

Aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med. L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Analyse der Rolle von STAT6 im klassischen Hodgkin-Lymphom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Kathrin Matthias
aus
Neustadt a. Rbge.

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kube

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Hodgkin-Lymphom	2
1.1.1. Klinik und Therapie	2
1.1.2. Pathologie und Klassifikation	6
1.1.3. Pathogenese - klonale Identität, Immunphänotyp, Apoptose-resistenz, Epstein-Barr-Virus und Zytokine	8
1.2. Der Jak/STAT- Signaltransduktionsweg	13
1.2.1. Allgemeines	13
1.2.2. Die Rolle von STAT3 bei malignen Erkrankungen	15
1.2.3. Die Rolle von STAT6 im Hodgkin-Lymphom	16
1.3. Das Prinzip der RNA-Interferenz	18
1.4. Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Geräte	21
2.1.2. Chemikalien	22
2.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (“Kits“)	24
2.1.4. Zelllinien	24
2.1.5. Plasmide und Bakterienstämme	24
2.1.6. Antikörper	25
2.2. Zellbiologische Analysen	27
2.2.1. Zellkultur	27
2.2.2. Transfektion	28
2.2.3. Durchflusszytometrische Analyse	32
2.2.4. Proliferations-Assay	34
2.3. Proteinbiochemische Analysen	35
2.3.1. Proteinisolation	35
2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford	36
2.3.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)	36
2.3.4. Western-Blot-Analyse	38

2.4. Molekularbiologische Analysen	41
2.4.1. Transformation von E.coli-Zellen	41
2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA	42
2.4.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	42
3. Ergebnisse	44
3.1. Einbringen von DNA in Hodgkinzellen: Nukleofektion der cHL-Zelllinien L591 und L1236	45
3.1.1. Quantifizierung der Transfektionseffizienzen	46
3.1.2. Ergebnisse der Testung verschiedener Nukleofektionsbedingungen für die Zelllinie L591	47
3.1.3. Ergebnisse der Testung verschiedener Nukleofektionsbedingungen für die Zelllinie L1236	49
3.2. Etablierung von cHL-Zellen mit reduzierter STAT6-Expression	52
3.3. Effekt der Hemmung von STAT6 auf die Proliferation von cHL-Zellen	53
3.4. Effekt der Hemmung von STAT6 auf die STS- sowie CD95/Fas/Apo-vermittelte Apoptoseneigung in cHL-Zellen	55
3.5. Effekt der Hemmung von STAT6 auf die Expression von B-Zell-typischen Oberflächenmarkern in cHL-Zellen	60
3.6. Expression von STAT6 in den STAT6si-transfizierten cHL-Zellen	67
4. Diskussion	71
4.1. Die Methode der Nukleofektion ermöglicht die Transfektion der cHL-Zelllinien L591 und L1236	71
4.2. Die Bedeutung von STAT6 für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms	72
4.3. Ausblick	79
5. Zusammenfassung	81
6. Literaturverzeichnis	82
7. Anhang: Abkürzungsverzeichnis	105

1. Einleitung

Bei dem klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) handelt es sich um eine maligne hämatologische Erkrankung noch nicht vollständig geklärter Pathogenese. Eine Besonderheit dieser Erkrankung stellt die hohe Anzahl reaktiver, nicht-maligner Zellen im betroffenen Gewebe im Verhältnis zu einer kleinen Population von Tumorzellen dar, die Hodgkin- und Reed-Sternberg (H/RS)-Zellen (Drexler, 1992). Eine Vielzahl konkurrierender als auch überlappender Signalwege sind im cHL aktiviert und bedingen eine autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren sowie eine permanente Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die im Zusammenhang mit der zellulären Transformation stehen könnten (Garcia J *et al.*, 2003).

Die Aktivierung von STAT-Proteinen (*engl.: signal transducer and activator of transcription*) scheint eine bedeutsame Rolle sowohl für das Zellwachstum als auch die Differenzierung von bestimmten hämatopoetischen Zellen zu spielen und unter definierten Bedingungen Apoptose in aktivierten Zellen zu verhindern (Benekli *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2000). Für das STAT-Familienmitglied STAT6 konnte ebenso wie für STAT3 eine permanente Aktivierung im cHL gezeigt werden (Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b). Es existieren wenige Erkenntnisse über die Art und Weise, in der aktiviertes STAT6 in die Transformation von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen involviert ist.

Das Hodgkin-Lymphom gehört zu den am besten therapierbaren Malignomen des Erwachsenenalters. Auch in fortgeschrittenen Stadien sind Heilungen bei der Mehrzahl der Patienten möglich. Im Blickpunkt der behandelnden Ärzte stehen nicht mehr allein die erzielbaren Heilungsraten, sondern vermehrt auch die Vermeidung von Langzeittoxizitäten durch die Therapie. Ernsthafte Probleme stellen insbesondere das erhöhte kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko sowie das signifikant erhöhte Risiko für Zweitneoplasien nach erfolgter Therapie dar. Aus diesen Erkenntnissen heraus besteht die Notwendigkeit, neue und effizientere Strategien in der Therapie des Hodgkin-Lymphomes zu entwickeln mit möglichst höherer bis gleichwertiger Tumorwirksamkeit und geringerer Begleittoxizität. Die Erwartung an neue Behandlungsstrategien ist ein möglichst spezifischer Angriff auf die maligne Zelle und deren intrazelluläre Signaltransduktionswege. Grundlage für solche Therapien ist ein umfassendes Verständnis der Pathogenese der Tumorerkrankung, wozu diese Arbeit durch Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von STAT6 für das Hodgkin-Lymphom einen Beitrag leisten wollte.

1.1. Das Hodgkin-Lymphom

1.1.1. Klinik und Therapie

Das Hodgkin-Lymphom ist ein malignes Lymphom mit einer Inzidenz von 2-4 Neuerkrankungen/100 000 Einwohner/ Jahr in den Industrieländern. Männer erkranken etwas häufiger an dieser Neoplasie als Frauen bei einem ungefähren Verhältnis von 10:6. Generell kann diese Erkrankung in allen Lebensphasen auftreten, allerdings sind zwei Häufigkeitsgipfel der Erkrankung zu verzeichnen. Ein Häufigkeitsgipfel liegt im jungen Erwachsenenalter zwischen dem 20. bis 30. Lebensjahr, ein anderer im sechsten Lebensjahrzehnt. Verwendete synonyme Bezeichnungen dieser Erkrankung sind Morbus Hodgkin (MH) oder auch der früher verwendete Begriff Lymphogranulomatose (Possinger und Regierer, 2007). Bezogen auf die Gesamtheit aller Krebserkrankungen liegt der Anteil der Hodgkin-Lymphome bei etwa 0,4 Prozent. Die Erkrankung beginnt meist lokalisiert in einer einzelnen peripheren Lymphknotenregion und breitet sich dann lymphogen, später per continuitatem entlang der Lymphbahnen oder auch hämatogen aus. Bei Diagnosestellung sind in absteigender Häufigkeit bevorzugt zervikale, axilläre und infradiaphragmale Lymphknoten betroffen. Computertomographisch lässt sich häufig ein Befall retroperitonealer und mediastinaler Lymphknoten nachweisen. Neben der schmerzlosen, druckindolenten Lymphknotenschwellung derber Konsistenz stehen klinisch so genannte B-Symptome im Vordergrund. Unter einer B-Symptomatik versteht man soweit nicht anderweitig begründbar Fieber über 38 Grad Celsius, Gewichtsverlust von mehr als 10 Prozent des Körpergewichtes innerhalb der letzten sechs Monate sowie Nachtschweiß (Possinger und Regierer, 2007). Weitere charakteristische Symptome sind Leistungsminde- rung, Juckreiz, Schwäche, Appetitlosigkeit sowie selten aber charakteristisch durch Alkohol induzierte Schmerzen der befallenen Lymphknotenregion. Nicht selten findet man eine Ver- größerung von befallenen Organen wie Leber und Milz. Außerdem kann ein Befall des Gastrointestinaltraktes, des Knochens, der Lunge, des Rückenmarkes und des Gehirns vor- kommen (Classen *et al.*, 2004).

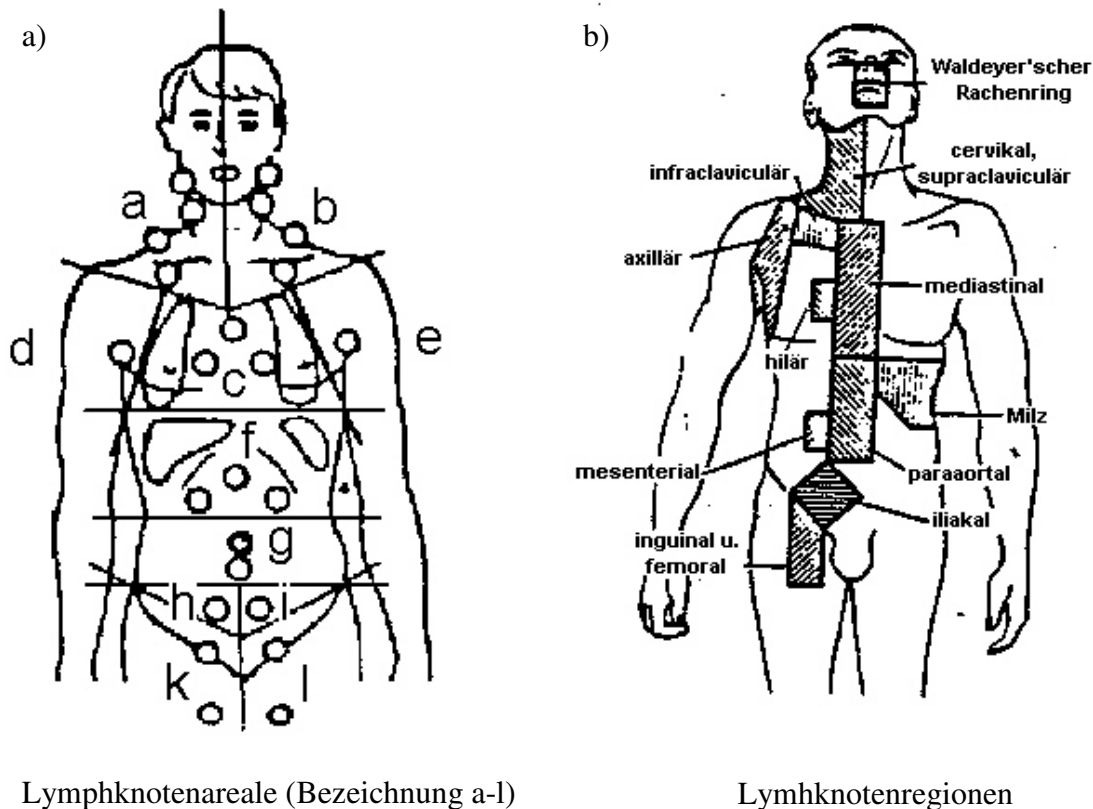
Zur Diagnosestellung ist die histologische Untersuchung eines vollständig entnommenen Lymphknotens wegweisend (Hoffbrand *et al.*, 1997).

Die Therapie selbst erfolgt stadienadaptiert. Eine gründliche klinische Untersuchung, bildge- bende Verfahren wie Sonographie und Computertomographie, eine Knochenmarksbiopsie sowie hämatologische und biochemisch- immunologische Laborparameter sind essentiell und

dienen der Abklärung des Ausbreitungsstadiums der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose (Diehl, 2002). Die gebräuchliche Stadieneinteilung erfolgt nach Ann-Arbor (s. [Tabelle 1](#)). Die Zusammenfassung in Risikogruppen nach Stadium der Lymphomausbreitung und Risikofaktoren erfolgt in internationalen Studiengruppen unterschiedlich. In der Deutschen Hodgkin-Lymphom-Studiengruppe (DHSG) hat sich eine therapierelevante Unterteilung in ein lokalisiertes (Stadium I/II ohne Risikofaktoren), intermediäres (Stadium I/II mit Risikofaktoren) sowie fortgeschrittenes Stadium (Stadium IIB mit Risikofaktoren, Stadium III, IV) bewährt (Diehl, 2002). Als Risikofaktoren gelten eine extranodale Tumorausbreitung, eine hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit, ein großer Mediastinaltumor oder mehr als drei befallene Lymphknotenareale (Classen *et al.*, 2004).

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation für nodale Lymphome (Quelle: Classen *et al.*, 2004, S. 758)

Stadium I.	Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I/N) oder Vorliegen eines einzigen lokalisierten extranodalen Herdes (I/E)
Stadium II.	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfelles (II/N) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfelles (II/E)
Stadium III.	Befall von Lymphknotenregionen ober- und unterhalb des Zwerchfelles (III/N) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen, so dass Herde auf beiden Seiten des Zwerchfells resultieren (III/E), eine Milzbeteiligung ist eingeschlossen, hat aber besondere Bedeutung (III/S)
Stadium IV.	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten
	A: ohne Allgemeinsymptome B: mit Fieber > 38,5° C u/o Nachtschweiß u/o unbeabsichtigter Verlust von >10% Körpergewicht in den letzten 6 Monaten E: extranodaler Befall (umschriebener Organbefall durch direktes Einwachsen aus einem beteiligten Lymphknoten oder in engem anatomischen Bezug) S: Milzbefall



Lymphknotenareale (Bezeichnung a-l)

Lymphknotenregionen

Abbildung 1: Einteilung des Lymphknotenbefalls beim Hodgkin-Lymphom (n. Deutsche Hodgkin-Lymphom-Studiengruppe, Leiter: Prof. Dr. V. Diehl, Universität Köln). a-l: Bezeichnung der Lymphknotenareale (Quelle: Possinger und Regierer, 2007, S. 405)

Grundsätzlich wird bei den verschiedenen Klassifikationen eine Unterscheidung zwischen der Anzahl der befallenen Lymphknotenregionen zur Bestimmung des Ausbreitungsstadiums der Erkrankung sowie der Anzahl der befallenen Lymphknotenareale zur Risikostratifizierung vorgenommen (s. [Abbildung 1](#)).

Bei der Therapie des Hodgkin-Lymphoms wird heute meist eine stadienabhängige Kombination aus Chemotherapie und gegebenenfalls nachfolgender Strahlentherapie eingesetzt. Die Art und Intensität der Behandlung erfolgt streng risikoadaptiert, eine Behandlung im Rahmen von Studienprotokollen sollte angestrebt werden. Zurzeit werden in Deutschland circa zwei Drittel aller Patienten, die an einem cHL erkranken, im Rahmen der Protokolle der Deutschen Hodgkin-Lymphom Studiengruppe (DHSG) mit Leitung in Köln therapiert (Diehl, 2002, S. 1762ff). In Hinblick auf die mögliche Toxizität der Behandlung sollten vor Beginn der Therapie ein Elektrokardiogramm, eine Echokardiographie, eine Lungenfunktionsprüfung und die Überprüfung der Leber- und Nierenfunktionswerte sowie der Schilddrüsenparameter erfolgen. Eine relevante Nebenwirkung der Therapie stellt bei den häufig jungen Patienten mit nicht

abgeschlossener Familienplanung eine mögliche Sterilität dar. Männern sollte bei Gefahr der Beeinträchtigung der Spermatogenese die Möglichkeit einer Spermakryokonservierung angeboten werden. Bei Frauen ist die Anwendung eines GnRH-Analogons zur Protektion der Ovarialfunktion zu diskutieren, aber in dieser Indikation noch nicht zugelassen (Possinger und Regierer, 2007). In anerkannten Therapieprotokollen wird die zeitliche Abfolge und Dosierung der Zytostatika festgelegt (s. Tabelle 2).

In Deutschland kommen vor allem das ABVD-Protokoll (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) nach Bonadonna (Bonadonna *et al.*, 1975) sowie das BEACOPP-Protokoll (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Prednison) in Form des Basisprotokolls oder in eskalierter Dosierung zur Anwendung (Diehl *et al.*, 2003). Insbesondere eine Chemotherapie nach dem BEACOPP-eskaliert-Protokoll geht mit einer deutlich erhöhten Hämatotoxizität einher und damit verbunden einem gesteigerten Infektionsrisiko. Eine intensivere Betreuung und die Fachkenntnis ausgewiesener Behandlungszentren sind für die Behandlung mit diesem Protokoll erforderlich. Im Anschluss an die Chemotherapie erfolgt zumeist die Bestrahlung (20-40 Gray) von Lymphknotenarealen mit klinisch manifestem Befall (Involved-field Radiotherapie). Im Fall von Rezidivkrankungen ergänzen gegebenenfalls intensive Chemotherapieprotokolle oder eine Hochdosis-Chemotherapie mit nachfolgender autologer Blutstammzelltransplantation die Therapieoptionen (Possinger und Regierer, 2007).

Tabelle 2: Standardtherapie (außerhalb von Studien) beim Morbus Hodgkin
(Quelle: nach Classen *et al.*, 2004, S. 759)

Lokalisierte Stadien (Gruppe 1) Stadium I/ II ohne Risikofaktoren	Abfolge von zwei bis vier Zyklen ABVD+ 30 Gy Involved-Field-Strahlentherapie
Intermediäre Stadien (Gruppe 2) Stadium I/ II mit Risikofaktoren	Abfolge von vier bis sechs Zyklen ABVD+ 30 Gy Involved-Field-Strahlentherapie
Fortgeschrittenes Stadium (Gruppe 3) Stadium IIB mit Risikofaktoren, Stadium III/ IV	Abfolge von acht Zyklen BEACOPP eskaliert oder acht Zyklen ABVD + Bestrahlung von Bulk- und/oder Resttumor

Das Hodgkin-Lymphom gehört zu den am besten therapierbaren Malignomen des Erwachsenenalters. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 84 Prozent, in frühen Stadien sind es sogar 90 Prozent. Auch in fortgeschrittenen Stadien sind Heilungen bei der Mehrzahl der Patienten möglich (Batzler *et al.*, 2008; Re *et al.*, 2005). Neben akuten und chronischen unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie wie Infertilität, Hämatotoxizität sowie kardialer und pulmonaler Toxizität werden diese Therapieerfolge allerdings durch das Risiko der bei Behandlungsbeginn durchschnittlich relativ jungen Patienten an Zweitneoplasien, vor allem an akuter myeloischer Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphomen, myelodysplastischem Syndrom und soliden Tumoren zu erkranken getrübt (Diehl, 2002). Das relative Risiko an einem zweiten Malignom zu versterben ist im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung sechsfach erhöht, in ähnlicher Größenordnung nimmt auch das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko zu. Das relative Risiko für Zweitmalignome ist umso höher, je jünger die Patienten zum Therapiezeitpunkt waren. Trotz exzellenter Heilungsraten unterstreichen diese Langzeitkomplikationen nach Radio- und Chemotherapie die Bedeutung von alternativen Therapiestrategien.

1.1.2. Pathologie und Klassifikation

Nach der Erstbeschreibung durch Thomas Hodgkin (Hodgkin, 1832) erfolgte eine detaillierte histologische Beschreibung durch Carl Sternberg (Sternberg, 1898) und Dorothy Reed (Reed, 1902). Normales Lymphgewebe ist durch abnorme Zellen, die einkernigen Hodgkin- und die mehrkernigen Reed-Sternberg-(H/RS)-Zellen, ersetzt. Eine Besonderheit unter den Lymphomen stellt die Tatsache dar, dass diese als Tumorzell-Population angenommenen Zellen nur einen geringen Anteil von 0,1-1 Prozent im infiltrierten Gewebe ausmachen (Bräuninger *et al.*, 2006; Drexler, 1992). Auffällig ist die hohe Anzahl reaktiver, nicht-maligner Zellen, darunter vor allem CD4 (*engl.: cluster of differentiation*)-positive Lymphozyten, B-Zellen, Plasmazellen, Neutrophile, Eosinophile und Histiozyten (Bräuninger *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2004). Dieses prägnante histologische Bild (s. [Abbildung 2](#)) steht mit einer vermehrt nachgewiesenen Zyto- und Chemokinexpression durch die H/RS-Zellen in Zusammenhang (Poppema, 1996) und impliziert einen möglichen Faktor für Tumorentstehung und Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps.

