

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

# **Mikroarraybasierte Charakterisierung spezifischer Genexpression in Hodgkin-Lymphomzellen**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ginés Melzer

geboren am 04.02.1992 in Rüdersdorf

Betreuer: apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger

Gutachter: 1. apl. Prof. Dr. med. Malte Erich Kornhuber (Sangerhausen)

2. PD Dr. rer. nat. Benno Weigmann (Erlangen-Nürnberg)

09.07.2019

10.06.2020

*Meinen Liebsten*

## Referat

Das Hodgkin-Lymphom als eine der häufigeren Krebs-Erkrankungen des jungen Erwachsenenalters weist eine gute Heilungsrate, bei Kindern derzeit von über 95%, auf. Aufgrund des häufig jungen Erkrankungsalters sind durch die Therapie hervorgerufene Langzeitfolgen wie unter anderem Zweitmalignome, Infertilität, kardiale und pulmonale Beeinträchtigungen und endokrine Dysfunktionen von großer Bedeutung für die Patienten. Das Risiko dieser Langzeitfolgen steigt durch die Behandlung von Rezidiven stark an. Um diese Rezidive frühzeitig zu erkennen und somit mit relativ niedriger Therapieintensität behandeln zu können, kann es von Vorteil sein, einen Marker der Minimalen Resterkrankung (MRD-Marker) des Hodgkin-Lymphoms ausfindig zu machen. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit an cDNA-Banken der Zelllinien KM-H2, L-1236 und L-428 durchgeführte Mikroarray-Analysen ausgewertet und mit Daten 25 verschiedener Proben peripheren Blutes und B-Zellen gesunder Spender verglichen. Hierbei zeigten zu verschiedenen Genen gehörende Probe-Sets eine deutlich höhere Signalintensität in den Hodgkin-Zelllinien als in den Vergleichszellen. Zu diesen gehörte unter anderem das *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S* (UBE2S), welches Gegenstand der weiteren Untersuchungen dieser Arbeit war. Mittels quantitativer Polymerasekettenreaktions-Bestimmung wurde die Expression des Gens UBE2S in 5 Hodgkin-Lymphomzelllinien mit Zellen des peripheren Blutes verglichen, wobei sich zwar eine deutliche Überexpression der Normtranskriptvariante (NM) des Gens sowie eine Unterexpression der Isoform X1 in Hodgkin-Lymphomzellen zeigte, diese jedoch nicht ausgeprägt genug waren, um dieses Gen als MRD-Marker verwenden zu können. Desweiteren wurde die Expression von UBE2S in Leukämie- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien untersucht, wobei die Normtranskriptvariante in Hodgkin-Lymphomzellen am stärksten exprimiert war, die Isoform X1 dagegen in Leukämie-Zellen im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Zelllinien am stärksten exprimiert wurde. Abschließend wurden Untersuchungen an konditional immortalisierten B-Zellen durchgeführt, deren Proliferation durch geeignete Wahl der Kulturbedingungen an- bzw. abgeschaltet werden konnte (Zelllinie P493-6). Anhand dieses Zellkulturmodells wurde nachgewiesen, dass die Expressionsrate der UBE2S-Varianten NM und X1 nicht abhängig von der Proliferation der Zellen ist, jedoch stellte sich das Verhältnis der beiden Varianten zueinander als proliferationsabhängig dar.

Melzer, Ginés: Mikroarraybasierte Charakterisierung spezifischer Genexpression in Hodgkin-Lymphomzellen, Halle (Saale), Univ, Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Hodgkin-Lymphom.....	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms .....	2
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild.....	3
1.1.4	Klassifikation und Stadieneinteilung .....	3
1.1.5	Therapie.....	5
1.1.6	Prognose .....	5
1.1.7	Langzeitfolgen durch die Therapie .....	6
1.2	Aktuelle Studienlage zur Genexpression des Hodgkin-Lymphoms.....	7
1.3	Die Bedeutung der minimalen Resterkrankung .....	8
1.4	CDNA-Banken .....	9
1.5	Lymphoblastoide Zelllinien .....	9
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
3.1	Material .....	11
3.1.1	Geräte.....	11
3.1.2	Chemikalien und Kits .....	11
3.1.3	Puffer und Medien.....	13
3.1.4	cDNA Banken .....	13
3.1.5	Verwendete Zelllinien .....	14
3.1.6	Primer .....	15
3.2	Methoden .....	17
3.2.1	Auswertung von Mikroarray-Daten .....	17
3.2.2	Reverse Transkription, cDNA Synthese .....	18
3.2.3	Quantitative Bestimmung mittels Real-Time PCR .....	18
3.2.4	Gelelektrophorese.....	19
3.2.5	Sequenzier-PCR .....	19
3.2.6	RNA-Extraktion .....	20
3.2.7	Zellkultur und Aufreinigung.....	21

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
4.1	Mittels Mikroarray-Analyse identifizierte Gene.....	22
4.2	Expression des <i>Ubiquitin binding enzyme E2 S</i> in verschiedenen Zelllinien ..	26
4.2.1	Vergleich der Hodgkin-Zelllinien mit PBMCs .....	26
4.2.2	UBE2S in Leukämie- und Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien.....	30
4.2.3	Vergleich der Hodgkin-Zelllinien mit lymphoblastoiden Zelllinien.....	33
4.2.4	Untersuchung der lymphoblastoiden Zelllinie P493-6.....	36
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
5.1	Das <i>Ubiquitin binding enzyme E2 S</i> .....	41
5.1.1	Struktur und Funktion des <i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 S</i> .....	41
5.1.2	Die Rolle von UBE2S in malignen Erkrankungen .....	43
5.2	Das Gen <i>Phosphatidylethanolamine binding protein 1</i> .....	44
5.3	UBE2S in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu PBMCs.....	44
5.4	Expression von UBE2S bei weiteren lymphoproliferativen Erkrankungen.....	45
5.5	UBE2S als möglicher Proliferationsmarker.....	46
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b> .....	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>60</b>
9.1	Zusammenfassung überexprimierter Gene der cDNA-Banken.....	60
9.2	Doppelbanden unter Verwendung des Primers „NM“ .....	63
9.3	Auswahl des <i>Housekeeping</i> -Gens zur Untersuchung der Zelllinie P493-6 ....	63
<b>10</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>IX</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>X</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>XI</b>

## I Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Darstellung des Gens UBE2S und seiner Isoformen mit Ansatzpunkten der verwendeten Primer
- Abbildung 2:** Darstellung der Expression der einzelnen Probe-Sets mit Hilfe einer Heatmap
- Abbildung 3:** Überexprimierte ProbelIDs von PEBP1 und UBE2S im Vergleich zu normalen Blutzellen
- Abbildung 4:** Signalintensität der Probe-Sets der IDs 3713482 , 3713481 und 3747003
- Abbildung 5:** Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „NM“
- Abbildung 6:** Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „NM2“
- Abbildung 7:** Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „X1“
- Abbildung 8:** Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „X2“
- Abbildung 9:** Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „2S“
- Abbildung 10:** Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „ID03“
- Abbildung 11:** Expression des Gens UBE2S bei Verwendung des Primer „NM2“ im Verhältnis zum Primer „X1“
- Abbildung 12:** Expression der Isoform X1 in Leukämie- und Lymphomzellen
- Abbildung 13:** Expression der Normtranskriptvariante NM in Leukämie- und Lymphomzellen
- Abbildung 14:** Expression von UBE2S NM im Vergleich zu X1 in Leukämie- und Lymphomzellen
- Abbildung 15:** Expression von UBE2S X1 in LCL im Vergleich zu HL-Zelllinien und PBMCs
- Abbildung 16:** Expression von UBE2S NM in LCL im Vergleich zu HL-Zelllinien und PBMCs
- Abbildung 17:** Expression von UBE2S NM im Vergleich zu X1 in lymphoblastoiden Zelllinien
- Abbildung 18:** Relative Expression von c-myc der Zelllinie P493-6
- Abbildung 19:** Relative Expression von ABHD6 der Zelllinie P493-6
- Abbildung 20:** Relative Expression von UBE2S NM der Zelllinie P493-6
- Abbildung 21:** Relative Expression von UBE2S X1 der Zelllinie P493-6
- Abbildung 22:** Expression von UBE2S NM im Vergleich zu X1 der Zelllinie P493-6
- Abbildung 23:** Proteinmodell der Normtranskriptvariante NM von UBE2S und der Isoform X1

- Abbildung 24:** *Anaphase promoting complex (APC/C)* mit UBE2S
- Abbildung 25:** Doppelbanden unter Verwendung des Primers „NM“
- Abbildung 26:** Relative Expression von c-myc und ABHD6, *Housekeeping-Gen*: Aktin
- Abbildung 27:** Relative Expression von c-myc und ABHD6, *Housekeeping-Gen*: TBP
- Abbildung 28:** Relative Expression von c-myc und ABHD6, *Housekeeping-Gen*: GAPDH
- Abbildung 29:** Relative Expression von c-myc und ABHD6, *Housekeeping-Gen*: HPRT1

## II Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	WHO-Klassifikation und Häufigkeiten der Hodgkin-Lymphom-Typen
<b>Tabelle 2:</b>	Stadieneinteilung nach Ann-Arbor
<b>Tabelle 3:</b>	Verwendete Geräte
<b>Tabelle 4:</b>	Verwendete Chemikalien und Kits
<b>Tabelle 5:</b>	Verwendete Puffer und Medien
<b>Tabelle 6:</b>	GSE- und GSM-Nummern der verwendeten Mikroarraydatensätze der Vergleichszellen
<b>Tabelle 7:</b>	verwendete Primer
<b>Tabelle 8:</b>	Reaktionsansatz reverse Transkription
<b>Tabelle 9:</b>	Reaktionsansatz qPCR
<b>Tabelle 10:</b>	Darstellung der in der Mikroarray-Analyse überexprimierten Gene
<b>Tabelle 11:</b>	Zellzahl von P493-6 nach Behandlung mit Östrogen und/oder Tetrazyklin
<b>Tabelle 12:</b>	Darstellung aller überexprimierter Probe-Sets

### III Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Miko
Abb.	Abbildung
ABHD6	<i>Alpha/Beta-Hydrolase Domain Containing 6</i>
ABVD	Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC/C	<i>Anaphase promoting complex / cyclosome</i>
BEACOPP	Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin (Vincristin), Procarbazin, Prednisolon
BLIMP1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
Bp	Basenpaare
Bzw	Beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
Ct	<i>threshold cycle</i>
D	Dezi-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DUSP5P1	<i>dual specificity phosphatase 5 pseudogene 1</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E-	Ohne Östrogen
E+	Mit Östrogen
EBNA2	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen 2</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogen-Rezeptor
ERV3	<i>engogenous retrovirus 3</i>

et al.	et alii
FCS	Fetales Kälberserum
FDG-PET	Fluordesoxyguucose Positronen-Emissions-Tomographie
G	Erdbeschleunigung
G	Gramm
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HL	Hodgkin-Lymphom
HPLC-H <sub>2</sub> O	<i>High performance liquid chromatography-H<sub>2</sub>O</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1</i>
HRSC	Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen
IκBα	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha</i>
IL13RA1	Interleukin-13-Rezeptor alpha 1
IPS	<i>International Prognostic Score</i>
L	Liter
L-myc	MYCL proto-oncogene
LAIP	<i>Leukemia-associated Aberrant Immunophenotypes</i>
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LMP1	<i>latent membrane protein 1</i>
LMP2	<i>latent membrane protein 2</i>
M	Milli-
M	Molar
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Min	Minuten
MRD	<i>Minimal residual disease</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
Myc	<i>MYC proto-oncogene</i>
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLPHL	Noduläres-lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PEBP1	<i>Phosphatidylethanolamine binding protein 1</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMBCL	<i>primär mediastinales diffus großzelliges B-Zell-Lymphom</i>
PRAME	<i>preferentially expressed antigen in melanoma</i>
pVHL	Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR)
RNA	Ribonukleinsäure
Ras	<i>Rat-sarcoma</i> (Proto-Onkogen)
rhoC	<i>Ras Homolog Family Member C</i>
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
S	Sekunden
SAC	<i>spindle arresting checkpoint</i>
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
T-	Ohne Tetrazyklin
T+	Mit Tetrazyklin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor</i>
UBCH10	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 C</i>
UBE2S	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 S</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VZ	Vergleichszellen
WHO	<i>World Health Organization</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Hodgkin-Lymphom

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Hodgkin-Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems, welche 1832 von Sir Thomas Hodgkin aufgrund sieben gleichartiger Autopsiebefunde erstmalig beschrieben und später nach ihm benannt wurde. Erst 1898 und 1902 entdeckten Carl Sternberg und Dorothy Reed unabhängig voneinander die für das Hodgkin-Lymphom pathognomonischen mehrkernigen Riesenzellen, die später ihre Namen trugen (Tzankov und Dirnhofer, 2006). Die mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen und einkernigen Hodgkinzellen sind von einer großen Anzahl reaktiver Zellen, den sogenannten *Bystander*-Zellen, umgeben. Diese setzen sich aus T-Zellen, Eosinophilen, Plasmazellen und Histiozyten zusammen (Thomas et al., 2004). Neoplastische Zellen bilden nur ca. 1% der gesamten Zellpopulation (Gobbi et al., 2013).

Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRSC) exprimieren die Oberflächenmarker CD15 und CD30 (Tzankov und Dirnhofer, 2006). CD30, auch als *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 8* bekannt, spielt sowohl für die Diagnose als auch für die Therapie eine Rolle (Weniger et al., 2018). Dieser wird für gewöhnlich nur von sehr wenigen Zellen des peripheren Blutes und des Keimzentrums exprimiert, kommt jedoch häufig bei Hodgkin-Lymphomen (HL), B-Zell-Lymphomen und in EBV-positiven Zellen der infektiösen Mononukleose vor (Kurth et al., 2000). Die CD30 positiven mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen und einkernigen Hodgkin-Zellen bilden die Voraussetzung für die Diagnose eines Hodgkin-Lymphoms (Tzankov und Dirnhofer, 2006).

Das Lebenszeitrisiko, an einem Hodgkin-Lymphom zu erkranken, beträgt 0,3% für Männer und <0,1% für Frauen (Robert Koch-Institut, 2017), in den USA beträgt der geschätzte Anteil des Hodgkin-Lymphoms an allen Krebs-Neuerkrankungen im Jahr 2018 0,5% (Howlader et al., 2018). Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland insgesamt etwa 2370 Menschen, wobei Männer etwas häufiger betroffen waren (1340 Männer, 1030 Frauen) (Robert Koch-Institut, 2017). Insgesamt gesehen handelt es sich damit um eine seltene Erkrankung, welche jedoch zu den häufigsten onkologischen Erkrankungen Jugendlicher und junger Erwachsener gehört.

Das Hodgkin-Lymphom kann in jedem Alter auftreten, betrifft jedoch meist junge Menschen. So befinden sich 31,2% der Erkrankten in der Altersklasse von 20-34 Jahren, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 39 Jahren (Howlader et al., 2018).

### 1.1.2 Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms

Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms ist nicht vollständig aufgeklärt. Ein Zusammenhang mit Infektionen durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) konnte jedoch beobachtet werden (Herbst et al., 1990). So haben bspw. an einer infektiösen Mononukleose erkrankte Personen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Hodgkin-Lymphoms (Hjalgrim et al., 2003). Zudem besteht bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten oder bei Immunsuppression nach Transplantation ein erhöhtes Erkrankungsrisiko durch Reaktivierung einer EBV-Infektion (Latour und Winter, 2018).

HRSC stammen zu >98% von präapoptotischen B-Zellen des Keimzentrums und zu <2% von T-Zellen ab (Tzankov und Dirnhofer, 2006). Sie besitzen im Vergleich zu normalen B-Zellen nur sehr wenige B-Zell-Rezeptoren, welche zudem eine eingeschränkte Affinität aufweisen können (Thomas et al., 2004). Da dies für gewöhnlich zur Apoptose der Zellen führt, haben HRSC antiapoptotische Mechanismen entwickelt (Tzankov und Dirnhofer, 2006). Eine Möglichkeit, dem Zelltod zu entgehen, ist eine Infektion der HRSC mit EBV (Tzankov und Dirnhofer, 2006). Ein Zusammenhang zwischen EBV-Infektionen und dem Hodgkin Lymphom lässt sich unter anderem daher vermuten, dass Patienten, die an einer infektiösen Mononukleose erkrankt sind, ein dreifach erhöhtes Risiko für ein Hodgkin-Lymphom aufweisen. Zudem zeigen sich bereits vor der Diagnose des Hodgkin Lymphoms erhöhte Titer für EBV-Antikörper (Mueller et al., 1989). EBV kodiert die Gene *latent membrane protein 1* und *2* (LMP1 und LMP2), welche stimulatorische Signale der umliegenden T-Zellen und dendritischen Zellen imitieren und somit zu einer Aktivierung des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB) führen. Hieraus folgt eine vermehrte Expression antiapoptotischer Gene und eine Inhibierung des FAS-Signalweges (Thomas et al., 2004). Eine EBV-Infektion kann jedoch nur in 50% der HRSC nachgewiesen werden (Thomas et al., 2004).

Doch auch in EBV-negativen HRSC spielt NFkB eine entscheidende Rolle. So sorgen Mutationen des *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha*-Gens (Ikb $\alpha$ ) wahrscheinlich dafür, dass NFkB ohne stimulatorische Signale in den Zellkern gelangt und dort Einfluss auf Apoptose, Zellzyklus und Proliferation nehmen kann (Thomas et al., 2004).

### 1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Hodgkin-Lymphom-Patienten werden meist durch schmerzlose Lymphknotenschwellungen, welche sich in über 50% der Fälle zervikal, supraclavikulär oder mediastinal befinden, auffällig (Gobbi et al., 2013). Zudem kann eine B-Symptomatik auftreten, zu welcher Gewichtsverlust von mindestens 10% des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten, Nachtschweiß und Fieber über 38°C gezählt werden. Das Pel-Ebstein-Fieber, ein undulierender Fiebertverlauf, ist für das Hodgkin-Lymphom bekannt, tritt jedoch auch bei anderen Erkrankungen wie CMV-Infektionen und Tuberkulose auf (Schattner und Keshet, 2010). Nahezu pathognomonisch sind zudem schmerzende Lymphknoten nach Alkoholkonsum, welche jedoch nur sehr selten auftreten (Gobbi et al., 2013).

Zur Diagnostizierung des Hodgkin-Lymphoms ist die Exzision eines auffälligen Lymphknotens notwendig (Diehl et al., 2004).

### 1.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

Die pathologische Unterscheidung der Hodgkin-Lymphom-Typen erfolgt gemäß der WHO-Klassifikation (Tab. 1):

Tabelle 1: WHO-Klassifikation und Häufigkeiten der Hodgkin-Lymphom-Typen (Gobbi et al., 2013)

Gruppe	Häufigkeit
<b>1. Noduläres-lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom (NLPHL)</b>	<b>ca. 5%</b>
<b>2. Klassisches Hodgkin-Lymphom (95%) (cHL):</b>	<b>ca. 95%</b>
- Nodulär-sklersodierender Typ	ca. 75-80%
- Mischtyp	ca. 15%
- Lymphozytenreicher Typ	ca. 6%
- Lymphozytenarmer Typ	ca. 1%

Der Unterschied des nodulär-lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms im Vergleich zum klassischen Hodgkin-Lymphom liegt zum einen darin, dass das EBV keine Rolle in der Pathogenese spielt, als auch in der Tatsache, dass das NLPHL ein relativ intaktes B-Zell-Programm des Keimzentrums aufweist (Venkataraman et al., 2014).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation; hierbei ist der Bezug zum Zwerchfell entscheidend (Tab. 2).

**Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Ann-Arbor (Gobbi et al., 2013)**

<b>Stadium I</b>	eine befallene Lymphknotenregion oder ein extranodaler Herd
<b>Stadium II</b>	zwei oder mehr befallene Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells oder extranodaler Befall und befallene Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
<b>Stadium III</b>	zwei oder mehr befallene Lymphknotenregionen oder extranodaler Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells
<b>Stadium IV</b>	disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe

Die Zusatzbezeichnung B beschreibt das Vorliegen von B-Symptomen, die Zusatzbezeichnung A wird bei Fehlen dieser Symptome verwendet.

Als zusätzliche Risikofaktoren gelten eine hohe mediastinale Tumormasse, eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit und ein Alter über 50 Jahren und mindestens 4 betroffene Regionen (GHSG, *German Hodgkin's Lymphoma Study Group*) bzw. eine extranodale Manifestation und mindestens 3 betroffene Regionen (EORTC, *European Organization for Research and Treatment of Cancer*) (Diehl et al., 2004).

Zudem wurde der *International Prognostic Score* (IPS) für fortgeschrittene Stadien des Hodgkin-Lymphoms entwickelt, in welchem ungünstige Faktoren zusammengefasst werden (Hasenclever und Diehl, 1998).

- Zu diesen zählen:
- Serumalbumin <40g/l
  - Hämoglobin <10,5 g/dl (6,52 mmol/l)
  - Männliches Geschlecht
  - Alter > 45 Jahren
  - Stadium IV nach Ann Arbor
  - Leukozytenzahl  $\geq 15 \times 10^9/l$
  - Lymphozytopenie (<0,6  $\times 10^9/l$  oder <8% der weißen Blutzellen)

### 1.1.5 Therapie

Die Therapie des Hodgkin-Lymphoms besteht aus einer Kombination aus Polychemotherapie und Radiotherapie. Frühe und intermediäre Stadien werden nach dem ABVD-Schema (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) und einer zusätzlichen *Involved-field*-Bestrahlung behandelt. Ab den intermediären Stadien wird das BEACOPP-Schema (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin (Vincristin), Procarbazin, Prednisolon) und gegebenenfalls eine zusätzliche Bestrahlung angewendet. (Diehl et al., 2004). Für Patienten, die ein Rezidiv erleiden, ergibt sich die Möglichkeit einer Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer oder allogener Stammzelltransplantation (Diehl et al., 2004). Im Rahmen klinischer Studien wird Brentuximab vedotin, ein an einen Mikrotubuli-Inhibitor gekoppelter CD30-Antikörper, derzeit erfolgreich angewendet (Weniger et al., 2018). Der Therapieansatz ist unabhängig vom Stadium kurativ.

Eine Reduktion der therapieinduzierten Komplikationen und Langzeitschäden kann in fortgeschrittenen Stadien zum Beispiel durch zusätzliche PET-Untersuchungen während der Behandlung erzielt werden, da hierdurch für einige Patienten die Therapie reduziert werden kann (Borchmann et al., 2017). Durch ein FDG-PET nach dem zweiten Zyklus ABVD kann eine Aussage bezüglich des Rezidivrisikos getroffen werden. Zudem wird untersucht, ob Dosisreduktionen der verschiedenen Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Bleomycin und Vincristin, möglich sind, ohne die Prognose zu verschlechtern. Hierbei zeigen sich häufig positive Ergebnisse (Haverkamp et al., 2015).

