL-Zelllinien sollte die Messung der Zellzyklusverteilung nach Herunterregulation des p21^{Cip1} ergeben, denn p21^{Cip1} hat möglicherweise Auswirkungen auf die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus.

Zunächst wurden die HL-Zelllinien mit siRNA-Oligonukleotiden, die gegen p21^{Cip1} gerichtet sind, mittels des zur ID2-Herunterregulation etablierten RiboJuice-Transfektionssystems transient transfiziert, und nach 48 Stunden die Expression des p21^{Cip1} auf Proteinebene durch Immunblot-Analyse überprüft (Abbildung 33A).

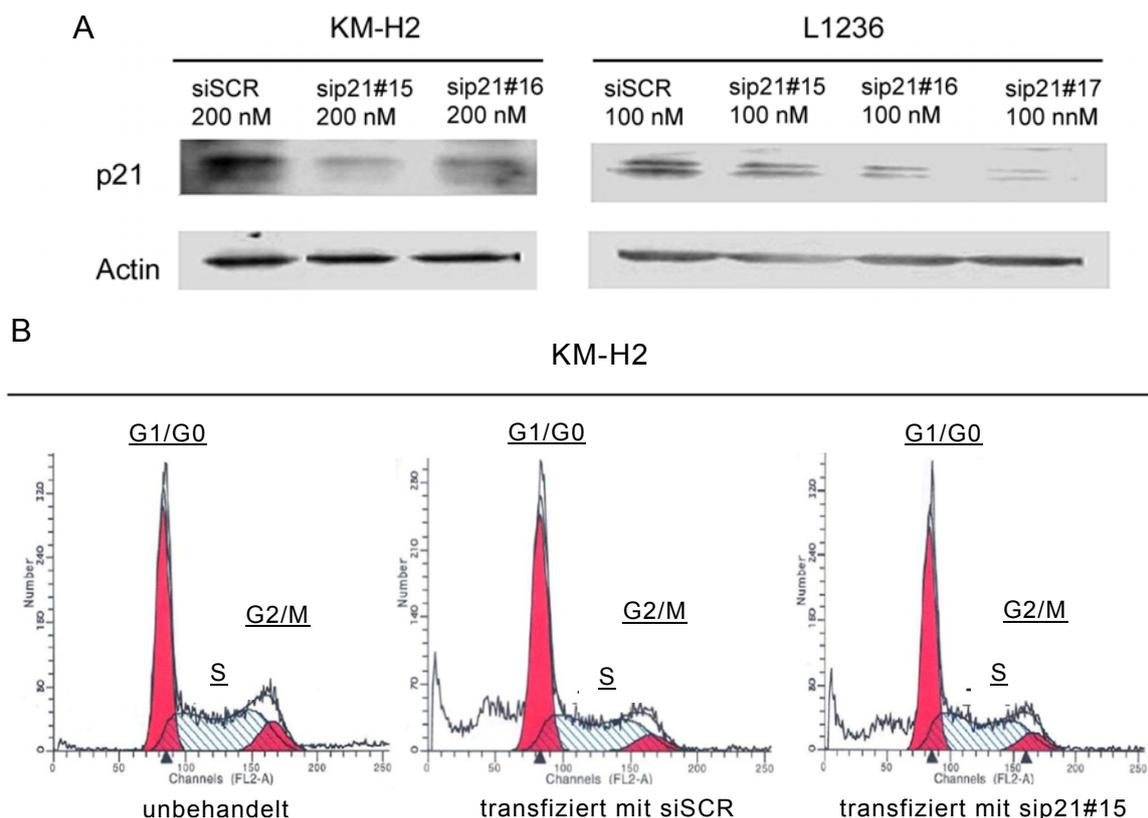


Abbildung 33: Einfluss der Herunterregulation von p21^{Cip1} in den HL-Zelllinien auf den Zellzyklus. (A) Western Blot-Analyse der Zell-Lysate 48h nach transienter Transfektion der HL-Linien KM-H2 und L1236 mit sip21#15, sip21#16 und sip21#17 bzw. einer *scrambled* siRNA (siSCR) mit einer jeweiligen Konzentration von 100 nM. Die Zell-Lysate enthielten Gesamtprotein aus 1×10^5 Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Protein p21 mit spezifischem Antikörper detektiert. Actin diente der Ladekontrolle des Immunblots. **(B)** 72 Stunden und 96 Stunden nach der Transfektion wurden diese Zellen fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und die Zellzyklusprofile im FACScan aufgenommen, hier exemplarisch gezeigt für KM-H2 Zellen 72 Stunden post Transfektion.

Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und solche, die mit einer siSCR transfiziert wurden.

Für die anschließende Analyse der Zellverteilung in den Zellzyklusphasen wurden Zellen mit herunterreguliertem p21^{Cip2}-Protein und Kontrollzellen sowohl nach 72 Stunden als auch nach 96 Stunden zunächst mit eiskaltem Ethanol 100% für mindestens 2 Stunden bei 4°C fixiert. Nach einem anschließenden RNase-Verdau und Propidiumiodid-Färbung für 30 Minuten unter Lichtschutz wurde die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus mittels FACScan gemessen. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen stieg der Anteil der Zellen in der subG1-Phase, welche die apoptotischen Zellen beinhaltet, bereits durch Transfektion mit einer *scrambled* siRNA (siSCR). Der Anteil apoptotischer Zellen nahm durch Transfektion der Zellen mit einer sip21^{Cip1} im Vergleich zu siSCR-transfizierten Zellen nicht weiter zu (Abbildung 33B, HL-Zelllinie KM-H2 repräsentativ 72 Stunden post Transfektion). Dieses Ergebnis wurde sowohl bei der Messung nach 72 Stunden als auch nach 96 Stunden erhalten.

Tabelle 8: Einfluss der Herunterregulation von p21^{Cip1} in den HL-Zelllinien auf die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus

KM-H2 72 Stunden post Transfektion				L1236 72 Stunden post Transfektion			
	Zellzyklusphasen				Zellzyklusphasen		
	G0/G1	G2/M	S		G0/G1	G2/M	S
unbehandelt	51,6	7,8	40,1	unbehandelt	43,9	16,8	42,4
siSCR	50,6	8,2	41,1	siSCR	44,9	14,3	40,9
sip21#15	51,5	9,3	39,0	sip21#15	43,4	17,6	39,0
sip21#16	51,9	7,5	40,6	sip21#16	40,5	16,3	43,2
sip21#17	53,4	6,3	40,2	sip21#17	42,1	18,1	39,8

KM-H2 96 Stunden post Transfektion				L1236 96 Stunden post Transfektion			
	Zellzyklusphasen				Zellzyklusphasen		
	G0/G1	G2/M	S		G0/G1	G2/M	S
unbehandelt	50,1	10,3	39,1	unbehandelt	38,4	16,8	44,3
siSCR	50,25	10,2	39,5	siSCR	39,3	17,2	43,4
sip21#15	50,08	10,1	39,0	sip21#15	37,8	17,5	44,8
sip21#16	50,34	10,9	38,8	sip21#16	39,8	14,4	45,8
sip21#17	50,6	9,9	39,5	sip21#17	40,8	14,7	44,5

Zellen der HL-Linien KM-H2 und L1236 wurden 72 Stunden sowie 96 Stunden nach transients Transfektion mit sip21#15, sip21#16, sip21#17 bzw. siSCR je 100nM für 2 Stunden mit 70% Ethanol fixiert und 1x10⁶ Zellen/500µl PI/RNase-Puffer im FACScan hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle.

Des Weiteren konnten auch keine Änderungen der prozentualen Anteile an Zellen in den Phasen G0/G1, G2/M oder S beobachtet werden; weder in der Zelllinie KM-H2

noch in der HL-Linie L1236 und weder 72 Stunden noch 96 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zu unbehandelten Zellen bzw. Zellen, die mit einer siSCR transfiziert worden sind (Tabelle 8).

Nach diesen Ergebnissen scheint die Herunterregulation von p21^{Cip1} in den HL-Zelllinien KM-H2 und L1236 keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu haben.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung des ID2 für die Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL und ALCL

Der nahezu vollständige Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene der von B-Zellen abstammenden HRS Zellen ist einzigartig unter allen B-Zell-Lymphomen und könnte ein essentieller Faktor in der Pathogenese des HL sein. So trägt der Verlust der B-Zell-Identität möglicherweise zu der aberranten Expression verschiedener Marker anderer hämatopoetischer Linien bei. Für einige dieser Gene hat sich bereits ihre Rolle in der Pathogenese des HL gezeigt. Beispielsweise könnte die Expression von TARC (*T cell directed cc chemokine*), das normalerweise in aktivierten TH2-Lymphozyten exprimiert wird, in den HRS Zellen das charakteristische T-Zell-Infiltrat im cHL erklären (van den Berg et al., 1999). Normale B-Zellen, vor allem Keimzentrums-B-Zellen sowie die Zellen der meisten B-Zell-NHL, sind von Überlebenssignalen über einen funktionellen B-Zell-Rezeptor abhängig (Küppers et al., 1999). Der Verlust der B-Zell-Identität, unabhängig des zugrunde liegenden Mechanismus, könnte ein Selektionsfaktor sein, der für die Pathogenese des HL eine wichtige Rolle spielt: HRS Zellen stammen von prä-apoptischen GC-B-Zellen ab, die aufgrund unvorteilhafter V-Gen-Mutationen keinen funktionellen BCR ausprägen können (Kanzler et al., 1996). Es fehlen folglich die BCR-vermittelten Überlebenssignale, weshalb betroffene Zellen normalerweise durch Apoptose sterben (Rajewsky, 1996). Der Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene ist demnach vermutlich wichtiger Teil einer Strategie der HRS Zellen, der stringenten Selektion für einen hoch affinen BCR, und somit der Apoptose, zu entgehen.

Drei Transkriptionsfaktoren, E2A, EBF sowie PAX5, sind für die B-Zell-Entwicklung essentiell und werden auch in reifen B-Zellen exprimiert, wo sie zur Aufrechterhaltung des B-Zell-Phänotyps beitragen (Horcher et al., 2001; Medina et al., 2004).

Die Beteiligung des E2A hinsichtlich der transkriptionellen Aktivierung der Gene in reifen B-Zellen, ist aufgrund des frühen Blocks der B-Zell-Differenzierung in E2A-defizienten Mäusen wenig untersucht. E2A kann als E-Protein an spezifische E-Box-Sequenzen (CANNTG) in DNA-Promotoren binden (Murre et al., 1989). Mathas und Kollegen untersuchten in ihrer Studie die Frage nach der Funktion der E-Box bezüglich der Promotoraktivität der B-Zell-spezifischen Gene CD79A und CD19. Tatsächlich fanden sie, dass die E2A-abhängige Transkription für die Regulation dieser Gene auch in reifen B-Zellen elementar ist (Mathas et al., 2006). EBF trägt

ebenfalls zur Aufrechterhaltung des B-Zell-Phänotyps bei. So ist die PAX5-vermittelte Aktivierung der B-Zell-spezifischen Gene wie CD19 und CD79A abhängig von EBF (Medina et al., 2004). PAX5 ist der kritische Faktor in der Determinierung der B-Zell-Identität. PAX5 aktiviert und verstärkt einerseits die Expression B-Zell-spezifischer Gene wie CD19 und BLNK, andererseits unterdrückt es die Aktivität von Signalwegen, die die Differenzierung zu anderen hämatopoetischen Linien begünstigen (Cobaleda et al., 2007).

E2A und PAX5 werden von den HRS Zellen primärer HL-Fälle auf Proteinebene exprimiert, wenn gleich die Ausprägung von PAX5 im Vergleich zu normalen B-Zellen deutlich schwächer ist. In dieser Arbeit konnte dies auch in HL-Zelllinien bestätigt werden. Da zu diesem Zeitpunkt kein Antikörper für den Nachweis von EBF mittels Immunblot zur Verfügung stand, wurde die Expression von EBF auf Proteinebene nicht untersucht. Die Expression der B-Zell-Gene, die von PAX5 und E2A direkt reguliert werden, wie z.B. CD19, lässt sich jedoch nicht mehr nachweisen. Diese Diskrepanz lässt sich nicht durch Mutationen im PAX5-Gen erklären (Schwering et al., 2003) und bleibt, ebenso wie die Ursache der deutlich geringeren Expression des PAX5 in HRS Zellen, weiter ungeklärt.

Somit ist die Frage nach den pathogenen Veränderungen in den HRS Zellen, die zum Verlust der B-Zell-Identität führen, bisher unbeantwortet. Möglicherweise trägt die aberrante Expression negativer Regulatoren der Transkriptionsfaktoren zur Inhibition der Expression B-Zell-spezifischer Gene bei. E2A wird durch direkte Interaktion mit *inhibitor of DNA binding*, ID2, negativ reguliert (Engel und Murre, 2001). ID2 gehört zur Familie der ID-Proteine und besitzt ebenso wie E2A eine bHLH-Struktur. In reifen B-Zellen, in der Plasmazell-Differenzierung, wird ID2 bei gleichzeitigem Verlust der Expression der meisten B-Zell-spezifischen Gene hochreguliert (Underhill et al., 2003). Alle ID-Proteine dimerisieren mit Transkriptionsfaktoren. Aufgrund ihrer fehlenden DNA-Bindungs-Domäne wird jedoch die Bindung der Heterodimere an die DNA verhindert und ihre transkriptionelle Aktivität inhibiert (Perk et al., 2005). Demnach kann die Interaktion von E2A mit ID2 letztendlich zu einer Inaktivierung des E2A führen. Infolgedessen wird die Transkription der Target-Gene des E2A unterbunden. Obwohl PAX5 keine HLH-Struktur aufweist, ist auch die Bindung von ID2 an überexprimiertes PAX5 gezeigt worden. (Roberts et al., 2001).