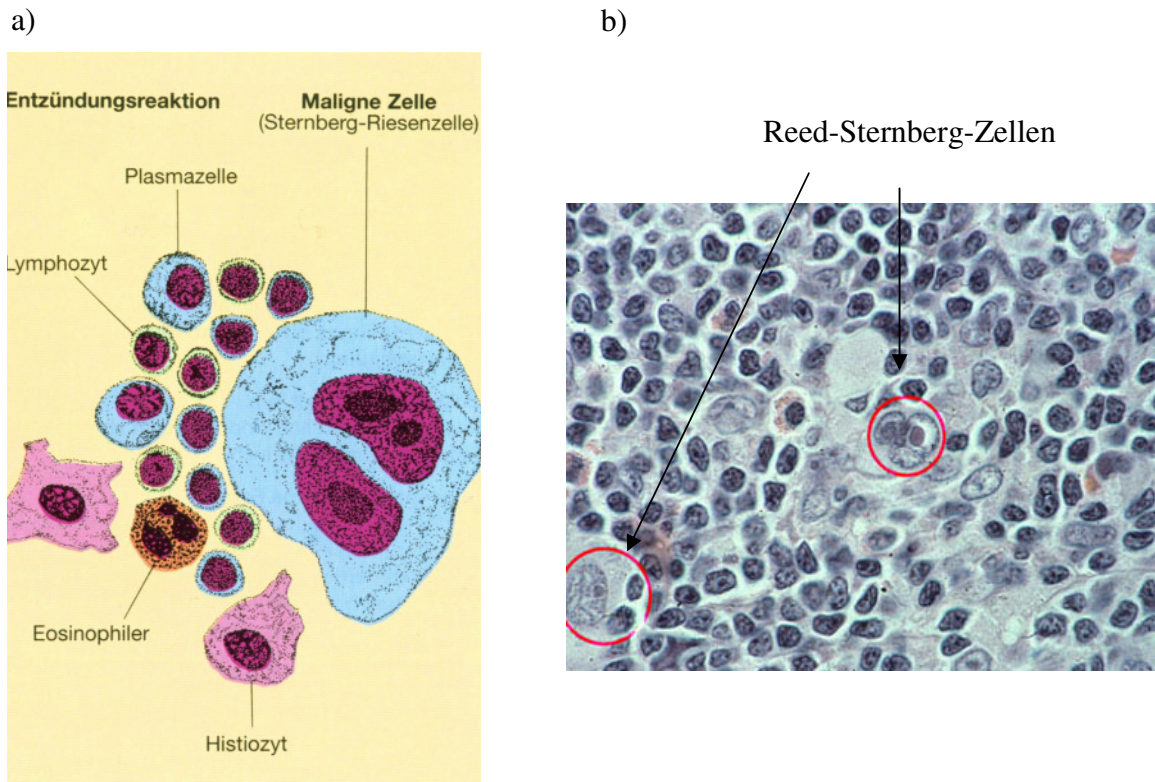


Abbildung 2: Histologie Hodgkin-Lymphom a) schematisch (Quelle: Hoffbrand *et al.*, 1997, S. 271), b) histologisches Bild von Reed-Sternberg-Zellen (Quelle: Classen *et al.*, 2004, S. 757)

Anhand des histologischen Schnittpräparates eines exstirpierten Lymphknotens erfolgt die Subtypisierung des cHL in vier histologische Unterklassen: nodulär-sklerosierend, gemischt-zellig, lymphozytenreich sowie lymphozytenarm (Jaffe *et al.*, 1999; WHO, 2003), dargestellt auch in Tabelle 3. Morphologische, zytochemische sowie immunologische Kriterien werden seit 1999 zur Einteilung nach der WHO-Klassifikation herangezogen (Harris *et al.*, 1994; WHO, 2003).

Das lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom (LPHL) stellt eine eigenständige Entität dar, da es sich morphologisch, immunphänotypisch und klinisch vom klassischen Hodgkin-Lymphom unterscheidet. Der histologische Typ beeinflusst den Krankheitsverlauf und insbesondere auch das Verhalten nach Rezidiven. Allerdings lassen verbesserte Therapiemöglichkeiten diesen Einfluss zunehmend in den Hintergrund treten.

Tabelle 3: WHO-Klassifikation der Hodgkin-Lymphome (Quelle: n. Classen *et al.*, 2004)**Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom (3-5%)****Klassisches Hodgkin-Lymphom (95-97%)**

mit den vier Subtypen:

1. Lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom (3%)
2. Klassisches Hodgkin-Lymphom vom nodulär-sklerosierenden Typ (82%)
3. Klassisches Hodgkin-Lymphom vom Mischtyp (14%)
4. Lymphozytenarmes klassisches Hodgkin-Lymphom (1%)

1.1.3. Pathogenese - klonale Identität, Immunphänotyp, Apoptoseresistenz, Epstein-Barr-Virus und Zytokine

Charakteristisch für die onkogen transformierten H/RS-Zellen ist ein Rearrangement und somatische Hypermutation von Immunglobulin-Genen, die einen Ursprung dieser malignen Zellen in Keimzentrums-B-Lymphozyten nahelegen (Bräuninger *et al.*, 2006; Kanzler *et al.*, 1996; Küppers und Rajewsky, 1998; Marafioti *et al.*, 2000). Der zelluläre Ursprung der H/RS-Zellen wurde aufgrund eines für B-Zellen ungewöhnlichen Immunphänotyps lange kontrovers diskutiert. Beim cHL besteht ein Defekt in der Aufrechterhaltung der B-Zell-typischen Genexpression in den H/RS-Zellen (Schwering *et al.*, 2003).

Die Nomenklatur von Zelloberflächenmarker erfolgt nach dem CD-System (*engl.: cluster of differentiation*), das die Marker in fortlaufender Reihenfolge nummeriert und von der World Health Organisation (WHO) zusammengestellt wurde. Ihre Identifikation erfolgte durch monoklonale Antikörper, die spezifisch einen bestimmten Oberflächenmarker binden.

Eine Vielzahl B-Zell-spezifischer Marker, darunter CD19, CD20, CD22 sowie der Leukozytenmarker CD45 oder Proteine des B-Zellrezeptors (CD79a und CD79b), sind im HL entweder gar nicht oder nur in einem kleinen Anteil der H/RS-Zellen exprimiert (Drexler, 1992; Falini *et al.*, 1996; Kuzu *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 2000). Zusätzlich findet man in H/RS-Zellen teilweise die Expression von Oberflächenmarkern anderen zellulären Ursprungs, darunter zelluläre Oberflächenmarker von dendritischen Zellen, Monozyten oder Makrophagen (Küppers, 2002). Im Gegensatz dazu bewahren die B-Zellen des Non-Hodgkin-Lymphoms die Expression typischer B-Zell-spezifischer Oberflächenmarker (Abelev, 2000; Greaves, 1986). Im Rahmen dieser Arbeit analysierte Oberflächenmarker sind mit ihrer näheren Charakterisierung und Expression in der Hodgkin-Zelllinie L428 in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelloberflächenmarker (Quelle: n. WHO, 2003)

CD Antigen	alternativer Name	zelluläre Expression	Expression in der Zelllinie L428	Funktion
CD19		B-Zellen	-	im Komplex mit CD21 und CD81, Ko-Rezeptor für B-Zellen
CD20		B-Zellen	-	mögliche Funktion in der Regulation der B-Zellaktivierung, Ko-Stimulation, Differenzierung
CD21	CR2	reife B-Zellen, folliculär-dendritische Zellen	-	Rezeptor für Komplement c3d, Epstein-Barr-Virus, Ko-Rezeptor für B-Zellen, assoziiert mit CD19 und CD81
CD22	BL-CAM	reife B-Zellen	-	bindet Sialkonjugate und CD75, B-Zelladhäsion
CD25	IL-2R α , Tac	aktivierte T-Zellen, regulatorische T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen	-	IL2-Rezeptor α -Kette
CD30	Ki-1	aktivierte T-, B- und NK-Zellen, Monozyten	+	bindet CD30L (CD153), Kreuzverbindung von CD30 erhöht Proliferation von B- und T-Zellen
CD40	CD154 Ligand	B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, basale Epithelzellen	+	bindet CD154 (CD40L), Rezeptor für kostimulatorisches Signal für B-Zellen, Anregung Wachstum, Differenzierung, Isotypenwechsel B-Zellen, Zytokin-Produktion durch Makrophagen und Dendritische Zellen
CD45	Leukocyte common antigen (LCA), T200, B220	alle hämatopoetischen Zellen	-	Tyrosin-Phosphatase, erhöhte signalisierung durch Rezeptor von B- und T-Zellen
CD54	ICAM-1	hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Zellen	+	intrazelluläres Adhäsionsmolekül, Rezeptor für Rhinovirus
CD95	Apo-1, Fas	Diverse Zellen	+	bindet TNF-ähnliche Fas Liganden (CD178), induziert Apoptose

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass einige für die B-Zell-Funktion entscheidende Transkriptionsfaktoren wie PU.1, *Octamer-binding transcription factor-2* (Oct-2) und *B-cell-specific coactivator OBF-1* (BOB-1) sowie der B-Zell-Rezeptor selbst in Primärgewebe sowie in kultivierten H/RS-Zellen runterreguliert sind (Re *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2001; Torlakovic *et al.*, 2001). B-Zellen mit einem Defekt im B-Zellrezeptor werden normalerweise durch Apoptose aussortiert. H/RS-Zellen exprimieren hingegen das antiapoptotische Protein c-Flip, einen Inhibitor der Fas-vermittelten Apoptose (Thomas *et al.*, 2004). Der für B-Zell-Differenzierung und Erhalt der B-Zell-Identität essentielle Transkriptionsfaktor *paired box protein 5* (Pax-5) ist in der Mehrzahl der Fälle in den H/RS-Zellen exprimiert (Foss *et al.*, 1999).

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Hodgkin-Lymphom-Tumorzellen ist eine Resistenz gegenüber proapoptotischen Stimuli. H/RS-Zellen weisen eine Resistenz sowohl gegenüber CD95/Fas/Apo-1-vermittelter (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Maggio *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2002) als auch Staurosporin (STS)-vermittelter Apoptose auf (Kashkar *et al.*, 2002; Kashkar *et al.*, 2003). Die Aktivierung von STAT-Proteinen beeinflusst die Transkription von Genen, die an der Regulation der Proliferation und Apoptose beteiligt sind. Diese Transkriptionsfaktoren könnten demzufolge eine bedeutsame Rolle bei der Inaktivierung apoptotischer Signalkaskaden spielen. Insbesondere das STAT-Familienmitglied STAT3 scheint eine zentrale Bedeutung als Regulator für die Proliferation und das Überleben von cHL-Zellen zu haben (Holtick *et al.*, 2005; Kube *et al.*, 2001). Für STAT3 konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression antiapoptotischer Proteine (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Survivin) und dem Überleben von Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten, unter anderem multiple Myelome und einige solide Tumoren, gezeigt werden (Burke *et al.*, 2001; Catlett-Falcone *et al.*, 1999).

Der CD95-Rezeptor (Fas, Apo-1) ist ein Mitglied der Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie. Durch Bindung des CD95-Liganden an den CD95-Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zum Zelltod durch Apoptose führt. Für die humane Myelom-Zelllinie U266 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition von STAT3 zu einer Sensitivierung gegenüber CD95/Fas/Apo-1-vermittelter Apoptose führt (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Maggio *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2002). Durch pharmakologische Hemmung von STAT3 mittels Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (AG17 und AG490) konnte eine Sensitivierung von H/RS-Zellen gegenüber CD95/Fas/Apo-1-vermittelter Apoptose gezeigt werden (Holtick *et al.*, 2005).

Der Proteinkinaseinhibitor Staurosporin (STS) ist prinzipiell über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und folgender Caspasenaktivierung in der Lage, Apoptose zu induzieren. In STS-behandelten cHL-Zellen bleibt allerdings die Cytochrom C-Freisetzung, Caspasen- und Bax-Aktivierung aus (Kashkar *et al.*, 2002) und bedingt eine Resistenz gegenüber STS-vermittelter Apoptose. Wie bereits für CD95-vermittelte Apoptose gezeigt, konnte für die pharmakologische Hemmung von STAT3 durch die Koinkubation der cHL-Zellen mit den Tyrosinkinaseinhibitoren AG17 oder AG490 sowie STS eine Sensitivierung gegenüber STS-vermittelter Apoptose bewiesen werden (Holtick *et al.*, 2005).

Immer wieder diskutiert wird eine infektiöse Genese des Hodgkin-Lymphoms, wobei die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) im Mittelpunkt des Interesses steht. Eine Vielzahl von malignen Tumorerkrankungen, darunter das Burkitt-Lymphom, das Nasopharyngeale Karzinom sowie das Hodgkin-Lymphom, wird mit einer EBV-Infektion assoziiert (Khanna und Burrows, 2000). In H/RS-Zellen konnte in 50 Prozent der Fälle EBV nachgewiesen werden (Herbst, 1996). Gestützt wird diese Theorie durch epidemiologische Daten. In einer Kohortenstudie konnte eine positive Assoziation zwischen der Infektiösen Mononukleose und dem EBV-positiven HL gezeigt werden (Hjalgrim *et al.*, 2003). Es besteht ein erhöhtes Risiko, nach einer serologisch durchgemachten Infektiösen Mononukleose ein Hodgkin-Lymphom zu entwickeln (Hjalgrim *et al.*, 2003; Miller und Beebe, 1974; Rosdahl *et al.*, 1974).

Das EB-Virus befällt insbesondere B-Zellen und kann über eine Expression von EBV-spezifischen Genen zu einer Immortalisierung von B-Zellen führen (Küppers *et al.*, 2005). Von besonderer Bedeutung für die Entstehung des malignen Phänotyps sind die latenten EBV-Membranproteine LMP-1 und LMP-2a anzusehen (Küppers, 2002), wobei die latente Expression von LMP-1 an der konstitutiven Aktivierung von *nuclear factor* (NF)- κ B beteiligt ist (Horie *et al.*, 2002).

Das auffällige histologische Bild des Morbus Hodgkin weist auf einen weiteren wichtigen Faktor hin, der mit der Pathogenese dieser malignen hämatologischen Erkrankung in Zusammenhang stehen könnte. Das cHL ist durch die Expression multipler Zytokine, darunter Interleukin (IL)-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, Lymphotoxin α , *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, *transforming growth factor* (TGF)- β , sowie Zytokinrezeptoren wie der IL-2-Rezeptor (IL-2R), IL-6R oder IL-13R charakterisiert (Gruss *et al.*, 1992; Skinnider und Mak, 2002). Die Interaktion der Zytokine mit ihren Zytokinrezeptoren führt zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden mit vielfachen Effekten auf die zelluläre Funktion.

Insgesamt liegen in H/RS-Zellen neben NF κ B weitere Signalwege permanent aktiviert vor, darunter cJun und JunB (Mathas *et al.*, 2002), AKT (Morrison *et al.*, 2004), MAP/ERK kinase (MEK)/ *extracellular signal-related kinase* (ERK) (Zheng *et al.*, 2003), *Neurogenic locus notch homolog protein 1* (NOTCH1) (Jundt *et al.*, 2002) sowie für diese Arbeit von besonderem Interesse der Jak (Januskinasen)/STAT-Signalweg (Cochet *et al.*, 2006; Holtick *et al.*, 2005; Kapp *et al.*, 1999; Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b).

Die Zytokinexpression steht nicht nur mit der Rekrutierung des charakteristischen Infiltrates des cHL in Zusammenhang, sondern weist auch auf einen möglichen Zusammenhang mit zellulären Prozessen wie der Proliferation der H/RS-Zellen hin.

Generell gilt, dass Zytokine und ihre Rezeptoren an der Kontrolle der Proliferation, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Zellen beteiligt sein könnten (Zubler, 1997). Zytokine sind von Zellen sezernierte Glykoproteine von etwa 25kDa und werden in die Familien der Interleukine, Interferone und Tumor-Nekrose-Faktoren unterteilt. Typischerweise entfalten Zytokine eine parakrine Wirkung auf umliegende Zellen oder wirken autokrin auf die Zelle zurück, die sie produziert hat. Eine Deregulation der Zytokin-oder Zytokinrezeptorexpression oder assoziierter Signalwege kann zur Proliferation und über auto- oder parakrine Stimulation zum Ausbleiben von Apoptose führen, ebenso wie zu einer Beeinflussung der Immunantwort (Foss *et al.*, 1993).

Die Familie der STAT-Proteine spielt eine entscheidende Rolle für die Signalkaskaden, die durch Zytokin-Rezeptor-Interaktion angestoßen werden (Bromberg und Darnell, 2000). Neben vielfältigen Rollen in physiologischen Zellprozessen wird ein Zusammenhang der STAT-Proteine mit der Transformation und Onkogenese von Zellen als gesichert angenommen. Ihr Beitrag zur Tumorgenese ist wohl eng mit Signalwegen der Wachstumsfaktoren, Apoptoseregulation und Angiogenese verknüpft. Eine Suppression von STAT-Signalwegen hat in einer wachsenden Anzahl von Fällen zu einem Untergang von Tumorzellen geführt (Bromberg, 2002).

1.2. Der Jak/STAT- Signaltransduktionsweg

1.2.1. Allgemeines

Bei den STAT-Molekülen handelt es sich um latente zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert werden können und an der Regulation biologischer sowie physiologischer Prozesse beteiligt sind (O`Shea *et al.*, 2002). Transkriptionelle Ziele der STAT-Moleküle sind in Zusammenhang mit der Zellproliferation, der Angiogenese und einer Apoptoseresistenz gebracht worden (Yu und Jove, 2004). Eine konstitutive STAT-Aktivierung konnte in der Vergangenheit neben dem Morbus Hodgkin (Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b) unter anderem auch für Akute Leukämien (Gouilleux *et al.*, 1996; Meydan *et al.*, 1996), das Multiple-Myelom (Catlett-Falcone *et al.*, 1999) sowie für einige weitere hämatologische und solide Tumoren (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002) gezeigt werden (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: STAT-Aktivierung in einer Auswahl von soliden und hämatologischen Malignomen (Quelle: n. Bromberg, 2002; Kube *et al.*, 2001; Yu und Jove, 2004)

Solide Malignome	STAT-Aktivierung
Mamma	1, 3
Ovar	3
Lunge	1, 3
Melanom	3
Pankreas	3
Prostata	3
Niere	3
Kopf-Hals-Tumoren	1, 3, 5
Hämatologische Malignome	STAT-Aktivierung
Multiples Myelom	1, 3
<i>Lymphome:</i>	
Burkitt-Lymphom	3
Mycosis fungoides	3
Kutanes T-Zell-Lymphom	3
Non-Hodgkin-Lymphom (NHL)	3
Hodgkin-Lymphom	3, 6
Akute myeloische Leukämie (AML)	1, 3, 5
Chronisch myeloische Leukämie (CML)	5
Erythrozytenleukämie	1, 5
Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)	1, 3

Eine Bindung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren als Liganden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt über verschiedene Zwischenschritte zu einer Tyrosinphosphorylierung der STAT-Moleküle. Die einzelnen Schritte sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt:

Bei Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK), die die Aktivierung von STAT-Molekülen vermitteln, handelt es sich um Mitglieder der Janus-Kinasen-(Jak)-Familie. Die Bindung des Liganden an den extrazellulären Teil des Receptors (Schritt A) führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und damit zu einer Aktivierung von assoziierten Jaks, die zuerst sich selbst und dann den Rezeptor phosphoryliert und eine Andockstelle für STAT-Moleküle erzeugt (Schritt B). Die an die Andockstelle bindenden STAT-Moleküle werden ebenfalls phosphoryliert (Schritt C). Diese Phosphorylierung bedingt eine Homo-oder Heterodimerbildung der STAT-Moleküle mit darauf folgender Translokation in den Nukleus (Schritt D). Dort binden die STAT-Moleküle an definierte DNA-Elemente in der Promotorregion von Zielgenen und aktivieren so deren Transkription (Schritt E) (Bromberg, 2002; Levy und Darnell, 2002; Kisseleva *et al.*, 2002).