Pädiatrische Patienten werden im Rahmen von Studien behandelt, deren Ziel es ebenfalls ist, die Langzeitfolgen zu reduzieren ohne jedoch die Überlebenswahrscheinlichkeit zu verringern (Mauz-Körholz et al., 2010).

### 1.1.6 Prognose

Das Hodgkin-Lymphom weist eine sehr gute Prognose auf, welche sich seit den 1970er Jahren noch weiter verbessert hat. Lag die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten bis 34 Jahren damals noch bei 80%, liegt sie heute bereits bei über 90%. Für Patienten über 65 Jahren beträgt diese 77,1% (Hodgkin Lymphoma - Cancer Stat Facts, 2018). Von den 2370 in Deutschland erkrankten Patienten starben im Jahr 2014 323 Personen (Robert Koch-Institut, 2017). Auch fortgeschrittene Stadien weisen bei optimaler Therapie eine gute Prognose auf. So beträgt das Langzeitüberleben unabhängig vom Stadium bei der Diagnose über 80% (Borchmann et al., 2017).

Trotz der meist erfolgreichen Therapie gibt es jedoch noch immer Patienten, die nicht auf eine Chemotherapie ansprechen (Staege et al., 2008).

### 1.1.7 Langzeitfolgen durch die Therapie

Aufgrund der hohen Heilungsrate und des oft jungen Erkrankungsalters der Betroffenen sind die Langzeitfolgen der Behandlung von besonderer Bedeutung. Zu diesen zählen neben endokrinen Dysfunktionen wie Hypoparathyreoidismus auch die Lungenfibrose, myokardiale Schäden, Wachstumsstörungen bei erkrankten Kindern und ein erhöhtes Risiko für Zweitmalignome wie der akuten myeloischen Leukämie, dem Myelodysplastischen Syndrom und Non-Hodgkin-Lymphomen, aber auch für solide Tumoren von z.B. Lunge, Brust und Kolon (Castellino et al., 2011; Diehl et al., 2004). Die Reduktion dieser Folgeschäden durch Modifizierung der Therapie ist aktuell Ziel zahlreicher Studien.

Eine weitere Nebenwirkung stellt die eingeschränkte Fertilität der Patienten dar. Aufgrund der Optimierung der Therapie konnte jedoch erreicht werden, dass die Rate der ehemaligen Patientinnen, die nach der Therapie ein Kind geboren haben, deutlich angestiegen ist. Es zeigte sich, dass Patientinnen, welche zwischen 1992 und 1997 diagnostiziert wurden, im Vergleich zu gesunden Frauen eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit zeigten, ein Kind zu gebären. Für diejenigen jedoch, die zwischen 2004 und 2009 die Diagnose eines Hodgkin-Lymphoms erhielten, zeigte sich eine deutliche Steigerung der Fertilität, welche vor allem in der zweiten Hälfte des Beobachtungszeitraumes von 7 Jahren der der gesunden Frauen entspricht (Weibull et al., 2018). In die Beobachtung wurden jedoch ausschließlich Patientinnen eingeschlossen, welche nach Erstlinientherapie behandelt wurden und kein Rezidiv entwickelten.

Männliche Patienten zeigen nach Therapie eines niedrigen oder intermediären Stadiums keine Einschränkung der Fertilität, nach Behandlung eines fortgeschrittenen Stadiums sind jedoch 80% von ihnen infertil (Diehl et al., 2004).

Dementsprechend ist es von Interesse, die Langzeitfolgen auch für fortgeschrittene Stadien und Rezidive zu senken.

## 1.2 Aktuelle Studienlage zur Genexpression des Hodgkin-Lymphoms

Die Genexpression des Hodgkin-Lymphoms ist derzeit Grundlage zahlreicher Untersuchungen um die Therapie weiter zu optimieren. Auch wenn die Prognose des Hodgkin-Lymphoms sehr gut ist, gibt es noch immer Patienten, welche auf die bisherige Therapie nicht ansprechen.

In Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass Hodgkin-Lymphomzelllinien mit unterschiedlicher Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie verschiedene Genexpressionsprofile besitzen. So zeigten zytostatikaresistente Zelllinien eine erhöhte Expression antiapoptotischer Gene wie beispielsweise CD40, Interleukin-13-Rezeptor *alpha 1* (IL13RA1) und *myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate* (MARCKS), welches bereits für das Ovarialkarzinom als Marker einer Cisplatinresistenz beschrieben wurde (Righetti et al., 2006), und ähneln in ihrem Phänotyp EBV-immortalisierten B-Zellen (LCL) (Staege et al., 2008). Auch eine hohe Expression des Tumorantigens *preferentially expressed antigen in melanoma* (PRAME), einem melanomassoziierten Antigen für zytotoxische T-Zellen, welches für eine Immuntherapie von Bedeutung sein kann, konnte nachgewiesen werden (Griffioen et al., 2006; Staege et al., 2008).

Im Vergleich dazu zeigten zytostatikasensible Zelllinien eine erhöhte Expression proapoptotischer Gene wie *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), *TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor* (TRAIL-R) und *B lymphocyte-induced maturation protein-1* (BLIMP1) (Staege et al., 2008).

Weitere Untersuchungen zeigten eine im Vergleich zu normalen Zellen des Keimzentrums abweichende Genexpression zahlreicher Gene in HRSC. So sind unter anderem einige potentielle Onkogene wie Cathepsin, *Ras Homolog Family Member C* (rhoC) oder L-myc überexprimiert (Schwering et al., 2003). Cathepsin ist eine für die Tumorprogression bedeutende Protease (Schwering et al., 2003). RhoC ist als Mitglied der Ras-Familie von Bedeutung für den Zellzyklus und Differenzierungsprozesse (Jaffe und Hall, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von rhoC die Metastasierung und Tumorprogression begünstigt (Clark et al., 2000). Außerdem sind der für die Zelladhäsion wichtige Lamininrezeptor und CD44 sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren überexprimiert (Schwering et al., 2003). Zu den unterexprimierten Genen gehören nahezu alle B-Zell-spezifischen Gene mit Ausnahme derer, die eine Rolle in der Antigenpräsentation auf MHC II Molekülen spielen. Auch einige negative Regulatoren von G-Protein-Signalwegen und interessanterweise zwei Gene, welche für negative Regulatoren von rho kodieren (rho GDI $\alpha$  und GDI $\beta$ ), sind unterexprimiert (Schwering et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass das Genexpressionsprofil des klassischen Hodgkin-Lymphoms große Ähnlichkeiten mit B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen wie beispielsweise dem primär mediastinalen diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (PMBCL) und dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) aufweist. Auch die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) weist Ähnlichkeiten auf, was durch die Hodgkin-Variante der Richter Transformation, wobei die CLL in ein Hodgkin-Lymphom übergeht, deutlich wird (Tzankov und Dirnhofer, 2006). In der Hälfte dieser Fälle konnte nachgewiesen werden, dass die HRSC und CLL-Zellen ihren Ursprung in demselben B-Zell-Klon haben (Tzankov und Dirnhofer, 2006).

### 1.3 Die Bedeutung der minimalen Resterkrankung

Bei malignen Erkrankungen ist es von besonderem Interesse, möglichst frühzeitig das Therapieansprechen zu messen und somit Aussagen über die Prognose treffen und eine risikoadaptierte Therapie durchführen zu können. Zudem sollen Rezidive frühzeitig erkannt und behandelt werden. Hierfür wurden für einige Erkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), Strukturen, die sogenannten *minimal residual disease* (MRD)-Marker, ausfindig gemacht, welche die Minimale Resterkrankung anzeigen (Kern et al., 2008; Gaipa et al., 2013).

Das Ziel ist es, eine maligne Zelle unter mindestens 10.000 normalen Zellen zuverlässig und schnell detektieren zu können (Gaipa et al., 2013). Hierfür werden zwei verschiedene Verfahren angewendet: die Durchflusszytometrie und die Real-Time PCR.

In der Durchflusszytometrie können spezifische Oberflächenmoleküle, die *Leukemia-associated Aberrant Immunophenotypes* (LAIPs), identifiziert werden (Kern et al., 2008).

Mit Hilfe der quantitativen Bestimmung mittels Real-Time PCR (qPCR) können dagegen beispielsweise spezifische Mutationen, Genfusionen und Gen-Rearrangements von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren nachgewiesen werden (Gaipa et al., 2013). Für die AML können zusätzlich stark überexprimierte Gene als MRD-Marker dienen (Kern et al., 2008).

Es gibt Untersuchungen, in denen auch für weitere Erkrankungen nach MRD-Markern gesucht wird, um das Rezidivrisiko einschätzen zu können. Zu diesen gehören z.B. das anaplastisch-großzellige Lymphom (Damm-Welk et al., 2014) und auch solide Tumoren wie das kolorektale Karzinom (Bork et al. 2014) und das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) (Masago et al., 2018).

## 1.4 CDNA-Banken

CDNA-Banken ermöglichen die Untersuchung von Genen, die beispielsweise durch Tumorzellen spezifisch exprimiert werden. Hierfür wird die mRNA einer Zelle durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in Vektoren inkloniert, welche in eukaryotische Zellen transfiziert werden können (Seed und Aruffo, 1987). Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits spezifische Genvarianten wie das *dual specificity phosphatase 5 pseudogene 1* (DUSP5P1) nachgewiesen werden, welches bei aktiver Erkrankung sogar im peripheren Blut nachgewiesen werden kann (Staege et al., 2014). Zudem wurde versucht, mittels cDNA-Banken mögliche Zielstrukturen und Resistenzfaktoren ausfindig zu machen. Hierbei zeigte sich die Proteinkinase TTK als interessanter Ansatzpunkt für eine zukünftige Therapie, da durch dessen Inhibierung die Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika erhöht werden konnte (Kewitz, 2015).

## 1.5 Lymphoblastoide Zelllinien

Lymphoblastoide Zellen, auch LCL genannt, sind Zellen, welche durch EBV immortalisiert wurden und somit unbegrenzt proliferieren können (Pajic et al., 2000). Die Zellen der Linie EREB2-5 enthalten ein Fusionsprotein bestehend aus dem *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2* (EBNA2) und der Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptor (ER/EBNA2). Die Proliferation findet demnach östrogenabhängig statt (Kempkes et al., 1995).

Durch zusätzliche stabile Transfektion mit dem Vektor p-myc-tet wurde die B-Zelllinie P493-6 geschaffen. Die Proliferation dieser Zellen wird durch Tetrazyklin in dem Sinne reguliert, dass diese in Anwesenheit von Tetrazyklin nicht stattfindet, da der Transkriptionsfaktor myc nicht exprimiert wird (Pajic et al., 2000; Schuhmacher et al., 1999). Durch Östrogenzugabe wird auch in diesen Zellen EBNA2 aktiviert. Die Proliferation wird demnach durch Östrogen begünstigt und durch Tetrazyklin gehemmt.

## 2 Zielsetzung

Die Reduzierung von Langzeitfolgen nach Behandlung eines Hodgkin-Lymphoms ist Ziel aktueller Forschungen. Dieses Risiko ist aufgrund intensiver Therapie bei fortgeschrittenen Stadien und Rezidiven im Vergleich zu frühen Stadien deutlich erhöht. Zudem ist es denkbar, die Therapie auch in frühen Krankheitsstadien zu reduzieren, ohne dadurch die Mortalität zu erhöhen. Eine risikoadaptierte Therapie, welche durch Messung des Therapieerfolgs erreicht werden kann, sowie das frühzeitige Erkennen von Rezidiven, um diese mit möglichst geringer Therapie behandeln und dadurch das Risiko für Langzeitfolgen in Zukunft senken zu können, ist daher von großem Interesse. Da es für das Hodgkin-Lymphom bisher keine Marker einer minimalen Resterkrankung (MRD-Marker) wie zum Beispiel für die AML oder ALL gibt, ist dies das Thema dieser Arbeit.

Um einen möglichen MRD-Marker ausfindig zu machen, wurde ein in der Arbeitsgruppe generierter Mikroarray-Datensatz verschiedener *in-vitro*-transkribierter cDNA-Banken ausgewertet und die Genexpression von Hodgkin-Lymphomzelllinien mit der von normalen Blutzellen verglichen. Hierbei wurde nach Genen gesucht, die im Vergleich zu normalen Blutzellen deutlich überexprimiert sind. Mittels Real-Time PCR wurde anschließend untersucht, ob das Ergebnis der Mikroarray-Analyse auf die Zelllinien übertragbar ist. Zudem wurde untersucht, ob es sich hierbei um ein für das Hodgkin-Lymphom spezifisches Ergebnis handelt oder ob dieses auch für weitere Lymphom- oder Leukämie-Zellen oder sogar für proliferierende Zellen im Allgemeinen zutrifft.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte verwendet (Tab. 3):

**Tabelle 3: Verwendete Geräte**

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller (Ort)</b>
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Gelelektrophoresekammern	Bio-Rad Laboratories (München)
Imager Quantum ST5	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Lichtmikroskop (invers), Axiovert25	Carl Zeiss (Jena)
Mastercycler personal und ~gradient	Eppendorf (Hamburg)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart)
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik (Friedrichsdorf)
Rotor Gene RG-3000	Corbett Research (Sydney, Australien)
Schüttler mit Inkubationshaube	Edmund Bühler (Tübingen)
<i>Speed-Vac</i>	Eppendorf (Hamburg)
Spektrophotometer (UV/VIS) DU800	Beckmann Instruments (Brea, USA)
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus (Hanau)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer compact,	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge fresco und ~pico	Heraeu (Hanau)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)

##### 3.1.2 Chemikalien und Kits

Zur Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Chemikalien und Kits verwendet.

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Kits**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller (Ort)</b>
10mM dNTP Mix	Thermo Fisher (Darmstadt)
5xRT Puffer	Thermo Fisher (Darmstadt)

Agarose	PEQ Lab (Erlangen)
$\beta$ -Estradiol	Sigma-Aldrich (Heidelberg)
BigDye-Mix	Life Technologies (Carlsbad, USA)
BigDye Puffer	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser 0,1%	Ambion (Austin, USA)
Ethanol 75-80%	Carl-Roth (Karlsruhe)
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich (Heidelberg)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Heidelberg)
Universal RNA Purification Kit	Roboklon (Berlin)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
GeneJET Gel Extraction Set: Binde-, Wasch- und Elutionspuffer	Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts)
GoTaq <sup>R</sup> qPCR Master Mix (2x)	Promega (Mannheim)
H-Minus RT	Thermo Fisher (Darmstadt)
Isopropanol	Carl-Roth (Karlsruhe)
Ladepuffer 6xLB	Thermo Fischer (Darmstadt)
Marker 100bp plus	Thermo Fischer (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
<i>Nuclease free</i> H <sub>2</sub> O	Promega (Mannheim)
Oligo dT12-18 Primer (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Thermo Fisher (Darmstadt)
<i>Phosphat Buffered Saline</i> (PBS)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPMI (Rosswell Park Memorial Institute) 1640	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Tetrazyklin sterilfiltriert	Sigma-Aldrich (Heidelberg)
Trizol	peqLab jetzt VWR (Erlangen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Heidelberg)

### 3.1.3 Puffer und Medien

Folgende Puffer und Medien wurden zur Durchführung der Untersuchungen verwendet (Tab. 5):

**Tabelle 5: verwendete Puffer und Medien**

<b>Puffer/Medium</b>	<b>Zusammensetzung/Hersteller</b>
Kulturmedium	RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin, 1% Streptomycin
Phosphat Buffered Saline	Life Technologies GmbH (Carlsbad, USA)
TAE Puffer (50x)	50mM EDTA, 2M Tris-HCl pH 8,0, 5,75% (v/v) Essigsäure

### 3.1.4 cDNA Banken

Es wurden cDNA-Banken der HL-Zelllinien KM-H2 (Kewitz 2015), L-1236 (Staege et al., 2014) und L-428 (Müller, 2011) analysiert. Mikroarraydaten von *in-vitro*-transkribierter RNA dieser Banken (Müller, 2011) wurden mit Arraydaten von 11 Proben peripheren Blutes und 14 Proben von B-Zellen gesunder Spender verglichen. Diese Daten wurden aus der öffentlich zugänglichen Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank heruntergeladen (siehe Tab. 6).

**Tabelle 6: GSE- und GSM-Nummern der verwendeten Mikroarraydatensätze der Vergleichszellen**

<b>GSE-Nummer</b>	<b>GSM-Nummer</b>	<b>Referenz</b>
GSE 18838	GSM466898	Shehadeh et al. 2010
	GSM466899	
	GSM466900	
	GSM466901	
	GSM466902	
	GSM466903	
	GSM466904	
	GSM466905	
	GSM466906	
	GSM466907	
GSM466908		
GSE 14352	GSM358912	Grigoryev et al. 2009, 2011
	GSM358913	
	GSM358914	

---

	GSM358915	
	GSM358916	
	GSM358917	
	GSM358918	
	GSM358919	
	GSM358920	
	GSM358921	
GSE 20200	GSM506714	Nikitin et al. 2010, Price et al. 2012
	GSM506715	
	GSM506716	
	GSM506717	

---

### 3.1.5 Verwendete Zelllinien

#### Hodgkin-Lymphomzellen

Zur Analyse der Genexpression des Hodgkin-Lymphoms am Beispiel des Gens UBE2S wurde RNA der humanen Hodgkin-Lymphomzelllinien KM-H2 (Kamesaki et al., 1986), HDLM-2 (Drexler et al., 1986), L-1236 (Wolf et al., 1996), L-540 (Diehl et al., 1982) und L-428 (Schaadt et al., 1979) verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Frau I. Volkmer, Mitarbeiterin des pädiatrischen Forschungslabors der Martin-Luther-Universität Halle, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig.

#### Peripheral Blood Mononuclear Cells

Zum Vergleich für die Genexpressionswerte wurden *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) 15 verschiedener gesunder Spender verwendet. Diese stammten von gesunden Blutspendern der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle. Die RNA dieser Zellen wurde dankenswerterweise von Frau I. Volkmer präpariert.

Die Gewinnung dieses Materials geschah mit Einwilligung der Spender, zudem lag ein Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität vom 14.10.2016 vor (Bearbeitungsnummer 2016-111).

#### Leukämie- und Lymphomzellen

Zum Vergleich der Expression des Gens *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S* (UBE2S) der Hodgkin-Zelllinien wurde zusätzlich die Expression der Burkitt-Lymphom-Zelllinien

Raji (Pulvertaft, 1964; Epstein et al., 1966) und Daudi (Klein et al., 1968; Nadkarni et al., 1969) sowie der Leukämie-Zelllinien NALM6 (Hurwitz et al., 1979), cALL2 (Tomeczkowski et al., 1995; Aburawi et al., 2011) und 679 (Findley et al., 1982) von der DSMZ untersucht. cALL2-Zellen und 697-Zellen lagen als in Flüssigstickstoff gelagerte Zellen vor, deren RNA zunächst extrahiert werden musste. Die bereits vorhandene RNA der Zelllinien Raji, Daudi und NALM6 wurde freundlicherweise von Frau I. Volkmer zur Verfügung gestellt.

#### Native HL-RNA

Es wurde vorhandene RNA einer Tumorbiopsie eines Hodgkinpatienten untersucht. Für die Analyse lagen eine Einwilligungserklärung sowie ein Ethikvotum vom 11.05.2011 vor.

#### Lymphoblastoide Zelllinien

Ebenfalls als Vergleich zu den Hodgkin-Lymphomzelllinien dienten die lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 (Hoennscheidt et al., 2009) und EREB2-5 (Kempkes et al., 1996). Zusätzlich wurde eine Zellkultur mit der Zelllinie P493-6 (Schuhmacher et al., 1999) angelegt.

EREB2-5-Zellen und P493-6-Zellen stammten von Prof. Dr. G. W. Bornkamm (München), die Linien LCL-73 und A2+2310 wurden von M. S. Staeger (Halle) zur Verfügung gestellt.

### **3.1.6 Primer**

Zur Analyse des Gens UBE2S wurden Primer für verschiedene Varianten und Abschnitte des Gens verwendet. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Plattform Primer3Plus (Untergasser et al., 2012) ermittelt.

Die Datenbank NCBI zeigte für das Gen UBE2S neben dem Wildtyp NM die beiden Isoformen X1 und X2. Für alle drei Varianten wurde jeweils ein spezieller Rückwärts-Primer verwendet. Der Rückwärts-Primer „UBE2S“ setzte in dem Teil des Gens an, der für alle Varianten identisch ist. Aufgrund von in der Gelelektrophorese entstandenen Doppelbanden der Produkte des NM-Primers (siehe Anhang), wurde dieser im Verlauf durch den NM2-Primer ersetzt. Ein zusätzliches Primerpaar diente der Analyse des überexprimierten Probe-Sets der ID 3747003 (siehe Ergebnisteil). Die Lage der verwendeten Primer im Gen UBE2S ist in Abbildung 1 dargestellt.

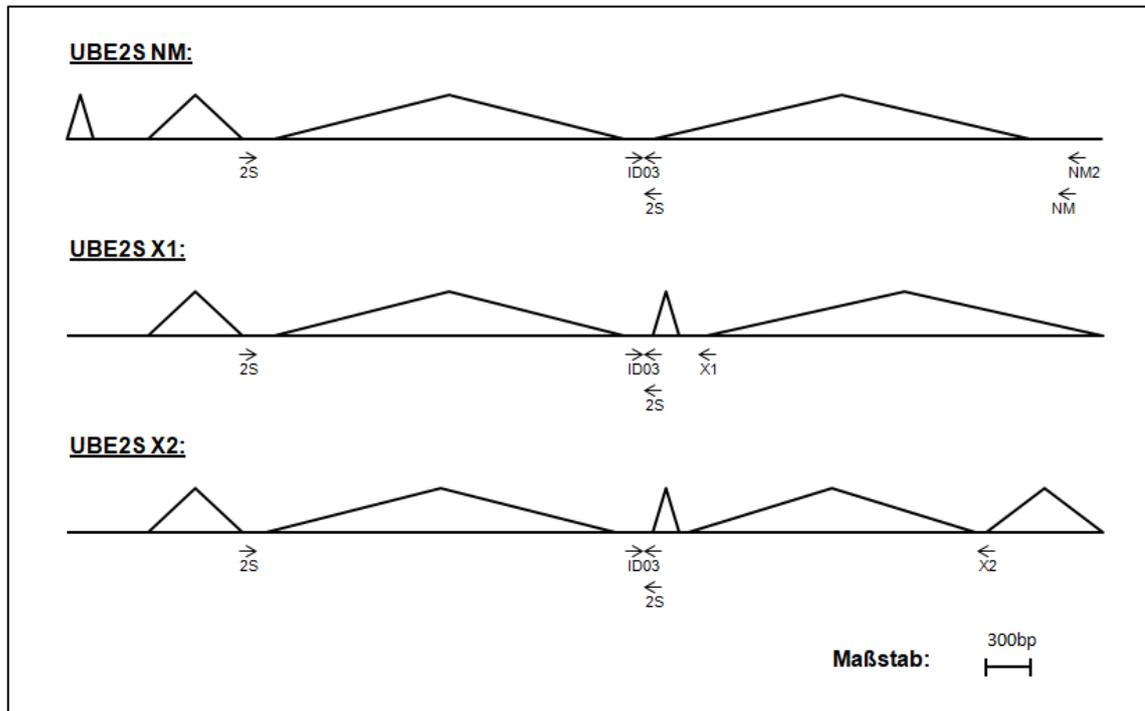
Zur Untersuchung der Zellen der Linie P493-6 wurden zunächst Aktin, *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1* (HPRT1), *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*

(GAPDH) und *TATA-binding protein* (TBP) als *Housekeeping*-Gene verwendet. Zusätzlich wurden die Gene *c-myc* und *Alpha/Betahydrolase Domain Containing 6* (ABHD6) untersucht. Für die vorherigen Untersuchungen aller anderen Zelllinien diente Aktin als *Housekeeping*-Gen.