Daten aus globalen Micorarray-Genexpressionsanalysen wiesen auf eine starke Überexpression des ID2 in HRS Zellen hin. Durch immunhistochemische Untersuchungen primärer HL-Fälle sowie Immunblot-Analysen der HL-Zelllinien

konnte ID2 als aberrant exprimiertes Protein bestätigt werden. ID2 ist in normalen B-Zellen nicht ausgeprägt, konnte aber in allen untersuchten HL-Fällen als stark exprimiert detektiert werden. Aufgrund dieser Homogenität der Überexpression im Gegensatz zu anderen im HL aberrant exprimierten Markern, die jeweils nur in einem Teil der Fälle nachgewiesen werden konnten, ist ID2 für die Pathogenese des HL wahrscheinlich von großer Bedeutung.

Die Transkriptionsfaktoren E2A und HEB, auch ein HLH-Protein, das wie E2A an der B-Zell-Entwicklung beteiligt ist und dort mit diesem Dimere bildet (Zhuang et al., 1996), spielen auch in der T-Zell-Entwicklung eine Rolle. Sie sind auch hier regulatorisch an Prozessen wie Rearrangements von Antigen-Rezeptor-Genen, oder der Übernahme der Expressionsregulation beteiligt (Rothenberg et al., 2008). Wie E2A gehört auch HEB zu den E-Proteinen, die an spezifische E-Box-Sequenzen (CANNTG) in DNA-Promotoren binden können (Murre et al., 1989). Solche E-Boxen finden sich auch in *enhancer*-Regionen beispielsweise der T-Zell-Rezeptor α - und β -Loci sowie der Immunglobulin-Loci (Ernst und Smale, 1995a, b; Ho et al., 1989). Für die T-Zell-Lymphom-Entität ALCL ist der teilweise Verlust T-Zell-spezifischer Gene ähnlich des Verlusts der B-Zell-Identität im HL beschrieben worden (Bonzheim et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels immunhistochemischer Färbungen primärer ALCL-Fälle sowie durch Western Blot-Analysen der entsprechenden Zelllinien gezeigt werden, dass das Protein ID2 im ALCL ebenfalls aberrant exprimiert wird.

Durch CoIP des ID2 aus den HL- und ALCL-Zelllinien konnte eine direkte Interaktion von ID2 mit E2A nachgewiesen werden. E2A wurde unter den verwendeten Bedingungen durchschnittlich zu mehr als 50% durch ID2 gebunden (anhand der Immunblot-Analyse optisch abgeschätzt). Die Heterodimerbildung mit ID2, dem die DNA-bindende Domäne fehlt, kann letztendlich in Teilen zu einer Inaktivierung des E2A führen, indem die Bindung des E2A an die DNA verhindert wird. Demnach kann sowohl im HL als auch im ALCL die Transkription der Target-Gene des E2A unterbunden sein. Diese Ergebnisse sind mit Resultaten einer parallel publizierten Studie von Mathas und Kollegen konsistent, die ebenfalls die Interaktion von ID2 mit E2A in den HL-Zelllinien und Expression von ID2-Transkripten in primären HRS Zellen demonstrieren konnten (Mathas et al., 2006). Darüberhinaus konnten qRT-PCR-Analysen zeigen, dass die starke Expression des ID2 im Verhältnis zu der Expression der B-Zell-Transkriptionsfaktoren E2A und EBF in HL-Zelllinien zur geringen Expression B-Zell-spezifischer Gene CD19, CD79A und BLNK invers korreliert (Renné et al., 2006).

Auch im ALCL wurde die gefundene Interaktion von ID2 mit E2A inzwischen bestätigt (Cotta et al., 2008; Mathas et al., 2009).

Des Weiteren geht aus der vorliegenden Arbeit auch die Beobachtung einer Interaktion des ID2 mit HEB in den ALCL-Zelllinien und zumindest in einer der drei HL-Zelllinien hervor. Es kann daraus geschlossen werden, dass die E-Box-DNA-Bindung des HEB sowohl in den ALCL- als auch in den HL-Zelllinien durch Interaktion mit ID2 inhibiert wird. Da die Interaktion jedoch in nur einer der drei HL-Linien gefunden wurde, scheint zwischen den Linien eine gewisse Heterogenität zu bestehen. Möglicherweise binden hier bereits andere Faktoren an HEB, sodass ID2 nicht mit HEB interagieren kann.

Eine Bindung von ID2 mit PAX5 konnte in den HL-Zelllinien unter den für diese Arbeit verwendeten Bedingungen nicht nachgewiesen werden, trotzdem diese Interaktion bereits beschrieben wurde. Da die Lysebedingungen für den Nachweis der Interaktionen bei den CoIP-Experimenten entscheidend sind, wurde die Bindung von ID2 mit PAX5 möglicherweise aus technischen Gründen nicht detektiert. Allerdings fand sich die in der Literatur gezeigte Interaktion zwischen ID2 und PAX5 auch nur in Zelllinien mit überexprimierten Bindungspartnern. Mit endogenen Mengen der Proteine blieb der Nachweis dagegen bisher aus (Roberts et al., 2001). Aufgrund dieses Resultats bleibt die Frage nach der Ursache der nicht vorhandenen Expression von PAX5-Target-Genen trotz Expression des PAX5 selbst unbeantwortet.

Es bleibt festzustellen, dass ID2 im HL aberrant exprimiert wird und eine Interaktion mit HEB und E2A nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion und somit die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2A, der in reifen B-Zellen durch direkte Regulation der Expression B-Zell-spezifischer Gene zur Aufrechterhaltung des B-Zell-Phänotyps beiträgt (Mathas et al., 2006), führt im HL vermutlich zum Verlust der B-Zell-Identität. Da PAX5 durch E2A indirekt über EBF reguliert wird (Medina et al., 2004), bewirkt die ID2-vermittelte Inaktivierung des E2A im HL möglicherweise, dass PAX5 nicht länger durch E2A induziert werden kann. So könnte diese verbundene Inhibition beider Transkriptionsfaktoren (E2A und PAX5) durch ID2 zur Unterdrückung der Expression der B-Zell-spezifischen Gene beitragen. Darüber hinaus führt die Inaktivierung des E2A via EBF möglicherweise auch zu der schwächeren Expression des PAX5 im HL gegenüber normalen B-Zellen. Demnach ist vermutlich eine zusammenhängende Inaktivierung von E2A durch ID2 und indirekt von PAX5 entscheidend für den Verlust der B-Zell-Identität, und ID2 wäre demnach ein wichtiger Faktor in der Dedifferenzierung der HRS Zellen.

Im ALCL wird ID2 ebenfalls aberrant exprimiert und die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren E2A und HEB, die auch an der T-Zell-Entwicklung regulatorisch beteiligt sind, konnte gezeigt werden. Die transkriptionelle Aktivität von E2A und HEB wird somit durch ID2 möglicherweise inhibiert, das demnach eine wichtige Rolle auch in der Dedifferenzierung des ALCL spielen könnte.

4.1.1 Etablierung einer siRNA-vermittelten Herunterregulation des ID2 in HL- und ALCL-Zelllinien

Um die Funktion und Bedeutung der aberranten Expression des ID2 auf die Dedifferenzierung in HL- und ALCL-Zelllinien genauer zu analysieren, sollte ein stabiles retrovirales shRNA-Transduktionssystem etabliert werden, um ID2 mittels des Mechanismus der RNA-Interferenz in den Zelllinien herunterzuregulieren. Die retrovirale Transduktion besitzt den Vorteil der stabilen Expression der shRNA durch die Integration des für die shRNA-kodierenden Vektors in das Genom der transduzierten Zelllinien, sodass Effekte der Herunterregulation des Zielgens über einen längeren Zeitraum analysiert werden können. Zudem ist bekannt, dass sich HL-Zelllinien im Allgemeinen schlecht transient transfizieren lassen. Anfänglich wurde daher ein retroviraler Vektor pVIG verwendet, in den jeweils eine shRNA-Sequenz, die gegen ID2 gerichtet ist, unter der Kontrolle eines Polymerase III-Promotors kloniert wurde. Dieses System wurde bereits erfolgreich zur Herunterregulation von STAT6 in HL-Linien verwendet (Baus und Pfitzner, 2006) und auch die gewählten Sequenzen haben sich bereits als funktional in humanen CD34-positiven Nabelschnurblut-Vorläuferzellen (Buitenhuis et al., 2005) sowie in Neuroblastomzellen (Lasorella et al., 2005) erwiesen.

Die korrekte Platzierung der shRNA-kodierenden Oligonukleotide in den Vektor wurde durch Sequenzierung überprüft, sodass Mutationen, die zur mangelhaften Übereinstimmung mit dem Zielgen führen können, ausgeschlossen werden konnten. Transduktionseffizienzen konnten aufgrund der Expression eines GFP-Selektionsmarkers im Vektor mittels FACS bestimmt werden. Unter der Verwendung des RetroNectins[®], ein Peptid, das sowohl Zelloberflächenproteine als auch Viruspartikel binden und ko-lokalisieren und so die Transduktionswahrscheinlichkeit erhöhen kann, wurden ausreichende Transduktionseffizienzen erzielt (HL- und ALCL-Linien 60%-80%). Trotz Publikation über erfolgreiche ID2-Herunterregulation mittels der zwei verschiedenen verwendeten siRNA-Sequenzen, und obwohl die Zahl transduzierter Zellen ausreichend war, erwiesen sich beide Sequenzen in den HL-Zelllinien als ineffizient. Eine nonsense-Sequenz (*scrambled* shRNA, shSCR)

diente als Kontrolle der Spezifität der gegen ID2 gerichteten shRNA. Weder das ID2-Protein noch die ID2-mRNA konnten in ihrer Expression vermindert werden.

Die Ursache hierfür könnte in einer unzureichenden Prozessierung durch den RISC begründet sein, denn die Zahl der RISC-Komponenten variiert je nach Zellart (Engels und Hutvagner, 2006) und kann für die Wirksamkeit der siRNA essentiell sein. Demgegenüber zeigt jedoch die erfolgreiche Herunterregulation des STAT6 in den HL-Linien (Baus und Pfitzner, 2006) die Prozessierung durch eine ausreichende Anzahl an RISC-Komponenten. Somit ist eine shRNA-vermittelte Herunterregulation in HL-Zelllinien generell möglich. Der grundlegende Unterschied, der in den verwendeten Zellarten im Vergleich zur bestehenden Literatur (Buitenhuis et al., 2005; Lasorella et al., 2005) liegt, könnte ebenfalls ursächlich am Misserfolg der Herunterregulation des ID2 in den HL- und ALCL-Zelllinien beteiligt sein. So kann die siRNA womöglich nicht an ihre entsprechende mRNA binden, da der Zielbereich an Proteine gebunden vorliegt oder durch sekundäre Strukturen nicht zugänglich ist (Tomari und Zamore, 2005). Darüber hinaus wurden in einer der beiden Arbeiten, nach der die Sequenzen gewählt wurden, kleine siRNA-Oligonukleotide direkt transfiziert (Lasorella et al., 2005). Werden die Sequenzen stattdessen als shRNA mittels eines Vektors in die Zellen transduziert, können sie dadurch möglicherweise ineffizient werden.

Die Verwendung eines neuen Typs lentiviraler Vektoren, pGIPZ, bei dem die gewünschte shRNA in ein primäres mikroRNA-Transkript eingebettet ist, und die eigentliche mikroRNA-Sequenz durch die Gen-spezifische shRNA-Sequenz ersetzt wurde, sollte die Effektivität der Prozessierung durch die Enzyme DROSHA und DICER erhöhen. Die Zahl der siRNA-Moleküle sollte folglich vermehrt werden und den *knockdown* verstärken. So konnte für schlecht herunterregulierbare Gene eine um das zehnfach bessere *knockdown*-Effektivität erreicht werden (Silva et al., 2005). Dieses System stellte eine Alternative zur Verwendung des pVIG-Systems dar. Trotz Kombination verschiedener Verpackungsplasmide, die für die Verwendung des pGIPZ Vektors empfohlen wurden, und solcher, die bei dem pVIG-System bereits Verwendung fanden, konnten die Transduktionseffizienzen mit dem lentiviralen pGIPZ Vektor weder in den HL- noch in den ALCL-Zelllinien durchschnittlich 30% übersteigen.