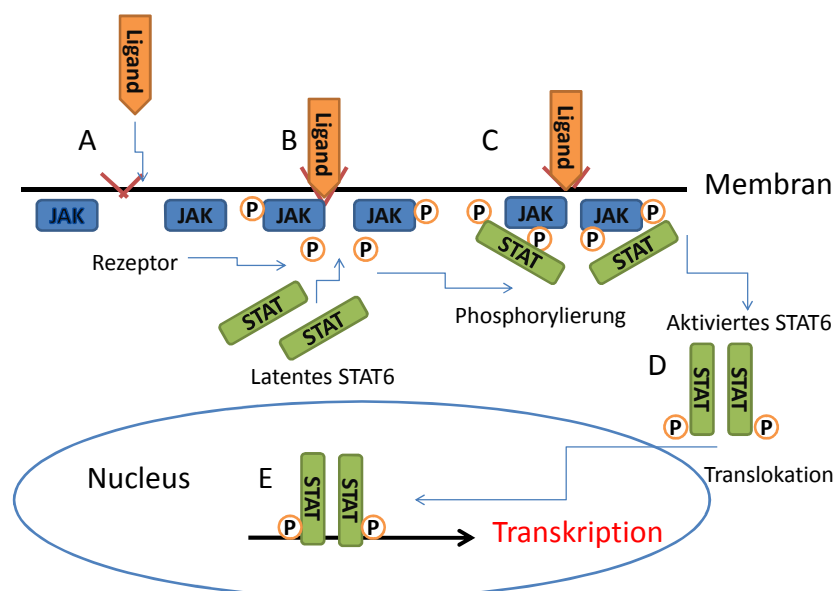


Abbildung 3: Darstellung des Jak/ STAT-Signalweges (Quelle: n. Bromberg *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 2002; Kisseleva *et al.*, 2002). Schematische Darstellung der Hauptkomponenten des Jak/ STAT-Signalweges und der sukzessiven intrazellulären Aktivierungsschritte nach Bindung des Liganden an den Rezeptor (Schritte A-E, im Text erläutert)

1.2.2. Die Rolle von STAT3 bei malignen Erkrankungen

Für STAT3 konnte eine konstitutive Aktivierung sowohl für das cHL als auch für einige solide und hämatologische Malignome (Burke *et al.*, 2001; Bromberg, 2002; Kube *et al.*, 2001; Sriuranpong *et al.*, 2003; Yu und Jove, 2004) nachgewiesen werden.

STAT3 spielt eine Rolle bei fundamentalen zellulären Prozessen, die in Zusammenhang mit der malignen Transformation beim cHL gebracht werden (Chen *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2001; Skinnider, 2002 b). Viele proliferative und antiapoptotische Signale werden über diesen Transkriptionsfaktor vermittelt (Darnell, 1997; Fukada *et al.*, 1998). Für STAT3 konnte eine Aktivierung durch IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, Leptin und EGF gezeigt werden.

Die Frage, welche Faktoren zu der Deregulation der Jak/STAT-Signalwege im cHL führen, konnte noch nicht abschließend geklärt werden.

In manchen Tumorentitäten wie dem Multiplen Myelom ist eine konstitutive Aktivierung von Jak/STAT-Molekülen das Ergebnis einer autokrinen oder parakrinen Stimulierung durch entsprechende Zytokine (Heinrich *et al.*, 1998). Die Expression der α -Kette des IL-6-Rezeptors gp80 konnte sowohl für Primärzellen des HL als auch für HL-Zelllinien gezeigt werden (Heinrich *et al.*, 1998; Hibi *et al.*, 1996). Von IL-6 ist bekannt, dass es in der Lage ist über Jak-Kinasen Mitglieder der STAT-Familie zu aktivieren (Lütticken *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994; Darnell, 1997). Durch Antikörper vermittelte Neutralisation von IL-6 oder des IL-6-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass beim cHL die STAT-Aktivierung von endogenem IL6 unabhängig ist (Kube *et al.*, 2001).

Als ein entscheidendes Prinzip zur Erforschung des Einflusses von STAT3 auf das unkontrollierte Wachstum und den onkogenen Phänotyp der cHL-Tumorzellen hat sich die Möglichkeit der Suppression dieses Signalweges herausgestellt. Eine Inhibition von STAT3 kann durch unterschiedliche Methoden wie pharmakologische Inhibitoren, dominant-negative Konstrukte oder Antisense/siRNA-Moleküle erreicht werden.

Pharmakologisch bedeutsam zeigt sich die Gruppe der Tyrphostine, eine neuere Klasse von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, darunter AG490 und AG17, mit Einfluss auf die Phosphorylierung von Jak2- und STAT3. Für das cHL, aber auch für das kutane T-Zell-Lymphom, Akute Leukämien und die Zelllinie U266 des Multiplen Myeloms konnte eine Blockade der STAT-Aktivierung durch AG490 gezeigt werden (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Kube *et al.*, 2001; Meydan *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997; Bromberg *et al.*, 1999). Die konstitutive STAT3-Aktivierung konnte ebenso wie die Proliferation der HL-Zelllinie L428 *in vitro* durch eine Behandlung der HL-Zellen mit dem Tyrphostin AG490 inhibiert werden.

Bei AG17 handelt es sich ebenfalls um einen Tyrosin-Kinase-Inhibitor mit Einfluss auf das Proliferationsverhalten und den Grad der STAT3-Phosphorylierung der Zellen. Außerdem führt AG17 zu einem Zell-Zyklus-Arrest und sensitiviert die HL-Zellen für CD95/FAS-Apo-1 oder Staurosporin vermittelte Apoptose (Holtick *et al.*, 2005).

Die Wirksamkeit der Tyrphostine wie AG490 und AG17 stützt die These eines bedeutsamen Einflusses von STAT3 auf das unkontrollierte Wachstum und den onkogenen Phänotyp der Tumorzellen. Die konstitutive STAT3-Aktivierung bedingt anscheinend eine Akkumulation der Tumorzellen. Außerdem vermittelt die konstitutive Aktivierung von STAT3 eine Resistenz gegenüber konventionellen Therapien, die sich eines proapoptischen Mechanismus zur Tumorzellelimination bedienen. Ergänzend zu den pharmakologischen Beeinflussungsmöglichkeiten ließ sich die entscheidende Bedeutung von STAT 3 für das Tumorstadium durch den Einsatz von dominant-negativen Konstrukten oder Antisense/siRNA-Molekülen *in vitro* sowie im Mausmodell zeigen (Alas und Bonavida, 2003; Amin *et al.*, 2004; Bharti *et al.*, 2003; Blaskovich *et al.*, 2003; Burke *et al.*, 2001; Garcia R *et al.*, 2001; Holtick *et al.*, 2005; Kube *et al.*, 2001; Nagel-Wolfrum *et al.*, 2004; Niu *et al.*, 1999).

1.2.3. Die Rolle von STAT6 im Hodgkin-Lymphom

In Veröffentlichungen konnte bislang gezeigt werden, dass eine STAT6-Defizienz mit einer verbesserten Immunität gegenüber Tumoren vergesellschaftet ist (Terabe *et al.*, 2000).

Für das STAT-Familienmitglied STAT6 konnte ebenso wie für STAT3 eine permanente Aktivierung für das cHL gezeigt werden (Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b). Anders als für STAT3 findet man diese Aktivierung nicht bei Non-Hodgkin-Lymphomen oder in normalem lymphatischem Gewebe. Eine permanente Aktivierung von STAT6 konnte außerdem für die mit dem Humanen T-Zell-lymphotropen-Virus (HTLV) assoziierte T-Zell-Leukämie sowie für p190^{bcr-abl} assoziierte Leukämien gezeigt werden (Wurster *et al.*, 2000).

STAT6 spielt eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunabwehr, unter anderem bei der Polarisierung naiver Th-Zellen zu Th2-Zellen sowie beim Klassenwechsel zum IgE-Isotyp der Immunglobuline (Kaplan *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996). Für STAT6 konnte eine entscheidende Funktion in der IL-4 vermittelten B- und T-Zell-Proliferation aufgezeigt werden (Shimoda *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1996).

Von STAT6 ist eine Aktivierung durch die Zytokine IL-4 und IL-13 bekannt. STAT6-defiziente Mäuse zeigen eine fehlende Antwort auf eine Stimulation mit diesen Zytokinen (Wurster *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001). Bei IL-13 handelt es sich um ein Th2-Zytokin mit einer wichtigen Funktion in der humoralen Immunabwehr (Zurawski und De Vries, 1994) und immunmodulierenden und antiinflammatorischen Funktionen durch direkte Interaktion mit B-Zellen und Makrophagen (Defrance *et al.*, 1994; De Waal Malefyt *et al.*, 1993; Lomo *et al.*, 1997; Mc Kenzie *et al.*, 1993; Minty *et al.*, 1993). IL-13 ist in der Lage die Freisetzung von Chemokinen wie unter anderem *macrophage-derived chemokine* (MDC) von Makrophagen und Eotaxin von Fibroblasten zu stimulieren und so die Th2-Immunantwort zu unterstützen (Andrew *et al.*, 1998; Bonecchi *et al.*, 1998; Hoeck und Woisetschlager, 2001).

Die Expression von IL-13 sowohl als auch IL-13R konnte für die H/RS-Zellen im cHL gezeigt werden (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001). Sie stellen einen möglichen autokrinen Stimulus dar, der mit der STAT6-Aktivierung und der cHL-Pathogenese in Zusammenhang gebracht werden kann (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 a). Es konnte eine Abnahme des Levels von aktiviertem STAT6 durch IL-13 neutralisierende Antikörper gezeigt werden (Wurster *et al.*, 2000). Eine Inhibition der IL-13-vermittelten Signalkaskaden durch neutralisierende Antikörper löst Apoptose in einigen cHL-Zelllinien aus (Trieu *et al.*, 2004). Eine Aktivierung des IL13-R führt letztlich zu einer Aktivierung von JAK1 und zu einer Phosphorylierung von STAT6. Diskutiert wird auch ein Zusammenhang zwischen der Entstehung und Aufrechterhaltung des charakterischen reaktiven Infiltrates im HL und einer parakrinen Wirkung von IL-13, entweder durch die IL-13-vermittelte Freisetzung von Chemokinen von H/RS-Zellen oder durch direkte Wirkung von IL-13 auf IL-13-Rezeptor-exprimierende Zellen, vor allem Makrophagen und B-Zellen (Skinnider *et al.*, 2001). Hingegen wird IL-4 im cHL nicht konstant exprimiert (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001) und scheint anders als IL-13 damit keinen Einfluss auf die permanente Aktivierung von STAT6 im cHL zu haben.

In Anbetracht der bisherigen Erkenntnisse ergeben sich Hinweise für einen möglichen entscheidenden Zusammenhang von einer permanenten STAT6-Aktivierung mit der Pathogenese des cHL. STAT6 scheint insbesondere in Bezug auf die Rolle von Zytokinen wie IL-13 bei der Entstehung des pathognomischen reaktiven Infiltrates eine wichtige Funktion zuzukommen. Die genaue Bedeutung von STAT6 für die Pathogenese des cHL ist allerdings nur unzureichend geklärt und deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.3. Das Prinzip der RNA-Interferenz

Bei der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine Technologie der posttranskriptionellen Genregulation, die es ermöglicht die Funktion von Proteinen und Genen zu untersuchen. Doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) modifizieren die Expression einzelner Gene im Wesentlichen durch Degradierung der mRNA des Zielgenes (Elbashir *et al.*, 2001). Prinzipiell könnte die Expression jedes beliebigen zellulären Gens über spezifische siRNAs verringert werden. Die resultierende Verringerung der Genprodukte eröffnet die Möglichkeit, physiologischen Funktion des Gens verstehen zu lernen. Das RNAi-Verfahren zur Untersuchung verschiedener Genfunktionen wird bislang bei Säugetierzellen hauptsächlich in der Zellkultur genutzt, auch wenn bereits eine erfolgreiche in-vivo-Anwendung durchgeführt werden konnte (Soutschek *et al.*, 2004). Fernziel bleibt der therapeutische Nutzen für den Menschen.

Entdeckt wurde das Prinzip der RNAi erstmals von Andrew Fire und Craig Mello als physiologisch vorkommende Form der sequenzspezifischen Inhibition der Genexpression im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Fire *et al.*, 1998). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass RNAi-Effekte in vielen eukaryontischen Organismen existieren (Hannon, 2002).

Nach Aufnahme der doppelsträngigen RNA von der Zelle prozessiert das Enzym Dicer, eine Typ-III-Ribonuclease, aus längeren dsRNA-Strängen eine small interfering RNA (siRNA) bestehend aus 21 bis 28 Nucleotiden (Elbashir *et al.*, 2001; Zamore *et al.*, 2000). Aus der Verbindung der beiden Stränge der siRNA mit Proteinen entsteht ein Ribonuclein-Komplex, der so genannte RNA-induzierte Silencing-Komplex (RISC), der wiederum komplementäre mRNA oder DNA binden und degradieren kann (Sharp, 2001; Tijsterman und Plasterk, 2004; Zamore *et al.*, 2000).

Eine Besonderheit bei der Anwendung des RNA-Interferenz bei Säugetierzellen ist die Tatsache, dass die Gabe von dsRNA mit mehr als 30 Nucleotiden anders als bei dem Nematoden *C. elegans* eine unspezifische Interferonantwort auslöst, wodurch ein RNAi-Effekt verhindert wird. Eine direkte Transfektion von siRNA löst hingegen keine Interferonantwort aus. Nachteil der Methode ist aber, dass die Expression der Zielgene nur vorübergehend abgeschaltet wird (Elbashir *et al.*, 2001). Die stabile, anhaltende Suppression eines Gens durch RNA-Interferenz wird durch die Transfektion mit Vektoren möglich, die nach Transkription in der Zelle siRNA freisetzen können (siRNA-Expressions-Kassetten).

Eine Möglichkeit ist die Verwendung der so genannten *short hairpin* RNA (shRNA). Vektorvermittelt kommt es in der Zelle zur Expression der kurzen shRNA, einer haarnadelförmigen doppelsträngigen RNA, die von dem Enzym Dicer zu einer siRNA umgesetzt wird (Brummelkamp *et al.*, 2002; Hannon, 2002; Paddison *et al.*, 2002). Selektionsmarker wie Antibiotikaresistenzen auf dem Plasmid ermöglichen die Selektionierung transfizierter Zellen. Für die vorliegende Arbeit wurde das Prinzip der RNA-Interferenz mittels shRNA genutzt, um eine Suppression von STAT6 in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms zu erreichen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Bedeutung von STAT6 für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms ist nur unzureichend geklärt und soll deshalb Gegenstand dieser Arbeit sein. Verschiedene Hodgkin-Zelllinien dienen als Modell, an dem Faktoren definiert werden können, die den transformierten Phänotyp aufrechterhalten (Küppers *et al.*, 1996; Vockerodt *et al.*, 1998; Vockerodt *et al.*, 2002). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es neue Erkenntnisse über die Rolle von STAT6 beim Morbus Hodgkin zu erlangen. Hierbei sollte an Zelllinien vor allem der Einfluss der konstitutiven Aktivierung von STAT6 auf die Zellverdopplungszeiten von Tumorzellen, den B-Phänotyp und die Regulation der Apoptose untersucht werden.

Die Aufgabenstellungen, die im Verlauf der Arbeit untersucht werden sollen, gliedern sich in einen ersten methodischen Teil zum „knockdown“ der STAT6 Expression sowie daran anknüpfend Analysen STAT6 abhängigen Zellverdopplungszeiten, möglichen Veränderungen der Apoptoseresistenz von Hodgkin-Lymphomzellen sowie zur Expression von B-Zelltypischen Zelloberflächenmarkern.

Insgesamt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag zu der Klärung der Frage leisten, ob die Inhibition von STAT6 in Zukunft eine neue Option in der Therapie des Hodgkin-Lymphoms darstellen könnte. Die Erwartung an neue Behandlungsstrategien ist ein möglichst spezifischer Angriff auf die maligne Zelle und intrazelluläre Signaltransduktionswege. Trotz exzellenter Heilungsraten unterstreichen Langzeitkomplikationen wie ein erhöhtes kardiovaskuläres Mortalitätsrisiko sowie eine signifikant erhöhte Rate an Zweitmalignomen nach Radio- und Chemotherapie die Bedeutung von alternativen Therapiestrategien.

Folgende Aufgaben sollen im Einzelnen bearbeitet werden:

- Mit den herkömmlichen Transfektionsmethoden sind die meisten Hodgkin-Zelllinien nur unzureichend transfizierbar. Mit Hilfe der Methode der Nukleofektion soll geklärt werden, ob mit dieser nichtviralen Methode des Gentransfers ein Einbringen von DNA in Hodgkin-Lymphomzellen ermöglicht wird, um die nachfolgenden Aufgaben zu lösen.
 - Folgende Fragen sollen untersucht werden:
 - Bietet die Methode der Nukleofektion eine praktikable Möglichkeit der Transfektion der Hodgkin-Zelllinien L1236 und L591?*
 - Welche der untersuchten Nukleofektionsbedingungen ist für die analysierten Zelllinien geeignet?*

- Im Anschluss soll mittels der Methode der RNA-Interferenz die Expression des Transkriptionsfaktors STAT6 in Hodgkin-Zelllinien reduziert werden. Um eine Möglichkeit zu schaffen gezielt die Funktion von STAT6 in Hodgkin-Zelllinien zu untersuchen, soll mittels der Nukleofektion von shRNA gegen STAT6 der Versuch unternommen werden, Hodgkin-Zellen mit stark reduzierter STAT6-Expression zu etablieren. Diese Zellen sollen in den anschließenden Funktionsanalysen als Modell dienen, an dem die funktionelle Rolle von STAT6 in den transformierten Zellen untersucht werden kann.
 - Im Einzelnen sollen folgende Fragen analysiert werden:
 - Welchen Effekt hat fehlendes STAT6 auf die Zellverdopplung als Maß der Zellproliferation?*
 - Führt eine reduzierte STAT6-Expression in Hodgkin-Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber Staurosporin-oder CD95-vermittelten Apoptose?*
 - Hat die reduzierte STAT6-Expression einen Einfluss auf die beschriebene fehlende B-Zellidentität der cHL-Zellen?*

2. Material und Methoden

Nachstehend (Kapitel 2.1.1. sowie 2.1.2.) sind im Materialteil alle regelmäßig verwendeten Geräte, Chemikalien und deren Hersteller aufgeführt. Artikel des täglichen Laborbedarfs wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen, Röntgenfilme, Sterilfilter, etc. wurden von den Firmen GE Healthcare (München), Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Der Methodenteil gliedert sich in zellbiologische Analysen (Kapitel 2.2.), proteinbiochemische Analysen (Kapitel 2.3.) sowie molekularbiologische Analysen (Kapitel 2.4.).