Alle, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 7: verwendete Primer**

<b>Primernamen</b>	<b>Sequenz</b>
UBES2S_for	5'-CTT TCC CAA CGA GGA GGA CC-3'
UBE2S_rev	5'-TCC CTC TTG AGC ACG TTG AC-3'
UBE2SNM_rev	5'-GAG GAA GCT TCA GTG CCA CT-3'
UBE2SX1_rev	5'-CAC CTG GCC TAC CCT ATC CT-3'
UBE2SX2_rev	5'-TCT GGT TCA ACG AGT GAG GC-3'
UBE2SNM2_rev	5'-CGC TTC TTG TCC GTC TTT TTC T-3'
U-ID03_for	5'-CAA CGT GCT CAA GAG GGA CT-3'
U-ID03_rev	5'-CAG CAG TAC GTG TCG GAT G-3'
Aktin for	5'-GGC ATC GTG ATG GAC TCC G-3'
Aktin rev	5'-GCT GGA AGG TGG ACA GCG A-3'
GAPDH_for	5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3'
GAPDH_rev	5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'
TBP_for	5'-CCA CTC ACA GAC TCT CAC AAC-3'
TBP_rev	5'-CTG CGG TAC AAT CCC AGA ACT-3'
ABHD6_left	5'-GTT GAG GCT GGT CAG GAG TC-3'
ABHD6_right	5'-AGC AGA TGC TGT GTG CAG AA-3'
HPRT1_for	5'-ACC AGT CAA CAG GGG ACA TAA-3'
HPRT1_rev	5'-CTT CGT GGG GTC CTT TTC ACC-3'
c-myc_for	5'-GGCTCCTGGCAAAGGTCA-3'
c-myc_rev	5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'



**Abbildung 1: Darstellung des Gens UBE2S und seiner Isoformen mit Ansatzpunkten der verwendeten Primer.**

Dargestellt werden die Normtranskriptvariante NM und die Isoformen X1 und X2 des Gens UBE2S. Exons entsprechen den Linien, Introns den Dreiecken. Die Lagen der verwendeten Primer werden durch Pfeile markiert. →: Vorwärtsprimer, ←: Rückwärtsprimer. NM/NM2, X1 und X2 sind spezifische Primer der verschiedenen Genvarianten, der gemeinsame Vorwärtsprimer und der Rückwärtsprimer 2S liegen in für alle Varianten identischen Genabschnitten. ID03 entspricht dem überexprimierten Probe-Set der ID 3747003.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Auswertung von Mikroarray-Daten

Zur Identifizierung von Genen, welche als potentielle MRD-Marker für das Hodgkin-Lymphom in Frage kommen, dienten Mikroarraydaten der cDNA-Banken der HL-Linien KM-H2, L-1236 und L-428. Diese standen im Labor aus Vorarbeiten zur Verfügung (siehe oben) und wurden mit Daten von 25 Proben des peripheren Blutes und isolierten B-Zellen verglichen. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms MAFilter so vorgefiltert, dass die Signalintensität der Zelllinie L-1236 mindestens 100 betrug (Winkler et al., 2012). Mit Microsoft Excel wurde der Datensatz weiterhin so verkleinert, dass die Signalintensität auch für die Zelllinien KM-H2 und L-428 mindestens 100 betrug. Anschließend wurde jeweils der kleinste Wert der HL-Linien mit dem größten Wert der Vergleichszellen verglichen. Als überexprimiert galten diejenigen Probe-Sets, für die die Intensität der HL-Linien mindestens dem Dreifachen der Vergleichszellen entsprach. Die Visualisierung der Daten und Clusteranalyse erfolgte mit dem Programm Genesis (Sturn et al., 2002).

### 3.2.2 Reverse Transkription, cDNA Synthese

Zur Gewinnung der cDNA wurde eine reverse Transkription aus bei -80°C gelagerter RNA der Hodgkin-Zelllinien KM-H2, HDLM-2, L-1236, L-540 und L-428 sowie aus zuvor extrahierter RNA 9 verschiedener PBMCs durchgeführt. Hierzu wurde der in Tabelle 8 aufgelistete Reaktionsansatz angefertigt:

**Tabelle 8: Reaktionsansatz reverse Transkription**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
5x RT Puffer	4 µl
Oligo dT12-18 Primer 0,5µg/µl	1 µl
10mM dNTP Mix	1 µl
H-Minus RT	1 µl
RNA	2 µg
DEPC-Wasser	13 µl – RNA-Volumen

Die reverse Transkription fand im Thermocycler bei 37 °C für eine Stunde und anschließender Inaktivierung bei 90 °C für 5 min statt. Die Lagerung der cDNA erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

### 3.2.3 Quantitative Bestimmung mittels Real-Time PCR

Die quantitative Bestimmung der DNA-Menge erfolgte mittels Real-Time PCR (qPCR) (Tab. 9).

**Tabelle 9: Reaktionsansatz qPCR**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Mastermix (dNTPs, Puffer, Taq-Polymerase)	10 µl
Vorwärts- und Rückwärts-Primer	je 1 µl
cDNA bzw. Nuclease free H <sub>2</sub> O	1 µl
Nuclease free H <sub>2</sub> O	7 µl

Bei der qPCR erfolgte im Thermocycler zunächst eine Denaturierung bei 95 °C für 5 min und anschließend 40 Zyklen der Denaturierung für 30 s bei 94 °C, Hybridisierung für 30 s bei 60 °C und der Elongation für 45 s bei 72 °C. Nach abschließenden 5 min bei 72° C wurden die Reaktionsgefäße bis zur Weiterverarbeitung bei 16 °C im Thermocycler gelagert.

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der Reaktionsprodukte überprüft werden. Die anschließende Auswertung der qPCR erfolgte gemäß der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak et al., 2001).

### 3.2.4 Gelelektrophorese

Die Darstellung der Produkte der qPCR erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierbei können DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuren der Größe nach aufgetrennt werden, indem sie innerhalb eines elektrischen Feldes zur Anode wandern. Hierfür wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer gelöst und für zwei Minuten in der Mikrowelle gekocht. Der hierbei entstandene Flüssigkeitsverlust wurde anschließend durch destilliertes Wasser aufgefüllt. Nach Hinzugabe von Ethidiumbromid (6  $\mu$ l auf 80 g TAE bzw. 12  $\mu$ l auf 120 g TAE) wurde das Gel in einer Gelkammer unter Aussparung von Taschen ausgegossen. In diese wurden jeweils 10  $\mu$ l der entsprechenden Probe und 3  $\mu$ l Ladepuffer hinein pipettiert.

Zur Bestimmung der Größe der Produkte wurde ein Marker aus 10  $\mu$ l nucleasefreiem Wasser, 3  $\mu$ l Ladepuffer (6xLB) und 2  $\mu$ l 100 bp plus Marker hergestellt und aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte unter Anlage einer Spannung von 80 V für ca. 5 min und anschließend 110 V, bis die Banden etwa die Mitte des Gels erreichten. Anschließend wurden die DNA-Banden mit Hilfe des Gerätes Imager Quantum ST5 fotografiert.

### 3.2.5 Sequenzier-PCR

Um eine in der Gelelektrophorese entstandene Doppelbande sequenzieren zu können, wurde die betreffende Bande zunächst mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Gel heraus geschnitten. Hierfür wurde die Bande mittels UV-Strahlung sichtbar gemacht, die Exposition wurde so kurz wie möglich gehalten. Anschließend wurde Bindepuffer im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und bei 50-60 °C für etwa 10 min inkubiert, bis das Gel gelöst war. Bei orange- oder violettfarbener Verfärbung der Lösung mussten 10  $\mu$ l 3M Natrium-Acetat mit einem pH von 5,2 hinzugegeben werden, um einen optimalen pH zu erreichen. Für DNA-Fragmente kleiner gleich 500 bp wurde zusätzlich 100% Isopropanol im Verhältnis 1:2 hinzugegeben und anschließend bis zu 800  $\mu$ l der Lösung in eine Aufreinigungssäule von GeneJET pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde, wie auch in den folgenden Schritten, verworfen.

Zunächst wurden 100 µl Bindepuffer und nach einminütigem Zentrifugieren 700 µl Waschpuffer in die Säule gegeben. Um diesen Waschpuffer vollständig zu entfernen, wurde nun zweimal für eine Minute zentrifugiert. Mittels 50 µl Elutionspuffer und erneuter einminütiger Zentrifugation wurde die DNA aus der Säule gelöst.

Die gewonnene DNA wurde für die Sequenzier-PCR verwendet. Hierfür wurde ein Reaktionsansatz aus 0,2 µl des Rückwärtsprimers (Primer NM), 2 µl Big-Dye-Puffer (5x), Big-Dye-Mix, 3 µl der DNA-Lösung und 3,8 µl HPLC-H<sub>2</sub>O angefertigt. Es wurde eine PCR mit 30 Zyklen (96 °C für 10 sec, 60 °C für 4 min, anschließende Lagerung bei 12 °C) durchgeführt.

Vor der Sequenzierung musste das PCR-Produkt ausgefällt werden, wofür 1 µl 3M Natriumacetat (pH 4,6) und 25 µl 100%iges Ethanol hinzugegeben wurden. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der Überstand abgenommen und 25 µl 70% Ethanol hinzugegeben. Nach erneutem Abnehmen des Überstandes wurde das ausgefällte PCR-Produkt in der SpeedVac getrocknet, bevor die Sequenzierung freundlicherweise vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther Universität durchgeführt wurde.

### 3.2.6 RNA-Extraktion

Die Präparation der PBMC-RNA sowie der Zelllinien cALL2 und 697 erfolgte mittels TRIzol-Extraktion. Die Isolation der RNA der mit Tetrazyklin und/oder Östrogen behandelten Zellen der Linie P493-6 wurde mit Hilfe des EURx GeneMatrix Universal RNA Purification Kit von Roboklon und nach dessen Anleitung durchgeführt.

Für die TRIzol-Extraktion wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C kurz angetaut und umgehend in Röhrchen mit 9 ml PBS gegeben. Nach vollständigem Auftauen wurden diese bei 210 g für 10 min zentrifugiert und das PBS unter der Sterilbank abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde in 1 ml TRIzol homogenisiert und erneut auf Eis gelagert. TRIzol inaktiviert die in den Zellen enthaltenen RNAsen. Nach Umfüllen des Inhalts der Tubes in 1 ml Eppendorfgefäße für RNA wurden diese bei 4 °C für 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue RNA-Eppendorfgefäße überführt und mit 0,2 ml Chloroform für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Es wurden 3 Phasen deutlich. In der unteren pinkfarbenen Phase befanden sich Proteine, die weiße Interphase enthielt DNA und die obere wässrige Phase RNA. Diese Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, pro ml Trizol 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugierung für 10 min bei 4 °C und 12000 g und anschließendem Abgießen des Überstandes, wurde 1 ml kaltes 75-80%iges Ethanol hinzugegeben und

kurz *gevortext*, sodass das im Reaktionsgefäß verbliebene Pellet vollständig von Ethanol umspült war. Nach zweimaliger Zentrifugation für 5 min bei 4 °C bei 7500 g wurde jeweils der Überstand entfernt. Das verbliebene Pellet wurde 5-10 min unter dem Abzug getrocknet und anschließend in 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Zuletzt erfolgte die Erhitzung bei 65 °C für 10 min.

Für die anschließende reverse Transkription zur cDNA-Gewinnung wurde der RNA-Gehalt mittels DU 800 Spectrophotometer bestimmt.

### 3.2.7 Zellkultur und Aufreinigung

Die Arbeit mit den Zellkulturen fand unter der Sterilbank statt. Es wurde eine Suspensionskultur aus Zellen der Linie P493-6, welche zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren waren, angefertigt. Als Kulturmedium wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), Streptomycin und Penicillin versetztes RPMI 1640 verwendet.

Da DMSO in aufgetauten Zellen toxisch wirkt, wurden die Zellen nach dem Antauen in dem auf 37 °C vorgewärmten Wasserbad sofort in Nährmedium gegeben und 10 min bei 210 g zentrifugiert. Der Überstand mit dem in ihm enthaltenen DMSO wurde anschließend abgesaugt und durch frisches Nährmedium ersetzt, in dem das zuvor entstandene Pellet resuspendiert wurde.

Nach 4-tägiger Inkubation der Zellen bei 37 °C und einmaliger Splittung im Verhältnis von 1:2 wurden je 3 ml der Suspension und 2 ml frisches Kulturmedium auf eine 6-Well-Platte (insgesamt 5 Ansätze) gegeben. Nach Zugabe von sterilfiltriertem Tetrazyklin 1 µg/ml und/oder Östrogen 1 µg/ml erfolgte eine erneute Inkubation im Brutschrank für 4 Tage.

Die Zellzahl wurde anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierfür wurde ein Deckglas bis zur Ausbildung Newtonscher Ringe auf die Kammer gedrückt und anschließend 100 µl der mit Trypanblau angefärbten Zellsuspension (Verdünnung 1:10) in die Zählkammer gegeben. Aufgrund der Kapillarkräfte gelangte die Probe unter das Deckglas und die Anzahl konnte mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt werden. Hierfür wurden die Zellen in den Diagonalen der Großquadrate gezählt. Da beschädigte Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, wurden nur die ungefärbten Zellen gezählt. Die Zellzahl wurde anschließend nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = \text{Gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mittels Mikroarray-Analyse identifizierte Gene

Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA, welche durch *In-Vitro*-Transkription von cDNA-Bibliotheken von HL-Zelllinien gewonnen worden war, zur Charakterisierung HL-assoziiierter Transkripte mittels DNA-Mikroarrayanalyse eingesetzt (Kewitz, 2015; Müller, 2011).

Die Auswertung der Mikroarray-Datensätze zeigte eine deutlich erhöhte Signalintensität der Probe-Sets verschiedener Gene in HL-Zellen gegenüber Zellen des peripheren Blutes und isolierter B-Zellen. Diese werden in Abbildung 2 in Form einer Heat Map dargestellt.

Als überexprimiert galten Probe-Sets, deren Signalintensität in allen HL-Zellen mindestens dem Dreifachen der Intensität der Vergleichsprobe (Zellen des peripheren Blutes oder isolierte B-Zellen) mit der höchsten Signalintensität entsprach. Tabelle 5 zeigt die Daten der Probe-Sets, deren Intensität der HL-Linien dem Zehnfachen der Vergleichszellen entspricht. Im Anhang sind die Werte aller überexprimierten Probe-Sets aufgelistet.

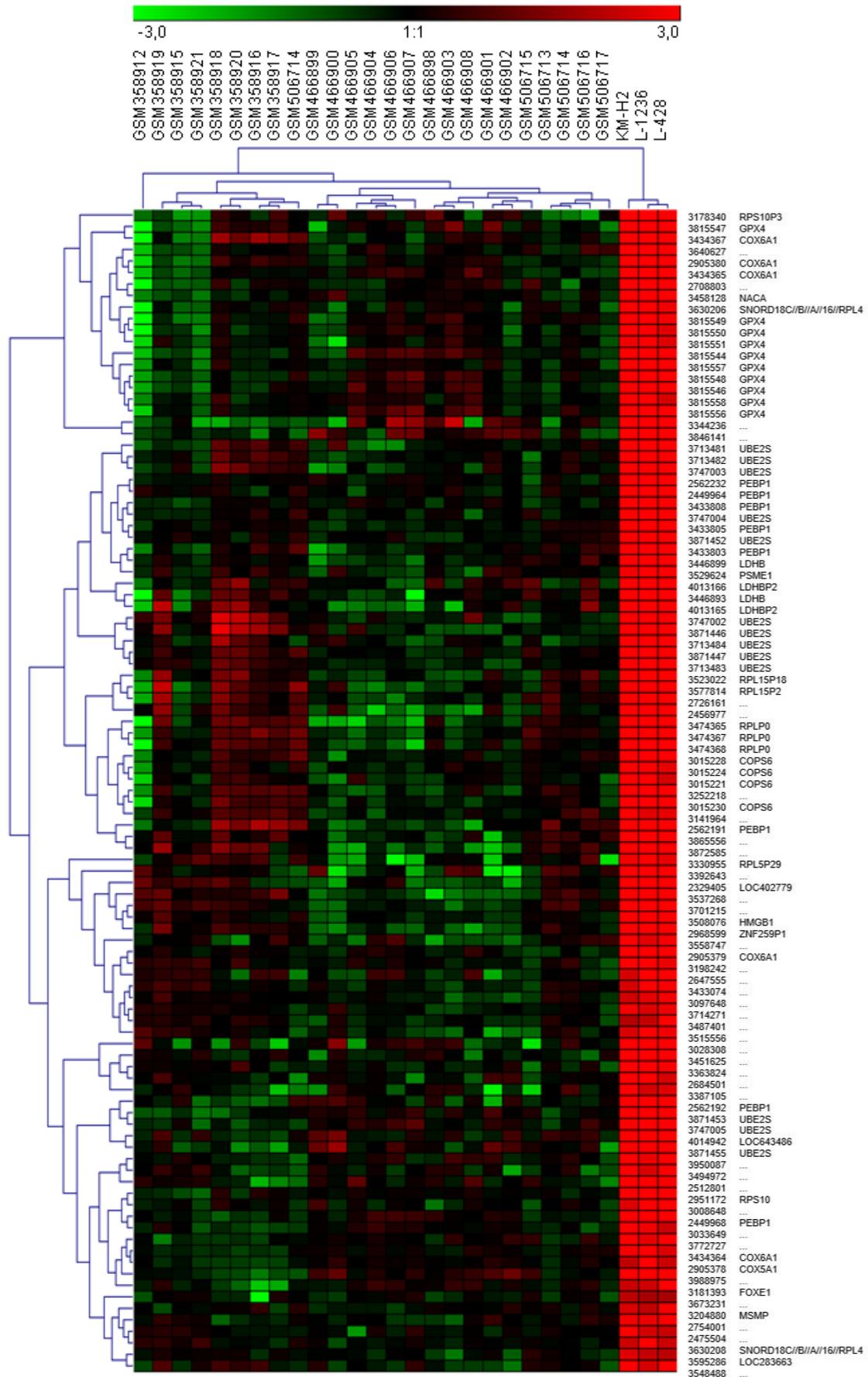


Abbildung 2: Darstellung der Expression der einzelnen Probe-Sets mit Hilfe einer Heatmap (Manhattan distance, log<sub>2</sub>-transformiert, complete linkage clustering)

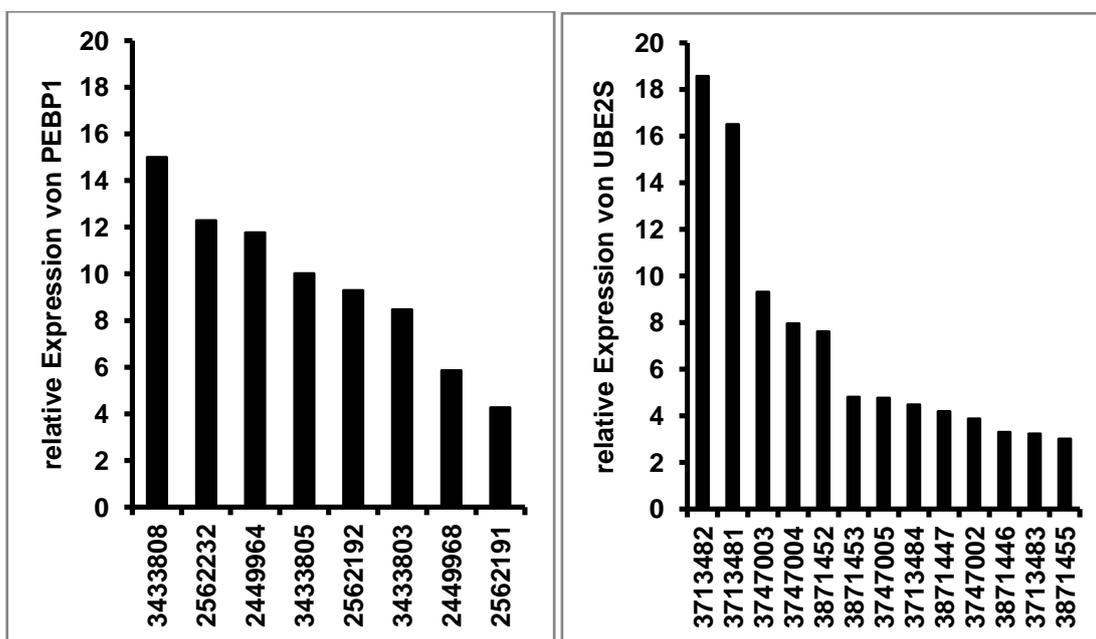
**Tabelle 10: Darstellung der in der Mikroarray-Analyse überexprimierten Gene**

Dargestellt werden alle Probe-Sets, deren Intensität der HL-Linie der geringsten Signalintensität mindestens dem zehnfachen der Vergleichszelle mit der stärksten Signalintensität entsprach. Als Vergleichszellen dienten 11 PBMCs und 14 Proben isolierter B-Zellen. Zur vereinfachten Darstellung wurde der Mittelwert der Vergleichszellen (VZ) gebildet.