Solch geringe Transduktionseffizienzen können auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden: In den letzten Jahren konnten Barrieren auf verschiedenen Ebenen der Infektion identifiziert werden. Eine solche Barriere verhindert beispielsweise die effiziente Transkription des Provirus und wird als Post-

Integrationsblock bezeichnet. Dieser scheint jedoch im HL zumindest keine regelmäßige Rolle zu spielen, da die Expression des GFP-Selektionsmarkers gut nachweisbar ist. Des Weiteren spricht auch hier die erfolgreiche Herunterregulation des STAT6 in den HL-Linien gegen diese Möglichkeit. Ein als Prä-Integrationsblock bezeichneter Mechanismus konnte bei der Infektion von hämatopoetischen Stammzellen detektiert werden (Beck-Engeser et al., 1991). In diesen Zellen konnte trotz ausreichender Infektion mit einer Virensuspension mit hohem Titer kein integrierter Provirus nachgewiesen werden. Dabei beruht der Prä-Integrationsblock möglicherweise auf einer insuffizienten Bindung des viralen Hüllproteins an zelluläre Rezeptoren, auf einer behinderten Penetration des Virus in die Zelle oder einer unzureichenden reversen Transkription. Da sich jedoch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Hüllprotein unter der Verwendung des pVIG-Transduktionssystems bereits als funktional erwiesen hat, spielt hier auch der Prä-Integrationsblock eher keine Rolle.

Im Allgemeinen besteht bei Erreichen von niedrigen Transduktionseffizienzen und bei Verwendung eines Vektors, der den GFP-Selektionsmarker exprimiert, die Möglichkeit die Zellen mittels FACS hinsichtlich GFP-positiver Zellen zu sortieren, um eine Population aus nahezu 100% transduzierter Zellen zu erhalten. Um den Effekt einer eventuellen Herunterregulation nachweisen und untersuchen zu können, wurden daher die transduzierten Zellen der ALCL- und HL-Linien im FACS Aria Cell-sorting System bezüglich GFP-positiver und somit infizierter Zellen sortiert. Für die sortierten Zellen der ALCL-Zelllinie SU-DHL-1, die mit dem pGIPZ Vektor transduziert wurden, der eine shRNA gegen die Positivkontrolle GAPDH ausprägt, konnte so 48 Stunden nach der Transduktion eine verminderte Expression des GAPDH-Proteins mittels Western Blot nachgewiesen werden. Eine *scrambled* shRNA (shSCR) diente als Kontrolle der Spezifität der gegen GAPDH gerichteten shRNA. Für die HL-Zelllinien stand die Sortierung technisch bedingt nicht zur Verfügung. Die Zellen dieser Linien sind im Durchmesser im Vergleich zu den Zellen der ALCL-Linien groß, sodass der Durchmesser der Düse des FACS-Gerätes größer hätte sein müssen, um die entstandene Beschädigung der Zellen durch Scher- und Reibungskräfte während des Sortierprozesses zu verhindern. Ein Austausch der Düse war nicht möglich, sodass sich unter diesen Bedingungen das Sortieren aufgrund der Schädigung der Zellen für eine weitere Analyse der HL-Zelllinien nicht eignete.

Eine Publikation von Flavell und Kollegen aus dem Jahr 2008 zeigte die Herunterregulation des Protein Tyrosinphosphatase-Rezeptors K in der HL-Zelllinie

KM-H2 nun doch durch transiente Transfektion synthetischer siRNA-Oligonukleotide unter Verwendung des neu auf den Markt gekommenen RiboJuice siRNA Transfektionsreagenzes (Flavell et al., 2008). Aufgrund dessen und der Schwierigkeiten bei der lentiviral-vermittelten Gen-Herunterregulation, wurde im Folgenden das System zur transienten Transfektion der HL- und ALCL-Zelllinien mittels RiboJuice siRNA Transfektionsreagenz etabliert. Um hier die Transfektionseffizienzen mittels FACS messen zu können, wurde eine fluoreszenzmarkierte *scrambled* siRNA, die keine Homologie zum menschlichen Genom besitzt, verwendet. Es konnten für alle mit dieser siSCR transfizierten Zellen hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden (Tabelle 3, 87%-100%). Durch Messung im FACS kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide an der Zelloberfläche adsorbieren, oder ob sie tatsächlich in die Zelle aufgenommen werden. Nur eine dreidimensionale Darstellung mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie erlaubt darüber eine Beurteilung und so konnte in dieser Arbeit eine Anhaftung der siSCR außerhalb der Zelle ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Nach einer Reihe weiterer Experimente, die der Etablierung optimaler Transfektionsbedingungen für die sieben verschiedenen siRNA-Oligonukleotide (entworfen und synthetisiert von den Firmen Ambion und Qiagen) dienten, wurde festgestellt, dass nach 48 Stunden der Effekt einer Herunterregulation auf Proteinebene mit zwei bzw. drei der siRNA-Oligonukleotide der Firma Ambion am prägnantesten war (durchschnittlich ca. 50% optisch abgeschätzt). Erste Effekte waren in einigen Fällen bereits nach 24 Stunden zu beobachten, nach 72 Stunden konnten größtenteils wieder ursprüngliche Proteinmengen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Veränderungen der Proteinmengen waren spezifisch, da Zellen, die mit einer siSCR transfiziert wurden, zu keinem Zeitpunkt Änderungen der üblichen Mengen des ID2-Proteins zeigten. Eine Herunterregulation der ID2-mRNA konnte nicht nachgewiesen werden, sodass die Regulation des ID2 durch RNAi in diesem Fall durch Blockade der Translation stattfand. Berücksichtigt man die Wirkungsweise der siRNA, so ist dies durchaus möglich und erklärbar. SiRNA binden an ihre Ziel-mRNA und degradieren sie, was zur nachweislichen Reduktion der mRNA führen würde, oder sie unterbinden die Translation in entsprechende Proteine ohne die Menge an mRNA zu beeinflussen oder beides. Im Umkehrschluss ist eine Reduktion auf RNA-Ebene ohne verminderte Proteinexpression denkbar, sollte die Inhibition der mRNA zu kurz, die Halbwertszeit des Proteins zu lang sein oder die Effizienz der Translation durch die Zelle gesteigert werden.

Insgesamt ist eine stabil reproduzierbare Herunterregulation mittels transienter Transfektion verschiedenen Einflüssen gegenüber störanfällig. Beispielsweise spielt die Zahl der Zell-Passagen vor der Transfektion, bei denen die Zellsuspensionen mit frischem Zellkulturmedium verdünnt wurden, eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Herunterregulation, wobei nicht mehr als 15 Passagen vor der Transfektion durchgeführt worden sein sollten. Auch die Beschaffenheit der verwendeten Materialien, beispielsweise verschiedene Kunststoffarten der verwendeten Zellkulturplatten oder Reaktionsgefäße, hat ebenso einen Einfluss wie die Behandlung der siRNA. Trotz deren Kürze neigen sie zur Degradation.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein transientes Transfektionssystem zur siRNA-vermittelten Gen-Herunterregulation in den HL- und ALCL-Zelllinien etabliert werden und ID2 auf Proteinebene signifikant herunterreguliert werden.

4.1.2 Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf den Phänotyp des HL

Ziel der siRNA-vermittelten Herunterregulation des ID2 in den HL-Zelllinien war die weiterführende Analyse des Einflusses von ID2 auf den Phänotyp der HRS Zellen. Aufgrund bereits bekannter Datenlage bzw. eigener Untersuchungsergebnisse lag die Vermutung nahe, dass ID2 die Expression bzw. Funktionsweise der B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren und damit auch die B-Zell-spezifische Genexpression beeinflusst. Durch die Interaktion und somit wahrscheinliche Inaktivierung des E2A durch ID2 kommt es unmittelbar zum Verlust der Regulation B-Zell-spezifischer Gene. Darüber hinaus wird PAX5 zusammen mit EBF durch E2A induziert (Medina et al., 2004). So führt die ID2-vermittelte Inaktivierung des E2A vermutlich dazu, dass via EBF auch die Regulation von PAX5 beeinflusst wird. PAX5 spielt bei der Differenzierung eine duale Rolle, denn es aktiviert nicht nur B-Zell-spezifische Gene wie BLNK, Ig α und CD19 (Nutt et al., 1999b), sondern es unterdrückt auch die Gene anderer Linien, wie den T-lymphoide Linien begünstigenden Faktor Notch-1 oder den myeloiden Zytokin-Rezeptor M-CSF-R (Souabni et al., 2002). Demnach könnte ID2 auch an der Expression von nicht B-Zell-spezifischen Genen im HL beteiligt sein.

Daher wurden Zellen der HL-Linien, in denen die Proteinmenge an ID2 durch siRNA vermindert war, 48 Stunden nach der Transfektion zunächst auf die Expression von E2A, PAX5 sowie EBF untersucht. Ebenfalls analysiert wurde die Expression deren Zielgene CD19 bzw. CD79A.

Aufgrund bisheriger Erkenntnisse war zu erwarten, dass einer ID2-Expressionsminderung nachfolgend die B-Zell-spezifischen Gene möglicherweise re-exprimiert werden, wenn deren regulierender Transkriptionsfaktor E2A nicht länger durch ID2 inhibiert würde. Es konnte allerdings keine Induktion weder der B-Zell-Gene noch der B-Zell-Transkriptionsfaktoren nach Transfektion mit einer siID2 detektiert werden, obwohl deren Effektivität mittels Western Blot-Analyse überprüft und die Spezifität durch die Verwendung zweier verschiedener siRNA-Oligonukleotide sowie der Negativkontrolle (*scrambled* siRNA) verifiziert wurde.

Da angenommen wird, dass die einer ID2-Herunterregulation nachfolgende Beeinflussung der Expression der B-Zell-Gene in kürzester Zeit erfolgt, kann der Zeitpunkt der Expressionsanalyse als Ursache der nicht detektierten Änderungen in der Expression der untersuchten Proteine weitestgehend ausgeschlossen werden. Zudem konnte auch in der Zelllinie, in der sich schon nach 24 Stunden eine ID2-Herunterregulation zeigte, nach 48 Stunden keine Änderung der Proteinexpression der B-Zell-Gene nachgewiesen werden.

Die Ursache liegt zum einen vermutlich in der nicht vollständigen Herunterregulation des ID2 (ca. 50% optisch abgeschätzt), sodass die verbleibende Existenz von komplexierenden E2A-ID2-Bindungen noch immer zur Inhibition der E2A-vermittelten Genexpression führen würde. Diese Vermutung ist auch dadurch begründet, dass in Zellen der HL-Linien nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von ABF-1, einem bHLH-Protein mit einer Transkriptions-reprimierenden Domäne, noch immer E2A-ABF-1-Komplexe identifiziert werden können (Mathas et al., 2006). Zum anderen konnte für ABF-1 im HL eine Funktion als transkriptioneller Repressor zumindest in Bezug auf die Funktion des E2A (nicht auf die des EBF) gefunden werden (Mathas et al., 2006). So besteht die Inhibition des E2A nicht nur durch ID2, sondern möglicherweise auch noch durch Komplexbildung mit ABF-1. Ferner führten Transfektionen von ID2 und ABF-1 als Inhibitoren des E2A, mit dem Ziel einen Einfluss auf die Expression endogener B-Zell-spezifischer Gene zu detektieren, zu dem Resultat, dass ABF-1 alleine nur ein moderates Absinken der Genexpression zur Folge hat. Dagegen führt ID2 alleine sowie in Kombination mit ABF-1 zu einer deutlichen Reduktion in der Ausprägung dieser Gene (Mathas et al., 2006).

Die Aktivität von E2A wird allerdings nicht nur durch ID2 und ABF-1 gehemmt. Auch Notch-1, ein T-Zell-Transkriptionsfaktor, der von HRS Zellen exprimiert wird (Jundt et al., 2002), ist dazu in der Lage. Notch-1 kann PAX5 binden, was in HL-Zelllinien durch CoIP-Experimente nachgewiesen werden konnte (Jundt et al., 2008). In jener Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass Notch-1 das Netzwerk der

Transkriptionsfaktoren stören kann, indem es die transkriptionelle Herunterregulation von E2A und EBF bewirkt. Darüber hinaus antagonisiert Notch-1 E2A durch Induktion dessen Inhibitors ABF-1. So trägt Notch-1 zur Supprimierung der B-Zell-Gene sowie zur Expression von Genen anderer hämatopoetischer Linien bei.

Am Verlust der B-Zell-Identität ist auch die aberrante DNA-Methylierung beteiligt (Doerr et al., 2005; Ushmorov et al., 2006). Demnach sollen DNA-Hypermethylierungen in Promotoren verschiedener B-Zell-Gene die Bindung der B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren verhindern und somit die Expression der entsprechenden Zielgene unterdrücken. Eine aktuelle Publikation aus dem Jahr 2008 von Ehlers und Kollegen konnte diese Hypothese durch genauere Analysen im Hinblick auf ihre Bedeutung für den HL-Phänotyp relativieren. Weder durch Demethylierung der Zellen der HL-Linien mit 5-Azadeoxycytidin alleine noch in Kombination mit der Acetylierung durch den Histondeacetylase-Hemmer Trichostatin A (TSA) konnte die Expression B-Zell-spezifischer Gene reaktiviert werden (Ehlers et al., 2008).

Aufgrund des epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung und der Beteiligung weiterer Faktoren, wie z.B. ABF-1 und Notch-1, die an dem Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene der HRS Zellen mitwirken, ist möglicherweise eine Re-Expression dieser Gene nur aufgrund der Herunterregulation eines einzelnen Faktors, in diesem Fall des ID2, nicht möglich. Eine gemeinsame Herunterregulation von ID2 zusammen mit ABF-1 oder Notch-1 könnte gegebenenfalls neue Erkenntnisse hinsichtlich ihrer synergistischen Beteiligung an der Inhibition von E2A bringen.