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Biofuge Pico	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Casy® cell counter	Schärfe-System, Reutlingen
Consort E734 Power Supply	Schütt Labortechnik, Göttingen
Elektrophoreseeinheit	BioRad, München
Elektroporationsgerät Easyject	Geneflow Ltd, Staffordshire, UK
FACScan Gerät	Becton Dickinson, Heidelberg
Hera-Freez -80°C Kühleinheit	Heraeus Instruments, Hanau
Inverses Durchlichtmikroskop (Telaval 31)	Zeiss, Jena
Inverses Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM IL)	Leica, Wetzlar
Microflow Laminar Downflow Workstation	Bioquell, Andover, UK
Multifuge 3 L-R	Heraeus Instruments, Hanau
Nukleoporator	Amaxa, Köln
Power-Pac 300 Power Supply	BioRad, München
Tischzentrifuge 1-15k	Sigma, Osterode
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

Ultra Low -152 °C Kühleinheit	Sanyo, Gunma, Japan
Ultraschallbad Branosonic 220	Lab Extreme Inc, Kent City, USA
UV-Spektrometer	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Schütt Labortechnik, Göttingen
Wasserbad	Kötterman Labortechnik, Hänigsen

2.1.2. Chemikalien

Zellkultur:

RPMI -1640 Medium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamine, 200 U/ml	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Penicillin G	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Geneticin (G418)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
HEPES-Puffer 1M (pH 7,4)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Phosphate Buffered Saline (PBS Dulbecco`s)	Invitrogen Corporation, UK

Chemikalien:

Acrylamid/Bisacrylamid 40%	BioRad, München
Actinomycin D	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bradford- Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Serva, Heidelberg
BSA (Zellkultur, getestet)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Complete Mini	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant-Blue G250	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
ECL- Reagenz	Amersham, Little Chalfont, UK

Ethanol (96%)	Baker, Desenter, Holland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Geneticin	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	BioRad, München
Membrane Blocking Agent	GE Healthcare, München
Methanol (100% (p.a.))	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
PMFS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-Standard für SDS-PAGE	GE Healthcare, München
Propidiumjodid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
RPMI-1640 Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Re-Blot-Plus Mild	Chemicon International, Hofheim
Roti-Load 4×Probenpuffer	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
TrisBase	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) 1M	Paesel+Lorei, Hanau

Trypton	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
100bp DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
1kbp DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme (“Kits“)

Cell-Line Nucleofector™ Kit:	Amaxa, Köln
ECL™-Western-Blotting Reagenz	GE Healthcare, München
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4. Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Zelllinien verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellursprung	Referenz
L1236	B-Zelle, Hodgkin-Lymphom	Wolf <i>et al.</i> , 1996
L591	B-Zelle, Hodgkin-Lymphom	Diehl <i>et al.</i> , 1982
L428	B-Zelle, Hodgkin-Lymphom	Schaadt <i>et al.</i> , 1979

2.1.5. Plasmide und Bakterienstämme

Zur Transformation der Plasmide, die in Tabelle 7 aufgeführt sind, wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F'proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r))) aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe verwendet. Alle verwendeten Vektoren wurden nach Anweisung des Herstellers (ABI/Applied Biosystems, Wei-

terstadt) mit dem Primer M13rev sequenziert. Die Oligonukleotide für die Klonierungen und die Sequenzierungen wurden vom IBA, Göttingen bezogen.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Vektor	Bezugsquelle
pSUPERneo	OligoEngine, Seattle, WA, USA
pSUPERneoSTAT6si	Eco RI / Hind III- Fragment des Vektors pSUPERneoSTAT6si, der eine STAT6-spezifische Oligonukleotid-Sequenz enthält in den Vektor pSUPERneo: (GATCCcatggcgcaccgtttgaggatTCAAGAGAtcctcaaacggtgcgccatttttgaaaA).

2.1.6. Antikörper

Die Primär- und Sekundärantikörper für die Proteindetektion im Immunoblot sowie die Antikörper zur Analyse zellbiologischer Parameter, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, sind in den Tabellen 8-10 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die Proteindetektion im Immunoblot

Antikörper	Verdünnung	Spezifität	Bezugsquelle
STAT6	1:1000	Monoklonaler Antikörper (Maus)	BD Transduction Laboratories, Lexington, UK
Aktin	1:5000	Monoklonaler Antikörper (Maus)	Chemicon International, Hofheim
Maus-HRP	1:2000	Polyklonaler Antikörper (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die Anwendung in der Zellkultur (Analyse der Zelloberflächenmarker)

Antigen	Spezifität	Bezugsquelle
Isotyp-Kontrolle PE/FITC	monoklonal Maus IgG	Diaclone, Gießen
CD20-FITC	monoklonal Maus IgG	Becton Dickinson, Heidelberg
CD21-FITC	monoklonal Maus IgG	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD40-FITC	monoklonal Maus IgG	Serotec, Düsseldorf
CD45-FITC	monoklonal Maus IgG	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD95-FITC	monoklonal Maus IgG	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD19-PE	monoklonal Maus IgG	Becton Dickinson, Heidelberg
CD22-PE	monoklonal Maus IgG	Becton Dickinson, Heidelberg
CD25-PE	monoklonal Maus IgG	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD30-PE	monoklonal Maus IgG	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD54-PE	monoklonal Maus IgG	Serotec, Düsseldorf

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die Anwendung in der Zellkultur (Apoptose-Assay)

Antikörper	Konjugat	Bezugsquelle
α -CD95	PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Annexin V	FITC	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

2.2. Zellbiologische Analysen

2.2.1. Zellkultur

Durchführung:

a) Kultivierung von Suspensionszellen:

Die verwendeten cHL-Zelllinien (L428, L591, L1236) wurden in RPMI-1640 Medium, dem 50 U/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und zusätzlich 10% fötales Kälber-Serum zugesetzt wurde, steril bei 37°C in 5%CO₂-haltige Atmosphäre kultiviert. Je nach Zelldichte fanden 25cm²-, 75 cm², oder 175 cm²-Zellkulturflaschen mit Belüftungsklappe Verwendung. Die Dichte der Zellen lag zwischen 3×10⁵- 5×10⁵ Zellen/ml. Die Häufigkeit des Wechsels des Nährmediums variierte nach der Proliferationsrate und der Stoffwechsellaktivität der jeweiligen Zelllinie.

b) Zellzahlbestimmung:

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Von der Zellsuspension wurden 10 µl 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt und 10 µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Bei bekanntem Volumen der Zählkammer ermöglicht das System die Bestimmung der Zellzahl pro ml. Das Auszählen der Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Mikroskops. Die Zellmembran toter Zellen ist im Gegensatz zu der der lebenden Zellen für den Farbstoff Trypanblau permeabel. Eine Färbung der Zellen mit Trypanblau ermöglichte dementsprechend die Unterscheidung lebender von toten Zellen.

c) Kryokonservierung und Auftauen von Zellen:

Für die Kryokonservierung wurden ca. 5×10⁶ Zellen (in gutem Allgemeinzustand und in der logarithmischen Wachstumsphase) bei 4°C und 750rpm für 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und in 1,5ml Einfriermedium bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrier Röhrchen überführt und in einer Einfrierbox für 24h bei -80°C eingefroren. Das in der Einfrierbox enthaltene Isopropanol ermöglichte das Abkühlen der Zellsuspension um 1°C pro Minute und verhinderte zusammen mit dem im Einfriermedium enthaltenem DMSO eine Zerstörung der Zelle durch zu schnelle Eiskristallbildung. Die Langzeitlagerung erfolgte dann bei -150°C.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Zellen in ein Wasserbad bei 37° gestellt. Im Anschluss erfolgte ein Waschriff zur Verhinderung zytotoxischer Schritte durch das DMSO. Dafür wurde die Zellsuspension in 10ml Zellkulturmedium überführt und 5 min bei 750rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zur weiteren Kultivierung in einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

d) Etablierung von Zellklonen:

Nach der Transfektion mit dem Vektor pSUPERneoSTAT6si oder pSUPERneo wurden die cHL-Zellen in RPMI 1640 komplett kultiviert, dem 1 mg/ml Geneticin (G418) zugefügt wurde. Die Antibiotikaresistenz diente dabei als Selektionsmarker, um transfizierte Zellen von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden.

2.2.2. Transfektion

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Standardtechnik der Molekularbiologie zur Einschleusung von heterologer DNA in eukaryontische Zellen.

Entwickelt wurde die Methode der Transfektion von McCutchan und Pagano, die mit Diethylaminoethyl transfizierten (1968), gefolgt von Arbeiten mit der Calcium-Phosphat-Technik (Graham und van der Eb, 1973), einer immer noch weit verbreiteten Methode. Häufig angewandte Techniken der Transfektion beruhen auf mechanischen, elektrischen oder chemischen Methoden, wovon einige in Tabelle 11 aufgelistet sind.

Tabelle 11: Übersicht wichtiger Transfektionsmethoden

Chemisch	Physikalisch
Lipofektion (Felgner <i>et al.</i> , 1987)	Elektroporation/ Nukleofektion (Neumann <i>et al.</i> , 1982)
Calcium-Phosphat (Graham und van der Eb, 1973)	Mikroinjektion (Cappecci, 1980)
DEAE-Dextran (McCutchan und Pagano, 1968)	Ballistik
	Druck

Für lymphatische Zellen erwiesen sich allerdings die physikalischen Transfektionsmethoden der Elektroporation und Nukleofektion als effizient (Andreason, 1993; Fouillard, 1996; Lurquin, 1997), während mildere Methoden keine Erfolge erbrachten.

Die Effizienz der Transfektion wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst (s. [Tabelle 12](#)), die sowohl für die Elektroporation als auch für die Nukleofektion gelten. Um maximale Transfektionseffizienzen zu erreichen müssen alle diese Parameter für den jeweiligen Zelltyp optimal eingestellt werden.

Grundsätzlich unterscheidet man eine transiente Expression von einer stabilen Expression der Gene in der Zielzelle. Bei der stabilen Transfektion wird ein Teil der transfizierten DNA in das Genom eingebaut, das fremde Gen kann anhaltend transkribiert und translatiert und so in ein Protein übersetzt werden. Bei der transienten Transfektion findet eine Expression der fremden DNA nur zeitlich begrenzt statt.

Tabelle 12: Parameter, die die Effizienz der Elektroporation maßgeblich beeinflussen

Faktoren	Beeinflussungsmöglichkeit
Einstellung Elektroporator	Stärke des elektrischen Feldes
	Dauer des elektrischen Impulses
Temperatur	vor/nach Puls
Elektroporationsmedium	Zusammensetzung
DNA	Qualität (Endotoxingehalt/ Reinheit)
	Konzentration

Durchführung:

a) Elektroporation:

Bei der Elektroporation wird durch das Anlegen eines oder mehrerer, aufeinander folgender elektrischer Impulse die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig erhöht und für DNA-Moleküle durchgängig (Neumann *et al.*, 1982).

Am Tag vor dem eigentlichen Versuch wurden die Zellen in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in frisches Medium aufgenommen, so dass sie sich für die Elektroporation in logarithmischer Wachstumsphase befanden.

12h später wurden die Zellen pelletiert, wobei die Zentrifuge vorgekühlt war (4°C). Nach einem Waschschrift mit gekühltem Medium wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen in 500µl RPMI mit 25mM HEPES aufgenommen, entsprechend einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml.

Die erforderliche Zellmenge wurde mit 5-13 µg der jeweiligen Plasmid-DNA gemischt (maximal 20µg Gesamt-DNA-Menge). Das DNA-Zellgemisch wurde in die eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt und elektroporiert (Elektroporationsbedingungen für die L428: Spannung von 250V; Kapazität 1650µF).

Anschließend wurde der Küvetteninhalt mit einer Pasteurpipette in eine kleine Zellkulturflasche (10ml) mit 8ml RPMI komplett/ 10mM HEPES (angewärmt auf Raumtemperatur) überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5%CO₂ im Inkubator. Um die Effizienz der Transfektion zu bestimmen, wurde bei allen Reaktionen ein Ansatz mit 5µg EGFP-Plasmid transfiziert und die Proteinexpression erstmals nach 6h unter dem Fluoreszenzmikroskop sowie nach 24h durchflusszytometrisch und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Bei dem Green Fluorescent Protein (GFP) handelt es sich um ein Protein der Qualle *Aequora victoria*, das bei entsprechender Anregung fluoresziert und sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch durch FACS-Analyse nachgewiesen werden kann, ohne dass eine Antikörperfärbung erforderlich ist. Es ist kein Substratumsatz nötig, da es sich bei dem Genprodukt selbst um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt.

b) Nukleofektion:

Bei der Nukleofektion handelt es sich um eine neuere Variante der Elektroporation.

Die DNA soll durch die Kombination spezifischer Puffer und elektrischer Parameter direkt in den Zellkern eingebracht werden. Bei dieser speziellen Form der Elektroporation erfolgt nicht nur ein Spannungsimpuls wie bei der Elektroporation, sondern es werden eine Reihe komplexer Spannungsmuster erzeugt. In Verbindung mit unterschiedlichen Puffersystemen ergibt sich so eine Vielzahl möglicher Transfektionsbedingungen (s. Tabelle 13).

Besonders vorteilhaft scheint diese Methode für primäre Zellen und schwer zu transfizierende Zelllinien zu sein. Die genaue Zusammensetzung der Puffer und Einzelheiten der Programme sind durch die Herstellerfirma Amaxa nicht freigegeben und können daher leider nicht angegeben werden.

Tabelle 13: Schema zur Optimierung der Nukleofektion

Programm:	Lösung R	Lösung T	Lösung V
1	A-23	A-23	A-23
2	A-27	A-27	A-27
3	T-20	T-20	T-20
4	T-27	T-27	T-27
5	T-16	T-16	T-16
6	T-01	T-01	T-01
7	G-16	G-16	G-16
8	O-17	O-17	O-17

Am Vorabend der geplanten Nukleofektion wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen, wobei die Zelldichte dabei den Bedingungen der Elektroporation entsprach (5×10^5 Zellen/ml). Die Zellen sollten sich für den Versuch wieder in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die benötigte Anzahl von Zellen, 1×10^6 - 1×10^7 Zellen pro Ansatz, wurden pelletiert (Zentrifugation 10 min bei $200 \times g$) und einmal mit PBS gewaschen.

Danach resuspendierte man die Zellen in der gewünschten Nukleofektionslösung (Lösung R, T oder V) bei RT, wobei die Konzentration 1×10^6 - 1×10^7 Zellen/100 μ l betrug, und mischte die Zellsuspension mit der jeweiligen Plasmid-DNA (Menge s. Elektroporation). Für den Puls wurden 100 μ l des Zell/DNA-Gemisches in die Nukleofektionsküvetten gegeben, verschlossen und in den Nukleofektor inseriert. Das gewünschte Programm wurde gewählt. Die Wahl des Programmes und der Nukleofektionslösung erfolgte nach dem Schema aus Tabelle 13, mit dem Ziel für jede Zelllinie die optimalen Nukleofektionsbedingungen zu ermitteln. Um die Zellen nach dem Impuls mit den Plastikküvetten in die 12-well-Platte zu überführen, gab man erst 500 μ l RPMI komplett (vorgewärmt) zu den Küvetten. Die anschließende Kultivierung erfolgte wie gehabt (37°C , $5\% \text{CO}_2$). Nach 6h wurden die Zellen nach Transfektion von EGFP erstmals unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt, nach 24h erfolgt die durchflusszytometrische und erneute mikroskopische Analyse der Transfektionseffizienzen.

2.2.3. Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie, auch FACS (*engl.: fluorescence activated cell sorting*) genannt, handelt sich um eine Methode zur Quantifizierung mehrerer physikalischer und Fluoreszenz-Parameter einzelner Zellen in einer größeren Zellpopulation. Die Zellen wandern in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl. Die Absorption und Reflektion von Licht wird gemessen, ebenso wie die Fluoreszenzen, die die Zellen emittieren. Aus diesen Parametern berechnet sich dann die Größe, Granularität und optische Dichte der Zellen. Die Färbung mit spezifischen Antikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen (FITC- oder PE-konjugiert) markiert sind, erlaubt den Nachweis der Expression bestimmter Moleküle auf und in der Zelle, außerdem lässt sich mittels Annexin V-Markierung Apoptose detektieren.

Während frühen Apoptosestadien finden Veränderungen an der Zellmembran statt, unter anderem kommt es zur Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Innenseite an die Außenseite der Membran. Annexin V hat als Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein eine hohe Affinität für PS und dient dementsprechend als Sonde für die PS-Exposition auf der Membranaußenseite.

Der FACScan ist in der Lage, mehrere Fluoreszenzen gleichzeitig zu detektieren, was Doppelfärbungen mit Antikörpern gekoppelt an unterschiedliche Fluorochrome ermöglicht. Die Ergebnisse werden als Histogramme oder Punkt-Plots in der Auswertungs- und Aufnahme-Software dargestellt.

Durchführung:

a) ohne Antikörperfärbung:

Bei den EGFP-exprimierenden Zellen, die bereits einen fluoreszierenden Marker tragen, war keine zusätzliche Antikörperfärbung erforderlich.

Ein Aliquot der zu untersuchenden Zellen wurde mit 2ml FACS-Puffer in 5ml-Rundbodenröhrchen überführt und zentrifugiert (750rpm, 4°C, 5min). Das entstandene Pellett wurde in 500µl FACS-Puffer resuspendiert.

Die Proben wurden auf Eis aufbewahrt und kurz vor der Messung 5µl Propidiumjodid (Verhältnis 1:100) zugegeben.

Propidiumjodid diente als Marker für tote Zellen. Durch die Membrandysfunktion toter Zellen kann das Propidiumjodid in den Zellkern eindringen und zu einer Interkalation mit der DNA führen. Im FACS-SCAN ist dies durch stärkere Fluoreszenz nachweisbar.

Alle durchflusszytometrischen Analysen erfolgten mit Hilfe der FACScalibur®, Cellquest Software®.

FACS-Puffer: 1xPBS (pH 7,4)
0,5% (w/v) BSA
Sterilfiltern des Puffers.

b) mit Antikörperfärbung:

Wie bei der Vorgehensweise ohne Antikörperfärbung wurde die erforderliche Anzahl Zellen ($1-5 \times 10^7 / \text{ml}$) erst mit 2ml FACS-Puffer in 5ml-Rundbodenröhrchen überführt und zentrifugiert (750rpm, 4°C, 5min). Der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Zellpellet anschließend für 15min mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper inkubiert. Das Färbevolumen betrug 50 μ l, wobei die Menge des eingesetzten Antikörpers den Herstellerangaben entsprach, meist 5 μ l (Verdünnung 1:10). Die Inkubation erfolgte auf Eis und im Dunklen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen in 1ml FACS-Puffer gewaschen, bei 250 \times g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Wie unter a) vermerkt, wurden die Zellen wiederum in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und vor der Analyse 5 μ l Propidiumiodid (1:100) hinzu gegeben. Die Aufbewahrung erfolgte auf Eis und zusätzlich vor Licht geschützt.

c) Apoptose-Assay:

Zur Quantifizierung der Induktion von Apoptose durch die Hemmung der STAT6-Expression, wurden die Zellen in einer Zelldichte von $5 \times 10^5 / \text{ml}$ eingesetzt. In frühen Apoptosestadien kommt es über Veränderungen der Membranintegrität zu einer Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran. Die FACS-Analyse erfolgte nach Färbung der Zellen mit Annexin V, einem Ca^{2+} -abhängigen, Phospholipid-bindenden Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin (s. Antikörperfärbung). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten für Annexin V wurden nach Inkubation der Zellen mit 100ng/ml α -CD95 Antikörper, bzw. Isotypkontrolle oder einer Behandlung der Zellen mit dem Protein-Kinase-Inhibitor Staurosporin über 24h in einer Konzentration von 1 μ M bestimmt.

2.2.4. Proliferations-Assay

Um quantitative Aussagen über das Wachstumsverhalten von Zellen in Zellkulturen machen zu können, wurde die Zelldichte zu bestimmten Zeitpunkten bestimmt, um daraus die Zellverdopplungszeiten zu ermitteln. Die Zelldichte wurde in einem automatischen Zellzähl-Gerät (Casy® cell counter, Schärfe-System, Reutlingen) bestimmt. Der verwendete Casy®ton-Puffer (isotonische Salzlösung) wurde nach Angaben des Herstellers hergestellt.

Casy®ton-Puffer:	Natriumchlorid 7,93g/l
	EDTA-Dinatriumsalz 0,38g/l
	Kaliumchlorid 0,4g/l
	Natriumdihydrogenphosphat 0,19g/l
	Dinatriumhydrogenphosphat 1,95g/l
	Natriumfluorid 0,3g/l.

Durchführung:

Die Zelldichte der für den Versuch vorgesehenen Zellen wurde 24h vor der ersten Messung bestimmt. Dann wurden die Zellen pelletiert und in einer Zelldichte von 3×10^5 /ml in 6ml RPMI 1640 komplett in einer kleinen 10-ml-Zellkulturflasche wieder aufgenommen und kultiviert. Die erste Messung erfolgte nach 24h, weitere zu den Zeitpunkten 48h, 72h und 96h.

Für jede Messung wurden die Zellen 1:500 mit Casy®ton Puffer verdünnt. Bestimmt wurde neben der Gesamtzahl der Zellen/ml, die absolute Zahl und der relative Anteil der toten Zellen. Insgesamt wurden drei Messreihen durchgeführt, wobei jeweils die verschiedenen L428 Zellklone aus der letzten Analyse wieder in eine einheitliche Zelldichte von 3×10^5 /ml eingesetzt wurden.

2.3. Proteinbiochemische Analysen

2.3.1. Proteinisolation

Der Lipidanteil von Zellmembranen wird durch das Reagenz NP-40 des RIPA-Puffers angegriffen und die Proteine freigesetzt (Helenius *et al.*, 1979).