Probe-Set ID	MW VZ	KM-H2	L-1236	L-428	Gen	Min HL / Max VZ
3713482	164,97991	8207,535	13810,84	6780,1	UBE2S	18,5656673
3713481	82,888854	2976,445	9125,883	5794,675	UBE2S	16,4991865
3433808	100,774379	2237,072	7370,007	5855,704	PEBP1	14,9985552
2562232	112,218313	1953,339	6315,275	4923,042	PEBP1	12,2905541
2449964	93,3143952	1641,24	6090,701	4483,22	PEBP1	11,7769551
4013166	6,8094364	270,3068	217,0031	749,1874	LDHBP2	11,4374148
3433805	278,637996	3877,676	10807,19	7359,117	PEBP1	10,0205182

VZ: Vergleichszellen, MW VZ: Mittelwert der Vergleichszellen

Wie in Tabelle 10 dargestellt, gehörten die Gene *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S* (UBE2S) und *Phosphatidylethanolamine binding protein 1* (PEBP1) zu den am stärksten überexprimierten Genen und kamen daher für weitere Untersuchungen in Betracht. In Abbildung 3 sind die überexprimierten Probe-Sets dieser Gene dargestellt.



**Abbildung 3: Überexprimierte Probe IDs von PEBP1 (links) und UBE2S (rechts) im Vergleich zu normalen Blutzellen**

Verglichen wurde jeweils der kleinste Wert der Zelllinien KM-H2, L-1236 und L-428 mit dem größten Wert der Vergleichszellen. Ein Probe-Set galt als überexprimiert, wenn die Signalintensität mindestens dem Dreifachen der Vergleichszellen entsprach. Dargestellt sind nur diejenigen Probe-Set IDs, welche nach dieser Berechnung überexprimiert sind.



## 4.2 Expression des *Ubiquitin binding enzyme E2 S* in verschiedenen Zelllinien

### 4.2.1 Vergleich der Hodgkin-Zelllinien mit PBMCs

In der zuvor durchgeführten Mikroarray-Analyse zeigte sich das Gen UBE2S im Vergleich zu normalen Blutzellen als überexprimiert und kommt somit als potentieller MRD-Marker zur frühzeitigen Erkennung eines Hodgkin-Lymphom-Rezidivs in Frage. Um zu untersuchen, ob das Ergebnis der Mikroarray-Analyse auf Analysenmittels Polymerasekettenreaktion übertragbar ist, wurde zunächst eine 3-fach Bestimmung der Zelllinien KM-H2, HDLM2, L-1236, L-540 und L-428 im Vergleich zu 9 PBMCs mittels qPCR unter Verwendung verschiedener Primer durchgeführt. Die Auswertung der qPCR erfolgte mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak, 2001). Als Kalibrator diente der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs des entsprechenden Primers.

Unter Verwendung des Primers „NM“ zeigte sich im Vergleich zu den PBMCs eine 9-13fache Expression des entsprechenden Traskripts in HL-Zellen (Abb. 5). Demnach konnte zwar eine deutliche Überexpression gezeigt werden, jedoch wurde für diesen Primer in der Gelelektrophorese eine Doppelbande bei etwa 200 und 500 bp nachgewiesen (siehe Anhang). Die Sequenzierung dieser Doppelbanden zeigte, dass die Bande bei 500 bp ein Produkt von UBE2S darstellte, die andere dagegen *Glucosylceramidase Isoform 13 precursor*. In den weiteren Untersuchungen wurde daher auf diesen Primer verzichtet und stattdessen „NM2“ verwendet.

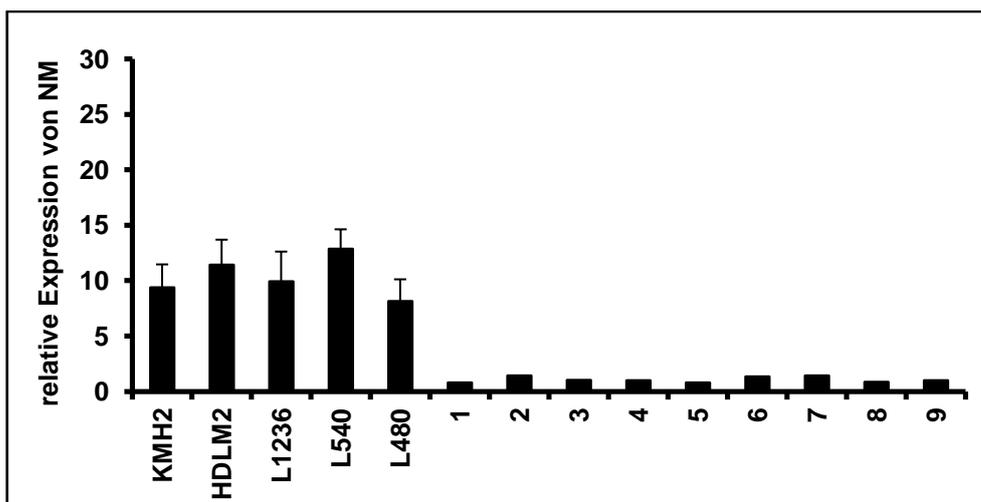
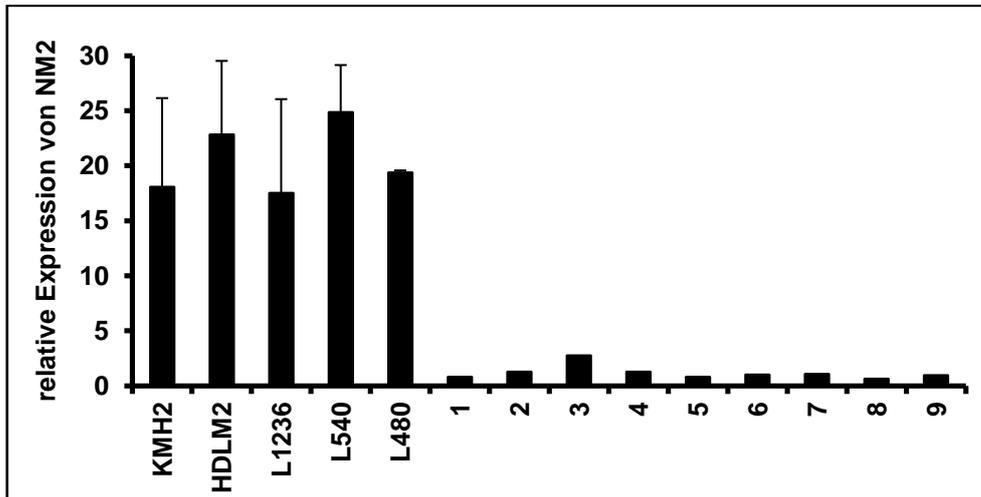


Abbildung 5: Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „NM“

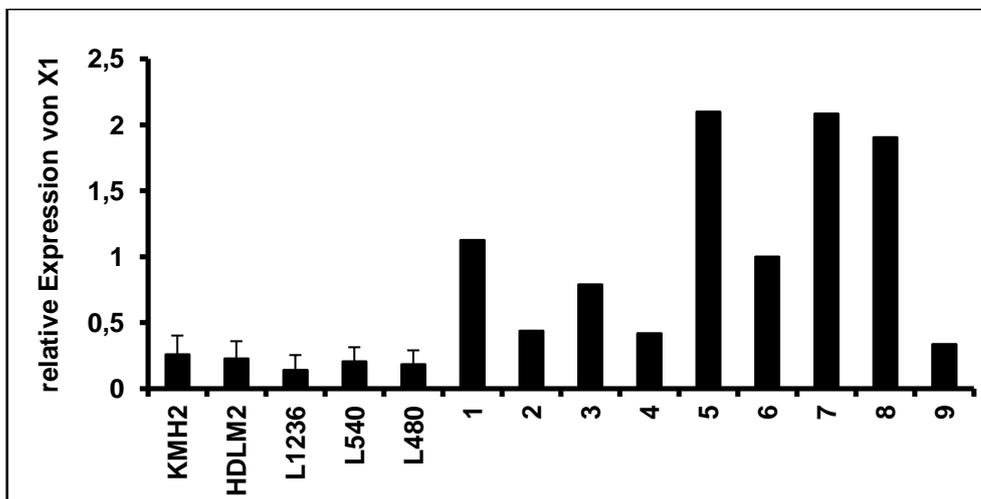
Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „NM“ in HL-Zelllinien im Vergleich zu 9 PBMCs (1-9). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die HL-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin.

Für den Primer „NM2“ zeigte sich mit dem Faktor 17 bis 25 sogar eine deutlichere Überexpression der Normtranskriptvariante des Gens (Abb. 6). „X1“ dagegen zeigte als einziger verwendeter Primer eine relative Überexpression von UBE2S in den PBMCs. So betrug die Expression für diesen Primer in den HL-Zellen nur das 0,14 – 0,25 fache der Expression in den Vergleichszellen (Abb. 7).



**Abbildung 6: Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „NM2“**

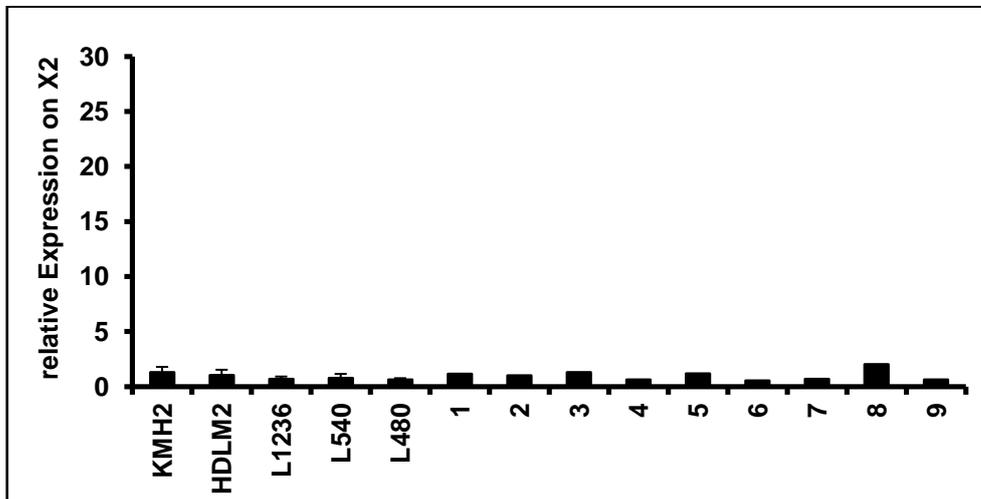
Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „NM2“ in HL-Zelllinien im Vergleich zu 9 PBMCs (1-9). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta C_t$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die HL-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin.



**Abbildung 7: Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „X1“**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „X1“ in HL-Zelllinien im Vergleich zu 9 PBMCs (1-9). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta C_t$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die HL-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin.

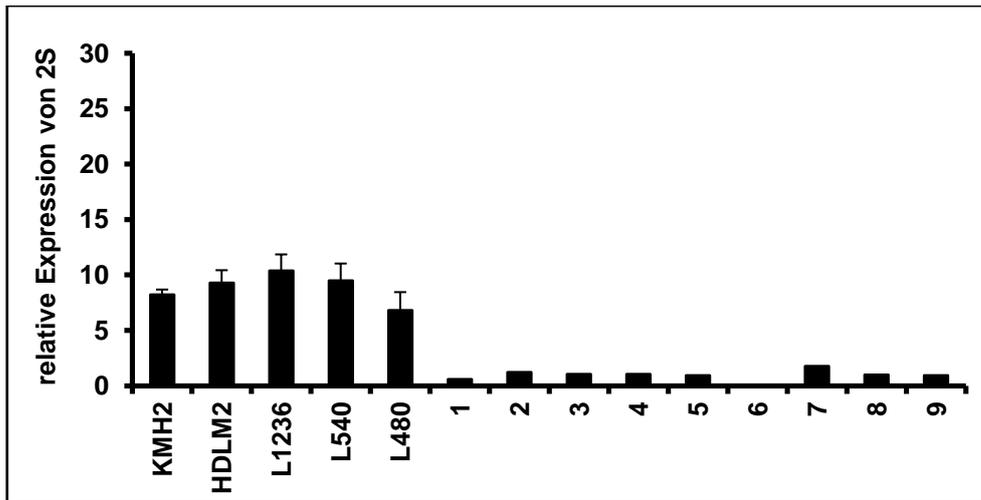
Für X2 zeigte sich keine eindeutige Über- oder Unterexpression im Vergleich zu den PBMCs (Abb. 8). Zudem zeigte sich weder eine Bande in der Gelelektrophorese noch ein eindeutiger Peak in der Analyse der Schmelzkurven. Daher wurde dieser Primer bei den folgenden Versuchen nicht weiter verwendet.



**Abbildung 8: Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „X2“**

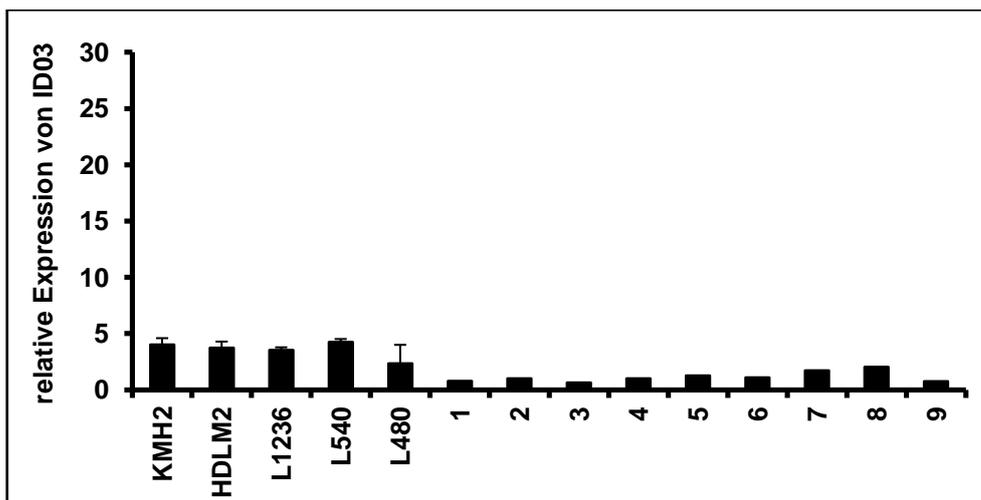
Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „X2“ in HL-Zelllinien im Vergleich zu 9 PBMCs (1-9). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die HL-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin.

Bei Verwendung des Primers „2S“ zeigte sich relativ zu den PBMCs ebenfalls eine erhöhte Expression (Abb. 9). Diese fällt mit dem Faktor 7 – 10 jedoch geringer aus als für die Primer „NM“ und „NM2“. Für den Primer „ID03“ zeigte sich die Expression der HL-Zellen nur um das 2-4fache erhöht (Abb. 10).



**Abbildung 9: Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „2S“**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „2S“ in HL-Zelllinien im Vergleich zu 9 PBMCs (1-9). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die HL-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin.



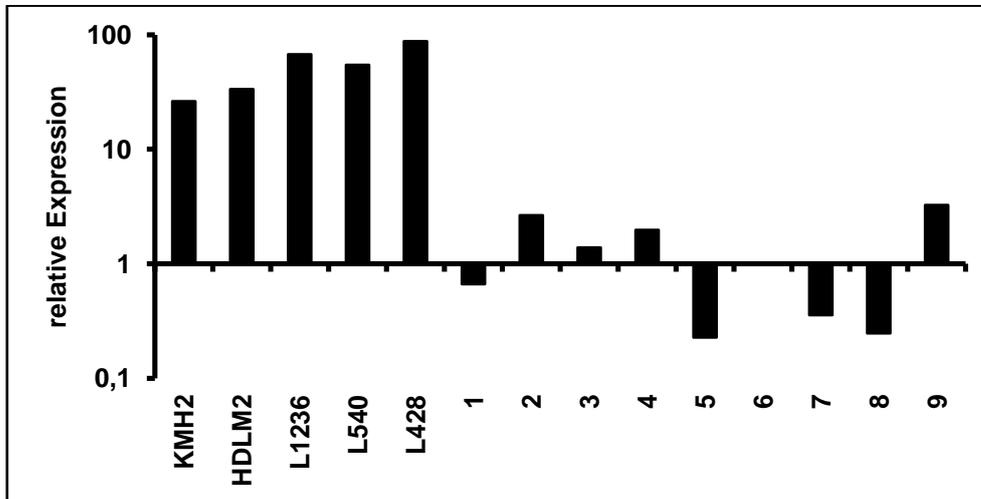
**Abbildung 10: Expression von UBE2S in Hodgkin-Zelllinien, Primer „ID03“**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „ID03“ in HL-Zelllinien im Vergleich zu 9 PBMCs (1-9). Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die HL-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden aufgrund der deutlichen Überbeziehungsweise Unterexpression des Gens UBE2S in den HL-Zelllinien in Relation zu den PBMCs nur noch die Primer „NM2“ und „X1“ verwendet.

Der direkte Vergleich von „NM2“ und „X1“ ist in Abbildung 11 dargestellt. Hierfür wurde als Referenz nicht das *Housekeeping*-Gen Aktin verwendet, sondern das Produkt des „X1“-Primers.

Der direkte Vergleich der Normtranskriptvariante mit der Isoform X1 zeigt mit einem Faktor von 26 (KMH2) bis 88 (L428) eine deutliche Überexpression der Normtranskriptvariante in den HL-Zelllinien (Abb. 11).

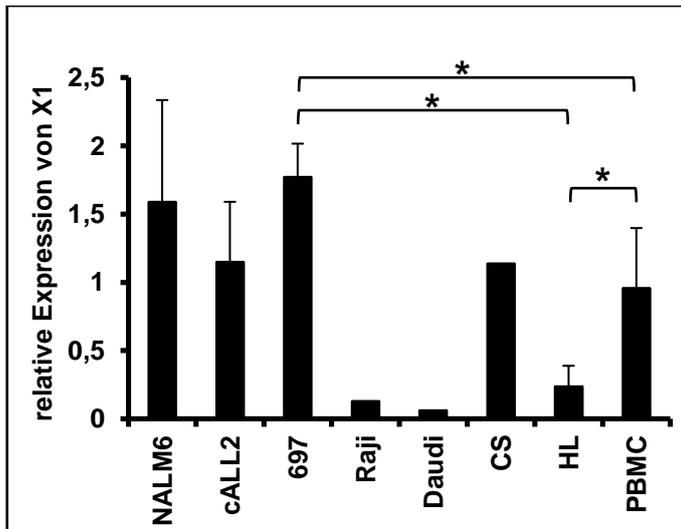


**Abbildung 11: Expression des Gens UBE2S bei Verwendung des Primer „NM2“ im Verhältnis zum Primer „X1“**

Logarithmische Darstellung der Expression von NM im Verhältnis zu X1 in HL-Zelllinien und PBMCs (1-9). Als Referenz diente das Produkt des „X1“-Primers, als Kalibrator der Median der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der PBMCs des „NM2“-Primers.

#### 4.2.2 UBE2S in Leukämie- und Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die Überexpression des Gens UBE2S spezifisch für Hodgkin-Lymphomzellen ist oder auch bei weiteren lymphatischen Erkrankungen auftritt, wurden ebenfalls qPCRs mit den Leukämie-Zelllinien NALM6, cALL2 und 697 und den Burkitt-Lymphom-Zelllinien Raji und Daudi durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Lymphknotenbiopsie eines Hodgkin-Lymphoms untersucht um zu prüfen, ob sich UBE2S auch in nativen Proben nachweisen lässt. Verglichen wurden diese Zellen mit dem Mittelwert der  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Werte der Hodgkin-Zelllinien sowie 6 verschiedener PBMCs. Als Kalibrator diente der Median der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte der PBMCs des entsprechenden Primers. Für die Zelllinien NALM6, cALL, 697 sowie für die Hodgkin-Zelllinien wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Raji, Daudi und die Biopsie wurden jeweils nur einfach bestimmt.

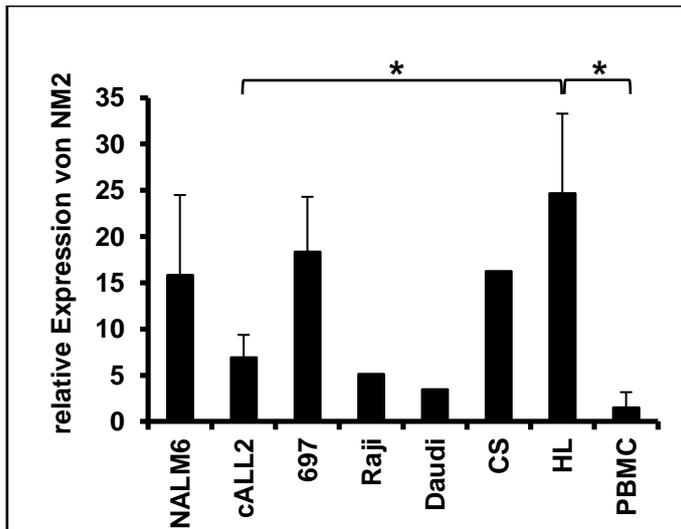


**Abbildung 12: Expression der Isoform X1 in Leukämie- und Lymphomzellen.**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „X1“ in den Leukämiezelllinien NALM6, cALL2 und 697, den Burkitt-Zelllinien Raji und Daudi und der Tumorbiopsie eines HL (CS) im Vergleich mit HL-Zelllinien und PBMCs. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die Leukämie-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. „HL“ bezeichnet den Mittelwert der Dreifachbestimmungen der HL-Zelllinien, „PBMC“ den Mittelwert 6 verschiedener PBMCs. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin. Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ .

In Abbildung 12 zeigt sich die Isoform X1 des Gens UBE2S in den Zelllinien NALM6, cALL2 und 697 im Vergleich zu den Hodgkin-Zelllinien überexprimiert. Vor allem für NALM6 und 697 war die Expression sogar höher als in den PBMCs. Die Expression der HL-Zelllinien entspricht dagegen nur ca. dem 0,2 fachen der PBMCs. Für die Zelllinie 697 war ein signifikanter Unterschied der Expression im Vergleich zu den PBMCs und den HL-Zelllinien erkennbar.