ID2 ist vermutlich nicht nur am Verlust der Expression von B-Zell-spezifischen Genen beteiligt, sondern auch an der Expression von Genen anderer Linien wie GATA-3 oder der Makrophagen assoziierte CSF-Rezeptor. Da es die Aktivität des E2A in HRS Zellen inhibiert, kommt es möglicherweise zu ähnlichen Effekten wie in E2A-defizienten lymphoiden Vorläuferzellen, die in der Lage sind, in verschiedene andere Linien zu differenzieren (Ikawa et al., 2004). Daher wurde als nächstes die Expression von GATA-3 und M-CSF-R, ebenso wie die der B-Zell-Gene zuvor, nach siRNA-vermittelter Herunterregulation des ID2-Proteingehalts durch Immunblot-Analyse überprüft. Auch hier zeigte sich kein Einfluss des ID2 bezüglich der Expression dieser Proteine. Wie bereits die Ursachen der fehlenden Änderung der Expression der B-Zell-spezifischen Gene diskutiert wurden, so kann auch die fehlende Änderung in der Expression von GATA-3 und M-CSF-R erklärt werden, mit

Ausnahme der möglichen DNA-Methylierung der beiden Proteine. Den Zusammenhang zwischen E2A und M-CSF-R bzw. GATA-3 untersuchten auch Mathas und Kollegen, die mit der Transfektion eines E2A-Dimer-Konstrukts die Expression eines aktiven E2A-Dimers in HL-Zelllinien imitiert haben. Tatsächlich konnten sie eine Herunterregulation des GATA-3 sowie des M-CSF-R in den HL-Zelllinien L1236 und L428 nachweisen. Des Weiteren konnte nach Herunterregulation des ABF-1 als Inhibitor des E2A mittels siRNA in der HL-Zelllinie L428 eine deutliche Verminderung der Expression des M-CSF-R ebenso wie eine moderate Reduktion des GATA-3 festgestellt werden. Allerdings wurden die Herunterregulationen nur auf RNA-Ebene nachgewiesen (Mathas et al., 2006).

Die Expression des GATA-3 wird in HRS Zellen darüber hinaus nicht nur durch E2A bzw. ID2 beeinflusst. Die Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription 5A* und *5B* (STAT5A und STAT5B) wurden ebenfalls als in die Deprogrammierung der HRS Zellen involvierte Faktoren identifiziert. Beide sind in HRS Zellen aktiv. Es konnte in normalen B-Zellen gezeigt werden, dass die Expression von konstitutiv aktivem STAT5A und STAT5B einen Phänotyp induziert, der den HRS Zellen ähnelt, wie beispielsweise die Hochregulation von CD30 und GATA-3 (Scheeren et al., 2008). Demzufolge könnte GATA-3 trotz verminderter ID2-Expression nicht nur durch die andauernde Inaktivierung des E2A durch ABF-1 bzw. Notch-1, sondern auch durch die konstitutive STAT-Expression weiterhin nachweisbar sein. Auch hier besteht darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit der multifaktoriellen Regulation des GATA-3, sodass die, wenn gleich auch deutliche Herunterregulation des ID2 von ca. 50% nicht ausreicht, um die Expression des GATA-3 zu beeinflussen.

Auch wenn in Folge der RNAi-vermittelten Herunterregulation von ID2 in den HL-Linien weder eine Re-Expression B-Zell-spezifischer Gene noch eine Beeinflussung der Expression Marker anderer hämatopoetischer Linien gefunden werden konnte, lassen sowohl die aberrante ID2-Expression als auch die durch Interaktion vermittelte Inhibition der transkriptionellen Aktivität des E2A durch ID2, dennoch weiter eine wichtige Rolle des ID2 in der Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL vermuten.

4.1.3 Einfluss der herunterregulierten ID2-Proteinexpression auf den Phänotyp des ALCL

Bonzheim und Kollegen konnten zeigen, dass ALCL weder T-Zell-Rezeptormoleküle noch TCR-assoziierte Moleküle wie ZAP70 und CD3 exprimieren (Bonzheim et al.,

2004). Dies ähnelt dem Verlust der BCR-Genexpression im HL. Da beim HL die aberrante ID2-Expression durch Inaktivierung des E2A eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist, und ALCL wie gezeigt ID2 ebenfalls aberrant exprimieren, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier ID2 möglicherweise die Expression der TCR-assoziierten Gene beeinflusst. Verstärkt wird diese Vermutung durch die nachgewiesene Interaktion zwischen ID2 und E2A in den ALCL-Zelllinien, die wahrscheinlich ebenfalls zur Inaktivierung des E2A führt.

Deshalb sollten ALCL-Zelllinien, in denen die Proteinexpression von ID2 erfolgreich mittels siRNA vermindert wurde, hinsichtlich der Expression T-Zell-spezifischer Gene untersucht werden. Mittels Western Blot wurde der Einfluss des ID2 wie bei den HL-Linien auf die Expression von ZAP70 und CD3 analysiert. Trotz prägnanter Herunterregulation des ID2 auf Proteinebene in den ALCL-Zelllinien Karpas299 und SU-DHL-1 mit zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen, konnte eine Veränderung in der Proteinexpression weder von ZAP70 noch von CD3 beobachtet werden. Sollten CD30 und ZAP70 tatsächlich von ID2 reguliert werden, könnte zum einen die unvollständige Herunterregulation des ID2-Proteins, die bereits beim HL als Ursache für die unveränderte Expression der B-Zell-Gene diskutiert wurde, eine Rolle für die gleichbleibende Expression von ZAP70 bzw. CD3 spielen. Auch besteht hier wieder die Möglichkeit, dass die Funktion des ID2 durch andere Faktoren ersetzt oder ergänzt wird. Mathas und Kollegen konnten jedoch in ihrer Arbeit aus 2009 durch Überexpression des ID2 in der T-Zell-Leukämie-Zelllinie Molt-14 eine ID2-vermittelte Reduktion der Expression einiger T-Zell-assoziiierter Gene wie CD3E, das für die konstante Region des T-Zell-Rezeptors β kodiert, zeigen (Mathas et al., 2009). Allerdings handelt es sich bei den verwendeten Leukämie-Zelllinien um frühe T-Zelllinien, während die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ALCL-Linien von reifen T-Zellen abstammen und sich somit deutlich unterscheiden.

Um den Einfluss des ID2 auf den Phänotyp des anaplastisch großzelligen T-Zell Lymphoms weiterführend zu untersuchen, wurden von Zellen der ALCL-Zelllinien, in denen die Proteinexpression des ID2 erfolgreich mittels siRNA-Transfektion vermindert wurde, globale Genexpressionsprofile erstellt. Dazu wurden zwei ALCL-Zelllinien, Karpas299 und SU-DHL-1, mit zwei verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden, die gegen ID2 gerichtet sind, transient transfiziert und Genexpressionsprofile erstellt. Ebenso wurden von den beiden Zelllinien, die mit einer *scrambled* siRNA transfiziert worden sind und ein normales Level der ID2-Expression aufweisen, Profile erstellt. Durch Vergleiche der erstellten Profile sollten die Gene, auf deren Expression ID2 Einfluss hat und die demzufolge differentiell

exprimiert werden, bestimmt werden. Unter Standard-Filterkriterien $-5 \leq FC \leq 5$, p-Wert $\leq 0,05$ fand sich nur eine erstaunlich geringe Anzahl differentiell exprimierter Gene. Es gab jedoch bis auf die Ausnahme eines Arrays keinen Hinweis auf technische Mängel dieser Genexpressionsanalyse. Die *Present calls* waren für alle Proben vergleichbar (durchschnittlich 35%) bis auf die Ausnahme einer der beiden Arrays Karpas299, die mit siID2#07 transfiziert wurde (*Present call* 26,5%), weshalb bei ihrer Analyse der p-Wert als wenig aussagekräftig vernachlässigt wurde. Des Weiteren konnte ID2 in den Microarray-Analysen auch auf RNA-Ebene als herunterreguliert gefunden und mittels qRT-PCR bestätigt werden, sodass die Ergebnisse dennoch als valide bezeichnet werden können.

Daher wurden als nächstes 16 weitere Gene zur Validierung mittels qRT-PCR ausgewählt, die in zwei oder mehr Vergleichen differentiell exprimiert wurden. Mittels quantitativer RT-PCR konnte nur ein einziges Gen, RRAD, als signifikant hochreguliert bestätigt werden. Es ist erstaunlich und nicht leicht zu begründen, weshalb trotz prägnanter Verminderung der ID2-Expression in den analysierten Zelllinien beinahe alle Gene in ihrer Expression unbeeinflusst blieben. Möglicherweise wird die Funktion des ID2 sehr effektiv von einem anderen Faktor wie ID1 oder ID3 übernommen, sodass beispielsweise E2A trotz nicht vorhandenem ID2 weiterhin inhibiert wird. Darüber hinaus wurden aufgrund der Tatsache, dass die Genexpressionsanalyse nur zum Zeitpunkt von 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte, möglicherweise differentiell regulierte Gene mit langer mRNA-Halbwertszeit nicht detektiert. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass nur eine Herunterregulation des ID2 in den ALCL-Zelllinien erzielt wurde, und kein vollständiger *knockdown* des Gens, sodass das wenn auch geringe, aber vorhandene restliche ID2 ausreichen könnte, die normale Funktion zu erhalten.

RRAD wurde mittels qRT-PCR als differentiell hochreguliertes Gen bestätigt. Dies konnte auch in einem unabhängig durchgeführten dritten Experiment, bei dem ID2 in einer der beiden ALCL-Linien, Karpas299, nochmals herunterreguliert wurde, belegt werden. Es handelt sich bei RRAD um das Gen *Ras-related associated with diabetes GTPase*, welche in Muskeln Typ II diabetischer Patienten sowie in Herz und Lunge exprimiert wird (Reynet und Kahn, 1993). RRAD ist in Fällen von Brusttumoren sowie entsprechenden Zelllinien hoch exprimiert, wenn es sich um hochgradige, großzellige und metastasierende Tumore handelt, weshalb dem Gen eine onkogene Eigenschaft zugesprochen wird (Tseng et al., 2001). Ein Zusammenhang mit ID2 ist, in allerdings weitem Sinne, tatsächlich in der Literatur einmal dahingehend hergestellt worden, als dass ID2-mRNA in den Muskeln von

Mäusen mit Typ II Diabetes als überexprimiert gefunden worden ist (Vicent et al., 1998).

Als nächstes sollte die Proteinexpression des RRAD in primären ALCL-Fällen immunhistochemisch untersucht werden, ebenso wie in den ALCL-Zelllinien mittels Immunblot-Analyse. Eine Untersuchung der RRAD-Proteinexpression konnte jedoch nicht erfolgen, da sich weder eine spezifische Bande im Western Blot nachweisen noch eine spezifische immunhistochemische Färbung etablieren ließ, trotz der Verwendung verschiedener Antikörper unter Berücksichtigung verschiedener experimenteller Bedingungen. Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass in RRAD betreffenden Publikationen die immunhistochemischen Färbungen und Immunblot-Analysen mittels eines von der Arbeitsgruppe um C.R. Kahn etablierten Antikörpers durchgeführt wurden, der nicht zur Verfügung gestellt wurde (Reynet und Kahn, 1993).

In Folge der RNAi-vermittelten Herunterregulation von ID2 im ALCL konnte nur ein Gen, RRAD, auf RNA-Ebene als differentiell exprimiert bestätigt werden. Demnach bleibt die Frage nach dem möglichen Einfluss des aberrant exprimierten ID2 hinsichtlich der Dedifferenzierung im ALCL weiter offen.

4.2 Einfluss des ID2 auf die Regulation des Zellzyklus im HL und ALCL

ID-Proteine sind auch in die positive Regulation der Zellproliferation, der Inhibition der Differenzierung sowie der Regulation der Apoptose involviert (Barone et al., 1994; Desprez et al., 1995; Kreider et al., 1992). Daher schien es interessant, die Frage nach Funktionen des ID2 im HL, unabhängig von der Rolle in der Dedifferenzierung der HRS Zellen, genauer zu untersuchen.

Es bestehen drei mögliche Zusammenhänge zwischen ID2 und der Regulation des Zellzyklus, die in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf das HL untersucht wurden: ID2 beeinflusst zum einen die Expression negativer Regulatoren des Zellzyklus via E2A (Prabhu et al., 1997), zum anderen ist eine direkte Interaktion des ID2 mit RB, einem Schlüsselfaktor in der Regulation des Zellzyklusverlaufs, gezeigt worden (Lasorella et al., 1996). Des Weiteren interagiert ID2 mit HEF1, einem bHLH-Protein, das durch Aktivierung der Aurora Kinase 1 ebenfalls an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Law et al., 1999). ID2 beeinflusst im HL daher möglicherweise nicht nur die Expression B-Zell-spezifischer Gene sowie Gene anderer hämatopoetischer Linien, sondern auch die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind.