Durchführung:

Für die Proteinisolation wurde die Zellzahl bestimmt und die als Pellet geernteten Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert. Man benötigte circa 100µl frisch angesetzten kompletten RIPA-Puffer für 1×10^7 Zellen. Das resuspendierte Pellet wurde nach ordentlichem Durchmischen zweimal für jeweils 5min im Ultraschallbad bei 4°C beschallt. Zwischen den Beschallungen erfolgte ein 10minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Im Anschluss wurden die Proben dann bei 15000rpm auf 4°C gekühlt abzentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde in der Proteinbestimmung eingesetzt (s. Kapitel 2.2.8.). Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

RIPA-Puffer:

1xPBS (pH 7,4)
1% (v/v) Nonidet P-40
0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
0,1% (w/v) SDS,

frisch zugeben:

10µM PMSF
1mM Natriumvanadat
Proteinaseinhibitor-Mix (complete mini, Fa. Roche).

2.3.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach dem Protokoll von Bradford im Doppelbestimmungsverfahren durchgeführt (1976).

Durchführung:

Jeweils 2 μ l Proteinlysate (s. Kapitel 2.2.7.) wurden mit A. bidest 1:500 verdünnt. In die Küvetten wurde 200 μ l Bradford-Lösung (Protein-Assay, Bio-Rad, München) vorgelegt und die verdünnten Proben hinzugegeben (Verhältnis 5:1), gut gemischt, um anschließend 15 min bei RT zu inkubieren. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen, wobei zur Berechnung der Proteinkonzentration (μ g/ml) eine Standarddeichkurve mit verschiedenen Konzentrationen BSA diente.

2.3.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page)

In der denaturierenden Gel-Elektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei die verwendeten Reagenzien die Sekundär- und Tertiärstruktur denaturieren und somit keinen Einfluss auf die Mobilität der Proteine mehr ausüben können (Lämmli, 1970).

Durchführung:

Das Trenngel wurde nach Rezept gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation, die circa 30 min benötigte, wurde das Isopropanol abgegossen, mit ddH₂O gespült und das restliche Wasser mit einem Filterpapier abgesaugt. Das Sammelgel wurde nach Rezept über das Trenngel gegossen, sowie ein 10-Taschenkamm eingesetzt. Trenn- und Sammelgel hatten eine Dicke von 0,75 mm. Von den Zelllysaten (s. Kapitel 2.2.7.) wurden wahlweise 30 μ g, 10 μ g oder 3,3 μ g an Proteinmenge eingesetzt, die sich aus der Bradford-Analyse ergeben haben (s. Kapitel 2.2.8.), wobei die Proben während der gesamten Vorbereitungszeit auf Eis gehalten wurden. Die berechnete Menge SDS-Lämmli-Puffer (Verhältnis 1:1) bzw. bei größeren Volumina 1:3 mit 4fach Probenpuffer (Roti®-Load, Roth, Karlsruhe) wurde zu den Proben gegeben, die dann vor dem Auftragen 5 min bei 95°C denaturiert und kurz anzentrifugiert wurden. Zum späteren Größenvergleich der Proteinbanden wurde neben den

Proben auch ein Protein-Molekulargewichtsstandard (Full Range Rainbow Molecular Weight Marker, GE Healthcare, München) mitgeführt Molekulargewichte untersuchte Proteine (s. Tabelle 14). Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35mV, einer maximalen Spannung von 180 V über einen Zeitraum von circa 1,5h, mit leichter Variation der Laufzeit in Abhängigkeit von der Wandergeschwindigkeit des Markers und der Lauffront des Probenpuffers.

Trenngel 11% :	2,5ml Trenngelpuffer (1M Tris pH 8,8) 2,8ml Acrylamid/Bisacrylamid 40% 4,7ml A. bidest 0,1ml SDS 10% 0,04ml APS 10% 0,013ml TEMED.
Sammelgel 5%:	1,25ml Sammelgelpuffer (1M Tris pH 6,8) 0,25ml Acrylamid/Bisacrylamid 40% 3,125ml A.bidest 0,045ml SDS 10% 0,02ml APS 10% 0,008ml TEMED.
SDS-Lämmli-Puffer (2x):	100mM Tris/HCL pH 6,8 100mM DTT 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Bromphenolblau.
Laufpuffer (1x):	25mM Tris 192mM Glycin 1% (w/v) SDS.

Tabelle 14: Molekulargewichte der untersuchten Proteine

Protein	Molekulargewicht
STAT6	100kDa
Aktin	42kDa

2.3.4. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse handelt es sich um eine Methode zur Übertragung von Proteinbanden aus einem Elektrophoresegel auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose. Im SDS-Gel (s. Kapitel 2.2.9.) liegen die Proteine in negativ geladener Form vor, im Spannungsfeld wandern sie in Richtung Kathode und werden dabei auf einer Membran fixiert. Die Bindung der Proteine an der Membran ist unspezifisch. Im Anschluss können die so immobilisierten Proteine mit Antikörpern markiert werden, wobei der erste Antikörper spezifisch gegen das Protein, das von Interesse ist, gerichtet wird. Gewonnen wird der Erstantikörper meist durch Immunisierung von Kaninchen oder Ziegen. Der Zweitantikörper bindet spezifisch an den Erstantikörper und ist außerdem Enzym markiert. Reaktionen, die von diesen Enzymen katalysiert werden, ermöglichen so eine Visualisierung, zum Beispiel in Form einer Chemilumineszenz (Gershoni und Palade, 1983; Towbin *et al.*, 1979).

Durchführung:

a) Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran:

Die Stocklösung des Transblotpuffers wurde mit ddH₂O auf einfache Konzentration verdünnt und unter dem Abzug Methanol für eine Endkonzentration von 15% ergänzt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C-extra, GE Healthcare, München) wurde mittels Nassblotverfahren durchgeführt. Hierzu wurden folgende Komponenten (in Transferpuffer getränkt) auf ein Trägergestell geschichtet unter Vermeidung von Lufteinschlüssen:

Kathode (Minuspol)

Schwamm

drei Lagen Filterpapier

SDS-Gel

Nitrozellulosemembran

drei Lagen Filterpapier

Schwamm

Anode (Pluspol).

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer mit voreingestellten Geräteparametern (Spannung 0,1kV, Stromstärke 300mA, Leistung 300W) im elektrischen Feld bei einer Temperatur von 4°C über 4h. Zur Konstanthaltung der Temperatur wurden Puffer und Kühlaggregat nach 2h erneuert.

Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran durch 3minütige Inkubation in Ponceau S-Lösung für eine Minute reversibel angefärbt, um einen ersten Anhalt für Transfer-effizienz und eventuelle Konzentrationsunterschiede zu erhalten. Eine vollständige Entfärbung der Membran wurde durch Waschen der Membran mit TBS-Tween erreicht.

Transferpuffer (1x) pH 8,3:	25mM Tris
	192mM Glycin
	15% (v/v) Methanol.

Ponceau-S-Lösung:	5% (v/v) Eisessig
	0,5% (w/v) Ponceau S.

b) Immundetektion:

Bei der Immundetektion handelt es sich um den Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper. Vor der Bindung des Erstantikörpers wurde die Membran nach dem Transfer (s. Kapitel 2.10.1.) in TBS-T gespült und eine Stunde in 5% MP (Amersham Blocking Agent)/TBS-T geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Für die Immundetektion wurden die Antikörper verdünnt (1% Milchpulver-TBS-T) (s. Tabelle 8) und die Membran darin bei 4°C über Nacht auf dem Kippschüttler inkubiert. Eine Ausnahme bildete dabei die Aktin-

Färbung, da dieser Erstantikörper nur 1h und bei RT inkubiert werden musste. Im nächsten Schritt wurde die Membran 3×10 min in TBS-T gewaschen. Der Zweitantikörper wurde verdünnt (s. Tabelle 8) und eine Stunde bei RT auf die Membran gegeben. Wie zuvor wurde die Membran 3×10 min in TBS-T gewaschen.

c) Detektion mit dem ECL-System:

Um die spezifisch gefärbten Proteinbanden sichtbar machen zu können, wurde eine ECL-Western-Blotting Reagenz verwendet, wobei es sich um das Substrat für die an den Sekundäntikörper gekoppelte Peroxidase handelt. Chemilumineszenz ist die Folge einer Reaktionskette, die durch die antikörpergebundene Peroxidase initiiert wird (Durrant 1994). Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt durch Auflegen von autoradiographischen Filmen.

Beide Komponenten der ECL-Western-Blotting Reagenz (Lösung A und B) wurden zu gleichen Anteilen gemischt, wobei pro Filter 4ml auf die Membran gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug 1min bei RT. Danach wurden die Filter in einer Filmkassette befestigt und vorher das überschüssige ECL entfernt. In der Dunkelkammer erfolgte das Einlegen des Filmes. Die Belichtungszeiten variierten nach der Stärke der zu erwartenden Proteinbanden, wobei Standardbelichtungszeiten eine Minute, zwei Minuten und fünf Minuten waren.

d) Lösung von spezifischen Bindungen (“Strippen“):

Verwendet man eine Membran nicht nur für eine einzige Antikörperfärbung, so besteht die Notwendigkeit spezifische Bindungen zu lösen, um restliche Signalintensitäten der vorhergehenden Färbung bei der späteren Filmentwicklung zu verhindern.

Hierzu wurde die Membran 3×15 min in TBS-T 1× gewaschen. Die Re-Blot-Plus-Mild-Lösung (Chemicon, Hofheim) wurde mit A.bidest auf einfache Konzentration verdünnt, wobei pro Membran 15ml Re-Blot-Plus-Mild 1× eingesetzt wurden. Die Inkubationszeit der Membran in dieser Lösung betrug bei Raumtemperatur 30min. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschrift über 15min in TBS-T 1×. Eine Aufbewahrung der Membran vor erneuter Verwendung erfolgte entweder in TBS-Tween im Kühlschrank bei 4°C oder im getrockneten Zustand bei Raumtemperatur.

TBS (1x) pH 7,6: 20mM Tris Base
 137mM Natriumchlorid.

TBS-Tween (1x) pH 7,6: 1xTBS
 0,1% (v/v) Tween-20.

2.4. Molekularbiologische Analysen

Die Plasmid-DNA, die für die Nukleofektions- und Elektroporationsversuche verwendet wurde, musste im Vorfeld der Versuche durch Transformation kompetenter Bakterien und anschließender Isolation der hochreinen Plasmid-DNA mittels Qiagen Plasmid-Kits gewonnen werden.

2.4.1. Transformation von E.coli-Zellen

Die Einführung von Plasmid-DNA in die Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation, basierend auf der Methode von Dagert und Ehrlich (1979). Verwendet werden E.coli-Stämme, die einer physikalischen und/oder (u/o) chemikalischen Behandlung unterzogen wurden, um ihre Fähigkeit DNA in ihr Inneres aufzunehmen zu verstärken. Man bezeichnet diese Bakterienstämme als kompetent. Zur Selektion der Transformanden plattiert man die Zellen auf LB-Selektionsagar, das ein Antibiotikum enthält (Ampicillin 50ng/ml bzw. Kanamycin 20ng/ml), da die Plasmide eine Antibiotikaresistenz als selektierbaren Marker enthalten.

Durchführung:

Nach dem Auftauen der chemisch kompetenten Zellen (50µl/Ansatz) auf Eis, wurde ca. 100ng Plasmid-DNA dazu gegeben und das Gemisch für 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45s, danach wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Es wurde 250µl SOC-Medium/Ansatz auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Abschließend erfolgte ein Ausplattieren des Transformationsansatzes (25µl und 75µl) auf Selektionsagar (je nach Plasmidresistenz: Ampicillin 50µg/ml oder Kanamycin 10µg/ml) und die Inkubation bei 37°C über Nacht.

2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA

Bei der Isolation von hochreiner Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid-Kits (Qiagen, Hilden) handelt es sich um eine schnelle und einfache Methode, um Plasmide aus einer Bakterienkultur zu präparieren. Dem Aufschlussverfahren liegt ein modifizierter alkalischer Aufschluss (Birnboim und Doly, 1979) zu Grunde.

Durchführung:

Von der bewachsenen Agarplatte wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte entnommen und als Starterkultur in 2-5ml LB-Medium, versetzt mit einem entsprechenden selektiven Antibiotikum in einer Konzentration von 1:1000, über acht Stunden bei 37°C schüttelnd (300 rpm) inkubiert. Als selektives Antibiotikum diente je nach Resistenz des jeweiligen Plasmids Kanamycin oder Ampicillin. Nach Ablauf der Zeit wurde die Starterkultur circa 1:500 verdünnt in 100ml frisches LB-Medium überführt, das wiederum mit einem selektiven Antibiotikum 1:1000 versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über 12-16h wiederum bei 37°C schüttelnd (300 rpm). Als nächster Schritt erfolgte die Isolation der Plasmide mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi-Kits nach den Angaben der Fa. Qiagen. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde in Endotoxin-freiem Wasser aufgenommen (Volumen abhängig von Größe Präzipitat). Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte im UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260nm.

Luria-Bertani (LB)-Medium: Trypton 10g/l
 Hefeextrakt 5g/l
 NaCl 10g/l.

2.4.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Nukleinsäurekonzentration in Lösungen wurde photometrisch mit einem Spektralphotometer in Quarzküvetten durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Einer optischen Dichte $(OD)_{260}$ von 1 kann man folgende Referenz-Konzentrationen zugrunde legen (Sambrook *et al.*, 1989):

doppelsträngige DNA: 50 µg/ ml
RNA: 40 µg/ ml.

Einen Anhalt für die Reinheit der DNA-Lösungen erhält man durch die Beziehung der Absorptionswerte unterschiedlicher Wellenlängen. Für reine DNA gilt folgende Beziehung (Sambrook et al. 1989): $OD_{260}:OD_{280}=1,8$.

Durchführung:

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die DNA 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten bei einer Extinktion von 260nm im Spektrometer, außerdem wurde der $OD_{260}:OD_{280}$ bestimmt.

3. Ergebnisse

In H/RS-Zellen liegen verschiedene Signaltransduktionskaskaden konstitutiv aktiviert vor, darunter der Jak/STAT-Signalweg (Cochet *et al.*, 2006; Holtick *et al.*, 2005; Kapp *et al.*, 1999; Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zu der noch unzureichend erforschten Frage geleistet werden, welche Bedeutung STAT6 für die Tumorentstehung- und Aufrechterhaltung im Hodgkin-Lymphom hat.

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in einen methodischen Teil (s. Kapitel 3.1. und 3.2.) sowie eine anschließende Analyse von Hodgkinzellen nach reduzierter STAT6-Expression. Hierbei wurde das Proliferationsverhalten der Zellen, mögliche Veränderungen der Apoptoseresistenz sowie die Expression von spezifischen Zelloberflächenmarkern untersucht (s. Kapitel 3.3.-3.6.). Hintergrund war die Notwendigkeit, methodische Grundlagen für eine Nukleofektion als Möglichkeit des nichtviralen Gentransfers von cHL-Zelllinien zu etablieren, um die Voraussetzung zu schaffen, durch Transfektion einer shRNA gegen STAT6 die Bedeutung dieses STAT-Familienmitglieds an mehreren cHL-Zelllinien vergleichend analysieren zu können. Insgesamt dienen die Ergebnisse des methodischen Teils über diese Arbeit hinaus als Grundlage für verschiedenste transfektionsabhängige Versuche mit den untersuchten cHL-Zelllinien. Daran anschließend wurden Experimente durchgeführt, mit dem Ziel der Etablierung von Hodgkin-Zelllinien mit reduzierter STAT6-Expression. Die Reihenfolge der Darstellung der Untersuchungsergebnisse des zweiten Teils dieser Arbeit ist vor allem den funktionellen Aspekten der Analyse dieser STAT6-defizienten Zellen geschuldet und dient der besseren Übersichtlichkeit, auch wenn die Analysen größtenteils zeitlich parallel erfolgt sind.

3.1. Einbringen von DNA in Hodgkinzellen: Nukleofektion der cHL-Zelllinien

L591 und L1236

In dem methodischen Teil der vorliegenden Arbeit sollten praktikable Nukleofektionsbedingungen für die cHL-Zelllinien L591 sowie L1236 ermittelt werden. Diese Zelllinien waren bisher mit herkömmlichen Transfektionsmethoden nicht effizient zu transfizieren. Anders als für die Zelllinie L428 waren mittels Elektroporation keine zufrieden stellenden Ergebnisse zu erlangen. Daher wurde in dieser Arbeit das von dem Hersteller Amaxa entwickelte Verfahren der Nukleofektion als spezielle Variante der Elektroporation getestet.

Durch die Kombination spezifischer Puffer und elektrischer Parameter soll die DNA bei dieser Methode direkt in den Zellkern eingebracht werden. Bei dieser speziellen Form der Elektroporation erfolgt nicht nur ein einzelner Spannungsimpuls wie bei der herkömmlichen Elektroporation, sondern es werden eine Reihe komplexer Spannungsmuster erzeugt. In Verbindung mit unterschiedlichen Puffersystemen ergibt sich so eine Vielzahl möglicher Transfektionsbedingungen, die jedoch im Detail zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit von der Herstellerfirma Amaxa nicht freigegeben waren. Um diese Methode für diese Zelllinien nutzbar zu machen, wurden verschiedene Transfektionspuffer (R, T und V) in Kombination mit einer Vielzahl unterschiedlicher Nukleofektionsprogramme (A-23, A-27, T-20, T-27, T-16, T-01, G-16, O-17) getestet. Um die Transfektionseffizienz bestimmen zu können, wurde ein pEGFP-Expressionsvektor als leicht nachweisbares Reportergen transfiziert. Bei dem Genprodukt selbst handelt es sich um ein fluoreszierendes Protein. Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss an die Nukleofektion erstmals nach 6h sowie 24h unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt (Daten nicht gezeigt). Außerdem erfolgte nach 24h die durchflusszytometrische Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten und damit der Transfektionseffizienz mittels FACS-Analyse.

3.1.1. Quantifizierung der Transfektionseffizienzen

Entscheidend für die Beurteilung der unterschiedlichen Nukleofektionsbedingungen war die in der FACS-Analyse ermittelte Transfektionseffizienz als Anteil EGFP-positiver Zellen (% total) und Anteil lebender, EGFP-positiver Zellen (% gated) sowie andererseits die Viabilität als Maß der Überlebensfähigkeit der transfizierten Zellen.