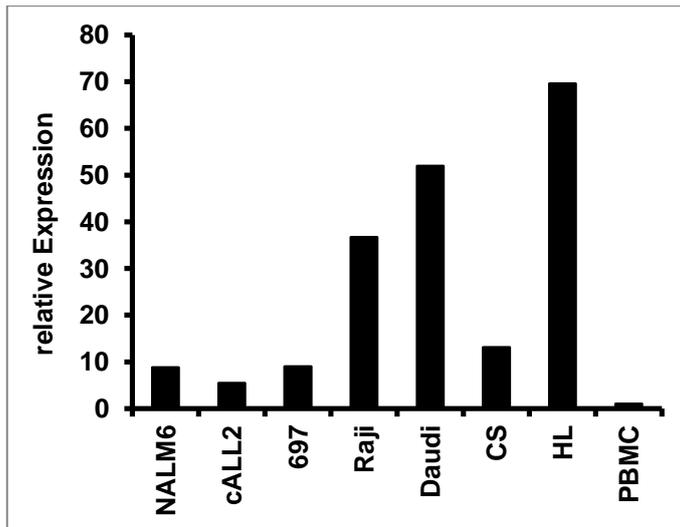
Auch in Raji und Daudi entsprach die Expression von UBE2S X1 ähnlich den HL-Zelllinien nur dem 0,06 - 0,1 fachen der PBMCs. In der untersuchten Tumorbiopsie CS entsprach die Expression von UBE2S X1 in etwa der der PBMCs. Aufgrund der Einfachbestimmung von Raji, Daudi und der Tumorbiopsie konnte hierfür keine Signifikanzprüfung durchgeführt werden.



**Abbildung 13: Expression der Normtranskriptvariante NM in Leukämie- und Lymphomzellen.**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „NM2“ in den Leukämiezelllinien NALM6, cALL2 und 697, den Burkitt-Zelllinien Raji und Daudi und der Tumorbiopsie eines HL (CS) im Vergleich mit HL-Zelllinien und PBMCs. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die Leukämie-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. „HL“ bezeichnet den Mittelwert der Dreifachbestimmungen der HL-Zelllinien, „PBMC“ den Mittelwert 6 verschiedener PBMCs. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin. Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ .

Für die Normtranskriptvariante unter Verwendung des Primers „NM2“ zeigen sich die Unterschiede der Expression wesentlich deutlicher als für X1 (Abb. 13). Es zeigt sich, dass UBE2S NM in allen untersuchten Zelllinien im Vergleich zu PBMCs überexprimiert war. In HL-Zelllinien war dies am stärksten ausgeprägt und entsprach dem 16,4-fachen der Expression in PBMCs. Die Expression der Patientenprobe CS entsprach in etwa der der Leukämie-Zelllinien NALM6 und 697 und war mit dem Faktor 10,5 - 12,2 deutlich höher als in den PBMCs. Am geringsten ausgeprägt war diese in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien Raji und Daudi, in denen die Expression nur dem 2,3 - 3,4 fachen entsprach. Es bestand ein signifikanter Unterschied der Expression von UBE2S NM zwischen cALL2 und HL.



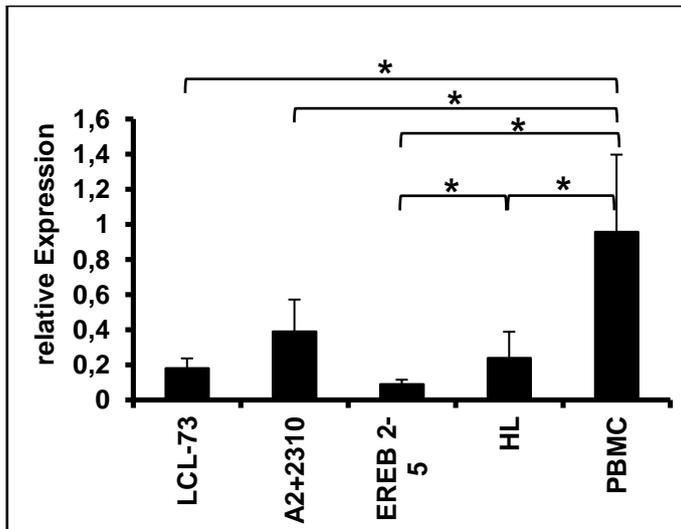
**Abbildung 14: Expression von UBE2S NM2 im Vergleich zu X1 in Leukämie- und Lymphomzellen**

Dargestellt ist die Expression von NM im Verhältnis zu X1 in den Leukämiezelllinien NALM6, cALL2 und 697, den Burkitt-Zelllinien Raji und Daudi und der Tumorbiopsie eines HL (CS) im Vergleich mit HL-Zelllinien und PBMCs. „HL“ bezeichnet den Mittelwert der Dreifachbestimmungen der HL-Zelllinien, „PBMC“ den Mittelwert 6 verschiedener PBMCs. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak et al., 2011). Als Referenz diente das Produkt des „X1“-Primers, als Kalibrator der  $\Delta C_t$ -Wert des Mittelwertes der PBMCs des „NM2“-Primers.

Relativ zur Isoform X1 wurde die Normtranskriptvariante NM in allen Leukämie- und Lymphomzelllinien im Vergleich zu PBMCs deutlich überexprimiert (Abb. 14). Am deutlichsten war dies für die Hodgkin-Zelllinien sowie die Burkitt-Zelllinien Raji und Daudi ausgeprägt. Für die Leukämie-Zelllinien und die Patientenprobe CS war die Expression von UBE2S NM relativ zur Isoform X1 in etwa im selben Niveau.

#### 4.2.3 Vergleich der Hodgkin-Zelllinien mit lymphoblastoiden Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die vermehrte Expression von UBE2S NM bzw. die verminderte Expression von UBE2S X1 spezifisch für maligne Zellen oder ein genereller Proliferationsmarker ist, wurden ebenfalls Versuche mit den lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 und EREB2-5 durchgeführt. Diese Zelllinien wurden mit Hilfe von EBV immortalisiert und können daher unbegrenzt proliferieren (Pajic et al., 2000). Die ermittelten Daten wurden mit denen der HL-Zelllinien verglichen.

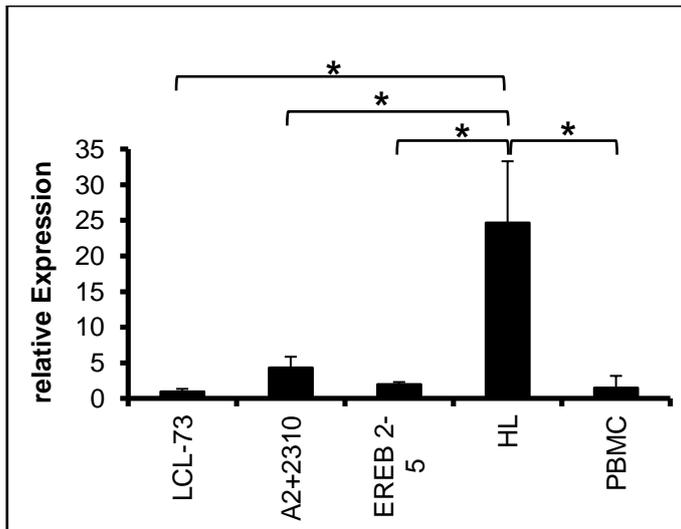


**Abbildung 15: Expression von UBE2S X1 in LCL im Vergleich zu HL-Zelllinien und PBMCs**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „X1“ in den lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 und EREB2-5 im Vergleich mit HL-Zelllinien und PBMCs. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011), der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die Leukämie-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind.

„HL“ bezeichnet den Mittelwert der Dreifachbestimmungen der HL-Zelllinien, „PBMC“ den Mittelwert 6 verschiedener PBMCs. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin. Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ .

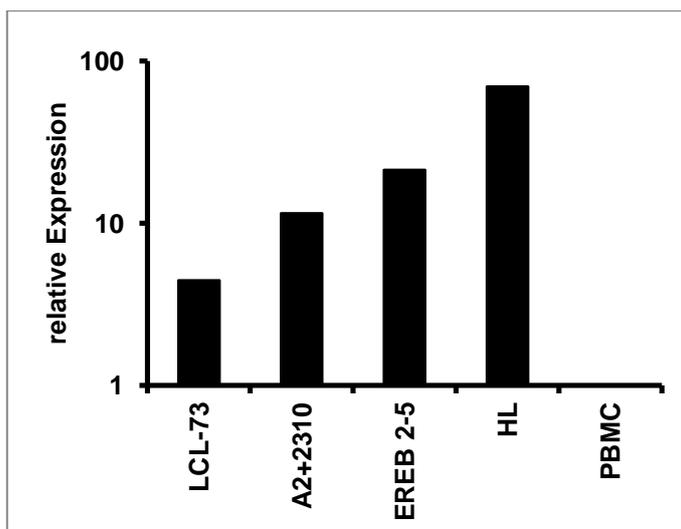
Die Isoform X1 von UBE2S war sowohl in den lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 und EREB2-5 sowie den HL-Zelllinien relativ zu PBMCs signifikant unterexprimiert (Abb. 15). Für EREB2-5 fiel die relative Expression am geringsten aus und entsprach nur etwa dem 0,09-fachen der PBMCs. Doch auch für die übrigen Zelllinien entsprach diese nur dem 0,18 – 0,39-fachen. Ein eindeutiger Unterschied zwischen HL-Zelllinien und den untersuchten lymphoblastoiden Zelllinien ließ sich in Bezug auf UBE2S X1 nur für EREB2-5 feststellen.



**Abbildung 16: Expression von UBE2S NM in LCL im Vergleich zu HL-Zelllinien und PBMCs**

Dargestellt ist die Expression von UBE2S unter Verwendung des Primers „NM2“ in den lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 und EREB2-5 im Vergleich mit HL-Zelllinien und PBMCs. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011). Der Median der  $\Delta Ct$ -Werte der PBMCs diente als Kalibrator. Für die Leukämie-Zelllinien wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, deren Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. „HL“ bezeichnet den Mittelwert der Dreifachbestimmungen der HL-Zelllinien, „PBMC“ den Mittelwert 6 verschiedener PBMCs. Als *Housekeeping*-Gen diente Aktin. Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ .

Für die Normtranskriptvariante NM zeigte sich, dass diese sowohl in den untersuchten lymphoblastoiden Zelllinien als auch in den PBMCs signifikant weniger exprimiert waren als in HL-Zelllinien (Abb. 16). In A2+2310 zeigte sich UBE2S NM 2,9 mal so stark exprimiert wie in PBMCs, in LCL-73 dagegen nur 0,6 mal. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 17: Expression von UBE2S NM im Vergleich zu X1 in lymphoblastoiden Zelllinien**

Logarithmische Darstellung der Expression von NM im Verhältnis zu X1 in lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 und EREB2-5 im Vergleich mit HL-Zelllinien und PBMCs. „HL“ bezeichnet den Mittelwert der Dreifachbestimmungen der HL-Zelllinien, „PBMC“ den Mittelwert 6 verschiedener PBMCs. Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011). Als Referenz diente das Produkt des „X1“-Primers, als Kalibrator der  $\Delta Ct$ -Wert des Mittelwertes der PBMCs des „NM2“-Primers.

In der logarithmischen Darstellung der lymphoblastoiden Zelllinien nach Vergleich der Normtranskriptvariante NM mit der Isoform X1 zeigte sich eine Überexpression von NM im Verhältnis zu X1 für alle Zelllinien. Diese war am stärksten für die HL-Zelllinien und am geringsten für LCL-73, welche in etwa im Niveau von cALL2 liegen, ausgeprägt (Abb. 17).

#### 4.2.4 Untersuchung der lymphoblastoiden Zelllinie P493-6

Um genauer zu untersuchen, ob die Expression von UBE2S proliferationsabhängig ist, wurden Versuche mit der Zelllinie P493-6 durchgeführt, deren Proliferation durch Östrogen und Tetrazyklin reguliert werden kann. Diese wird aufgrund des Fusionsproteins aus dem *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2* (EBNA2) und der Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors (ER/EBNA2) durch Zugabe von Östrogen gesteigert (Kempkes et al., 1995). Durch Tetrazyklin dagegen wird diese inhibiert, da myc aufgrund der Transfektion mit p-myc-tet in Anwesenheit von Tetrazyklin nicht exprimiert wird (Pajic et al., 2000; Schuhmacher et al., 1999).

Bereits durch die Bestimmung der Zellzahl zeigte sich der Einfluss von Östrogen und Tetrazyklin auf die Proliferation (Tab. 9).

**Tabelle 11: Zellzahl von P493-6 nach Behandlung mit Östrogen und/oder Tetrazyklin**

Die Inkubation mit Östrogen und/oder Tetrazyklin erfolgte für insgesamt 5 Tage. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und der folgenden Formel: Zellen/ml = Gezählte Zellen x  $10^4$  x Verdünnungsfaktor.

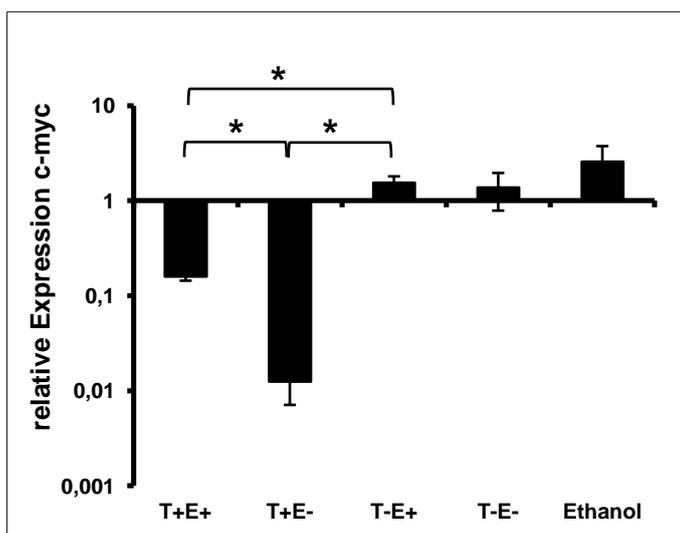
Behandelte Zellen	Zellzahl x $10^5$
T+E+	65,5
T+E-	47
T-E+	68
T-E-	56
Ethanol	74

E+: mit Östrogen, E- : ohne Östrogen, T+: mit Tetrazyklin, T-: ohne Tetrazyklin

Zusätzlich zu dem Gen UBE2S unter Verwendung der Primer NM2 und X1 wurden die Gene *Alpha/Beta-Hydrolase Domain Containing 6* (ABHD6) und c-myc untersucht. ABHD6 wird durch eine erhöhte Aktivität von EBNA2 vermehrt exprimiert (Maier et al. 2006). Dieses wiederum wird in der Zellreihe P493-6-Zellen durch Östrogen aktiviert (Max et al., 2009).

Zunächst musste jedoch das für diese Zelllinie passende *Housekeeping*-Gen ermittelt werden, da sich für Aktin nicht der erwartete Effekt des Östrogens bei Betrachtung von

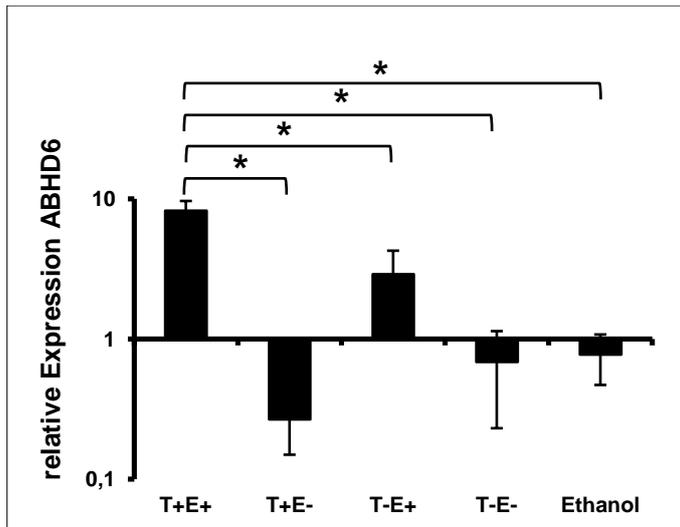
ABHD6 zeigte. Daher wurden zusätzlich *TATA-binding protein* (TBP), *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) und *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1* (HPRT1) untersucht und das für die folgenden Versuche verwendete *Housekeeping*-Gen unter Betrachtung von ABHD6 und c-myc ermittelt (Abbildungen im Anhang). Da der Einfluss von Tetrazyklin und Östrogen, in dem Sinne, dass Tetrazyklin die Expression von c-myc inhibiert und Östrogen die Expression von ABHD6 fördert, nur unter Verwendung von TBP als *Housekeeping*-Gen sichtbar wurde, wurde dieses für die folgenden Untersuchungen verwendet. Es wurden Dreifachbestimmungen für die Gene ABHD6, c-myc, UBE2S NM und UBE2S X1 durchgeführt, als Kalibrator diente der Median der jeweiligen  $\Delta\text{Ct}$ -Werte.



**Abbildung 18: Relative Expression von c-myc der Zelllinie P493-6**

Es wurde RNA aus einer Zellkultur der Linie P493-6 isoliert, welche mit Tetrazyklin und/oder Östrogen behandelt wurden. Nach reverser Transkription wurden qPCRs zur Untersuchung des Gens c-myc durchgeführt und die Daten mittels  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode (Livak et al., 2011) ausgewertet. Als *Housekeeping*-Gen diente TBP, als Kalibrator der Median der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Werte und die Standardabweichung bestimmt. Logarithmische Darstellung der relativen Expression, Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ . T+: mit Tetrazyklin, T-: ohne Tetrazyklin, E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen

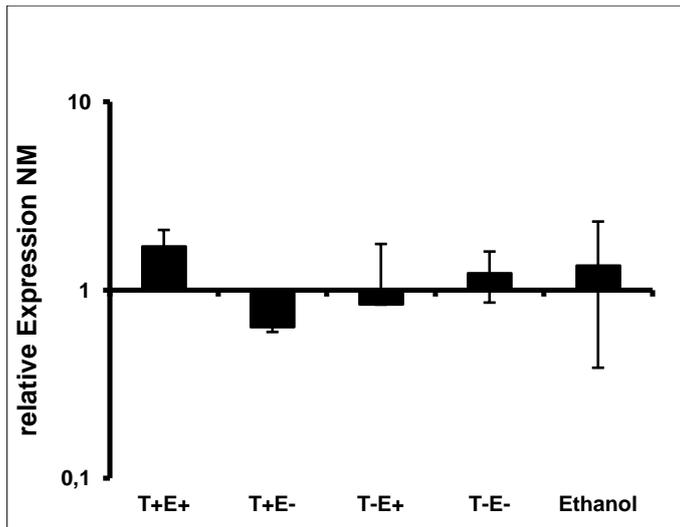
Wie erwartet zeigte sich für c-myc eine deutlich verringerte Expression nach Behandlung der Zellkultur mit Tetrazyklin (Abb. 18). Durch zusätzliche Behandlung mit Östrogen (T+E+) war diese signifikant höher. Der Unterschied der Expression im Vergleich zu Zellen, welche nicht mit Tetrazyklin behandelt wurden, war für beide Gruppen signifikant.



**Abbildung 19: Relative Expression von ABHD6 der Zelllinie P493-6**

Es wurde RNA aus einer Zellkultur der Linie P493-6 isoliert, welche mit Tetrazyklin und/oder Östrogen behandelt wurden. Nach reverser Transkription wurden qPCRs zur Untersuchung des Gens ABHD6 durchgeführt und die Daten mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011) ausgewertet. Als *Housekeeping*-Gen diente TBP, als Kalibrator der Median der  $\Delta Ct$ -Werte. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte und die Standardabweichung bestimmt. Logarithmische Darstellung Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ . T+: mit Tetrazyklin, T-: ohne Tetrazyklin, E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen.

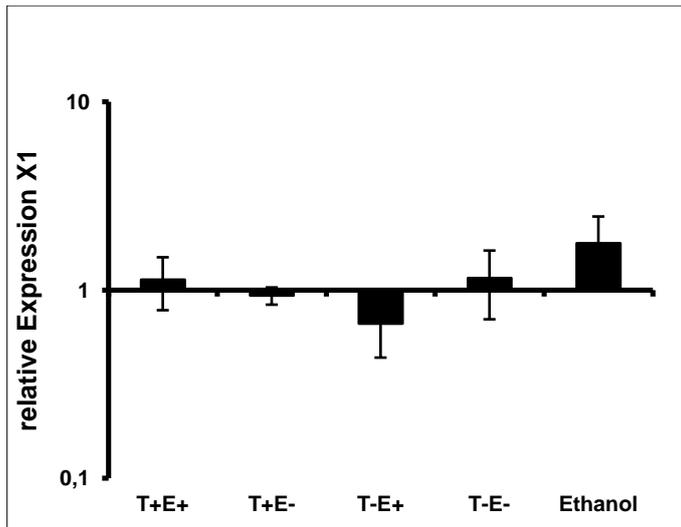
ABHD6 wird durch Östrogen-induzierte Aktivierung von EBNA2 vermehrt exprimiert, wie in Abbildung 19 deutlich wird. Die geringste Expression von ABHD6 zeigte sich wie erwartet nach ausschließlicher Behandlung mit Tetrazyklin. Um auszuschließen, dass die vermehrte Expression durch das Ethanol bedingt ist, in welchem das Östrogen gelöst ist, wurde ein Teil der Zellen ausschließlich mit Ethanol behandelt. Der Unterschied zwischen Östrogen und Ethanol war signifikant, die vermehrte Expression kann dementsprechend nicht auf Ethanol zurückgeführt werden.



**Abbildung 20: Relative Expression von UBE2S NM der Zelllinie P493-6**

Es wurde RNA aus einer Zellkultur der Linie P493-6 isoliert, welche mit Tetrazyklin und/oder Östrogen behandelt wurden. Nach reverser Transkription wurden qPCRs zur Untersuchung der Normtranskriptvariante des Gens UBE2S unter Verwendung des Primers „NM2“ durchgeführt und die Daten mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011) ausgewertet. Als *Housekeeping*-Gen diente TBP, als Kalibrator der Median der  $\Delta Ct$ -Werte. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte und die Standardabweichung bestimmt. Logarithmische Darstellung; T+: mit Tetrazyklin, T-: ohne Tetrazyklin, E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen

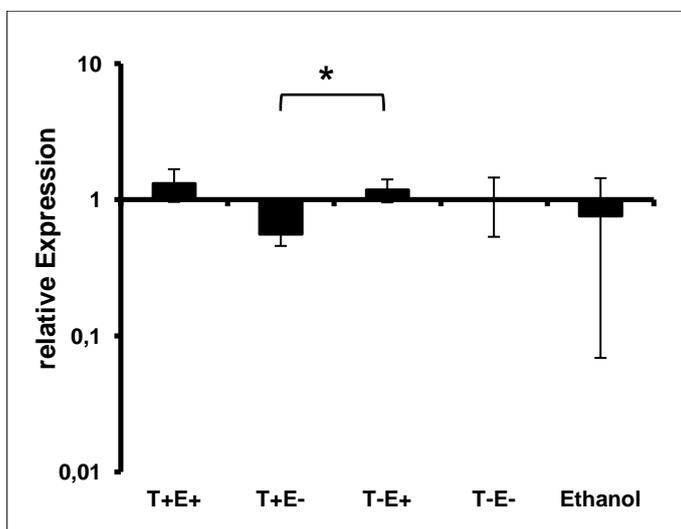
Für die Normtranskriptvariante von UBE2S unter Verwendung des Primers „NM2“ zeigte sich die stärkste Expression für T+E+ und die geringste für T+E- (Abb. 20). Es lässt sich daher eine verminderte Expression von UBE2S NM in Zellen vermuten, welche im Zellzyklus arretiert sind. Jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Eine eindeutige Verstärkung oder Verminderung der Expression in Abhängigkeit von einer Behandlung mit Östrogen bzw. Tetrazyklin lässt sich daher nicht nachweisen.