Prabhu und Kollegen beschrieben in einer Publikation aus dem Jahre 1997, dass ID2 via E2A den Verlauf des Zellzyklus beeinflusst. Demnach inhibiert ID2 E2A, welches dadurch die Expression des negativen Zellzyklusregulators p21^{Cip1} nicht induzieren kann. Somit zieht eine Überexpression des ID2 ein Fortschreiten des Zellzyklus nach sich (Prabhu et al., 1997). Bezogen auf das HL könnte dieser Zusammenhang möglicherweise die starke Expression Proliferations-assoziiierter Gene sowie die eher schwache Expression des p21^{Cip1} in HRS Zellen erklären. Auch p16^{INK4a} wird durch ID-Proteine, die mit E2A interagieren und so die E2A-vermittelte Gentranskription verhindern, inhibiert (Zheng et al., 2004). Rothschild und Kollegen konnten in Neuroblastomzellen p57^{Kip2}, das für den Zellzyklusarrest essentiell ist, als Target von E2A identifizieren und in Übereinstimmung mit der E2A-inaktivierenden Rolle des ID2 belegen, dass ID2 die Expression des p57^{Kip2} verhindert (Rothschild et al., 2006). In den Promotorsequenzen von p15^{INK4b} konnten E-Box-Sequenzen gefunden werden, die Target-Sequenzen unter anderem für den Transkriptionsfaktor E2A repräsentieren (Pagliuca et al., 2000).

Demnach sollte ein möglicher Bezug der aberranten Expression des ID2 zu der Expression der negativen Zellzyklusregulatoren p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p21^{Cip1} sowie p57^{Kip2} in den HL-Zelllinien untersucht werden. Da ID2 auch im ALCL aberrant exprimiert wird und so eine möglicherweise ähnliche Rolle in der Pathogenese spielt, sollten die entsprechenden Zelllinien auch in dieser Untersuchungsreihe berücksichtigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Zellen der HL-Zelllinien KM-H2 und L1236, in denen die ID2-Proteinexpression durch transiente Transfektion mit siID2-Oligonukleotiden reduziert worden war, auf die Expression der Proteine p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p21^{Cip1} sowie p57^{Kip2} mittels Immunblot untersucht. Ebenso wurde mit den ALCL-Zelllinien SU-DHL-1 und Karpas299 verfahren. Aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge wurde erwartet, dass die den Zellzyklus regulierenden Proteine durch möglicherweise reaktiviertes E2A vermehrt exprimiert werden.

In keiner der beiden ALCL-Zelllinien konnte ein Einfluss des ID2 auf die Expression der negativen Zellzyklusregulatoren beobachtet werden. E2A wird in den ALCL-Linien nachweislich durch ID2 inhibiert und somit wird die DNA-Bindungsaktivität des E2A möglicherweise reduziert. Dennoch scheint ID2 in diesen Linien die Expression negativer Zellzyklusregulatoren nicht via E2A zu beeinflussen und ist daher vermutlich auf diese Weise nicht an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt.

Diese Rolle übernimmt einer Arbeit von Leventaki und Kollegen zufolge unter anderem JNK/cJun, das durch die onkogene NPM-ALK Kinase aktiviert wird

(Leventaki et al., 2007). Durch diese Aktivierung kommt es zur Herunterregulation von p21^{Cip1} als Target von cJun und folglich zum Fortschreiten des Zellzyklus. Auch die Stimulation von CD30, einem Mitglied der Familie der TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), kann im ALCL zur Induktion eines antiproliferativen Effekts führen. Der Mechanismus zur Regulation des Zellzyklus via CD30-Stimulation in Karpas299-Zellen zeigt eine starke Hochregulation des p21^{Cip1} und führt so zu einer Induktion eines Zellzyklusarrests (Hubinger et al., 2001).

Bezüglich der HL-Linien ließ sich keine Veränderung der p16^{INK4a}-, p15^{INK4b}- sowie p57^{Kip2}-Proteinlevel nach siRNA-vermittelter ID2-Proteinreduktion erkennen. Möglicherweise greifen hier die gleichen Erklärungen wie für die fehlende Re-Expression der B-Zell-spezifischen Gene. E2A ist wahrscheinlich noch immer durch ABF-1 bzw. Notch-1 komplexiert und somit in der Funktion gehemmt. Zudem werden vermutlich auch die Regulatoren des Zellzyklus multifaktoriell reguliert, sodass möglicherweise die Reduktion des ID2-Proteins allein nicht ausreichen kann, um die CDKI in ihrer Expression zu beeinflussen. Des Weiteren wurde schon bei der nicht beobachtbaren Änderung der Expression B-Zell- und nicht-B-Zell-spezifischer Gene infolge der verminderten ID2-Proteinexpression als mögliche Ursache diskutiert, dass mittels siRNA nur eine Herunterregulation des Proteins erreicht wird, nicht jedoch ein vollständiger *knockdown* des Gens. Somit könnte restlich vorhandenes ID2 möglicherweise durchaus reichen, um dessen Funktionen aufrechtzuhalten.

Für die Expression des Proteins p21^{Cip1} infolge verminderter ID2-Expression ergab sich in den HL-Zelllinien ein überraschendes Resultat. Entgegen der Erwartung, dass eine Verminderung der ID2-Expression eine E2A-vermittelte Hochregulation des p21^{Cip1} nach sich ziehen würde, konnte eine deutlich spezifische Herunterregulation des p21^{Cip1} durch zwei verschiedene Oligonukleotid-Sequenzen in beiden untersuchten HL-Zelllinien KM-H2 und L1236 beobachtet werden.

Möglicherweise wirkt E2A im HL daher nicht aktivierend, sondern durch Interaktion mit anderen Faktoren reprimierend. Denkbar ist statt einer direkten Bindung des E2A an den Promotor des p21^{Cip1}, auch eine über Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren indirekte Interaktion zwischen E2A und p21^{Cip1} im HL. Die Rolle des p21^{Cip1} als mögliches ID2-Target im HL wird später diskutiert.

Des Weiteren schien es interessant, die mögliche Interaktion des ID2 mit RB, dem zur Familie der Pocket-Proteine gehörenden Schlüsselregulator des Zellzyklusverlaufs, in den HL-Zelllinien zu analysieren. Lasorella und Kollegen fanden diese Interaktion durch CoIP und konnten so zeigen, dass ID2 RB inaktiviert und somit dessen Zellzyklus-inhibierenden Effekt vermindert (Lasorella et al., 1996).

In den HL-Zelllinien konnte eine Interaktion von ID2 mit RB mittels CoIP nicht nachgewiesen werden.

Zum einen kommen hierfür technische Ursachen in Frage, denn die Lyse der Zellen ist ein kritischer und entscheidender Schritt für eine erfolgreiche CoIP. Die Möglichkeit, dass die Bindung von ID2 mit RB durch zu harsche Lysereagenzien zuvor gelöst wurde, kann daher nicht ausgeschlossen werden, zumal keine Positivkontrolle verwendet wurde. Zum anderen konnten auch Smialowski und Kollegen die Interaktion zwischen ID2 und RB nicht nachweisen. Die Gruppe untersuchte aufgereinigte Proteine mittels verschiedener biophysikalischer und biochemischer Methoden, unter anderem mittels Massenspektrometrie, auf in der Literatur bereits beschriebene Interaktionen verschiedener Proteine und konnte einige dieser Interaktionen bestätigen, andere widerlegen. Trotz dieses Multi-Methodenspektrums fanden sie keine direkte Wechselwirkung des ID2 mit RB (Smialowski et al., 2005).

Daraus lässt sich schließen, dass ID2 als Zellzyklusregulator via Inaktivierung des RB in HRS Zellen keine oder nur eine äußerst geringe Rolle zukommt. Offensichtlich wird RB im HL primär von anderen Faktoren reguliert.

HEF1 ist ein weiterer, möglicherweise durch ID2 beeinflusster Faktor. Law und Kollegen konnten in einer Arbeit aus dem Jahre 1999 zeigen, dass der C-Terminus des HEF1 eine Helix-loop-Helix-Domäne umfasst und infolgedessen in der Lage ist, mit anderen Proteinen dieser Struktur, beispielsweise ID2, zu interagieren (Law et al., 1999). HEF1 gehört zu einer Familie von *multidomain docking* Proteinen und spielt eine zentrale koordinierende Rolle in der Tyrosinkinase-basierenden Signalgebung bezüglich der Zelladhäsion und Differenzierung. HEF1 ist ein Aktivator der Aurora Kinase 1 (Pugacheva und Golemis, 2005). Aurora Kinase 1 phosphoryliert nach Aktivierung Gene, die den Ablauf der Mitose begünstigen (Marumoto et al., 2005). Eine der wichtigsten Funktionen der Aurora Kinase 1 ist die im Zentrosom stattfindende Aktivierung des CyclinB/CDK1-Komplex. Sie ist folglich in die Regulation des Zellzyklus involviert (Hirota et al., 2003). Die fehlende Aktivierung der Aurora Kinase 1 führt zum Arrest der G2-Phase bzw. zum gestörten Eintritt in die Mitosephase sowie zu Fehlern in der Anordnung der Chromosomen (Glover et al., 1995; Marumoto et al., 2003). In den letzten Jahren ist die Aurora Kinase aufgrund ihrer viel beobachteten Überexpression in verschiedenen Tumoren mit der Tumorgenese in Zusammenhang gebracht und als onkogen beschrieben worden (Bischoff et al., 1998; Goepfert et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte die direkte Interaktion von ID2 mit HEF1 durch Ko-Immunopräzipitationsexperimente, trotz starker Expression in den HL-Zelllinien, nur in der HL-Linie KM-H2 identifiziert werden. Es herrscht anscheinend Heterogenität zwischen den Linien bezüglich der Interaktion mit HEF1. Vermutlich wird es in den anderen Linien von anderen Faktoren gebunden, sodass eine Interaktion mit ID2 nicht möglich ist. Dennoch kann weiter spekuliert werden, dass diese Interaktion zumindest in der HL-Linie KM-H2 zu einer unzulänglichen Aktivierung der Aurora Kinase 1 und damit zu einem fehlerhaften Mitoseverlauf der HRS Zellen führen könnte.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse jedoch deutlich, dass ID2 in der Lage ist, Proteine, die unter anderem den Zellzyklus regulieren, zu beeinflussen. Hieraus wird klar ersichtlich, dass ID2 nicht nur bezüglich der Dedifferenzierung, sondern vermutlich auch in der Regulation des Zellzyklus im HL eine Rolle spielt.

4.3 Die Bedeutung des p21^{Cip1} als ID2-Target-Gen im HL

Der negative Zellzyklusregulator p21^{Cip1} konnte als einziges ID2-Target gefunden werden konnte. Da die mögliche ID2-vermittelte Regulation zudem anders als erwartet war (siehe dazu auch 4.2) und somit auf mögliche neue Funktionen des p21^{Cip1} im HL unabhängig der Inhibition des Zellzyklus hinwies, sollte die Bedeutung des p21^{Cip1} im HL untersucht werden.

Der Ablauf eines kontrollierten Zellzyklus setzt dessen präzise, durch Zellzyklusinhibitoren vermittelte, Regulation voraus. Diese werden in zwei Familien unterteilt, zum einen die INK4-Familie, deren Mitglieder nur an die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 binden, zum anderen die Cip/Kip-Familie, dessen Mitglieder alle Cyclin/CDK-Komplexe inhibieren, wie beispielsweise p21^{Cip1}. Verschiedene Studien haben darüber hinaus belegen können, dass Proteine der Cip/Kip-Familie neben ihrer Rolle als Zellzyklusinhibitoren zusätzliche Funktionen innehaben. So fungieren sie unter anderem als Ko-Transkriptionsfaktoren oder als Regulatoren der Apoptose (Abbas und Dutta, 2009; Coqueret, 2003).

Diese Funktionen sind teils mit der Lokalisation des Zellzyklusregulators und dessen Phosphorylierung und teils mit dessen Interaktion mit verschiedenen Targets verknüpft, was für p21^{Cip1} gezeigt werden konnte. Eine mögliche Phosphorylierung von p21^{Cip1} bewirkt beispielsweise den Verlust der Zellzyklus-hemmenden Funktion, bewahrt dagegen dessen anti-apoptotische Funktion (Child und Mann, 2006). Während der monozytären und neuronalen Differenzierung relokalisiert p21^{Cip1} ins Zytoplasma (Asada et al., 1999; Tanaka et al., 2002), wo es dann mit SAPK (*stress*

activated protein kinases) oder ASK1 (*apoptosis signal regulatin Kinase1*) direkt interagiert, deren katalytische Aktivitäten unterbindet und so Apoptose verhindert (Asada et al., 1999; Shim et al., 1996). Des Weiteren bindet p21^{Cip1} Procaspase3 und verhindert so dessen Aktivierung (Suzuki et al., 1998). Ferner finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Funktion als transkriptioneller Ko-Faktor, wodurch p21^{Cip1} an der Gentranskription beteiligt wäre. So bindet p21^{Cip1} an den Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription3*) und unterdrückt dessen Aktivität. Dadurch wird die Zytokin-stimulierte und STAT3-abhängige Genexpression verhindert (Coqueret und Gascan, 2000). Eine wichtige Rolle spielt p21^{Cip1} auch in der DNA-Reparatur. Die Zellzyklus-inhibierende Funktion des p21^{Cip1} ermöglicht die Reparatur der DNA, um die Apoptose zu verhindern. Es kann aber auch zur Interaktion mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) kommen, welches direkt an DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist. Die Interaktion p21^{Cip1}-PCNA ist ausreichend, um den DNA-Reparaturprozess zu inhibieren (Mortusewicz et al., 2005).