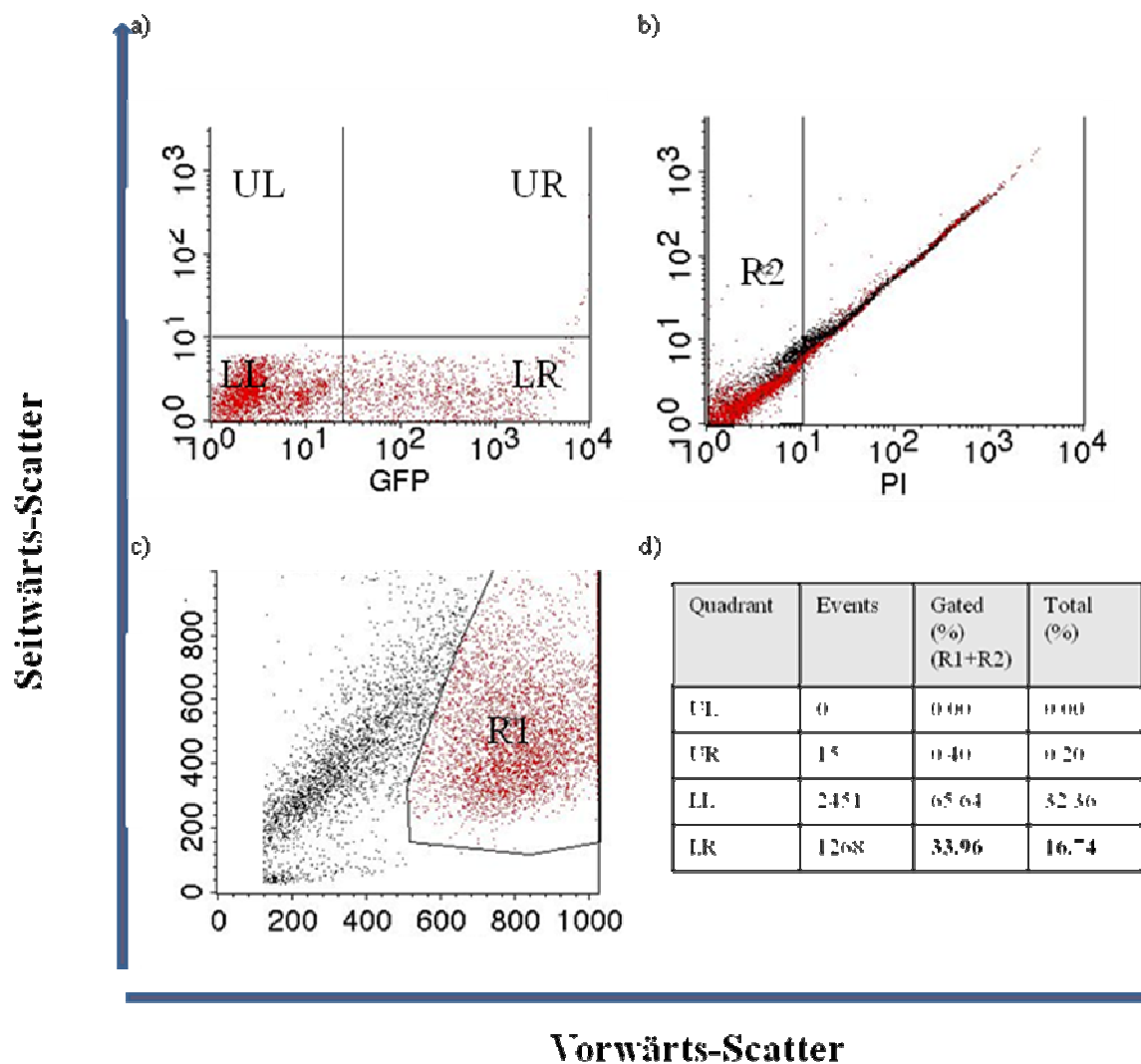


Abbildung 4: Eine repräsentative Nukleofektion der Zelllinie L591 ist die Kombination aus Puffer V mit dem Programm A-23: FACS-Auswertung 24h nach der Nukleofektion. Propidium-Iodid (PI) diente als Marker für tote Zellen. a), b), c): graphische Darstellungen, d): Quadrantenstatistik (UL: engl.: upper left, UR: engl.: upper right, LL: engl.: lower left, LR: engl.: lower right). Es wurden insgesamt 10000 Zellen aufgenommen. Gesetzte Gates R1 und R2, weitere Erläuterung im Text.

In Abbildung 4 sind Graphiken der FACS-Auswertung einer repräsentativen Nukleofektion der L591 dargestellt, der Kombination aus Puffer V mit Programm A-23. Sie dienen der Veranschaulichung wie die Werte für Viabilität und Transfektionseffizienz der Zelllinie L591 sowie der Zelllinie L1236 gewonnen wurden.

Bei der Analyse der Zellen dient das Setzen von elektronischen Gates der Abgrenzung von Zellverbänden mit bestimmten Eigenschaften. Die Detektoren des Gerätes erfassen die Lichtsstreuung als Vorwärtsstreuung (*engl.: forward scatter*; FSC) in Relation zur Zellgröße und im rechten Winkel dazu als Seitwärtsstreuung (*engl.: side scatter*; SSC) in Abhängigkeit von der intrazellulären Granularität und Membranbeschaffenheit. In Abbildung 4a) ist die Verteilung der EGFP-positiven Zellen und damit der Transfektionseffizienz dargestellt. Das Gate R2 in Abbildung 4b) erlaubt anhand der Propidium-Iodid-Färbung eine Aussage über die Viabilität der transfizierten Zellen. Propidiumiodid dient als Marker für tote Zellen. Durch die Membrandysfunktion toter Zellen kann das Propidiumiodid in den Zellkern eindringen und zu einer Interkalation mit der DNA führen. Das Gate R1 in Abbildung 4c) dient der Abgrenzung intakter Zellen von Zelltrümmern. Die Quadrantenstatistik in Abbildung 4d) basiert auf Abbildung 4a). Unter Prozent Total ist der prozentuale Anteil der Gesamtzellzahl angegeben, der sich im jeweiligen Quadranten befindet. Zur Bestimmung der Viabilität der transfizierten Zellen wurde das Verhältnis der Gated events zu Total events herangezogen. Für die Kombination von Puffer V mit dem Programm A-23 konnte für die Zelllinie L591 ein Anteil EGFP-positiver Zellen von 16,74% aller aufgenommenen Zellen und ein Anteil von 33,96% der lebenden Zellen ermittelt werden.

3.1.2. Ergebnisse der Testung verschiedener Nukleofektionsbedingungen für die Zelllinie L591

In der FACS-Analyse ergaben sich folgende Ergebnisse für die unterschiedlichen Kombinationen aus Puffern und Nukleofektionsprogrammen für die Zelllinie L591 (s. Tabelle 15):

Bei jedem der drei verwendeten Transfektionspuffer (R, T, V) wurde das beste Verhältnis aus Transfektionseffizienz und Viabilität mit einem Programm der Kategorie A-23 oder A-27 erzielt. In der Gesamtbetrachtung stellten sich für die Zelllinie L591 die drei Kombinationen aus Puffer V mit Programm A-23, Puffer T mit Programm A-27 sowie Puffer R mit Programm A-23 als repräsentative Nukleofektionsbedingungen heraus. Durch die Verwendung des Puffers V wurde in Kombination mit dem Programm A-23 eine Viabilität von 50% bei

33,96% EGFP-positiven, lebenden Zellen sowie 16,74% EGFP-positiven Zellen für die transfizierten Zellen erreicht. Die Kombination des Puffers T mit dem Programm A-27 ergab für die transfizierten Zellen eine Viabilität von 71% bei 18,91% EGFP-positiven, lebenden Zellen sowie insgesamt 13,45% EGFP-positiven Zellen.

Tabelle 15: Transfektionseffizienzen der Nukleofektion für die Zelllinie L591

a) Puffer V

Programm	Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
A-23	33,96	16,74	50%
A-27	10,25	7,41	72%
T-20	62,39	11,38	18%
T-27	54,58	10,15	19%
T-16	45,64	11,15	24%
T-01	28,03	11,14	40%
G-16	31,53	9,42	30%
O-17	46,31	12,58	27%

b) Puffer T

Programm	Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
A-23	27,51	15,96	42%
A-27	18,91	13,45	71%
T-20	40,92	7,5	18%
T-27	49,35	6,79	14%
T-16	54,28	10,4	19%
T-01	26,28	12,04	46%
G-16	34,32	11,27	33%
O-17	43,17	12,04	28%

c) Puffer R

Programm	Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
A-23	24,68	13,55	54%
A-27	7,63	5,83	76%
T-20	44,05	9,23	21%
T-27	39,38	7,95	20%
T-16	38,27	10,48	27%
T-01	23,69	8,99	38%
G-16	27,44	8,88	32%
O-17	37,81	9,42	25%

Ergebnisse der FACS-Analyse 24h nach Nukleofektion. Es wurden drei verschiedene Transfektionspuffer (R, T und V) in Kombination mit acht verschiedenen Nukleofektionsprogrammen (A-23, A-27, T-20, T-27, T-16, T-01, G-16, O-17) getestet. Für die Nukleofektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 - 1×10^7 Zellen/100µl Nukleofektor Lösungen a) V, b) T oder c) R pro Ansatz eingesetzt. Als Plasmid-DNA wurde EGFP in einer Konzentration von 5 µg Plasmid-DNA/Ansatz (in 1-5 µl H₂O oder TE) verwendet. Propidium-Iodid diente als Marker für tote Zellen. Farblich unterlegt die jeweils günstigste Nukleofektionsbedingung für den jeweiligen Puffer.

Ähnlich gute Ergebnisse erzielte auch die Kombinationen von Puffer R mit dem Programm A-23 für die transfizierten Zellen, eine Viabilität von 54% bei einem Anteil von 24,68% EGFP-positive, lebenden Zellen sowie 13,55% EGFP-positiven Zellen aller untersuchten Zellen. Insgesamt betrachtet fiel aufgrund der leichten Überlegenheit in der Transfektionseffizienz die Entscheidung für die Verwendung des Puffers V in Kombination mit Programm A-23 für folgende Nukleofektionsversuche. Sicherlich wären aber auch die anderen beiden Kandidaten (Puffer T mit Programm A-27 sowie Puffer R mit Programm A-23) potentiell einsetzbar gewesen.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die für die Nukleofektion verwendeten Zellen entsprechend den Bedingungen für die Zelllinie L428 zusätzlich mittels Elektroporation transfiziert. Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl aus mehreren Versuchen (s. [Tabelle 16](#)).

Im Vergleich zu den Transfektionseffizienzen der Elektroporation (Viabilität 28%, Anteil EGFP-positiver Zellen 9,78%) zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Nukleofektion für die Zelllinie L591 (Puffer V, Programm A-23: Viabilität 50%, Anteil EGFP-positiver Zellen 16,74%).

Tabelle 16: Transfektionseffizienzen der Elektroporation für die Zelllinie L591

Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
35,23	9,78	28%

Ergebnis der FACS-Analyse der Zelllinie L591 24h nach Transfektion. Für die Elektroporation wurden die Zellen pro Ansatz in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/500 μ l RPMI (mit 25mM HEPES) eingesetzt. EGFP wurde in einer Konzentration von 1,5 μ g Plasmid-DNA pro Ansatz verwendet (Elektroporationsbedingungen: 250V/1650 μ F).

3.1.3. Ergebnisse der Testung verschiedener Nukleofektionsbedingungen für die Zelllinie L1236

Für die Zelllinie L1236 wurde aufgrund von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) aus Kosten- und Zeitgründen ein kleinerer Versuchsansatz gewählt. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Zelllinie L1236 verglichen mit den Zelllinien L428 und L591 empfindlicher sowohl auf Nukleofektion als auch Elektroporation reagierte. Für die meisten Bedingungen war aufgrund eines hohen Anteils toter Zellen keine Auswertung der Daten möglich. Für die

vorliegende Arbeit wurden deshalb nur einige wenige aussichtsreiche Nukleofektionsbedingungen weiter getestet. Es ergaben sich folgende Ergebnisse für die unterschiedlichen Kombinationen aus Puffern und Nukleofektionsprogrammen für die Zelllinie L1236 (s. [Tabelle 17](#)): Bei jedem der drei verwendeten Transfektionspuffer (R, T, V) wurde für die Zelllinie L1236 die beste Kombination aus Transfektionseffizienz und Viabilität mit einem Programm der Kategorie A-23 erzielt. Allerdings erwies sich die Kombination aus Puffer V und Programm A-23 anders als bei der Zelllinie L591 nicht als beste Nukleofektionsbedingung. Sowohl die Kombination von Puffer R als auch Puffer T mit dem Programm A-23 ergab eine höhere Viabilität von 29%, bzw. 24% für die transfizierten Zellen gegenüber 19% für die Kombination mit Puffer V.

Tabelle 17: Transfektionseffizienzen der Nukleofektion für die Zelllinie L1236

a) **Puffer V**

Programm	Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
A-23	33,53	8,08	19
A-27	21,73	5,53	25

b) **Puffer T**

Programm	Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
A-23	43,42	8,15	24

c) **Puffer R**

Programm	Gated (live gate %)	Total (%)	Viabilität (%)
A-23	40,6	11,65	29

Ergebnisse der FACS-Analyse 24h nach Nukleofektion. Es wurden drei verschiedene Transfektionspuffer a) V, b) T und c) V in Kombination mit zwei verschiedenen Nukleofektionsprogrammen (A-23, A-27) getestet. Für die Nukleofektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 - 1×10^7 Zellen/100µl Nukleofektor Lösungen R, V oder T pro Ansatz eingesetzt. Als Plasmid-DNA wurde EGFP in einer Konzentration von 5µg Plasmid-DNA/Ansatz (in 1-5µl H₂O oder TE) verwendet. Propidium-Iodid diente als Marker für tote Zellen.

Insgesamt erwies sich die Kombination aus Puffer R und Programm A-23, bei der eine Viabilität von 29% und 11,65% EGFP-positive Zellen gemessen wurden, als praktikable Nukleofektionsbedingung. Die Zelllinie L1236 erwies sich als schwerer transfizierbar im Vergleich zu der Zelllinie L591. Während die Zelllinie L591 mit einer Viabilität von 50% und einem Anteil von 16,74% EGFP-positiven Zellen (Puffer V, Programm A-23) transfizierbar war, wurde für die Zelllinie L1236 eine maximale Viabilität von 29% mit einem Anteil von 11,65% EGFP-positiven Zellen (Puffer R, Programm A-23) erreicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Methode der Nukleofektion eine Möglichkeit der Einbringung von DNA in die generell als schwierig transfizierbar anzusehenden Zelllinien L591 sowie L1236 darstellt.

Für die Zelllinie L591 erwies sich der Puffer V in Kombination mit dem Programm A-23 sowie für die Zelllinie L1236 der Puffer R in Kombination mit Programm A-23 als geeignet für weitere Nukleofektionsversuche verwendet zu werden. Für die Zelllinie L591 wären außerdem Puffer T mit Programm A-27 sowie Puffer R mit Programm A-23 in Frage gekommen.

Anzumerken ist, dass zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Versuchsreihen noch keine Angaben des Herstellers Amaxa in Bezug auf die untersuchten cHL-Zelllinien vorlagen. Empfohlen wird durch Amaxa mittlerweile unter anderem auch die Verwendung von Puffer V in Kombination mit Programm T-01 für die Zelllinie L1236.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über die Methodik der Nukleofektion und durch die Ermittlung von praktikablen Nukleofektionsbedingungen für die untersuchten Zelllinien wurde es möglich eine Reihe von transfektionsabhängigen Experimenten durchzuführen. Die Ergebnisse der Optimierung der Nukleofektionsbedingungen stellten dementsprechend für unsere Arbeitsgruppe die Grundlage zum weiteren Arbeiten mit diesen Zelllinien dar. Für diese Arbeit ermöglichten die methodischen Vorarbeiten einen Einstieg in die Untersuchung der Bedeutung und Funktion des in cHL-Zelllinien permanent aktiv vorliegenden Transkriptionsfaktors STAT6 durch die Verwendung einer shRNA spezifisch für STAT6.

3.2. Etablierung von cHL-Zellen mit reduzierter STAT6-Expression

Die Methode der RNA-Interferenz soll eingesetzt werden, um eine Reduktion (“*Knock-down*“) der STAT6-Expression in cHL Tumorzellen zu erzielen und damit die Möglichkeit zu Analysen der Funktion und Bedeutung von STAT6 unter anderem für die Zellproliferation der cHL-Zellen zu schaffen.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits für STAT3 gezeigt werden, dass eine RNAi vermittelte Reduktion der STAT3-Expression möglich ist und dass konstitutiv aktives STAT3 für die Proliferation von cHL-Tumorzellen notwendig ist (Holtick *et al.*, 2005).

Für die vorliegende Arbeit wurden cHL-Zellen der Zelllinien L428, L591 sowie L1236 mit dem STAT6-shRNA-exprimierendem Vektor (pSUPERneoSTAT6si) mittels Nukleofektion transfiziert. Die Auswahl der Transfektionsbedingungen richtete sich nach den individuell für jede Zelllinie ermittelten Ergebnissen der Optimierungsversuche (s. Kapitel 3.1.) oder Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Als Kontrollen dienten mit einem leeren Vektor (pSUPERneo) transfizierte cHL-Zellen. Anschließend wurden die pSUPERneo- sowie die pSUPERneoSTAT6si-transfizierten Zellen durch Zugabe von Geneticin (G418) zu dem Kulturmedium einer Selektion unterzogen und entsprechend aus den Zellkulturplatten isoliert.

Unter den Transfektanden der Zelllinie L428 konnte eine repräsentative Anzahl G418-resistenter Zellen kultiviert werden. Es ließen sich sowohl pSUPERneo-Zellen als auch pSUPERneoSTAT6si-Zellen etablieren. Hierbei wurden folgende L428-Zellen für nachfolgende Analysen isoliert:

Die mit pSUPERneoSTAT6si transfizierten L428-Zellen wurden als Klone 11, 24, 27, 32 und 49 weitergeführt. Die mit pSUPERneo transfizierten L428-Zellen wurden als Klone 70, 72 und 73 benannt. Die pSUPERneo-Zellen sind eine Auswahl von 10 unabhängigen Klonen, während die pSUPERneoSTAT6si-Zellen alle isolierten unabhängigen Klone einschließen.

Die Transfektion der Zelllinie L591 mit dem Vektor pSUPERneoSTAT6si sowie zu dem Kontroll-Vektor pSUPERneo war mit einer kompletten Abwesenheit G418-resistenter Zellen verbunden. Es konnten weder pSUPERneoSTAT6si-Zellen noch pSUPERneo-Zellen gewonnen werden. Hingegen konnten unter den Transfektanden der Zelllinie L1236 zwar G418-resistente Zellen selektioniert werden, dabei handelte es sich allerdings ausschließlich um pSUPERneo-Zellen. Zellen mit pSUPERneoSTAT6si konnten für diese Zelllinie nicht gewonnen werden. Somit konnten auch keine L1236-Zellen mit reduzierter STAT6-Expression isoliert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass lediglich für die Zelllinie L428 eine ausreichende Anzahl sowohl von pSUPERneo-Zellen als auch von pSUPERneoSTAT6si-Zellen etabliert werden konnte, die weiter kultiviert wurden. Weder für die Zelllinie L591 noch L1236 ließen sich entsprechende Ergebnisse erzielen. In Bezug auf die Zelllinie L1236 fiel auf, dass keine Zellen mit pSUPERneoSTAT6si wohl aber Zellen mit pSUPERneo gewonnen werden konnten als möglichen indirekten Hinweis für die essentielle Rolle von STAT6 in dieser Zelllinie. Ähnliche Erfahrungen für die Zelllinie L1236 hatten sich bereits für die Arbeit mit spezifisch gegen STAT3 gerichtete shRNA ergeben (Holtick *et al.*, 2005).

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit wurden nach Selektion unter G418 die mit pSUPERneoSTAT6si transfizierten L428-Zellen im Vergleich mit pSUPERneo transfizierten L428-Zellen näher charakterisiert, um die funktionelle Rolle von STAT6 in den cHL-Zellen zu untersuchen.

Es erfolgte deshalb die vergleichende Analyse der pSUPERneo- und pSUPERneoSTAT6si-Zellen bezüglich ihres Proliferationsverhaltens (s. Kapitel 3.3.), der Sensitivierung gegenüber STS- sowie CD95-vermittelter Apoptose (s. Kapitel 3.4.), der Expression von ausgewählten zellulären Oberflächenmarkern (s. Kapitel 3.5.) und der STAT6- Expression (s. Kapitel 3.6.).

3.3. Effekt der Hemmung von STAT6 auf die Proliferation von cHL-Zellen

Zur Untersuchung der Bedeutung von STAT6 für das Wachstum und das Überleben von L428-Zellen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von fehlendem STAT6 auf die Zellverdoppelung als ein Maß der Proliferation verschiedener pSUPERneoSTAT6si-Zellen analysiert. Verglichen wurde die Zellzahl über 96h als ein Maß der Proliferation der Zellklone. Als Kontrollen dienten pSUPERneo-transfizierte Zellklone der Zelllinie L428. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte jeweils nach 24h, 48h, 72h sowie 96h, um daraus Aussagen zu Zellverdopplungszeiten und absoluter Zellzahl zu ermitteln.

Messungen für die Zelllinien L1236 sowie L591 konnten nicht wie ursprünglich geplant durchgeführt werden, da für diese Hodgkin-Zelllinien keine entsprechenden Zellen gewonnen werden konnten (s. Kapitel 3.2.).

Für die Zelllinie L428 ergaben sich folgende Ergebnisse (s. [Abbildung 5](#)):

Die L428-pSUPERneoSTAT6si-Klone 11, 24, 27, 32 und 49 zeigten gegenüber den pSUPERneo-Klonen 70, 72 und 73 ein abweichendes Proliferationsverhalten. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die mit pSUPERneoSTAT6si transfizierten L428-Zellen deutlich langsamer wuchsen verglichen mit den pSUPERneo-transfizierten L428-Zellen. Die Zellverdopplungszeiten der L428-STAT6si-Zellen 11, 24, 27, 32 sowie 49 lagen über 96h. Die Zellen der drei verwendeten Kontrollklone wichen nur minimal im Proliferationsverhalten voneinander ab. Ihre Zellverdopplungszeiten lagen zwischen 30h bis 35h.