**Abbildung 21: Relative Expression von UBE2S X1 der Zelllinie P493-6**

Es wurde RNA aus einer Zellkultur der Linie P493-6 isoliert, welche mit Tetrazyklin und/oder Östrogen behandelt wurden. Nach reverser Transkription wurden qPCRs zur Untersuchung der Isoform X1 des Gens UBE2S durchgeführt und die Daten mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011) ausgewertet. Als *Housekeeping*-Gen diente TBP, als Kalibrator der Median der  $\Delta Ct$ -Werte. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte und die Standardabweichung bestimmt. T+: mit Tetrazyklin, T-: ohne Tetrazyklin, E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen

Auch für die Isoform X1 konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression in Abhängigkeit einer Behandlung mit Tetrazyklin oder Östrogen nachgewiesen werden (Abb. 21).



**Abbildung 22: Expression von UBE2S NM im Vergleich zu X1 der Zelllinie P493-6**

Es wurde RNA aus einer Zellkultur der mit Tetrazyklin und/oder Östrogen behandelten Zelllinie P493-6 gewonnen und nach reverser Transkription qPCRs durchgeführt, welche mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011) ausgewertet wurden. Die  $\Delta Ct$ -Werte entsprechen der Differenz zwischen den Werten für NM2 und X1. Als Kalibrator diente der Median der  $\Delta Ct$ -Werte von X1. Logarithmische Darstellung, Signifikanztestung mittels T-Test, \*:  $p < 0,05$ . E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen, T+: mit Tetrazyklin, T-: ohne Tetrazyklin

In Abbildung 22 zeigt sich, dass in ruhenden Zellen (T+E-) NM relativ zu X1 weniger exprimiert wurde. Mit Östrogen behandelte Zellen dagegen zeigten eine etwas stärkere Expression von NM. Dieser Unterschied zwischen T+E- und T+E+ war signifikant. Es zeigt sich demnach ein proliferationsabhängiger Effekt auf das Verhältnis der Expression der beiden Varianten von UBE2S zueinander.

## 5 Diskussion

Das Hodgkin-Lymphom, welches häufig junge Erwachsene betrifft, besitzt gute Heilungschancen. Bedingt durch das junge Erkrankungsalter sind durch die Therapie hervorgerufene Spätfolgen von besonderer Bedeutung. Zudem erleiden einige Patienten ein Rezidiv, welches eine erneute Therapie zu Folge hat. Es ist daher von Interesse, diese Rezidive frühzeitig erkennen und mit möglichst geringen Medikamentendosen behandeln zu können, um das Risiko für Spätfolgen zu senken. Zur Identifizierung eines möglichen MRD-Markers wurden Mikroarray-Daten von cDNA-Banken der HL-Zelllinien KM-H2, L-1236 und L-428 ausgewertet. Diese zeigte eine verstärkte Signalintensität verschiedener Gene in HL-Zelllinien im Vergleich zu PBMCs und isolierten B-Zellen. Der Unterschied dieser Signalintensität war vor allem für das *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S* (UBE2S) und das *Phosphatidylethanolamine binding protein 1* (PEBP1) besonders stark ausgeprägt. Beide Gene waren bereits Bestandteil vorhergehender Untersuchungen und konnten mit weiteren malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.

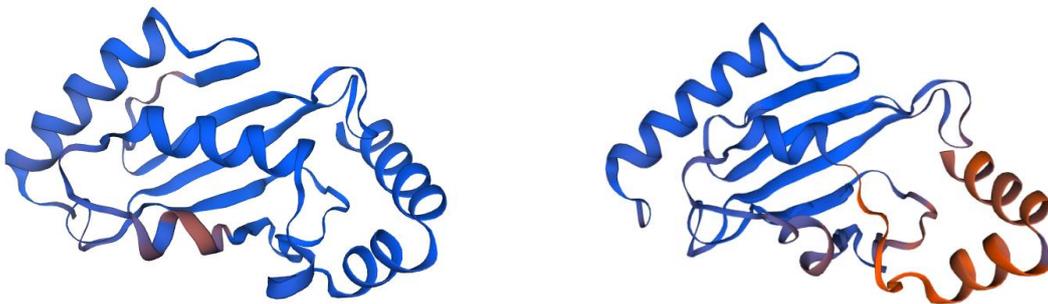
### 5.1 Das Ubiquitin binding enzyme E2 S

#### 5.1.1 Struktur und Funktion des *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S*

Das Gen *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S* (UBE2S), auch E2-EPF genannt, ist ein auf Chromosom 19 lokalisiertes Gen. Es kodiert das gleichnamige Protein, welches zu der Gruppe E2 der Ubiquitin konjugierenden Enzymen gehört. Zusätzlich zu der Normtranskriptvariante NM zeigte die Datenbank NCBI die Isoformen X1 und X2. Anhand der Aminosäuresequenzen konnten mit Hilfe des Programmes SwissModel die Proteinmodelle von NM und X1 modelliert werden (Abb. 23) (Waterhouse et al., 2018; Guex et al., 2009; Bienert et al., 2017). Hierbei ist zu sehen, dass zwei der alpha-Helices von X1 kürzer sind als bei NM, wobei bei einer dieser Helices die

Übereinstimmung zwischen der Proteinsequenz von X1 und der Vorlage nur gering ist und somit nicht gut mit NM verglichen werden kann.

Der bei der Isoform X1 fehlende Teil der anderen, vergleichbaren alpha-Helix ist Bestandteil der Ligandenbindungsdomäne von *4,5-Dideoxy-5-(3',5'-Dichlorobiphenyl-4-Yl)-4-[(Methoxyacetyl)amino]-L-Arabinonic Acid* (Yang und Zhang, 2015; Zhang et al., 2017), auch CC0651 genannt. CC0651 ist als Inhibitor des menschlichen E2-Enzyms CDC34a bekannt (Huang et al., 2014).

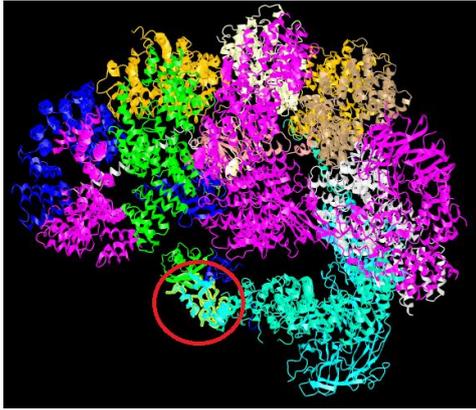


**Abbildung 23: Proteinmodell der Normtranskriptvariante NM von UBE2S (links) und der Isoform X1 (rechts)**

Modelliert mit SwissModel. Grundlage waren für NM das Modell 5b bnb.1.A (Lorenz et al. 2016) und für X1 das Modell 1zdn.1.A (Sheng et al. 2012). In orange dargestellten Abschnitten ist die Übereinstimmung zwischen der Proteinsequenz von UBE2S und dem Modell, welches als Vorlage diente, nur gering. Blau dargestellt sind die Abschnitte mit großer Übereinstimmung.

UBE2S scheint ein Regulator des *Anaphase promoting complex / cyclosome* (APC/C) zu sein (Williamson et al., 2009). Für die Zellteilung ist es essentiell, dass Proteine ubiquitiniert und somit für den Abbau durch Proteasomen markiert werden. Dies geschieht durch eine Kaskade von E1 zur Ubiquitin-Aktivierung, E2 zur Ubiquitin-Konjugation und E3, den Ubiquitin-Protein-Ligasen (Wickliffe et al., 2011). APC/C ist ein E3-Enzym. Gemeinsam mit diesem und dem Enzym UBCH10 verlängert UBE2S an dem Lysin K11 des Ubiquitins gekoppelte Polyubiquitinketten, wodurch die Substrate des APC/C moduliert und für den Abbau im Proteasom markiert werden (Williamson et al., 2009; Wickliffe et al., 2011). Abbildung 24 zeigt ein Modell des APC/C und UBE2S.

Es zeigte sich, dass UBE2S allein für die Mitose nur eine geringe und nicht-essenzielle Rolle spielt (Garnett et al., 2009). Jedoch ist UBE2S notwendig, um den *spindle arresting checkpoint* (SAC) nach medikamentenindizierter Arretierung in der Mitose zu inaktivieren und ermöglicht somit die Fortführung der Mitose (Garnett et al., 2009). Es handelt sich dementsprechend um einen Regulator der Mitose.



**Abbildung 24: Anaphase promoting complex (APC/C) mit UBE2S**

Dargestellt ist die Lage des Proteins UBE2S im Anaphase promoting complex (Brown et al., 2016). UBE2S ist rot markiert.

### 5.1.2 Die Rolle von UBE2S in malignen Erkrankungen

Das UBE2S scheint eine Rolle in der Genese verschiedener maligner Erkrankungen zu spielen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Stabilität des Tumorsuppressorgens von Hippel Lindau (pVHL) von der Expression von UBE2S abhängt, da dieses pVHL für den Abbau durch Proteasomen markiert. Hieraus ergibt sich eine gesteigerte Proliferation und eine erhöhte Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung (Jung et al., 2006).

Eine erhöhte Expression von UBE2S konnte bereits für verschiedene maligne Erkrankungen festgestellt werden. So ist dieses z.B. in Mamma-Karzinomzellen, vor allem in Östrogenrezeptor-negativen Zellen, deutlich überexprimiert (Tedesco et al., 2007). Nach Ausschalten von UBE2S konnte hier jedoch keine Veränderung der Proliferationsrate festgestellt werden (Tedesco et al., 2007). Auch in Zellen des Zervixkarzinoms zeigt sich eine erhöhte Expression von UBE2S, welche mit dem klinischen Stadium korreliert (Liang et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung von Zellen des Zervixkarzinoms mit UBE2S-spezifischer siRNA, wodurch das Gen ausgeschaltet wird, die Sensitivität gegenüber Topoisomerase-I- (Topotecan) und -II-Inhibitoren (Etoposid, Doxorubicin) verdoppelt wird und das Zellwachstum und die Zellinvasion reduziert werden können (Tedesco et al., 2007; Liang et al., 2012).

Für das hepatozelluläre Karzinom ist UBE2S ein möglicher prognostischer Marker, da eine erhöhte Expressionsrate des Gens mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Ma et al., 2018), ebenso für das Ösophaguskarzinom (Chen et al., 2009). Zudem scheint UBE2S ein mögliches Ziel für die Therapie des kolorektalen Karzinoms zu sein, da es  $\beta$ -Catenin stabilisiert und somit die Tumorprogression begünstigt (Li et al., 2018).

## 5.2 Das Gen *Phosphatidylethanolamine binding protein 1*

Das in der Mikroarray-Analyse ebenfalls mit gesteigerter Signalintensität dargestellte Gen *Phosphatidylethanolamine binding protein 1* (PEBP1) könnte ebenfalls als möglicher MRD-Marker in Betracht gezogen werden. Es spielt eine Rolle in verschiedenen Signalwegen, z.B. von MAPK und NFκB (Yeung et al., 1999). Auch dieses Protein steht in Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen. Im Gegensatz zu UBE2S ist PEBP1 in Zellen des hepatozellulären Karzinoms jedoch im Vergleich zu gesunden Zellen weniger exprimiert (Huang et al., 2018).

## 5.3 UBE2S in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu PBMCs

Die Expressionsrate von UBE2S in HL-Zelllinien wurde mit Hilfe verschiedener Primer untersucht. Hierbei zeigte sich eine Überexpression der Normtranskriptvariante unter Verwendung des Primers „NM2“ in allen HL-Zelllinien. Die Isoform X1 dagegen zeigte sich in PBMCs als stärker exprimiert. Besonders deutlich wird der Unterschied der beiden Varianten im direkten Vergleich miteinander. Insgesamt gesehen ist diese Über- bzw. Unterexpression jedoch nicht stark genug ausgeprägt, um eine HL-Zelle unter mindestens 10.000 normalen Zellen detektieren zu können, wie es die Voraussetzung für einen MRD-Marker ist (Gaipa et al., 2013). Dies zeigt sich unter anderem durch die Untersuchung der Lymphknotenbiopsie eines Hodgkin-Lymphom-Patienten. Für diese konnte eine Überexpression der Isoform X1 im Vergleich zu Hodgkin-Zelllinien und weiteren Lymphomzelllinien gezeigt werden, welche in etwa der der PBMCs entsprach. Dies ist vermutlich durch den großen Anteil der Bystander Zellen und relativ geringen Anteil der HRSC in befallenen Lymphknoten zu erklären (Gobbi et al., 2013). Trotz dessen war UBE2S NM im Vergleich zu PBMCs überexprimiert, auch wenn dieser Effekt geringer ausgeprägt war als in den HL-Zelllinien. Der Effekt der Bystander Zellen zeigte sich auch im direkten Vergleich der Normtranskriptvariante NM mit der Isoform X1. Hierbei ist zwar die Normtranskriptvariante im Vergleich zu X1 in der Lymphknotenbiopsie noch immer überexprimiert, jedoch ist dieser Effekt deutlich geringer ausgeprägt als in HL-Zelllinien. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass für die Lymphknotenbiopsie aufgrund Materialknappheit nur eine Einfachbestimmung durchgeführt werden konnte. Zudem sollte der eventuelle Einfluss der Zellkultur, aus der die für die Versuche verwendete RNA der HL-Zelllinien stammte, auf die Genexpression bedacht werden (Schwering et al., 2003).

Da in der Mikroarrayanalyse nicht die Signalintensitäten vollständiger Gene sondern nur die einzelner Genabschnitte miteinander verglichen werden, könnte es bei der

Suche nach einem geeigneten MRD-Marker dementsprechend vorteilhaft sein, quantitative Untersuchungen mittels Real-Time PCR nicht an einem gesamten Gen sondern nur an einzelnen Abschnitten entsprechend der Probe-Sets mit der stärksten Signalintensität durchzuführen. Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgte dies durch das Primerpaar „ID03“, welches spezifisch für das Probe-Set der ID 3747003 war. Dieses ist das am drittstärksten exprimierte Probe-Set von UBE2S. Jedoch zeigte sich hierfür nur eine geringe Überexpression, weshalb bei weiteren Untersuchungen auf dieses Primerpaar verzichtet wurde. Da das Probe-Set mit der ID 3713482 das am stärksten exprimierte Probe-Set darstellte, könnte bei zukünftigen Untersuchungen versucht werden, ein spezifisches Primerpaar hierfür zu konstruieren um damit eventuell deutlichere Ergebnisse zeigen zu können.

#### **5.4 Expression von UBE2S bei weiteren lymphoproliferativen Erkrankungen**

Da MRD-Marker den Anspruch erfüllen sollten, spezifisch für eine bestimmte Erkrankung zu sein, wurde die Expressionsrate von UBE2S ebenfalls in Leukämie- und Burkitt-Lymphom-Zelllinien untersucht. Es zeigte sich für X1 eine sowohl im Vergleich zu HL-Zelllinien als auch zu PBMCs erhöhte Expression in Leukämiezellen, welche vor allem für die Zelllinie 697 signifikant war. In Burkitt-Lymphom-Zelllinien scheint die Expression geringer zu sein als für das HL, jedoch wurde hierfür keine Dreifachbestimmung und dementsprechend keine Signifikanzprüfung durchgeführt.

Die Normtranskriptvariante NM dagegen war in allen untersuchten Zelllinien stärker exprimiert als in PBMCs, auch wenn diese Überexpression in den Burkitt-Zelllinien und der Leukämie-Zelllinie cALL2 nur gering ausfiel. UBE2S NM ist demnach sowohl in soliden Tumoren wie dem Mamma-, Zervix- und hepatozellulärem Karzinom (Tedesco et al. 2007, Liang et al. 2012, Ma et al. 2018) als auch in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom und der Leukämie überexprimiert. Die von Tedesco und Liang beobachtete Steigerung der Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika nach Behandlung von Zervixkarzinomzellen mit UBE2S-spezifischer siRNA (Tedesco et al., 2007; Liang et al., 2012) ergibt demnach auch für hämatologische Erkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom und der ALL eine interessante Therapiemöglichkeit. Dies könnte sowohl bei der Behandlung chemotherapieresistenter HL als auch zur möglichen Senkung der Langzeitfolgen durch die Dosisreduktion von Medikamenten Anwendung finden.

In Hodgkin-Lymphomen scheint UBE2S NM im Vergleich zur ALL und dem Burkitt-Lymphom am stärksten exprimiert zu sein. Betrachtete man jedoch die Lymphknoten-

Biopsie eines HL-Patienten, konnte kein Unterschied zu Leukämie-Zelllinien mehr festgestellt werden. Zudem ist der Unterschied der Expressionsrate zwischen HL- und Leukämie-Zelllinien nicht stark genug ausgeprägt, um UBE2S als eindeutigen MRD-Marker für das HL zu nutzen.

### 5.5 UBE2S als möglicher Proliferationsmarker

Aus der Betrachtung von UBE2S in verschiedenen Zelllinien lymphoproliferativer Erkrankungen ergibt sich die Frage, ob die Überexpression von UBE2S NM spezifisch für maligne Erkrankungen ist oder generell in proliferierenden Zellen auftritt. Hierfür wurden zunächst die lymphoblastoiden Zelllinien LCL-73, A2+2310 und EREB2-5 und anschließend die Zelllinie P493-6 untersucht, deren Proliferation sich durch Tetrazyklin aus- und durch Östrogen-induzierte Aktivierung von *Epstein-Barr virus nuclear antigen 2* (EBNA2) anschalten lässt. Im Gegensatz zu den HL-Zelllinien zeigte sich UBE2S NM in den lymphoblastoiden Zelllinien im Vergleich zu PBMCs nicht als überexprimiert, jedoch ist UBE2S X1 sowohl in HL-Zelllinien als auch in lymphoproliferativen Zellen im Vergleich zu PBMCs unterexprimiert. Hieraus ergab sich die Vermutung, dass dies ein für proliferierende Zellen spezifischer Effekt ist.

Zur genaueren Untersuchung von UBE2S in Abhängigkeit von der Proliferation wurde die Zelllinie P493-6 betrachtet. Die Zellen, die weder mit Tetrazyklin noch mit Östrogen behandelt wurden und in denen dementsprechend ausschließlich c-myc aktiviert war, entsprechen in ihrem Phänotyp dem Burkitt-Lymphomzellen Typ I und haben somit aufgrund einer verringerten Expression von HLA-I-, Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen ein geringes immunstimulierendes Potential. Nach zusätzlicher Aktivierung von EBNA2 mittels Östrogen entstehen Zellen, die eher dem Burkitt-Lymphom-Typ III entsprechen, welcher jedoch aufgrund seines hohen immunogenen Potentials nur *in vitro* existiert (Staege et al., 2002). Es wurden zunächst die Gene ABHD6 und c-myc untersucht, wobei die erwarteten Effekte sichtbar wurden. Dementsprechend wurde die Expression von ABHD6 durch Östrogen gesteigert und die von c-myc durch Tetrazyklin gesenkt. ABHD6 wird durch Aktivierung von EBNA2 verstärkt exprimiert. In der Zelllinie P493-6 bilden EBNA2 und die Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors ein Fusionsprotein (Kempkes et al., 1995), die Aktivierung von EBNA2 und anschließender Expression von ABHD6 erfolgt daher durch Östrogen (Max et al., 2009). Zudem ist jedoch auch eine direkte Steigerung der Expression von ABHD6 durch Östrogen beschrieben (Drehmer et al., 2018). Auf welchen Mechanismus die Expression in diesem Fall basiert, ist demnach nicht vollständig geklärt und könnte in weiterführenden Untersuchungen betrachtet werden.

Bei der Untersuchung der Normtranskriptvariante NM des Gens UBE2S sowie der Isoform X1 konnte für keine der beiden Varianten eine eindeutige Abhängigkeit der Expression von der durch Tetrazyklin oder Östrogen beeinflussten Proliferation beobachtet werden. Die Vermutung, dass die verminderte Expression von UBE2S X1 eine spezifische Eigenschaft proliferierender Zellen ist, ließ sich anhand der Zelllinie P493-6 dementsprechend nicht bestätigen. Es lässt sich jedoch eine im Vergleich zu ruhenden Zellen (T+E-) etwas verstärkte Expression von NM in den Burkitt-Lymphom Typ I entsprechenden Zellen (T-E-) erkennen. Dieser leichte Effekt ist auch bei der Betrachtung der Burkitt-Zelllinien Raji und Daudi im Vergleich mit PBMCs zu beobachten.

Bei der Betrachtung des Verhältnisses der Normtranskriptvariante NM zur Isoform X1 zeigt sich jedoch eine signifikant erniedrigte Expression in denjenigen Zellen, welche durch ausschließliche Behandlung mit Tetrazyklin im Zellzyklus arretiert wurden im Vergleich zu proliferierenden Zellen. Das Verhältnis der Expression der beiden Varianten des Gens UBE2S scheint daher abhängig von der Proliferationsrate zu sein.

Aus der Untersuchung der Zelllinie P493-6 ergibt sich demnach, dass die vor allem in HL-Zelllinien, aber auch in Leukämie- und in geringerem Ausmaß in Burkitt-Lymphom-Zelllinien, beobachtete Überexpression des Gens UBE2S NM nicht durch die erhöhte Proliferationsrate entarteter Zellen zu erklären ist. Auch die Expression von UBE2S X1 stellte sich als nicht proliferationsabhängig heraus. Nur auf das Verhältnis der beiden Varianten zueinander scheint die Proliferationsrate einen Einfluss zu besitzen. Hierbei zeigte sich für alle untersuchten Zelllinien, unter anderem der Linie P493-6, eine verstärkte Expression von NM im Verhältnis zu X1 in proliferierenden Zellen.