Die Expression des p21^{Cip1} in HRS Zellen primärer HL-Fälle im Zellkern ist bereits mittels immunhistochemischer Färbungen nachgewiesen worden (Sanchez-Beato et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden, außerdem konnte zusätzlich eine zytoplasmatische Lokalisation des p21^{Cip1} gezeigt werden (12/21 Fälle). Sie betrifft das cHL sowohl vom nsSubtyp als auch vom mcSubtyp. Umgebende B-Zellen sind nur in sehr seltenen Fällen positiv für p21^{Cip1}. Darüber hinaus wurden primäre HL-Fälle hinsichtlich der Phosphorylierung des Threonin 145 des p21^{Cip1} analysiert und in einigen Fällen (8/21) konnte tatsächlich die Phosphorylierung des p21^{Cip1} gezeigt werden. Auch in den HL-Zelllinien konnte, wenn auch sehr schwach, phosphoryliertes p21^{Cip1} nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt weiter vermuten, dass p21^{Cip1} auch im HL die eingangs beschriebenen weiteren Funktionen unabhängig der des negativen Zellzyklusregulators hat.

Um diese Funktionen des p21^{Cip1} im HL zu untersuchen, wurde zunächst p21^{Cip1} aus Zellen der HL-Zelllinien KM-H2 und L1236 präzipitiert und auf mögliche Interaktionen mit Caspase3, ASK1, STAT3 sowie PCNA untersucht. Keiner dieser möglichen komplexierenden Bindungspartner konnte in den beiden HL-Linien mittels CoIP als solcher nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle der CoIP diente die bereits bekannte Interaktion von p21^{Cip1} mit CDK2 (Zhu et al., 2005). Diese konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nur in der Zervixkarzinom-Zelllinie HELA nachgewiesen werden, nicht in der HL-Linie L1236. Mögliche Unterschiede im

Vorhandensein bzw. in der Intensität der Interaktionen von p21^{Cip1} mit CDK2 in Abhängigkeit zur Phase des Zellzyklus, in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Analyse befinden, wurden bei der Durchführung der CoIP berücksichtigt.

Technische Ursachen, die bereits für die nicht detektierbare Interaktion von ID2 mit RB diskutiert wurden und einen Nachweis verhindern könnten, wie z.B. die Lysebedingungen, scheiden für den Fall der nicht nachweisbaren Interaktion CDK2-p21^{Cip1} in der HL-Linie aus, da diese Interaktion unter den gleichen Bedingungen in der HELA-Linie gezeigt werden konnte. Für die anderen nicht detektierbaren Interaktionen (Caspase3-p21^{Cip1}, ASK1-p21^{Cip1}, STAT3-p21^{Cip1}, PCNA-p21^{Cip1}) in den HL-Linien könnten technische Ursachen durchaus zugrunde liegen. Aber auch zu geringe Mengen der jeweiligen potentiellen Bindungspartner machen möglicherweise einen Nachweis ihrer Interaktion unmöglich. Beispielsweise ist die Menge an p21^{Cip1}-Protein im Vergleich zu der CDK2-oder Caspase3-Proteinmenge in den HL-Linien äußerst gering. Warbrick konnte darüber hinaus zeigen, dass p21^{Cip1} die Fähigkeit zur Interaktion mit PCNA einbüßt, sobald es an Threonin 145 phosphoryliert wird (Warbrick, 2000). Die Phosphorylierung des p21^{Cip1} im HL konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Somit wäre ein Verlust der Fähigkeit von p21^{Cip1} zur Interaktion mit PCNA und möglicherweise auch mit den anderen potentiellen Bindungspartnern im HL denkbar.

Dieses Ergebnis bestätigt zwar nicht direkt die Vermutung nach den zusätzlichen Funktionen des p21^{Cip1}, aber es schließt die Möglichkeit dennoch nicht aus. Die in den primären HRS Zellen gezeigte zytoplasmatische Lokalisation ist mit Aufgaben des p21^{Cip1}, die unabhängig von denen in der Regulation des Zellzyklus sind, sicher verknüpft. Zudem deutet die im HL gefundene Phosphorylierung auf eine anti-apoptotische Funktion hin. Bisher konnten diese Funktionen im HL allerdings nicht eindeutig identifiziert werden.

P21^{Cip1} hat in den HL-Zelllinien möglicherweise Einfluss auf die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen. Die Messung der Zellzyklusverteilung nach siRNA-vermittelter Herunterregulation des p21^{Cip1} sollte weiteren Aufschluss über die Funktion des p21^{Cip1} in den HL-Zelllinien geben. Es wurden die HL-Zelllinien mit drei siRNA-Oligonukleotiden, die gegen p21^{Cip1} gerichtet sind, mittels des bereits zur Herunterregulation des ID2 etablierten RiboJuice-Transfektionssystems transient transfiziert und ihr Effekt mittels Western Blot überprüft. Die Messung der Zellzyklusverteilung der Zellen mit vermindertem p21^{Cip1}-Proteingehalt sowie der Zellen mit normalem Gehalt an p21^{Cip1} (unbehandelte Zellen und Zellen, die mit einer *scrambled* siRNA transfiziert wurden) erfolgte im FACS. Es konnte in den HL-

Zelllinien kein signifikanter Einfluss der verminderten p21^{Cip1}-Proteinmenge auf die Verteilung der Zellen in den Phasen des Zellzyklus im Vergleich zu Kontrollzellen (transfiziert mit *scrambled* siRNA) beobachtet werden. Eine Veränderung der Zellzyklen war weder 24 Stunden nach erfolgter Herunterregulation des p21^{Cip1}-Proteins (entspricht etwa einer Zellteilung, also einem Zellzyklus) noch 48 Stunden nach erfolgter Herunterregulation des p21^{Cip1}-Proteins (entspricht etwa zwei Zellzyklen) festzustellen. Die Herunterregulation des p21^{Cip1} könnte ungenügend sein, da der Gehalt an p21^{Cip1}-Protein lediglich um ca. 50% (optisch abgeschätzt) vermindert ist. Vor dem Hintergrund der Empfindlichkeit des Zellzyklus gegenüber der geringsten Beeinträchtigung einer der Regulatoren, ist es dennoch erstaunlich, dass die Verminderung des p21^{Cip1} im HL wenig Einfluss auf die Zellzyklusregulation zu haben scheint. Die Regulation des Zellzyklus ist jedoch gleichzeitig so komplex, dass die Minderung der Funktionalität des p21^{Cip1} möglicherweise kompensiert werden könnte.

Die Möglichkeiten hinsichtlich der Prozesse, an denen p21^{Cip1} beteiligt sein kann, sind immens vielfältig. Sie sind mit der zellulären Lokalisation eng verbunden. Im HL konnte nicht nur die nukleäre Lokalisation bestätigt werden, sondern auch die zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden. Auch aufgrund der Identifikation des p21^{Cip1} als ID2-Target im HL scheint es interessant, die Funktionen des p21^{Cip1} weitergehend zu untersuchen, um neue Erkenntnisse hinsichtlich regulatorischer Prozesse und auch nicht zuletzt bezüglich der Pathogenese des HL zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Die Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen des klassischen Hodgkin Lymphoms stammen von Keimzentrums-B-Zellen ab. Dennoch prägen sie fast keine B-Zell-spezifischen Gene aus, stattdessen ko-exprimieren sie Marker anderer hämatopoetischer Linien. Die Ursache für den Verlust des B-Zell-Phänotyps ist weitestgehend unbekannt, da die Transkriptionsfaktoren E2A und PAX5, die in reifen B-Zellen zur Aufrechterhaltung der Expression B-Zell-spezifischer Gene essentiell sind, von primären HRS Zellen ausgeprägt werden. Allerdings wird PAX5 im Vergleich zu normalen B-Zellen deutlich schwächer exprimiert.

E2A wird durch direkte Interaktion mit dem *inhibitor of DNA binding*, ID2, negativ reguliert. ID2 besitzt eine bHLH-Struktur und dimerisiert mit Transkriptionsfaktoren. Da ihm jedoch die DNA-bindende Domäne fehlt, wird die Bindung der Heterodimere an die DNA verhindert und die Transkriptionsfaktoren somit inaktiviert. In hämatopoetischen Zellen scheint die ID2-Expression die B-Zell-Entwicklung und auch die Expression B-Zell-spezifischer Gene zu unterdrücken und stattdessen die Ausprägung von Genen anderer Linien zu unterstützen. In reifen B-Zellen wird ID2 während der Plasmazellentwicklung bei gleichzeitigem Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene stark exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ID2, das in normalen B-Zellen nicht detektiert werden konnte, dagegen in allen HL-Fällen nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene stark exprimiert wird. Ko-Immunopräzipitation des E2A mit ID2 aus HL-Zelllinien zeigte die Interaktion und somit vermutlich auch die transkriptionelle Inaktivierung des E2A durch ID2, wodurch es zum Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene kommt. Darüber hinaus wird PAX5 zusammen mit EBF durch E2A induziert. So führt die ID2-vermittelte E2A-Inaktivierung im HL vermutlich dazu, dass ID2 via EBF auch die Regulation von PAX5 beeinflusst. PAX5 spielt bei der Differenzierung eine duale Rolle, denn es aktiviert nicht nur B-Zell-spezifische Gene, sondern es unterdrückt auch die Gene anderer Linien. Demnach könnte ID2 auch an der Expression der nicht-B-Zell-spezifischen Gene im HL beteiligt sein. Darüber hinaus ist ID2 im HL durch die E2A-Inaktivierung via EBF auch möglicherweise an der schwächeren Expression des PAX5 im Vergleich zu normalen B-Zellen beteiligt. Obwohl das ID2-Protein in den HL-Zelllinien durch RNA-Interferenz erfolgreich reduziert werden konnte, zeigte sich allerdings weder eine Änderung der Proteinexpression der B-

Zell-spezifischen Gene CD19 und CD79A noch der Gene anderer hämatopoetischer Linien GATA-3 und M-CSF-R.

Unabhängig von seiner möglichen Beteiligung an der Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL, spielt ID2 vermutlich auch eine weitere Rolle in der Pathogenese des HL. Verschiedene Interaktionen weisen darauf hin, dass ID2 auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Zum einen konnte in dieser Arbeit die Interaktion des ID2 mit dem HLH-Protein HEF1 zumindest in einer der HL-Zelllinien gezeigt werden. HEF1 ist ein Aktivator der Aurora Kinase 1, welche nach Aktivierung Gene phosphoryliert, die den Ablauf der Mitose begünstigen. Zum anderen konnte der negative Zellzyklusregulator p21^{Cip1} in HL-Zelllinien durch RNAi-vermittelte Reduktion des ID2-Proteins als ID2-Target-Gen identifiziert werden. Auch wenn die Interaktion mit RB, dem zur Familie der Pocket-Proteine gehörenden Schlüsselregulator des Zellzyklusverlaufs, in HL-Zelllinien nicht nachgewiesen werden konnte, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die aberrante ID2-Expression offenbar an der Veränderung des Zellzyklus im HL beteiligt ist. Sie lassen jedoch noch keinen endgültigen Schluss zu.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wird ID2 ebenfalls im anaplastisch großzelligen T-Zell-Lymphom aberrant exprimiert. Auch eine Interaktion mit E2A, das auch in der T-Zell-Entwicklung eine Rolle spielt, konnte gezeigt werden. Nicht zuletzt scheint demnach ID2 auch in der Dedifferenzierung des ALCL ein wichtiger Faktor zu sein.

ID2 wird im HL aberrant exprimiert und es konnte die Interaktion mit E2A in den HL-Zelllinien nachgewiesen werden, wodurch die transkriptionelle Aktivität des E2A vermutlich inhibiert wird. Auch wenn in Folge der RNAi-vermittelten Herunterregulation von ID2 in den HL-Linien weder eine Re-Expression B-Zell-spezifischer Gene noch eine Beeinflussung der Expression Marker anderer hämatopoetischer Linien gefunden werden konnte, spielt ID2 vermutlich dennoch eine wichtige Rolle in der Dedifferenzierung der HRS Zellen im HL. Unabhängig davon konnte der negative Zellzyklusregulator p21^{Cip1} als ID2-Target-Gen identifiziert und eine Interaktion mit HEF1 gezeigt werden. Demnach ist ID2 möglicherweise nicht nur an der Dedifferenzierung, sondern auch an der Dysregulation des Zellzyklus im HL beteiligt und somit ein wichtiger Faktor in der Pathogenese des HL.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, T., und Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-414.

Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I., und Busslinger, M. (1992). Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes & development* 6, 1589-1607.

Akasaka, H., Akasaka, T., Kurata, M., Ueda, C., Shimizu, A., Uchiyama, T., und Ohno, H. (2000). Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer research* 60, 2335-2341.

Akashi, K., Richie, L.I., Miyamoto, T., Carr, W.H., und Weissman, I.L. (2000). B lymphopoiesis in the thymus. *J Immunol* 164, 5221-5226.

Akerblad, P., und Sigvardsson, M. (1999). Early B cell factor is an activator of the B lymphoid kinase promoter in early B cell development. *J Immunol* 163, 5453-5461.

Alber, G., Kim, K.M., Weiser, P., Riesterer, C., Carsetti, R., und Reth, M. (1993). Molecular mimicry of the antigen receptor signalling motif by transmembrane proteins of the Epstein-Barr virus and the bovine leukaemia virus. *Curr Biol* 3, 333-339.

Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., und Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nature immunology* 4, 168-174.

Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., und Mizutani, S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 18, 1223-1234.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., und Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.

Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Volland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., und Murre, C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Molecular and cellular biology* 17, 4782-4791.

Barberis, A., Widenhorn, K., Vitelli, L., und Busslinger, M. (1990). A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation. *Genes & development* 4, 849-859.

Barndt, R., Dai, M.F., und Zhuang, Y. (1999). A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J Immunol* 163, 3331-3343.

Barone, M.V., Pepperkok, R., Peverali, F.A., und Philipson, L. (1994). Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4985-4988.

Bartholdy, B., und Matthias, P. (2004). Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* 327, 1-23.

- Baus, D., und Pfitzner, E. (2006). Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *International journal of cancer* *118*, 1404-1413.
- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C., und Küppers, R. (2005). Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* *106*, 4345-4350.
- Beck-Engeser, G., Stocking, C., Just, U., Albritton, L., Dexter, M., Spooncer, E., und Ostertag, W. (1991). Retroviral vectors related to the myeloproliferative sarcoma virus allow efficient expression in hematopoietic stem and precursor cell lines, but retroviral infection is reduced in more primitive cells. *Hum Gene Ther* *2*, 61-70.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., *et al.* (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* *17*, 3052-3065.
- Bonzheim, I., Geissinger, E., Roth, S., Zettl, A., Marx, A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H.K., und Rudiger, T. (2004). Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* *104*, 3358-3360.
- Bräuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renné, C., Hansmann, M.L., und Küppers, R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* *118*, 1853-1861.
- Brocke-Heidrich, K., Kretzschmar, A.K., Pfeifer, G., Henze, C., Löffler, D., Koczan, D., Thiesen, H.J., Burger, R., Gramatzki, M., und Horn, F. (2004). Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* *103*, 242-251.
- Brouns, G.S., de Vries, E., van Noesel, C.J., Mason, D.Y., van Lier, R.A., und Borst, J. (1993). The structure of the mu/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction. *Eur J Immunol* *23*, 1088-1097.
- Buitenhuis, M., van Deutekom, H.W., Verhagen, L.P., Castor, A., Jacobsen, S.E., Lammers, J.W., Koenderman, L., und Coffey, P.J. (2005). Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix-loop-helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2. *Blood* *105*, 4272-4281.
- Buslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* *22*, 55-79.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F., und Hay, R.T. (1999). Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* *18*, 3063-3070.
- Calame, K. (2001). Immunology. End game for B cells. *Nature* *412*, 289-290.
- Carbone, A., Ghoghini, A., Gattei, V., Aldinucci, D., Degan, M., De Paoli, P., Zagonel, V., und Pinto, A. (1995). Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* *85*, 780-789.
- Carmell, M.A., und Hannon, G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 214-218.

- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., und Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5, 317-327.
- Chaganti, S., Bell, A.I., Pastor, N.B., Milner, A.E., Drayson, M., Gordon, J., und Rickinson, A.B. (2005). Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* 106, 4249-4252.
- Child, E.S., und Mann, D.J. (2006). The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 5, 1313-1319.
- Chittal, S.M., und Delsol, G. (1997). The interface of Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Surv* 30, 87-105.
- Choi, J.K., Shen, C.P., Radomska, H.S., Eckhardt, L.A., und Kadesch, T. (1996). E47 activates the Ig-heavy chain and TdT loci in non-B cells. *The EMBO journal* 15, 5014-5021.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., und Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology* 8, 463-470.
- Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13, 65-70.
- Coqueret, O., und Gascan, H. (2000). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem* 275, 18794-18800.
- Cotta, C.V., Leventaki, V., Atsaves, V., Vidaki, A., Schlette, E., Jones, D., Medeiros, L.J., und Rassidakis, G.Z. (2008). The helix-loop-helix protein Id2 is expressed differentially and induced by myc in T-cell lymphomas. *Cancer* 112, 552-561.
- Desprez, P.Y., Hara, E., Bissell, M.J., und Campisi, J. (1995). Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* 15, 3398-3404.
- Doerr, J.R., Malone, C.S., Fike, F.M., Gordon, M.S., Soghomonian, S.V., Thomas, R.K., Tao, Q., Murray, P.G., Diehl, V., Teitell, M.A., *et al.* (2005). Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J Mol Biol* 350, 631-640.
- Drexler, H.G. (1992). Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma* 8, 283-313.
- Ehlers, A., Oker, E., Bentink, S., Lenze, D., Stein, H., and Hummel, M. (2008). Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype. *Leukemia* 22, 835-841.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., und Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haeflker, A., Vry, M.S., Dohner, K., Bommert, K., Stein, H., und Dorken, B. (2003). Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *The Journal of pathology* 201, 413-420.

- Engel, I., und Murre, C. (2001). The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol* 1, 193-199.
- Engels, B.M., und Hutvagner, G. (2006). Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25, 6163-6169.
- Ernst, P., und Smale, S.T. (1995a). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427-438.
- Ernst, P., und Smale, S.T. (1995b). Combinatorial regulation of transcription. I: General aspects of transcriptional control. *Immunity* 2, 311-319.
- 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.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., und Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fisher, R.I. (2003). Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Seminars in oncology* 30, 3-9.
- Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B., und Younes, A. (2001). Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 98, 2784-2790.
- Flavell, J.R., Baumforth, K.R., Wood, V.H., Davies, G.L., Wei, W., Reynolds, G.M., Morgan, S., Boyce, A., Kelly, G.L., Young, L.S., *et al.* (2008). Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 111, 292-301.
- Foss, H.D., Anagnostopoulos, I., Araujo, I., Assaf, C., Demel, G., Kummer, J.A., Hummel, M., und Stein, H. (1996). Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 88, 4005-4011.
- Foss, H.D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., und 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.
- Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., und Malim, M.H. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *The EMBO journal* 16, 4531-4539.
- Frankel, A.D. (1992). Activation of HIV transcription by Tat. *Current opinion in genetics & development* 2, 293-298.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., und Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes & development* 18, 411-422.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5, R80.

Ghosh, S., und Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews* 8, 837-848.

Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., und Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.

Goebel, P., Janney, N., Valenzuela, J.R., Romanow, W.J., Murre, C., und Feeney, A.J. (2001). Localized gene-specific induction of accessibility to V(D)J recombination induced by E2A and early B cell factor in nonlymphoid cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 645-656.

Goepfert, T.M., Adigun, Y.E., Zhong, L., Gay, J., Medina, D., und Brinkley, W.R. (2002). Centrosome amplification and overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 62, 4115-4122.

Goossens, T., Klein, U., und Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2463-2468.

Grawunder, U., Leu, T.M., Schatz, D.G., Werner, A., Rolink, A.G., Melchers, F., und Winkler, T.H. (1995). Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* 3, 601-608.

Greenbaum, S., und Zhuang, Y. (2002). Identification of E2A target genes in B lymphocyte development by using a gene tagging-based chromatin immunoprecipitation system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15030-15035.

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., *et al.* (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nature immunology* 4, 380-386.

Hannon, G.J., und Rossi, J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.

Harris, N.L. (1999). Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol* 36, 220-232.

Hayashi, K., Yamamoto, M., Nojima, T., Goitsuka, R., und Kitamura, D. (2003). Distinct signaling requirements for Dmu selection, IgH allelic exclusion, pre-B cell transition, and tumor suppression in B cell progenitors. *Immunity* 18, 825-836.

Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H., und Scheiderei, 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. *The Journal of experimental medicine* 196, 605-617.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., und Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.

- Hirsch, B., Hummel, M., Bentink, S., Fouladi, F., Spang, R., Zollinger, R., Stein, H., und Durkop, H. (2008). CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am J Pathol* 172, 510-520.
- Ho, I.C., Yang, L.H., Morle, G., und Leiden, J.M. (1989). A T-cell-specific transcriptional enhancer element 3' of C alpha in the human T-cell receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6714-6718.
- Hochberg, Y., und Benjamini, Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 9, 811-818.
- Holtick, U., Vockerodt, M., Pinkert, D., Schoof, N., Sturzenhofecker, B., Kussebi, N., Lauber, K., Wesselborg, S., Loffler, D., Horn, F., *et al.* (2005). STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrophostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia* 19, 936-944.
- Horcher, M., Souabni, A., und Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779-790.
- Horie, R., Watanabe, T., Ito, K., Morisita, Y., Watanabe, M., Ishida, T., Higashihara, M., Kadin, M., und Watanabe, T. (2002). Cytoplasmic aggregation of TRAF2 and TRAF5 proteins in the Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *The American journal of pathology* 160, 1647-1654.
- Hu, J.S., Olson, E.N., und Kingston, R.E. (1992). HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol Cell Biol* 12, 1031-1042.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., und Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics (Oxford, England)* 18 Suppl 1, S96-104.
- Hubinger, G., Muller, E., Scheffrahn, I., Schneider, C., Hildt, E., Singer, B.B., Sigg, I., Graf, J., und Bergmann, L. (2001). CD30-mediated cell cycle arrest associated with induced expression of p21(CIP1/WAF1) in the anaplastic large cell lymphoma cell line Karpas 299. *Oncogene* 20, 590-598.
- Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., und Israel, M.A. (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 8, 1270-1284.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Wright, L.Y., und Murre, C. (2004). Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity* 20, 349-360.
- Jaffe, E.S., und World Health Organization. (2001). Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (LyonOxford, IARC Press ;Oxford University Press (distributor)).
- Janeway, C., und Travers, P. (1997). Immunobiology : the immune system in health and disease, 3rd edn (London ; San FranciscoNew York, Current Biology ;Garland Pub.).
- Jarrett, R.F., und MacKenzie, J. (1999). Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36, 260-269.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H., und Dorken, B. (2002). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99, 3398-3403.

Jundt, F., Schwarzer, R., und Dorken, B. (2008). Notch signaling in leukemias and lymphomas. *Curr Mol Med* 8, 51-59.

Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2000). Clonal deleterious mutations in the I kappa B alpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 191, 395-402.

Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K. (1996). 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., 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. *The Journal of experimental medicine* 189, 1939-1946.

Karasuyama, H., Kudo, A., und Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* 172, 969-972.

Kee, B.L., und Murre, C. (1998). Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med* 188, 699-713.

Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., und 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, 1700-1709.

Klein, U., Goossens, T., Fischer, M., Kanzler, H., Bräuninger, A., Rajewsky, K., und Küppers, R. (1998). Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological reviews* 162, 261-280.

Kondo, M., Weissman, I.L., und Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

Kreider, B.L., Benezra, R., Rovera, G., und Kadesch, T. (1992). Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* 255, 1700-1702.

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

Küppers, R., und Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-5594.

Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., und Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529.

Küppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Bräuninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Califano, A., Hansmann, M.L., *et al.* (2003). Identification of Hodgkin und Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 111, 529-537.

Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., und 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 U S A* 91, 10962-10966.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., und Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, NY)* 294, 853-858.

Lasorella, A., Iavarone, A., und Israel, M.A. (1996). Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins. *Mol Cell Biol* 16, 2570-2578.

Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y., und Iavarone, A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* 407, 592-598.

Lasorella, A., Rothschild, G., Yokota, Y., Russell, R.G., und Iavarone, A. (2005). Id2 mediates tumor initiation, proliferation, and angiogenesis in Rb mutant mice. *Molecular and cellular biology* 25, 3563-3574.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., und Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* 294, 858-862.

Law, S.F., Zhang, Y.Z., Fashena, S.J., Toby, G., Estojak, J., und Golemis, E.A. (1999). Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain. *Exp Cell Res* 252, 224-235.

Leventaki, V., Drakos, E., Medeiros, L.J., Lim, M.S., Elenitoba-Johnson, K.S., Claret, F.X., und Rassidakis, G.Z. (2007). NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 110, 1621-1630.

Lin, H., und Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376, 263-267.

Lin, Y., Wong, K., und Calame, K. (1997). Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science (New York, NY)* 276, 596-599.

Lu, R., Medina, K.L., Lancki, D.W., und Singh, H. (2003). IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes & development* 17, 1703-1708.

MacLennan, I.C., Liu, Y.J., und Johnson, G.D. (1992). Maturation and dispersal of B-cell clones during T cell-dependent antibody responses. *Immunol Rev* 126, 143-161.

Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., *et al.* (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.

Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J., und 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. *The Journal of experimental medicine* 183, 971-977.

Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., und Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 278, 51786-51795.

Marumoto, T., Zhang, D., und Saya, H. (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer* 5, 42-50.

- Mathas, S., Janz, M., Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., *et al.* (2006). Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol* 7, 207-215.
- Mathas, S., Kreher, S., Meaburn, K.J., Johrens, K., Lamprecht, B., Assaf, C., Sterry, W., Kadin, M.E., Daibata, M., Joos, S., *et al.* (2009). Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5831-5836.
- Medina, K.L., Pongubala, J.M., Reddy, K.L., Lancki, D.W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R., and Singh, H. (2004). Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Developmental cell* 7, 607-617.
- Meister, G., und Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Melchers, F. (1995). B cell differentiation in bone marrow. *Clinical immunology and immunopathology* 76, S188-191.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., und Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science (New York, NY)* 297, 110-113.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., und Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., und Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8905-8909.
- Mottok, A., Renné, C., Willenbrock, K., Hansmann, M.L., und Bräuninger, A. (2007). Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 110, 3387-3390.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., und Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* 16, 720-728.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., *et al.* (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., und Busslinger, M. (1999a). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-562.
- Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dorfler, P., Rolink, A., und Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J* 17, 2319-2333.
- Nutt, S.L., Thevenin, C., und Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 198, 227-235.
- Nutt, S.L., Vambrie, S., Steinlein, P., Kozmik, Z., Rolink, A., Weith, A., und Busslinger, M. (1999b). Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat Genet* 21, 390-395.