Vergleich man die Zellverdopplungszeiten der Zellen der L428-STAT6si-transfizierten Zellklone in allen drei Versuchsansätzen, zeigte sich keine relevante Abweichung in den verschiedenen Zellverdopplungszeiten. Alle untersuchten pSUPERneoSTAT6si-Zellen waren nahezu gleichermaßen in der Proliferation eingeschränkt.

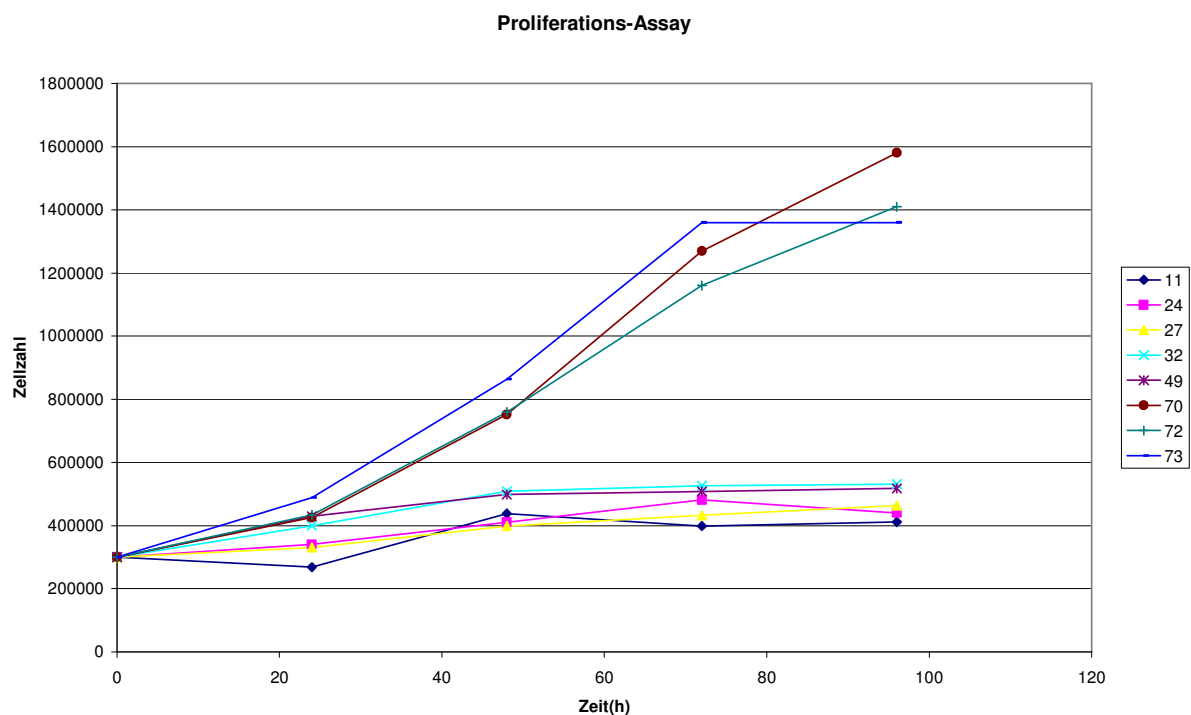


Abbildung 5: Konstitutiv aktives STAT6 ist für die Proliferation von cHL-Tumorzellen notwendig. Vergleich der Zellverdopplungszeiten der L428-pSUPERneo-transfizierten Kontrollen (Klone 70, 72, 73) und L428-pSUPERneoSTAT6si-transfizierten Zellen (Klone 11, 24, 27, 32, 49) durch Bestimmung der Zellzahl zu den vier Messzeitpunkten 24h, 48h, 72h und 96h. Dargestellt ist eine repräsentative Auswahl (Zahl der Wiederholungen: n=3). Nach Abschluss einer Messreihe wurden die verschiedenen L428-Zellklone wieder in eine einheitliche Zelldichte von $3 \times 10^5/\text{ml}$ eingesetzt und erneut analysiert.

3.4. Effekt der Hemmung von STAT6 auf die STS- sowie CD95/Fas/Apo-1-vermittelte Apoptoseneigung in cHL-Zellen

Ein wichtiges Charakteristikum von cHL-Zellen ist die Resistenz gegenüber proapoptotischen Stimuli, darunter eine Resistenz gegenüber Staurosporin- sowohl als auch CD95/Fas/Apo-1-vermittelte Apoptose (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Kashkar *et al.*, 2002; Kashkar *et al.*, 2003; Maggio *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2002). Durch pharmakologische Hemmung von STAT3 mittels Tyrosin-Kinase-Inhibitoren konnte für cHL-Zellen gezeigt werden, dass eine Inkubation mit AG17 sowie AG490 zu einer Sensitivierung der H/RS-Zellen gegenüber CD95/Fas/Apo-1-vermittelter Apoptose führt (Holtick *et al.*, 2005).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob auch eine Hemmung von STAT6 mittels spezifischer shRNA zu einer Sensitivierung der cHL-Zellen gegenüber Staurosporin- oder CD95-vermittelter Apoptose führt.

Die pSUPERneoSTAT6si-Zellen der Zelllinie L428 (Klone 11, 24, 32 sowie 49) wurden im Vergleich zu den pSUPERneo-Zellen (Klon 70, 72 sowie 73) über 24h mit STS behandelt, sowie in einem weiteren Versuchsansatz mit dem agonistischen α -CD95 Antikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Annexin-V-FITC als Marker für Apoptose und die durchflusszytometrische Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten. Bestimmt wurden jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) sowie die Differenz (Δ MFI) aus der MFI nach STS oder α -CD95-Behandlung mit der MFI der jeweiligen Kontrolle (DMSO oder Isotyp). Als aussagekräftig wurde eine mehr als zweifache Abweichung der MFI nach STS- oder α -CD95-Behandlung von der MFI der Kontrollen gewertet.

Auffällig war bei der Auswertung der Versuchsdaten, dass die mit pSUPERneoSTAT6si-transfizierten Zellklone bereits ohne STS-Behandlung oder Inkubation mit α -CD95-Antikörper eine höhere Spontanapoptoserate als die Kontrollklone aufwiesen, erkenntlich an den MFI-Werten der DMSO- oder Isotyp-Kontrollen. Ein Vergleich der STAT6si-Zellklone untereinander zeigte hier vor allem hohe MFI-Werte für den Klon 11 (MFI 18,69), den Klon 24 (10,16) sowie für den Klon 49 (MFI 11,41). Der Wert der MFI für den Klon 32 (MFI 7,47) lag ungefähr im Bereich der Kontrollklone (MFI 5,17-6,77).

Zur Veranschaulichung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte eine Darstellung der FACS-Analysen in [Abbildung 6 a\)](#) und [Abbildung 6 b\)](#) in Form von Histogrammen.

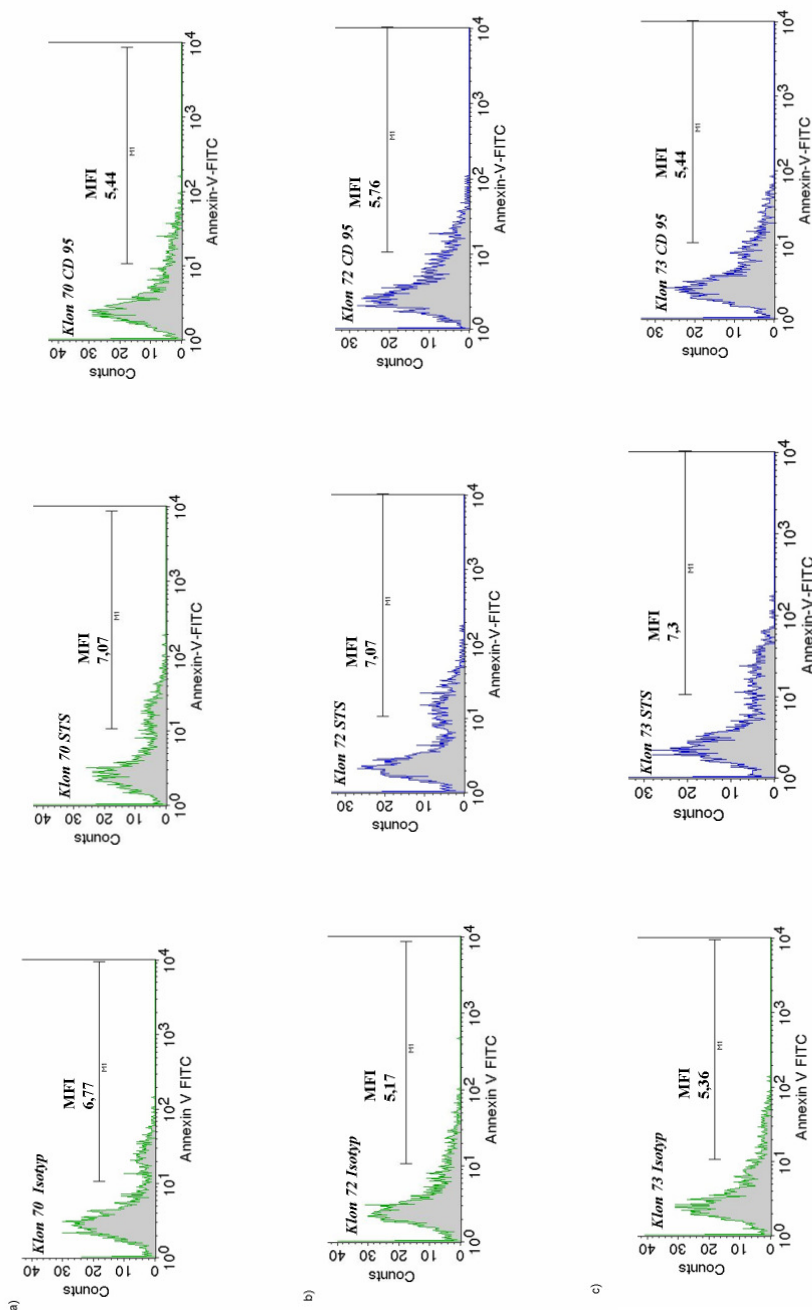


Abbildung 6a (a-c): Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse (s. Tabelle 18 und 19) als Histogramme (im Querformat von links nach rechts: Isotyp-Kontrolle, Staurosporin, α -CD-95-Antikörper). Dargestellt wurden die pSUPERneo-Zellen (Kontrollen) a) 70, b) 72 und c) 73) sowie vergleichend eine Auswahl von pSUPERneoSTAT6si-Zellen in Abbildung 6b). Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) in Prozent als Zahl innerhalb der Histogramme.

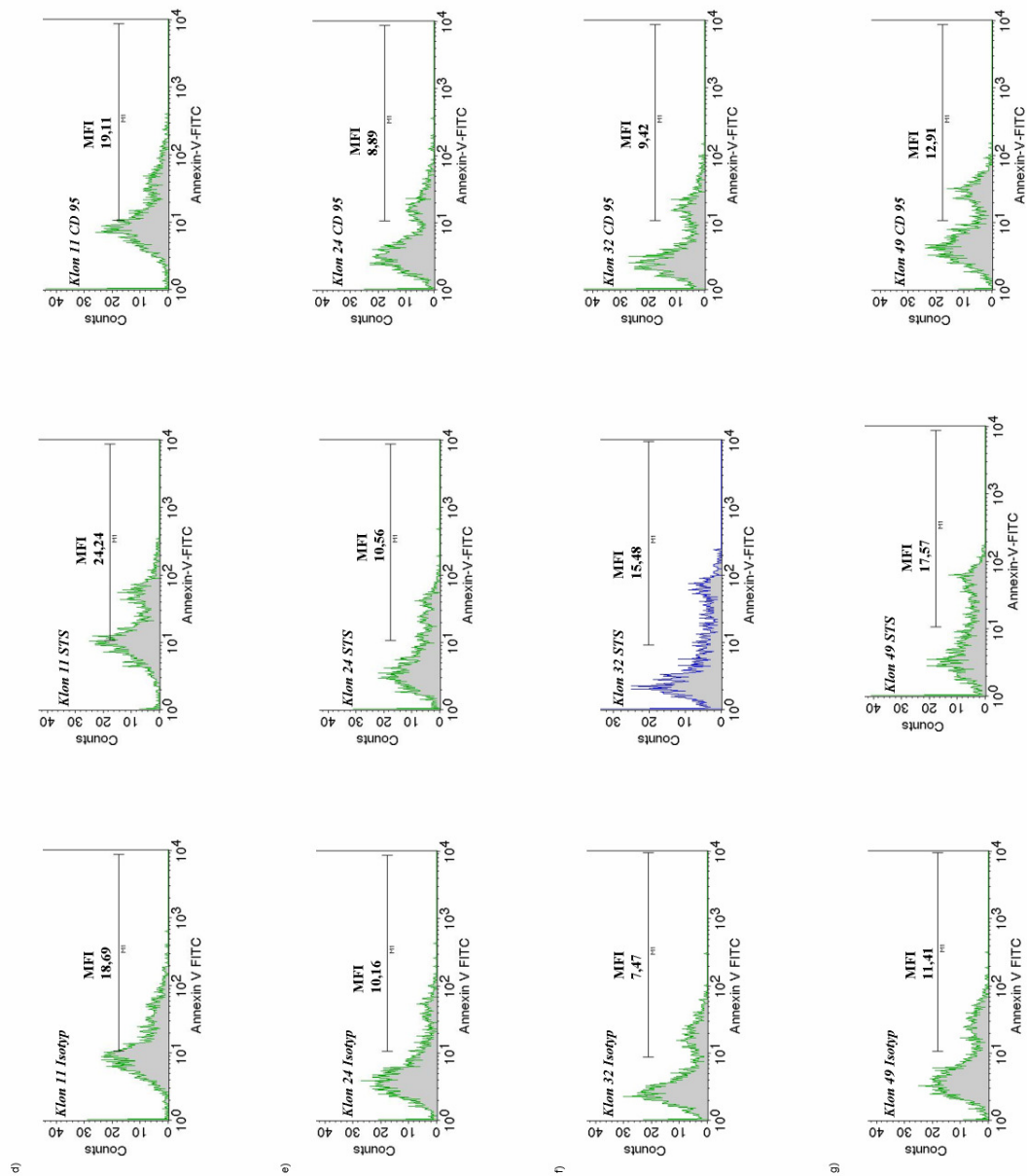


Abbildung 6b (d-g): Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse (s. Tabelle 18 und Tabelle 19) als Histogramme (im Querformat von links nach rechts: Isotyp-Kontrolle, Staurosporin, α -CD-95-Antikörper). Dargestellt wurden die pSUPERneoSTAT6si-Zellen d) 11, e) 24, f) 32 und g) 49) sowie vergleichend eine Auswahl von pSUPERneo-Zellen (Kontrollen) in Abbildung 6a). Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) in Prozent als Zahl innerhalb der Histogramme.

Im Einzelnen ergaben sich in der FACS-Analyse folgende Ergebnisse für die Behandlung der cHL-Zellen der Zelllinie L428 mit STS (s. Tabelle 18):

Es konnte mit Ausnahme von Klon 32 kein relevanter Unterschied in der Reaktion auf die STS-Behandlung zwischen den stabil mit pSUPERneoSTAT6si transfizierten Zellen und den mit pSUPERneo stabil transfizierten Zellen festgestellt werden. Die pSUPERneo-Zellen 70, 72 sowie 73 zeigten keine Reaktion auf die STS-Behandlung, es ergab sich ein relativ einheitliches Bild mit einer Δ MFI zwischen 0,3 bis 1,94 für Annexin. Der STAT6si-Klon 24 lag mit einer Δ MFI von 0,4 für Annexin im Bereich der Kontrollklone.

In den anderen STAT6si-Zellklonen zeigte sich nach der Behandlung mit STS eine etwas stärkere Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität mit einer Δ MFI zwischen 5,55 (Klon11) bis 8,01 (Klon 32) für Annexin im Vergleich zu den pSUPERneo-Zellen.

Tabelle 18: cHL-Zellen mit gehemmter STAT6-Expression zeigen eine leichte Tendenz zur Sensitivierung gegenüber Staurosporin-vermittelter Apoptose.

Zellklon		DMSO MFI	STS MFI	Δ MFI	MFI (STS) / MFI (DMSO)
70	Kontrolle	6,77	7,07	0,3	1,04
72	Kontrolle	5,17	7,07	1,9	1,37
73	Kontrolle	5,36	7,3	1,94	1,36
11	STAT6↓	18,69	24,24	5,55	1,30
24	STAT6 ↓↓	10,16	10,56	0,4	1,04
32	STAT6 ↓↓	7,47	15,48	8,01	2,07
49	STAT6 ↓	11,41	17,57	6,16	1,54

FACS-Analyse der L428-Zellen nach 24h Inkubation mit STS (1 μ M) gegenüber der DMSO-behandelten Kontrolle. Verglichen wurden die pSUPERneoSTAT6si-Zellen (Klone 11, 24, 32 sowie 49) mit den pSUPERneo-Zellen (Klone 70, 72 sowie 73). Zur Quantifizierung der Apoptoseinduktion wurden die Zellen mittels Färbung mit Annexin-V-FITC analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sowie die Differenzen Δ MFI. Die Berechnung von Δ MFI ergab sich nach folgender Formel: Δ MFI= MFI (STS)-MFI (DMSO). Als signifikant wurde eine mehr als zweifache Abweichung der MFI nach STS-Behandlung von der MFI der Kontrollen (DMSO) gewertet. Die Pfeile symbolisieren den Grad der STAT6-Reduktion (↓: leichte Reduktion, ↓↓ mittelgradige Reduktion, ↓↓↓: starke Reduktion), der sich aus den parallel durchgeführten Western-Blot-Analysen ergeben hat (s. Kapitel 3.6.).

Für den Klon 32 war mit einer MFI von 15,48 das Kriterium einer zweifachen Abweichung im Vergleich zu der MFI der DMSO-Kontrolle (MFI 7,47) erfüllt. Allerdings zeigte sich insgesamt keine sehr deutliche Sensitivierung der STAT6si-Klone gegenüber STS-vermittelter Apoptose. Die Werte für die MFI nach STS-Behandlung blieben für die restlichen STAT6si-Klone unter einer zweifachen Abweichung im Vergleich zu der MFI ohne STS-Behandlung (DMSO-Kontrollen). Eine Tendenz zur Sensitivierung der pSUPERneoSTAT6si-Zellen gegenüber STS-vermittelter Apoptose lässt sich aber festhalten. Die Aussagekraft der vorliegenden Daten ist jedoch aufgrund der limitierten Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen eingeschränkt.

Für die Behandlung der L428-Hodgkinzellen mit dem agonistischen α -CD95 ergaben sich folgende Ergebnisse in der FACS-Analyse (s. [Tabelle 19](#)):

Tabelle 19: cHL-Zellen mit gehemmter STAT6-Expression zeigen keine Sensitivierung gegenüber CD95/Fas/Apo-1-vermittelter Apoptose.

Zellklon	Isotyp	MFI	α -CD95 MFI	Δ MFI	MFI (STS) / MFI (Isotyp)
70	Kontrolle	6,77	5,44	-1,33	0,80
72	Kontrolle	5,17	5,76	0,59	1,11
73	Kontrolle	5,36	5,44	0,08	1,01
11	STAT6↓	18,69	19,11	0,42	1,02
24	STAT6↓↓	10,16	8,89	-1,27	0,88
32	STAT6↓↓	7,47	9,42	1,95	1,26
49	STAT6↓	11,41	12,91	1,5	1,13

FACS-Analyse der L428-Zellen nach Zugabe von α -CD95-Antikörper (100 ng/ml) im Vergleich zur Isotypkontrolle. Verglichen wurden die pSUPERneoSTAT6si-Zellen (Klone 11, 24, 32 sowie 49) mit den pSUPERneo-Zellen (Klone 70, 72 sowie 73). Zur Quantifizierung der Apoptoseinduktion wurden die Zellen mittels Färbung mit Annexin-V-FITC analysiert. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sowie die Differenzen Δ MFI. Die Berechnung von Δ MFI ergab sich nach folgender Formel: Δ MFI = MFI (α -CD95) - MFI (Isotyp-Kontrolle). Als signifikant wurde eine mehr als zweifache Abweichung der MFI nach α -CD95-Behandlung von der MFI der Kontrollen (Isotyp) gewertet. Die Pfeile symbolisieren den Grad der STAT6-Reduktion (↓: leichte Reduktion, ↓↓ mittelgradige Reduktion, ↓↓↓: starke Reduktion), der sich aus den parallel durchgeführten Western-Blot-Analysen ergeben hat (s. Kapitel 3.6.).