## **6 Zusammenfassung**

Das Hodgkin-Lymphom ist eine vor allem junge Erwachsene betreffende maligne Erkrankung mit einer guten Heilungsrate von insgesamt über 80% nach durchgeführter Chemo- und gegebenenfalls Strahlentherapie. Auch Stammzelltransplantationen stellen eine Therapieoption dar. Aufgrund des häufig jungen Erkrankungsalters sind durch die Therapie hervorgerufene Langzeitfolgen von besonderer Bedeutung. Zu diesen gehören neben endokrinen Dysfunktionen, myokardialen und pulmonalen Schäden auch ein erhöhtes Risiko für Zweitmalignome und Infertilität. Dementsprechend ist es von allgemeinem Interesse, die Therapie so weit zu optimieren, dass das Risiko dieser Spätfolgen bei gleichbleibendem Therapieerfolg so

weit wie möglich verringert wird. Zudem gibt es noch immer Patienten, welche resistent gegenüber einer Chemotherapie sind oder Rezidive erleiden, durch welche wiederum das Risiko für Langzeitfolgen durch eine intensiviertere Therapie steigt. Durch einen geeigneten MRD-Marker könnten diese Rezidive frühzeitig erkannt und mit möglichst geringer Therapieintensität behandelt werden. Auf der Suche nach einem geeigneten Gen, welches als MRD-Marker genutzt werden könnte, wurden von cDNA-Banken der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien KM-H2, L-428 und L-1236 stammende Mikroarraydaten ausgewertet und mit denen normaler Blutzellen verglichen. Hierbei zeigten sich einige Gene in HL-Zelllinien als überexprimiert, zu denen unter anderem die Gene *Ubiquitin conjugating enzyme E2 S* (UBE2S) und *Phosphatidylethanolamine binding protein 1* (PEBP1) gehörten. Für das Gen UBE2S wurden daraufhin quantitative Bestimmungen mittels Real-Time PCR durchgeführt, in welchen die HL-Zelllinien KM-H2, L-428, L-1236, L-540 und HDLM-2 mit Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) verglichen wurden. Hierbei zeigte sich eine deutliche Überexpression der Normtranskriptvariante NM des Gens UBE2S und eine Unterexpression der Isoform X1 im Vergleich zu PBMCs, welche noch deutlicher wird, wenn man diese beiden Varianten ins Verhältnis setzt. Auch wenn ein deutlicher Unterschied der Expression zwischen den HL-Zelllinien und PBMCs besteht, ist dieser jedoch nicht groß genug, um mit diesem Gen eine HL-Zelle unter mindestens 10.000 normalen Zellen detektieren zu können. UBE2S kann daher leider nicht als MRD-Marker verwendet werden. Jedoch könnten quantitative Bestimmungen, des dem Probe-Set der ID 3713482 entsprechenden Genabschnitts, deutlichere Unterschiede der Expression in HL-Zelllinien im Vergleich zu PBMCs und anderen Zelllinien zeigen.

Durch die Untersuchung der Zelllinie P493-6, deren Proliferation durch Tetrazyklin und Östrogen beeinflusst werden kann, konnte gezeigt werden, dass weder die vermehrte Expression der Normtranskriptvariante NM noch die verminderte Expression der Isoform X1 in HL-Zelllinien durch eine gesteigerte Proliferation bedingt waren. Jedoch zeigte sich ein Einfluss der Proliferationsrate auf das Verhältnis dieser beiden Varianten zueinander. Das Gen UBE2S wurde bereits bei zahlreichen vorhergehenden Untersuchungen im Zusammenhang mit weiteren malignen Erkrankungen untersucht. Hierbei konnte eine erhöhte Sensitivität von Zervixkarzinom-Zellen gegenüber Chemotherapeutika durch Behandlung mit UBE2S siRNA festgestellt werden. Dies könnte auch für die Behandlung des Hodgkin-Lymphoms von Bedeutung sein.

## 7 Literaturverzeichnis

Aburawi HE, Biloglav A, Johansson B, Paulsson K (2011) Cytogenetic and molecular genetic characterization of the 'high hyperdiploid' B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia cell line MHH-CALL-2 reveals a near-haploid origin. *Brit J Haematol.* 154 (2): 275-277.

Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T (2017) The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313-D319.

Borchmann P, Goergen H, Kobe C, Lohri A, Greil R, Eichenauer DA, Zijlstra JM, Markova J, Meissner J, Feuring-Buske M, Hüttmann A, Dierlamm J, Soekler M, Beck HJ, Willenbacher W, Ludwig WD, Pabst T, Topp MS, Hitz F, Bentz M, Keller UB, Kühnhardt D, Ostermann H, Schmitz N, Hertenstein B, Aulitzky W, Maschmeyer G, Vieler T, Eich H, Baues C, Stein H, Fuchs M, Kuhnert G, Diehl V, Dietlein M, Engert A (2017) PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): final results of an open-label, international, randomised phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group. *Lancet* 390 (10114): 2790-2802.

Bork U, Grützmann R, Rahbari NN, Schölch S, Distler M, Reissfelder C, Koch M, Weitz J (2014) Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 20 (30): 10296-10304.

Brown NG, VanderLinden R, Watson ER, Weissmann F, Ordureau A, Wu KP, Zhang W, Yu S, Mercredi PY, Harrison JS, Davidson IF, Qiao R, Lu Y, Dube P, Brunner MR, Grace CRR, Miller DJ, Haselbach D, Jarvis MA, Yamaguchi M, Yanishevski D, Petzold G, Sidhu SS, Kuhlman B, Kirschner MW, Harper JW, Peters JM, Stark H, Schulman BA (2016) Dual RING E3 Architectures Regulate Multiubiquitination and Ubiquitin Chain Elongation by APC/C. *Cell* 165 (6): 1440–1453.

Castellino SM, Geiger AM, Mertens AC, Leisenring WM, Tooze JA, Goodman P, Stovall M, Robison LL, Hudson MM (2011) Morbidity and mortality in long-term survivors of Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood* 117 (6): 1806-1816.

Chen MF, Lee KD, Lu MS, Chen CC, Hsieh MJ, Liu YH, Lin PY, Chen WC (2009) The predictive role of E2-EPF ubiquitin carrier protein in esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol. Med. (Berlin, Germany)* 87 (3): 307-320.

Clark, E. A.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Hynes, R. O. (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406 (6795): 532-535.

- Damm-Welk C, Mussolin L, Zimmermann M, Pillon M, Klapper W, Oschlies I, d'Amore, ESG, Reiter A, Woessmann W, Rosolen A (2014) Early assessment of minimal residual disease identifies patients at very high relapse risk in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 123 (3): 334-337.
- Diehl V, Kirchner HH, Burchard H, Stein H, Fonatsch C, Gerdes J, Schaadt M, Heit W, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Heintz F, Sueno K (1982) Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines. *Cancer Treat Rep.* 66 (4): 615-32.
- Diehl V, Thomas RK, Re D (2004) Part II: Hodgkin's lymphoma—diagnosis and treatment. *Lancet Oncol.* 5 (1): 19–26.
- Drehmer MN, Muniz YCN, Marrero AR, Löfgren SE (2019) Gene Expression of ABHD6, a Key Factor in the Endocannabinoid System, Can Be Modulated by Female Hormones in Human Immune Cells. *Biochem Gen.* 57 (1): 35-45.
- Drexler HG, Gaedicke G, Lok MS, Diehl V, Minowada J. (1986) Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res.* 10 (5): 487-500.
- Findley HW Jr., Cooper MD, Kim TH, Alvarado C, Ragab AH (1982) The new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood* 60 (6): 1305-1309.
- Gaipa G, Basso G, Biondi A, Campana D (2013) Detection of minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometrie* 84 (6): 359-369
- Garnett MJ, Mansfeld J, Godwin C, Matsusaka T, Wu J, Russell P, Pines J, Venkitaraman AR (2009) UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nature Cell Biol.* 11 (11): 1363-1369
- Gobbi PG, Ferreri AJM, Ponzoni M, Levis A (2013) Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 85 (2): 216-237.
- Griffioen M, Kessler JH, Borghi M, van Soest RA, van der Minne CE, Nouta J, van der Burg SH, Medema JP, Schrier PI, Falkenburg JHF, Osanto S, Melief CJM (2006) Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy. *Clin Cancer Res.* 12 (10): 3130-3136.
- Grigoryev YA, Kurian SM, Nakorchevskiy AA, Burke JP, Campbell D, Head SR, Deng J, Kantor AB, Yates JR, Salomon DR (2009) Genome-Wide Analysis of Immune Activation in Human T and B Cells Reveals Distinct Classes of Alternatively Spliced Genes. *PLoS One* 4 (11): e7906.

- Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, Campbell D, Head SR, Yates JR, Salomon DR (2011) MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol.* 187 (5): 2233-2234.
- Guex N, Peitsch MC, Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30 Suppl 1: 162-173.
- Hasenclever D, Diehl V (1998) A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Eng J Med.* 339 (21): 1506–1514.
- Haverkamp H, Böll B, Eichenauer DA, Sasse S, Fuchs M, Borchmann P, Diehl V, Engert A, von Tresckow B (2015) Impact of Bleomycin and Vincristine Dose Reductions in Patients With Advanced Hodgkin Lymphoma Treated With BEACOPP: An Analysis of the German Hodgkin Study Group HD12 and HD15 Trials. *J Clin Oncol.* 33 (22): 2430–2436.
- Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, Hummel M, Finn T, Anagnostopoulos I, Bergholz M, Krieger G, Stein H (1990) High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 137 (1): 13-18.
- Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS, Madsen M, Rosdahl N, Konradsen HB, Storm H (2003) Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med.* 249 (14): 1324-1332.
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/), based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019. Zuletzt geprüft am 28.05.2019.
- Hoennscheidt C, Max D, Richter N, Staeger MS (2009) Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Scand J Immunol* 70 (3): 216–22
- Huang CZ, Huang AM, Liu JF, Wang B, Lin KC, Ye YB (2018) Somatostatin Octapeptide Inhibits Cell Invasion and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma Through PEBP1. *Cell Physiol Biochem.* 47 (6): 2340-2349.
- Huang H, Ceccarelli DF, Orlicky S, St-Cyr DJ, Ziemba A, Garg P, Plamondon S, Auer M, Sidhu S, Marinier A, Kleiger G, Tyers M, Sicheri F (2014) E2 enzyme inhibition by stabilization of a low-affinity interface with ubiquitin. *Nature Chem Biol.* 10 (2): 165-163.

- Hurwitz R, Huzier J, LeBien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J (1979) Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 23 (2): 174-180.
- Jaffe AB, Hall A (2002) Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv cancer Res* 84: 57-80.
- Jung CR, Hwang KS, Yoo J, Cho WK, Kim JM, Kim WH, Im DS (2006) E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nature Med.* 12 (7): 809-816.
- Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, Uchino H, Yamabe H, Miwa H, Shirakawa S, Hatanaka M, Honjo T (2003) Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood* 68 (1): 285-292.
- Kempkes B, Spitkovsky D, Jansen-Dürr P, Ellwart JW, Kremmer E, Delecluse HJ, Rottenberger C, Bornkamm GW, Hammerschmidt W (1995) B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J* 14 (1): 88-96.
- Kempkes B, Zimmer-Strobl U, Eissner G, Pawlita M, Falk M, Hammerschmidt W, Bornkamm GW (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2)-oestrogen receptor fusion proteins complement the EBNA2-deficient Epstein-Barr virus strain P3HR1 in transformation of primary B cells but suppress growth of human B cell lymphoma lines. *J Gen Virol.* 77 (Pt 2): 227-37.
- Kern W, Haferlach C, Haferlach T, Schnittger S (2008) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Cancer* 112 (1): 4-16.
- Kewitz S (2015) Identifizierung neuer Hodgkin-Lymphom-assoziiierter Zielstrukturen [Dissertation]. Halle: Martin-Luther-Universität
- Kewitz S, Staeger MS (2013) Expression and Regulation of the Endogenous Retrovirus 3 in Hodgkin's Lymphoma Cells. *Front Oncol.* 3: 179.
- Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P (1968) Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* 28 (7): 1300-1310.
- Kurth J, Spieker T, Wustrow J, Strickler GJ, Hansmann LM, Rajewsky K, Küppers R (2000) EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13 (4): 485-495.

- Latour S, Winter S (2018) Inherited Immunodeficiencies With High Predisposition to Epstein-Barr Virus-Driven Lymphoproliferative Diseases. *Front Immunol.* 9: 1103.
- Lemcke S, Hönnscheidt C, Waschatko G, Bopp A, Lütjohann D, Bertram N, Gehrig-Burger K (2010) DHEA-Bodipy--a functional fluorescent DHEA analog for live cell imaging. *Mol cell endocrinol*, 314 (1):31-40
- Li Z, Wang Y, Li Y, Yin W, Mo L, Qian X, Zhang Y, Wang G, Bu F, Zhang Z, Ren X, Zhu B, Niu C, Xiao W, Zhang W (2018) Ube2s stabilizes  $\beta$ -Catenin through K11-linked polyubiquitination to promote mesendoderm specification and colorectal cancer development. *Cell Death Dis.* 9 (5): 456.
- Liang J, Nishi H, Bian ML, Higuma C, Sasaki T, Ito H, Isaka K (2012) The ubiquitin-conjugating enzyme E2-EPF is overexpressed in cervical cancer and associates with tumor growth. *Oncol Rep.* 28 (4): 1519–1525.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lorenz S, Bhattacharyya M, Feiler C, Rape M, Kuriyan J (2016) Crystal Structure of a Ube2S-Ubiquitin Conjugate. *PLoS One* 11 (2): e0147550.
- Ma Y, Li K, Li S, Liang B, Liu Q, Mo Z (2018) Prognostic value of ubiquitin-conjugating enzyme E2 S overexpression in hepatocellular carcinoma. *Int J Biol Macromol.* 119: 225-231.
- Maier S, Staffler G, Hartmann A, Höck J, Henning K, Grabusic K, Mailhammer R, Hoffmann R, Wilmanns M, Lang R, Mages J, Kempkes B (2006) Cellular target genes of Epstein–Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 80 (19): 9761–71.
- Masago K, Fujita S, Yatabe Y (2018) Targeting minimal residual disease after surgery with molecular targeted therapy: the real path to a cure? *J Thorac Dis.* 10 (Suppl 17): 1982-1985.
- Mauz-Körholz C, Hasenclever D, Dörffel W, Ruschke K, Pelz T, Voigt A, Stiefel M, Winkler M, Vilser C, Dieckmann K, Karlén Jonas, Bergsträsser E, Fosså A, Mann G, Hummel M, Klapper W, Stein H, Vordermark D, Kluge R, Körholz D (2010) Procarbazine-free OEPA-COPDAC chemotherapy in boys and standard OPPA-COPP in girls have comparable effectiveness in pediatric Hodgkin's lymphoma: the GPOH-HD-2002 study. *J Clin Oncol* 28 (23): 3680–3686.

- Max D, Hesse M, Volkmer I, Staeger MS (2009) High expression of the evolutionarily conserved alpha/beta hydrolase domain containing 6 (ABHD6) in Ewing tumors. *Cancer science*. 100 (12): 2383–2389.
- Müller J (2011) Etablierung und Charakterisierung einer cDNA-Bank aus Hodgkin-Lymphom-Zellen [Diplomarbeit]. Halle: Martin-Luther-Universität.
- Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, Orentreich N, Polk BF, Vogelmann J (1989) Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Eng J Med*. 320 (11): 689-695.
- Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Clifford P, Manolov G, Fenyo EM, Klein E (1969) Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas. *Cancer* 23 (1): 64-79.
- Nikitin PA, Yan CM, Forte E, Bocedi A, Tourigny JP, White RE, Allday MJ, Patel A, Dave SS, Kim W, Hu K, Guo J, Tainter D, Rusyn E, Luftig MA (2010) An ATM/Chk2-mediated DNA damage-responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus. *Cell Host Micr*. 8 (6): 510-522.
- Pajic A, Spitkovsky D, Christoph B, Kempkes B, Schuhmacher M, Staeger MS, Brielmeier M, Ellwart J, Kohlhuber F, Bornkamm GW, Polack A, Eick D (2000) Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87 (6): 787-793.
- Pulvertaft JV (1964) Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet* 1 (7327): 238-240.
- Price AM, Tourigny JP, Forte E, Salinas RE, Dave SS, Luftig MA (2012) Analysis of Epstein-Barr virus-regulated host gene expression changes through primary B-cell outgrowth reveals delayed kinetics of latent membrane protein 1-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J Virol*. 86 (20): 1096–11106.
- Righetti SC, Perego P, Carenini N, Corna E, Dal Bo L, Cedrola S, La Porta CAM, Zunino F (2006) Molecular alterations of cells resistant to platinum drugs: role of PKC $\alpha$ . *Biochim Biophys Acta*. 1763 (1): 93–100.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe, Berlin, 2017, Seite 116-119.
- Schaadt M, Fonatsch C, Kirchner H, Diehl V (1979) Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut* 38 (2): 185-90.

Schattner A, Keshet N (2010) Pel-Ebstein cyclic fever: not just lymphoma. *Am J Med.* 123 (7), e3.

Schwering I, Bräuninger A, Distler V, Jesdinsky J, Diehl V, Hansmann ML, Rajewsky K, Küppers R (2003) Profiling of Hodgkin's Lymphoma Cell Line L1236 and Germinal Center B Cells: Identification of Hodgkin's Lymphoma-specific Genes. *Mol Med.* 9 (3-4): 85-95.

Shehadeh LA, Yu K, Wang L, Guevara A, Singer C, Vance J, Papapetropoulos S (2010) SRRM2, a potential blood biomarker revealing high alternative splicing in Parkinson's disease. *PloS One* 5 (2), e9104.

Sheng Y, Hong JH, Doherty R, Srikumar T, Shloush J, Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Neculai D, Wan JW, Kim SK, Arrowsmith CH, Raught B, Dhe-Paganon S (2012) A Human Ubiquitin Conjugating Enzyme (E2)-HECT E3 Ligase Structure-function Screen. *Mol. Cell. Proteomics* 11 (8): 329–341.

Staege MS, Banning-Eichenseer U, Weißflog G, Volkmer I, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D (2008) Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol.* 36 (7): 886–896.

Staege MS, Lee SP, Frisan T, Mautner J, Scholz S, Pajic A, Rickinson AB, Masucci MG, Polack A, Bornkamm GW (2002) MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (7): 4550-4555.

Staege MS, Müller K, Kewitz S, Volkmer I, Mauz-Körholz C, Bernig T, Körholz D (2014) Expression of Dual-Specificity Phosphatase 5 Pseudogene 1 (DUSP5P1) in Tumor Cells. *PloS One* 9 (2): e89577.

Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18 (1): 207-208

Schuhmacher M, Staege MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Current Biol.* 9 (21): 1255-1258.

Tedesco D, Zhang J, Trinh L, Lalehzadeh G, Meisner R, Yamaguchi KD, Ruderman DL, Dinter H, Zajchowski DA (2007) The Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2-EPF Is Overexpressed in Primary Breast Cancer and Modulates Sensitivity to Topoisomerase II Inhibition. *Neoplasia* 9 (7): 601-613.

- Thomas RK, Re D, Wolf J, Diehl V (2004) Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol.* 5 (1): 11-18.
- Tomeczkowski J, Yakisan E, Wieland B, Reiter A, Welte K, Sykora KW (1995) Absence of G-CSF receptors and absent response to C-CSF in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL cells. *Brit J Haematol.* 89 (4): 771-779.
- Tzankov A, Dirnhofer S (2006) Pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology* 73 (3): 107-125.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40 (15): e115.
- Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V (2014) Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol* 165 (3): 287–299.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46 (W1): W296-W303.
- Weibull CE, Johansson ALV, Eloranta S, Smedby KE, Björkholm M, Lambert PC, Dickman W, Glimelius I (2018) Contemporarily Treated Patients With Hodgkin Lymphoma Have Childbearing Potential in Line With Matched Comparators. *J Clin Oncol.* 36 (26):2718-2725.
- Weniger MA, Tiacci E, Schneider S, Arnolds J, Rüschenbaum S, Duppach J, Seifert M, Döring C, Hansmann ML, Küppers R (2018) Human CD30+ B cells represent a unique subset related to Hodgkin lymphoma cells. *J Clin Invest.* 128 (7):2996-3007.
- Wickliffe KE, Williamson A, Meyer HJ, Kelly A, Rape M (2011) K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends Cell Biol.* 21 (11): 656-663.
- Williamson A, Wickliffe KE, Mellone BG, Song L, Karpen GH, Rape M (2009) Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (43): 18213-18218.
- Winkler C, Steingrube DS, Altermann W, Schlaf G, Max D, Kewitz S, Emmer A, Kornhuber M, Banning-Eichenseer U, Staeger MS (2012) Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigen-specific immune responses. *Cancer Immunol Immunoth.* 61 (10): 1769-1779.
- Wolf J, Kapp U, Bohlen H, Kornacker M, Schoch C, Stahl B, Mücke S, von Kalle C, Fonatsch C, Schaefer HE, Hansmann ML, Diehl V (1996) Peripheral blood

mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* 87 (8): 3418-3428.

Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 43 (W1): W174-W181.

Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401 (6749): 173-177.

Zhang C, Freddolino PL, Zhang Y (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res.* 45 (W1): W291-W299.

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

## **Thesen der Dissertation**

Mikroarraybasierte Charakterisierung spezifischer  
Genexpression in Hodgkin-Lymphomzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ginés Melzer

geboren am 04.02.1992 in Rüdersdorf

## 8 Thesen

1. Durch mikroarraybasierte Auswertung von cDNA Banken lassen sich Hodgkin-Lymphom-assoziierte Transkripte identifizieren.
2. Die Normtranskriptvariante des Gens UBE2S ist in Hodgkin-Lymphomzellen im Vergleich zu PBMCs überexprimiert.
3. Die Transkriptvariante X1 des Gens UBE2S ist in Hodgkin-Lymphomzellen im Vergleich zu PBMCs unterexprimiert.
4. Die Expression der Normtranskriptvariante NM und der Transkriptvariante X1 des Gens UBE2S ist nicht proliferationsabhängig.
5. Das Verhältnis der Expression der Normtranskriptvariante zu der Transkriptvariante X1 des Gens UBE2S scheint in der Zelllinie P493-9 proliferationsabhängig zu sein.
6. Das Gen UBE2S kann mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Primer nicht als MRD-Marker des Hodgkin-Lymphoms verwendet werden.

## 9 Anhang

### 9.1 Zusammenfassung überexprimierter Gene der cDNA-Banken

Im Rahmen der Auswertung der verwendeten cDNA-Banken zeigten sich zu unterschiedlichen Genen gehörige Probe-Sets als überexprimiert. Diejenigen Probe-Sets, deren Signalintensitäten in HL-Zelllinien im Vergleich zu den verwendeten Vergleichszellen am stärksten ausfielen, werden in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 12: Darstellung aller überexprimierter Probe-Sets**

Zum Vergleich der HL-Linien mit den Vergleichszellen wurde der Quotient aus der geringsten Signalintensität der HL-Linien und der stärksten Signalintensität der Vergleichszellen bezüglich eines Probe-Sets gebildet. Als Vergleichszellen dienten 11 PBMCs und 14 Proben isolierter B-Zellen. Dargestellt werden alle Probe-Sets, deren Intensität der cDNA-Banken der HL-Linien der geringsten Signalintensität mindestens dem Dreifachen der Vergleichszelle mit der stärksten Signalintensität entsprach. Zur vereinfachten Darstellung wurde der Mittelwert der Vergleichszellen gebildet.