- Ordentlich, P., Lin, A., Shen, C.P., Blaumueller, C., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., und Kadesch, T. (1998). Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 18, 2230-2239.
- Pagliuca, A., Gallo, P., De Luca, P., und Lania, L. (2000). Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth. *Cancer research* 60, 1376-1382.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., *et al.* (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11816-11821.
- Perk, J., Iavarone, A., und Benezra, R. (2005). Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 603-614.
- Poppema, S. (1996). Immunology of Hodgkin's disease. *Bailliere's clinical haematology* 9, 447-457.
- Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S.T., und Sun, X.H. (1997). Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol* 17, 5888-5896.
- Pugacheva, E.N., und Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* 7, 937-946.
- Quong, M.W., Martensson, A., Langerak, A.W., Rivera, R.R., Nemazee, D., und Murre, C. (2004). Receptor editing and marginal zone B cell development are regulated by the helix-loop-helix protein, E2A. *J Exp Med* 199, 1101-1112.
- R Development Core Team 2005. R: A language and environment for statistical computing (vienna, Austria)
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., und 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.
- Rajewsky, K., Forster, I., und Cumano, A. (1987). Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238, 1088-1094.
- Rana, T.M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 23-36.
- Re, D., Muschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V., und Wolf, J. (2001). Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* 61, 2080-2084.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., und Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412, 300-307.

- Reimold, A.M., Ponath, P.D., Li, Y.S., Hardy, R.R., David, C.S., Strominger, J.L., und Glimcher, L.H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med* 183, 393-401.
- Reljic, R., Wagner, S.D., Peakman, L.J., und Fearon, D.T. (2000). Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med* 192, 1841-1848.
- Renné, C., Martin-Subero, J.I., Eickernjäger, M., Hansmann, M.L., Küppers, R., Siebert, R., und Bräuninger, A. (2006). Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 169, 655-664.
- Reynet, C., und Kahn, C.R. (1993). Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science* 262, 1441-1444.
- Rickinson, A.B., Lee, S.P., und Steven, N.M. (1996). Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol* 8, 492-497.
- Roberts, E.C., Deed, R.W., Inoue, T., Norton, J.D., und Sharrocks, A.D. (2001). Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Molecular and cellular biology* 21, 524-533.
- Rogozin, I.B., und Diaz, M. (2004). Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol* 172, 3382-3384.
- Romanow, W.J., Langerak, A.W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I.L., van Dongen, J.J., Feeney, A.J., und Murre, C. (2000). E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells. *Molecular cell* 5, 343-353.
- Rothenberg, E.V., Moore, J.E., und Yui, M.A. (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8, 9-21.
- Rothschild, G., Zhao, X., Iavarone, A., und Lasorella, A. (2006). E Proteins and Id2 converge on p57Kip2 to regulate cell cycle in neural cells. *Molecular and cellular biology* 26, 4351-4361.
- Sanchez-Beato, M., Piris, M.A., Martinez-Montero, J.C., Garcia, J.F., Villuendas, R., Garcia, F.J., Orradre, J.L., und Martinez, P. (1996). MDM2 and p21WAF1/CIP1, wild-type p53-induced proteins, are regularly expressed by Sternberg-Reed cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 180, 58-64.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., und Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y., und Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol* 4, 586-593.
- Scheeren, F.A., Diehl, S.A., Smit, L.A., Beaumont, T., Naspetti, M., Bende, R.J., Blom, B., Karube, K., Ohshima, K., van Noesel, C.J., *et al.* (2008). IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 111, 4706-4715.

- Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M.L., und Küppers, R. (2009). Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annual review of pathology* 4, 151-174.
- Schnell, T., Foley, P., Wirth, M., Munch, J., und Uberla, K. (2000). Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Human gene therapy* 11, 439-447.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., und Küppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 1505-1512.
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., und Staudt, L.M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199-212.
- Shen, C.P., und Kadesch, T. (1995). B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Molecular and cellular biology* 15, 4518-4524.
- Shim, J., Lee, H., Park, J., Kim, H., und Choi, E.J. (1996). A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 381, 804-806.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Sigvardsson, M. (2000). Overlapping expression of early B-cell factor and basic helix-loop-helix proteins as a mechanism to dictate B-lineage-specific activity of the lambda5 promoter. *Mol Cell Biol* 20, 3640-3654.
- Sigvardsson, M., Clark, D.R., Fitzsimmons, D., Doyle, M., Akerblad, P., Breslin, T., Bilke, S., Li, R., Yeaman, C., Zhang, G., *et al.* (2002). Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Mol Cell Biol* 22, 8539-8551.
- Sigvardsson, M., O'Riordan, M., und Grosschedl, R. (1997). EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* 7, 25-36.
- Silva, J.M., Li, M.Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M.C., Rickles, R.J., Siolas, D., Hu, G., Paddison, P.J., Schlabach, M.R., *et al.* (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* 37, 1281-1288.
- Skinnider, B.F., Elia, A.J., Gascoyne, R.D., Trümper, L.H., von Bonin, F., Kapp, U., Patterson, B., Snow, B.E., und 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.
- Smialowski, P., Singh, M., Mikolajka, A., Majumdar, S., Joy, J.K., Nalabothula, N., Krajewski, M., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., und Holak, T.A. (2005). NMR and mass spectrometry studies of putative interactions of cell cycle proteins pRb and CDK6 with cell differentiation proteins MyoD and ID-2. *Biochimica et biophysica acta* 1750, 48-60.
- Smith, E.M., Gisler, R., und Sigvardsson, M. (2002). Cloning and characterization of a promoter flanking the early B cell factor (EBF) gene indicates roles for E-proteins and autoregulation in the control of EBF expression. *J Immunol* 169, 261-270.

Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., und Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781-793.

Souza, T.A., Stollar, B.D., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., und Thorley-Lawson, D.A. (2005). Peripheral B cells latently infected with Epstein-Barr virus display molecular hallmarks of classical antigen-selected memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18093-18098.

Stein, H., Marafioti, T., Foss, H.D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G., und 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.

Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H., *et al.* (1985). The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 66, 848-858.

Sun, X.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., und Baltimore, D. (1991). Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins. *Molecular and cellular biology* 11, 5603-5611.

Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., und Miura, M. (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17, 931-939.

Tanaka, H., Yamashita, T., Asada, M., Mizutani, S., Yoshikawa, H., und Tohyama, M. (2002). Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J Cell Biol* 158, 321-329.

Tomari, Y., und Zamore, P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-529.

Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H.D., und 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.

Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E.G., und Weissman, I.L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science (New York, NY)* 290, 2152-2154.

Trümper, L.H., Brady, G., Bagg, A., Gray, D., Loke, S.L., Griesser, H., Wagman, R., Brazier, R., Gascoyne, R.D., Vicini, S., *et al.* (1993). Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood* 81, 3097-3115.

Tseng, Y.H., Vicent, D., Zhu, J., Niu, Y., Adeyinka, A., Moyers, J.S., Watson, P.H., und Kahn, C.R. (2001). Regulation of growth and tumorigenicity of breast cancer cells by the low molecular weight GTPase Rad and nm23. *Cancer Res* 61, 2071-2079.

Tukey, J.W. (1977). *Exploratory data analysis* (Reading, Mass., Addison-Wesley Pub. Co.).

Turner, C.A., Jr., Mack, D.H., und Davis, M.M. (1994). Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77, 297-306.

- Underhill, G.H., George, D., Bremer, E.G., und Kansas, G.S. (2003). Gene expression profiling reveals a highly specialized genetic program of plasma cells. *Blood* 101, 4013-4021.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F., und 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.
- Ushmorov, A., Leithauser, F., Sakk, O., Weinhausel, A., Popov, S.W., Moller, P., und Wirth, T. (2006). Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 2493-2500.
- Ushmorov, A., Ritz, O., Hummel, M., Leithauser, F., Moller, P., Stein, H., und Wirth, T. (2004). Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 104, 3326-3334.
- Usui, T., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Kaneko, S., Koseki, H., und Kita, T. (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, 3197-3204.
- van den Berg, A., Visser, L., und Poppema, S. (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 154, 1685-1691.
- Vicent, D., Piper, M., Gammeltoft, S., Maratos-Flier, E., und Kahn, C.R. (1998). Alterations in skeletal muscle gene expression of ob/ob mice by mRNA differential display. *Diabetes* 47, 1451-1458.
- Warbrick, E. (2000). The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22, 997-1006.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., Wegener, S., Bucur, A.J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.F., und Moller, P. (2006). Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 25, 2679-2684.
- Yekta, S., Shih, I.H., und Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science (New York, NY)* 304, 594-596.
- Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., und Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702-706.
- Zeng, Y., Yi, R., und Cullen, B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9779-9784.
- Zheng, M., und McKeown-Longo, P.J. (2002). Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF-beta 1 and cell adhesion. *The Journal of biological chemistry* 277, 39599-39608.
- Zheng, W., Wang, H., Xue, L., Zhang, Z., und Tong, T. (2004). Regulation of cellular senescence and p16(INK4a) expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast. *The Journal of biological chemistry* 279, 31524-31532.

Zhu, H., Nie, L., und Maki, C.G. (2005). Cdk2-dependent Inhibition of p21 stability via a C-terminal cyclin-binding motif. *The Journal of biological chemistry* 280, 29282-29288.

Zhuang, Y., Barndt, R.J., Pan, L., Kelley, R., und Dai, M. (1998). Functional replacement of the mouse E2A gene with a human HEB cDNA. *Molecular and cellular biology* 18, 3340-3349.

Zhuang, Y., Cheng, P., und Weintraub, H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 16, 2898-2905.

Zhuang, Y., Soriano, P., und Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Bräuninger für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie für die hervorragende Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek für seine Betreuung, seine Begutachtung und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit am Senckenbergischen Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main und das große Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Krebshilfe gefördert (Verbundprojekt 102362). Für diese Förderung möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Daniela Baus für die Überlassung des pVIG-Transduktionssystems und die entsprechende Einarbeitung sowie Dr. Stefan Stein, Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main, für die Unterstützung beim Sortieren der shRNA-transduzierten Zellen.

Allen Wegbegleitern aus den Kooperationsgruppen Essen und Münster, vor allem Prof. Dr. Ralf Küppers, herzlichen Dank für die vielen anregenden Diskussionen.

Für das sehr gute Arbeitsklima, die bereitwillige Unterstützung sowie die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, beruflichen und persönlichen Gespräche danke ich den Mitarbeitern des Senckenbergischen Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Besonders danken möchte PD. Dr. Christoph Renné, Claudia Döring, Dr. Katrin Birkenmeier, Tanja Schaffer-Horscht, Christiane Kehm, Sabine Albrecht, Christiane Wenk, Alexander Benz und Fabian Lang. Ekaterini Hadzoglou verdient besonderen Dank für ihre zuverlässige technische, aber vor allem auch seelische Unterstützung in jeder Hinsicht während der gesamten Zeit.

Ebenso besonderer Dank an Dr. Sylvia Hartmann für die schöne Zeit als Zimmerkollegin, die große Anteilnahme am allgemeinen Stand der Dinge sowie für den „laufenden“ Ausgleich nach der Arbeit.

Nicht zuletzt gilt meine tiefe Dankbarkeit Torben, meinen Freunden und meiner Familie, die mich alle mit viel Liebe und Tatkraft begleitet und vielfältig unterstützt haben.

Teilpublikation

C. Renné, J. I. Martin-Subero, **M. Eickernjäger**, M-L. Hansmann, R. Küppers, R. Siebert, A. Bräuninger (2006). Aberrant Expression of ID2, a Suppressor of B cell Specific Gene Expression, in Hodgkin's Lymphoma, The American Journal of Pathology 169 (2): 655-664

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Maren Eickernjäger
Geburtsdatum	19. Januar 1978
Geburtsort	Kiel

SCHUL- UND BERUFSAUSBILDUNG

1984-1988	Grundschule, Raisdorf
1988-1997	Gymnasium Elmschenhagen, Kiel
1997-2000	Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin (PTA) an der Theodor-Litt-Schule, Neumünster
08/1999-01/2000	Praktikum im Rahmen der Ausbildung zur PTA in der Greif-Apotheke, Kiel

HOCHSCHULAUFBILDUNG

2000-2004	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
08/2002	1. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
06/2004	2. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
07/2004-12/2004	Pharmaziepraktikum in der Wald Apotheke, Wahlstedt
01/2005-06/2005	Pharmaziepraktikum bei der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
08/2005	3. Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung und Erhalt der Approbation als Apothekerin
01/2006	Beginn der Promotion am Senckenbergischen Institut für Pathologie des Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinikums, Frankfurt am Main, unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Bräuninger und Prof. Dr. Rolf Marschalek

Frankfurt am Main, März 2010

Eidesstattliche Erklärung

Die selbstständige Anfertigung dieser Arbeit erkläre ich an Eides statt.

Frankfurt am Main, 30.03.2010

(Maren Eickernjäger)