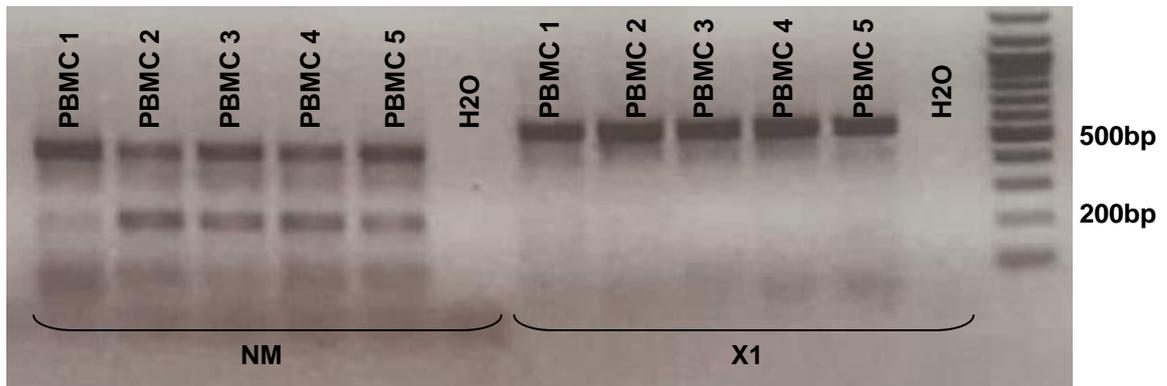
Probe-Set ID	MW VZ	KM-H2	L-1236	L-428	Gen	Min HL / Max VZ
3713482	164,97991	8207,535	13810,84	6780,1	UBE2S	18,5656673
3713481	82,888854	2976,445	9125,883	5794,675	UBE2S	16,4991865
3433808	100,774379	2237,072	7370,007	5855,704	PEBP1	14,9985552
2562232	112,218313	1953,339	6315,275	4923,042	PEBP1	12,2905541
2449964	93,3143952	1641,24	6090,701	4483,22	PEBP1	11,7769551
4013166	6,8094364	270,3068	217,0031	749,1874	LDHBP2	11,4374148
3433805	278,637996	3877,676	10807,19	7359,117	PEBP1	10,0205182
3815544	178,012151	6261,801	7353,578	3482,605	GPX4	9,88290144
3747003	60,9448148	1601,551	4201,628	4849,787	UBE2S	9,3194542
2562192	36,5198602	665,2296	3386,037	1443,399	PEBP1	9,29180385
3451625	17,5546758	229,3452	235,2117	393,5219	---	8,59966028
3433803	124,470692	2203,611	7341,489	3536,068	PEBP1	8,47998002
3747004	56,7850392	760,678	5857,841	3675,095	UBE2S	7,96518046
3871452	65,0497592	727,6693	6462,42	4226,674	UBE2S	7,62347097
3815557	270,095673	4088,01	3129,32	3317,397	GPX4	7,15234888
2905379	321,370324	3202,67	6839,086	4433,426	COX6A1	6,26566455
3701215	37,4917864	975,1263	479,6163	451,2513	---	5,95902291
2449968	109,200037	1090,723	3540,753	1461,258	PEBP1	5,86024888
2905380	244,131534	3073,672	4761,553	2724,489	COX6A1	5,80799082
3446899	66,8635052	1292,497	812,3987	2772,361	LDHB	5,77662199
2708803	84,1650852	1627,388	1839,498	949,2317	---	5,6486017
2951172	287,71006	2338,38	3146,848	5101,749	RPS10	5,63907898
3640627	388,519083	4230,079	4625,899	5214,693	---	5,53610118
3446893	139,657712	1506,395	3764,44	4340,613	LDHB	5,28637368
3815548	621,215336	8914,186	8898,271	7320,138	GPX4	5,27000567
3630206	404,616693	4778,22	6276,442	3336,992	SNORD18C /18B/18A /16 /RPL4	5,15545423
3392643	19,3712265	902,9775	211,6026	256,8526	---	4,92178276
3434365	325,096189	3515,126	6774,975	3494,128	COX6A1	4,85796331

3871453	37,6355568	328,3908	3782,57	2186,68	UBE2S	4,80514405
3474367	413,127744	11324,12	4694,85	5340,825	RPLP0	4,79643367
3747005	74,4034996	713,8093	4628,297	2846,755	UBE2S	4,7763598
3523022	53,84541	2502,619	1928,877	723,6965	RPL15P18	4,6556884
3815546	531,79764	9686,26	7220,483	5298,521	GPX4	4,60892851
3434364	521,680336	4133,246	5908,924	3347,84	COX6A1	4,56213971
3713484	11,903056	200,8503	198,2603	1652,877	UBE2S	4,48897615
2754001	49,4719772	379,2377	358,6543	406,2064	---	4,46564829
3865556	29,5262034	950,83	746,6669	257,5906	---	4,41352617
3363824	41,061156	1102,603	1094,87	340,9526	---	4,35934708
3577814	79,590788	5248,061	6054,537	1389,792	RPL15P2	4,32687018
3529624	122,606113	887,5491	10860,93	5920,736	PSME1	4,31179579
3815549	316,687584	3201,644	4256,211	2515,75	GPX4	4,3055749
2562191	87,1121104	1128,703	3382,542	1833,865	PEBP1	4,27617736
3252218	226,760268	2940,284	2349,87	1886,836	---	4,22334128
3772727	98,1664844	1463,395	671,9899	823,0849	---	4,22043765
3474365	367,808131	7873,759	3608,323	3717,291	RPLP0	4,21230129
3871447	53,7079488	443,876	1741,331	2651,109	UBE2S	4,19547688
3458128	190,777472	3046,923	5842,241	1716,116	NACA	4,19388106
3815547	248,448297	5496,238	5791,857	2761,788	GPX4	4,15688212
3434367	190,310996	2910,708	4379,695	2251,511	COX6A1	4,14528094
4013165	81,4477444	1299,957	1744,691	4738,697	LDHBP2	4,13440636
3198242	136,216784	1539,782	1311,998	889,2057	---	4,11652153
3950087	38,2963908	337,6517	261,6977	1009,86	---	4,09654885
3537268	67,2770576	744,0153	688,2374	774,8399	---	3,99054775
3714271	328,206512	2553,508	2082,641	2404,892	---	3,97185731
3815550	1137,18063	11160,53	10089,36	8191,708	GPX4	3,94910335
3344236	16,9499932	642,2453	465,3884	277,924	---	3,94842571
3508076	69,9012652	1018,6	566,3821	882,6508	HMGB1	3,90294225
3747002	25,0649662	403,2618	467,6624	1600,63	UBE2S	3,88127916
3815551	774,375636	6324,316	7086,775	5502,483	GPX4	3,84049926
3015224	206,07483	2199,373	2065,268	1396,543	COPS6	3,8371879
3474368	329,054242	8130,729	2657,174	3768,464	RPLP0	3,82857466
4014942	14,1141109	125,0874	373,0074	209,2572	LOC643486	3,80989656
2329405	20,5337366	183,0713	203,8252	232,1231	LOC402779	3,80189223
3494972	15,6565783	188,6668	102,7805	140,2615	---	3,80142655
2726161	68,226502	3286,706	3166,729	826,6652	---	3,72588048
3028308	39,1622423	904,7993	821,3522	422,4239	---	3,63612802
2475504	161,030524	1314,302	914,8715	838,172	---	3,63400663
2456977	66,9329076	2850,18	860,9595	759,424	---	3,61638226
2512801	43,6741005	501,764	439,3983	342,4923	---	3,57396633
3008648	79,69316	520,6548	746,935	908,2054	---	3,51250532
3015228	204,137363	2597,086	3981,059	1587,709	COPS6	3,48881627
3558747	14,503203	127,2391	102,0579	120,7106	---	3,42489851
3595286	45,84583	312,9496	248,6377	231,3526	LOC283663	3,39526684

3178340	29,9459699	332,4057	241,3129	230,088	RPS10P3	3,39049486
3033649	160,633749	2097,047	1258,989	925,1536	---	3,3629769
2905378	675,527444	3444,216	7330,476	3735,64	COX6A1	3,36007961
3815558	512,975976	6903,726	5216,7	2990,263	GPX4	3,32747164
3015221	227,304318	2289,273	2389,489	1412,1	COPS6	3,30913756
2684501	22,3552379	644,424	583,8416	134,6026	---	3,30849389
3871446	24,8913477	430,2016	381,5099	1625,339	UBE2S	3,30803941
3988975	74,8928476	537,2126	718,3345	671,6245	---	3,30530738
3204880	74,6727772	454,8967	370,3177	576,9019	MSMP	3,30406569
2968599	264,774653	4715,811	2355,744	2531,649	ZNF259P1	3,29846928
3630208	246,33836	1302,439	4339,62	1295,649	SNORD18C /18B/18A /16 /RPL4	3,26199808
3433074	90,5672396	518,0121	868,4911	693,3624	---	3,24515509
3181393	39,3188978	209,8349	218,7491	358,8144	FOX1	3,24198072
3713483	63,6152712	476,9678	1661,604	2579,115	UBE2S	3,2343488
2647555	27,3853443	161,2421	294,8297	240,6445	---	3,19251965
3815556	1948,3783	18771,14	13230,27	16917,29	GPX4	3,15446476
3330955	19,050718	141,4598	502,6883	130,4436	RPL5P29	3,15424317
3015230	255,196821	3551,593	4431,278	1955,311	COPS6	3,14276323
3387105	23,86243	321,2097	158,623	173,0439	---	3,11432429
3097648	48,9820432	281,8933	333,7087	380,1917	---	3,10676139
3141964	38,0569016	342,5629	209,1998	219,4979	---	3,08754558
3673231	66,7171516	357,8527	300,1383	302,9242	---	3,08639815
3487401	43,4396836	194,029	222,5275	358,4154	---	3,07184834
3515556	149,341719	971,0718	1368,077	1179,067	---	3,06623526
3872585	43,459773	897,1569	465,758	398,137	---	3,04384457
3846141	18,7680939	936,072	150,7577	188,924	---	3,02849269
3871455	78,4205772	1358,043	2734,584	743,9075	UBE2S	3,02398104
3548488	53,4504708	469,0984	308,7636	559,293	---	3,02093674

VZ: Vergleichszellen, MW VZ: Mittelwert der Vergleichszellen

## 9.2 Doppelbanden unter Verwendung des Primers „NM“

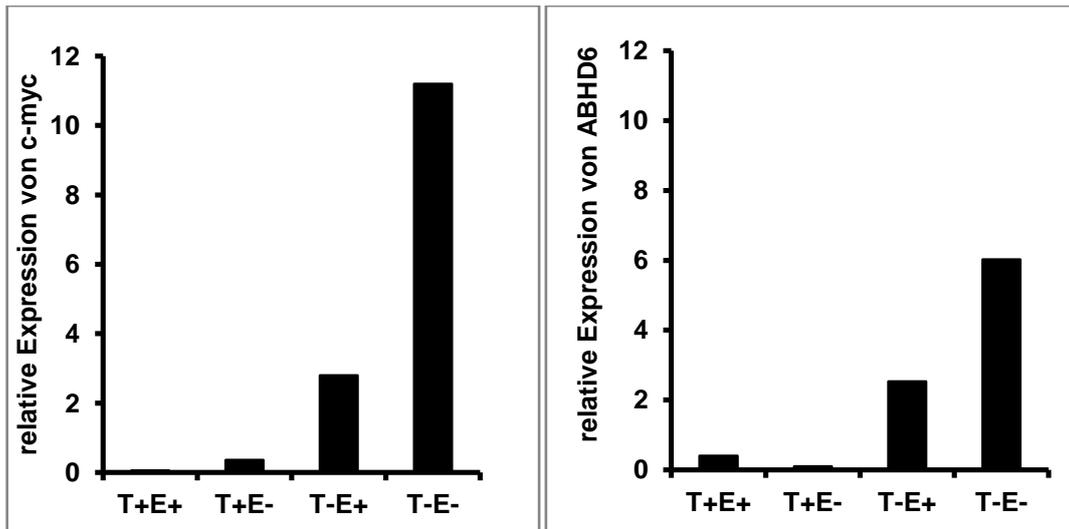


**Abbildung 25: Doppelbanden unter Verwendung des Primers „NM“**

Unter Verwendung des Primers „NM“ zur Untersuchung des Gens UBE2S konnten in der Gelelektrophorese Doppelbanden gezeigt werden. Dargestellt ist dies exemplarisch für 5 PBMCs (links). Für den Primer X1 (rechts) war keine Doppelbande zu erkennen. In weiteren Untersuchungen wurde auf den Primer „NM“ verzichtet.

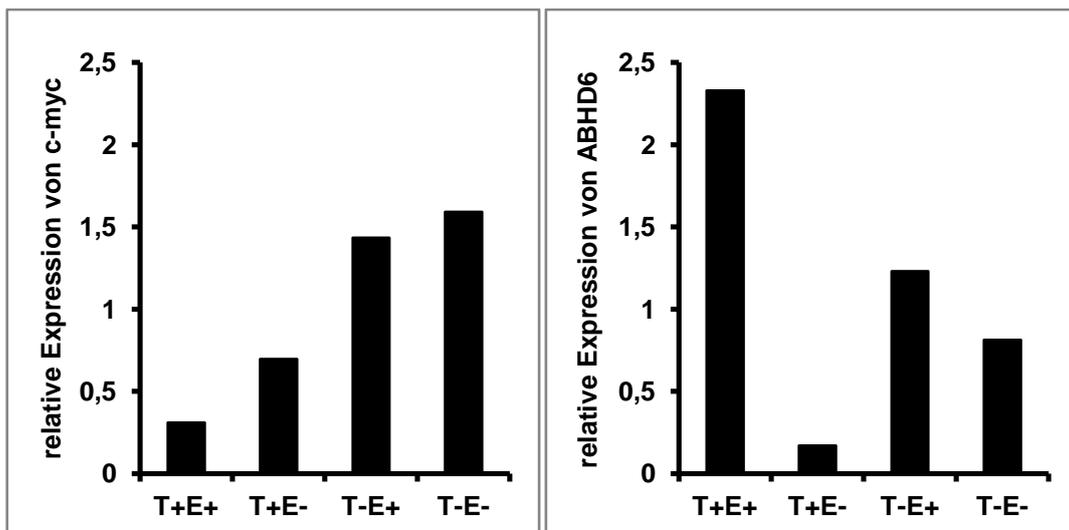
## 9.3 Auswahl des *Housekeeping*-Gens zur Untersuchung der Zelllinie P493-6

Nach einer Behandlung der Zellen mit Tetrazyklin wird erwartet, dass die Expression von c-myc geringer ausfällt als ohne Tetrazyklin. Durch Östrogen dagegen wird ABHD6 verstärkt exprimiert. Da sich diese Effekte für das bisher verwendete *Housekeeping*-Gen Aktin nicht zeigten, musste für weiterführende Versuche zunächst ein passendes *Housekeeping*-Gen ermittelt werden. Hierfür wurden zusätzlich Einfachbestimmungen für die Gene *TATA-binding protein* (TBP) *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) und *Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1* (HPRT1) untersucht (Abb. 25-28). Der erwartete Effekt zeigte sich ausschließlich für TBP, weswegen dieses Gen in den nachfolgenden Untersuchungen als *Housekeeping*-Gen diente.



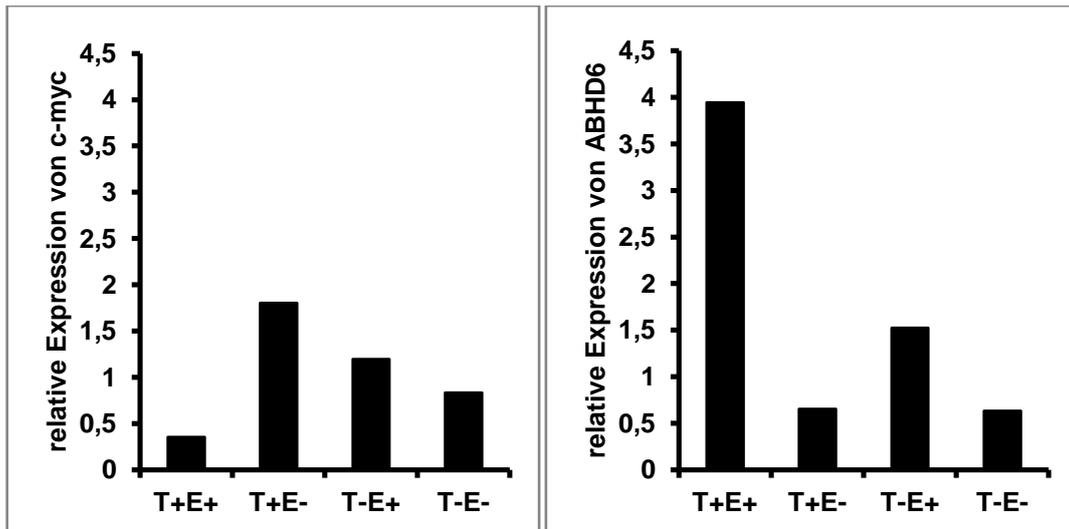
**Abbildung 6: Relative Expression von c-myc und ABHD6, *Housekeeping-Gen*: Aktin**

Dargestellt ist die relative Expression von c-myc bzw. ABHD6 der Zelllinie P493-6 nach Behandlung mit Tetrazyklin und/oder Östrogen. E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen, T+: mit Terazyklin, T-: ohne Tetrazyklin. Die Auswertung der Daten der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011). Als Kalibrator diente jeweils der Median der  $\Delta Ct$ -Werte von ABHD6 bzw. c-myc.



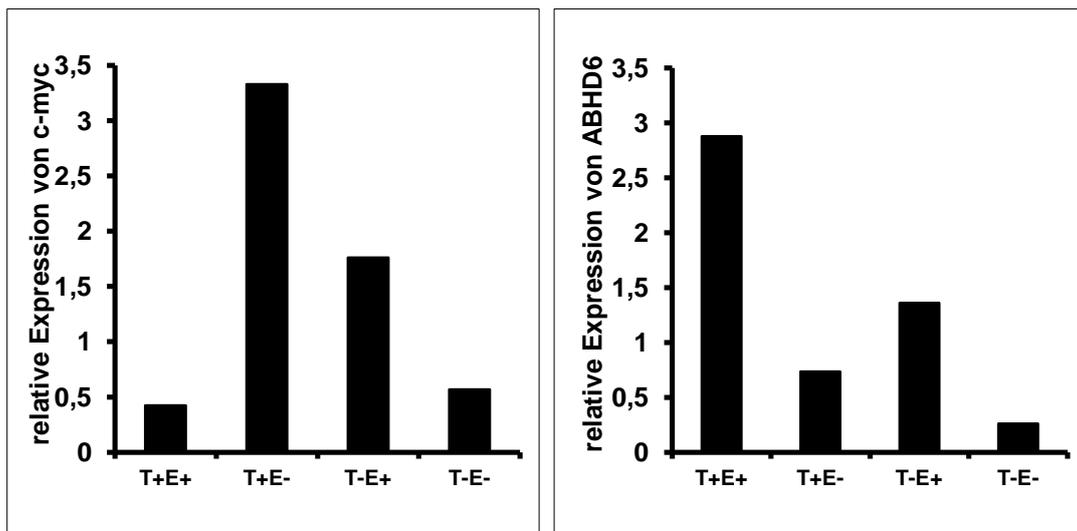
**Abbildung 27: Relative Expression von c-myc und ABHD6, *Housekeeping-Gen*: TBP**

Dargestellt ist die relative Expression von c-myc bzw. ABHD6 der Zelllinie P493-6 nach Behandlung mit Tetrazyklin und/oder Östrogen. E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen, T+: mit Terazyklin, T-: ohne Tetrazyklin. Die Auswertung der Daten der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011). Als Kalibrator diente jeweils der Median der  $\Delta Ct$ -Werte von ABHD6 bzw. c-myc.



**Abbildung 28: Relative Expression von c-myc und ABHD6, Housekeeping-Gen: GAPDH**

Dargestellt ist die relative Expression von c-myc bzw. ABHD6 der Zelllinie P493-6 nach Behandlung mit Tetrazyklin und/oder Östrogen. E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen, T+: mit Terazyklin, T-: ohne Tetrazyklin. Die Auswertung der Daten der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al., 2011). Als Kalibrator diente jeweils der Median der  $\Delta Ct$ -Werte von ABHD6 bzw. c-myc.



**Abbildung 29: Relative Expression von c-myc und ABHD6, Housekeeping-Gen: HPRT1**

Dargestellt ist die relative Expression von c-myc bzw. ABHD6 der Zelllinie P493-6 nach Behandlung mit Tetrazyklin und/oder Östrogen. E+: mit Östrogen, E-: ohne Östrogen, T+: mit Terazyklin, T-: ohne Tetrazyklin. Die Auswertung der Daten der qPCR erfolgte mittels  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak et al. 2011). Als Kalibrator diente jeweils der Median der  $\Delta Ct$ -Werte von ABHD6 bzw. c-myc

## **10 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Ginés Melzer, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen beziehungsweise eine Promotion begonnen habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule oder Universität im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

Ginés Melzer

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ginés Melzer  
Geburtsdatum/ -ort: 04.02.1992 in Rüdersdorf

### Ausbildung

06/2018: dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erhalt der  
Approbation  
04/2017: zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
09/2013: erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/2011 – 06/2018: Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg  
06/2011: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Immanuel-Kant-  
Gymnasium Berlin

### Ärztliche Tätigkeit

Seit 11/2018: Ärztin in Weiterbildung für Innere Medizin am Klinikum St. Georg  
in Leipzig

---

Ort, Datum

Ginés Melzer

## **12 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn apl. Prof. Martin S. Staeger für die Überlassung dieses interessanten Themas für meine Promotion, die gute Betreuung, geduldige Beantwortung aller Fragen, die guten Ratschläge und die zügigen Korrekturen dieser Arbeit bedanken.

Zudem danke ich dem gesamten Team des Forschungslabors der Kinder- und Jugendmedizin, insbesondere Frau I. Volkmer, für die schöne und angenehme Zeit sowie die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich stets unterstützt und motiviert haben.