Nach der Behandlung der cHL-Zellen mit α -CD95-Antikörper zeigte sich in den pSUPERneoSTAT6si-Zellen keine stärkere Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensitäten für Annexin als in den pSUPERneo-Zellen. Hierbei lagen die Δ MFI der pSUPERneo-Zellen im Bereich von -1,33 bis 0,59, während die Δ MFI der pSUPERneoSTAT6si-Zellen zwischen -1,27 (Klon24) bis 1,95 (Klon 32) streuten. Es ließ sich demzufolge keine Sensitivierung der L428-Zellen mit gehemmter STAT6-Expression gegenüber CD95-vermittelter Apoptose feststellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die STAT6si-Klone bereits ohne STS- oder α -CD95-Behandlung eine höhere Spontanapoptoserate aufwiesen als die Kontrollklone. Deutlich wird dies insbesondere bei der Betrachtung der Histogramme (s. [Abbildung 6](#)).

Die Hemmung von STAT6 in den L428-cHL-Zellen lässt eine Tendenz der Sensitivierung gegenüber STS-vermittelter Apoptose erkennen. Lediglich für den pSUPERneoSTAT6si-Klon 32 konnte definitionsgemäß eine Sensitivierung im Sinne einer mehr als zweifachen Abweichung der MFI nach STS- oder α -CD95-Behandlung von der MFI der Kontrollen (DMSO oder Isotyp) belegt werden.

Die Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose blieb trotz gehemmter STAT6-Expression in den cHL-Zellen bestehen. Die Unterschiede innerhalb der pSUPERneoSTAT6si-Zellen im Vergleich zu den pSUPERneo-Zellen fielen dabei geringer aus als bei den mit STS-behandelten cHL-Zellen.

Insgesamt sind die beobachteten Effekte auf die Apoptoseneigung als vorhandene Tendenz und biologisch nicht als dominanter Effekt zu bewerten. Den beobachteten deutlichen Effekt des Fehlens von STAT6 auf das Wachstumsverhalten der untersuchten pSUPERneoSTAT6si-Zellklone (s. Kapitel 3.3) lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht auf eine Sensitivierung gegenüber den untersuchten proapoptotischen Stimuli zurückführen.

3.5. Effekt der Hemmung von STAT6 auf die Expression von B-Zell-typischen Oberflächenmarkern in cHL-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fehlen der B-Zell-typischen Genexpression in H/RS-Zellen (Schwering *et al.*, 2003) zum Anlass genommen, den möglichen Einfluss einer Hemmung von STAT6 in cHL-Zellen auf das Expressionsmuster ausgewählter B-Zell-spezifischer Oberflächenmarker zu analysieren (s. Kapitel 1.1.3.). Es sollte geprüft werden, ob eine per-

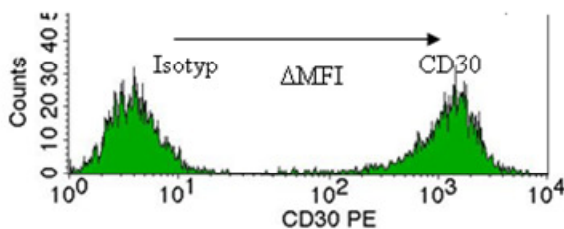
manente Aktivierung von STAT6 ursächlich für das Fehlen der B-Zellidentität verantwortlich sein könnte.

Eine Auswahl von pSUPERneoSTAT6si-Zellen (Klone 11, 24 sowie 49) wurde im Vergleich mit den pSUPERneo-Zellen (Klone 70 sowie 72) hinsichtlich der Expression von ausgewählten Oberflächenmarkern analysiert. Für die vorliegende Arbeit sollte die Oberflächenexpression von CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD40, CD45 sowie CD54 untersucht werden. Zusätzlich wurde ergänzend die Expression von CD95/ Fas/ Apo-1 analysiert.

Hierfür wurden die cHL-Zellen mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und die Fluoreszenz anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gemessen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sowie die Differenzen (Δ MFI) aus der MFI der ausgewählten Zelloberflächenmarker mit der MFI der jeweiligen IgG-Isotyp-Kontrolle. Zur Veranschaulichung dienen die Histogramme aus [Abbildung 7](#).

Als aussagekräftige Abweichung in dem Expressionsgrad wurde eine mehr als zweifache Abweichung in der MFI im Vergleich zu den Kontrollantikörpern gewertet.

a)



b)

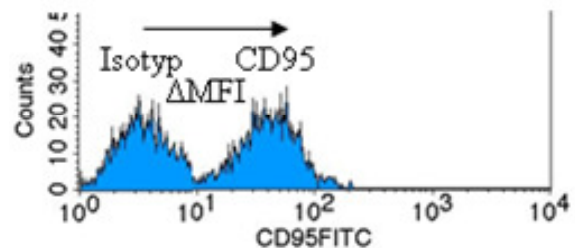


Abbildung 7: FACS-Analyse der Expression von Zelloberflächenmarkern in L428-cHL-Zellen. Anhand des pSUPERneoSTAT6si-Klones 49 sind beispielhaft die Histogramme der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der a) CD30-PE Färbung sowie der b) CD95-FITC Färbung im Vergleich zur jeweiligen Isotyp-Kontrolle dargestellt. Die Berechnung von Δ MFI für Tabelle 20 ergab sich nach folgender Formel: Δ MFI= MFI (analysierter Zelloberflächenmarker)-MFI (Isotyp-Kontrolle).

Bei den pSUPERneoSTAT6si-Zellen zeigte allerdings der Zellklon 11 morphologische Besonderheiten in der durchflusszytometrischen Analyse, ein abweichendes Verhalten im Vorwärts- und Seitwärts-Scatter. Er unterschied sich damit nicht nur von den pSUPERneo-Zellen, sondern auch von den anderen pSUPERneoSTAT6si-Klonen (s. [Abbildung 8](#)).

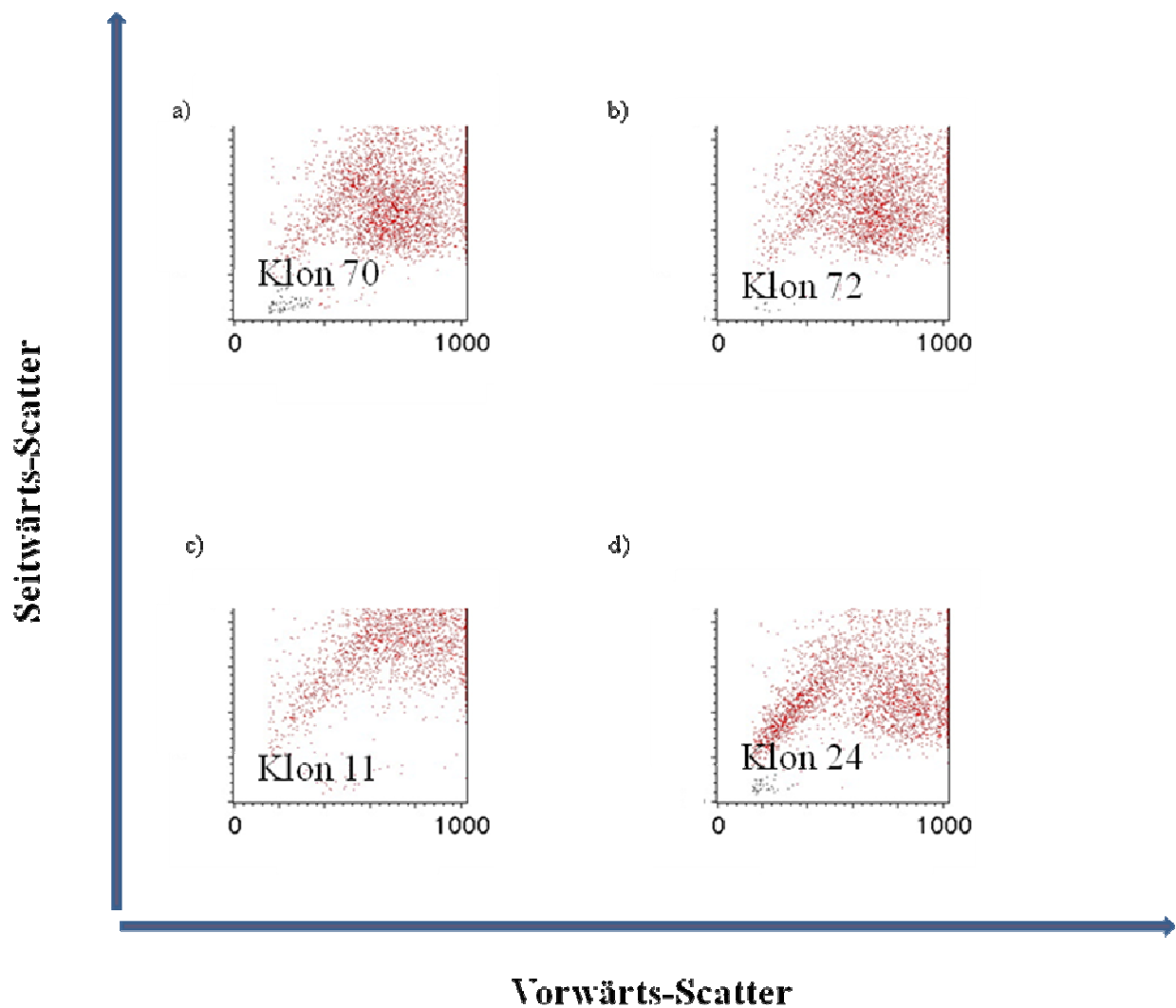


Abbildung 8: Der STAT6si-Klon 11 zeigte ein abweichendes morphologisches Verhalten im Vorwärts- sowie Seitwärts-Scatter bei der FACS-Analyse. Dargestellt wurden c) der STAT6si-Klon 11 (pSUPERneoSTAT6si) im Vergleich zu dem d) Klon 24 (pSUPERneoSTAT6si) sowie zu den pSUPERneo-Klonen a) 70 und b) 72.

In der FACS-Analyse ergaben sich folgende Ergebnisse für die Expression der untersuchten Zelloberflächenmarkern in den pSUPERneoSTAT6si-Zellen gegenüber den mit pSUPERneo-transfizierten Kontrollen (s. Tabelle 20):

Tabelle 20: Expression von Zelloberflächenmarkern in L428-cHL-Zellen

	Klon 70 ΔMFI	Klon 72 ΔMFI	Klon 11 ΔMFI	Klon 24 ΔMFI	Klon 49 ΔMFI
CD19	-0,28	0,63	0,43	1	0,85
CD20	3,18	1,65	2,2	3,64	1,66
CD21	2,45	2,27	2,59	3,78	0,84
CD22	0,31	0,57	8,57	0,37	0,82
CD25	1,09	0,9	4,42	1,41	2,5
CD30	1985,54	1909,3	2302,23	1585,08	1347,75
CD40	69,75	71,04	108,03	44,74	62,4
CD45	0,4	0,26	0,47	0,93	0,85
CD54	387,57	306	349,82	485,24	289,44
CD95	55,04	62,21	118,87	60,56	40,49

FACS-Analyse der Expression von Zelloberflächenmarkern. Mit pSUPERneoSTAT6si-transfizierte Zellklone der Zelllinie L428 (Klone 49, 11 sowie 24) wurden im Vergleich zu den mit pSUPERneo-transfizierten Kontrollen (Klone 70 sowie 72) analysiert. Der jeweilige Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:10 eingesetzt, bei einem Färbavolumen von 50 μ l. Die Inkubationzeit erfolgte über 10 min auf Eis und unter Lichtabschluss. Propidium-Iodid diente als Marker für tote Zellen. Die Berechnung von Δ MFI ergab sich nach folgender Formel: Δ MFI= MFI (analysierter Zelloberflächenmarker)-MFI (Isotyp-Kontrolle).

Es ließen sich insgesamt keine systematischen Unterschiede bei der Expression der untersuchten Zelloberflächenmarker feststellen. Die pSUPERneoSTAT6si-Zellen zeigten ebenso wie die pSUPERneo-Zellen eine Expression der Zelloberflächenmarker CD30, CD40, CD54 sowie CD95/Fas/Apo-1. Wie bereits in anderen Publikationen beschrieben zeigten die cHL-Zellen ein Defizit in der B-Zell-typischen Genexpression. Eine Expression der Zelloberflächenmarker CD19, CD20, CD21, CD22, CD25 sowie CD45 war kaum nachweisbar.

Betreffend die mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Zelloberflächenmarker zeigte der STAT6si-Klon 11 ein leicht abweichendes Verhalten gegenüber den anderen Zellklonen. Er wies verglichen mit den anderen Zellklonen den jeweils höchsten Wert Δ MFI für die Zelloberflächenmarker CD22, CD25, CD30, CD40 sowie CD95 auf.

Wertete man nun eine mehr als zweifache Abweichung in der MFI im Vergleich zu den Kontrollantikörpern als aussagekräftige Abweichung in dem Expressionsgrad, bleiben lediglich für CD22 mit einer Δ MFI von 8,57 gegenüber den Kontrollen (Klon 70 Δ MFI: 0,31, Klon 72 Δ MFI: 0,57) sowie für CD25 (Δ MFI: 4,42) gegenüber den Kontrollklonen (Klon 70 Δ MFI: 1,09, Klon 72 Δ MFI: 0,9), eine erhöhte Expression bestehen. Die Werte für die Expression von CD95 waren mit einer Δ MFI von 118,87 gegenüber den Kontrollklonen (Klon 70 Δ MFI: 55,04, Klon 72 Δ MFI: 62,21) grenzwertig erhöht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich ein sehr heterogenes Bild hinsichtlich der Expression der analysierten Zelloberflächenmarker bei allen Zellklonen ergab, was darauf schließen lässt, dass eine Hemmung von STAT6 zu keiner Wiederherstellung der B-Zell-spezifischen Expression von Zelloberflächenmarkern in cHL-Zellen führt. Die Diagramme in Abbildung 9 dienen nochmals der Veranschaulichung der gewonnenen Ergebnisse aus Tabelle 20. Dargestellt ist je ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Analysen.

Exemplarisch wurde die Expression der Oberflächenmarker CD30, CD40 sowie CD45 dargestellt. Auch die Expression von CD95/Fas/Apo-1 veränderte sich nicht durch die Herunterregulation von STAT6 in den pSUPERneoSTAT6si-Klonen.

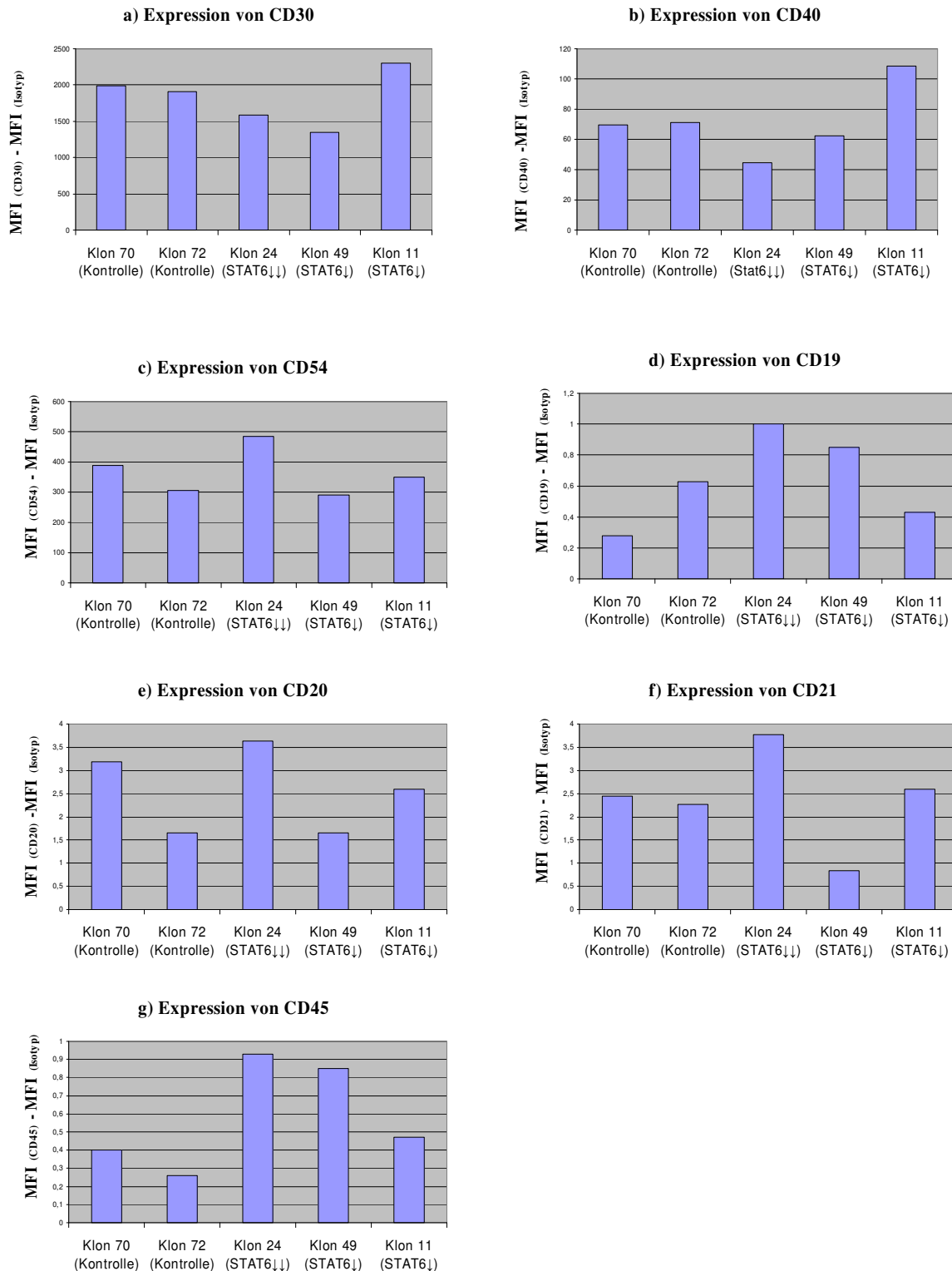


Abbildung 9 (a-g): Eine Hemmung der STAT6-Expression führt in cHL-Zellen nicht zu einer durchgängigen Veränderung der B-Zell-spezifischen Expression von Zelloberflächenmarkern. Die Diagramme zeigen die Werte für die Δ MFI der im cHL exprimierten Zelloberflächenmarker a) CD30, b) CD40, c) 54 sowie der kaum exprimierten Zelloberflächenmarker d) CD 19, e) CD 20, f) CD 21 und g) CD45. Die mit pSUPERneoSTAT6si-transfizierten L428-Zellklone (Klone 24, 49 sowie 11) wurden im Vergleich zu den mit pSUPERneo-transfizierten L428-Kontrollen (Klone 70 sowie 72) analysiert. Eine mehr als zweifache Abweichung in der MFI im Vergleich zu den Kontrollantikörpern konnte nicht nachgewiesen werden. Dargestellt ist je ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Analysen

Lediglich für den Klon 11 zeigte sich eine Steigerung der Expression von CD22 sowie CD25 im Vergleich zu den anderen untersuchten Klonen. Die Aussagekraft der Ergebnisse für den Klon 11 wurde aber durch sein morphologisch anderes Aussehen in der FACS-Analyse eingeschränkt. Insgesamt ist der Klon 11 nicht als repräsentativ für die pSUPERneoSTAT6si-Klone zu betrachten. Die Diagramme in [Abbildung 10](#) verdeutlichen abschließend nochmals das teilweise abweichende Expressionsmuster von Oberflächenmarkern für den Klon 11 im Vergleich zu den anderen L428-Zellklonen.

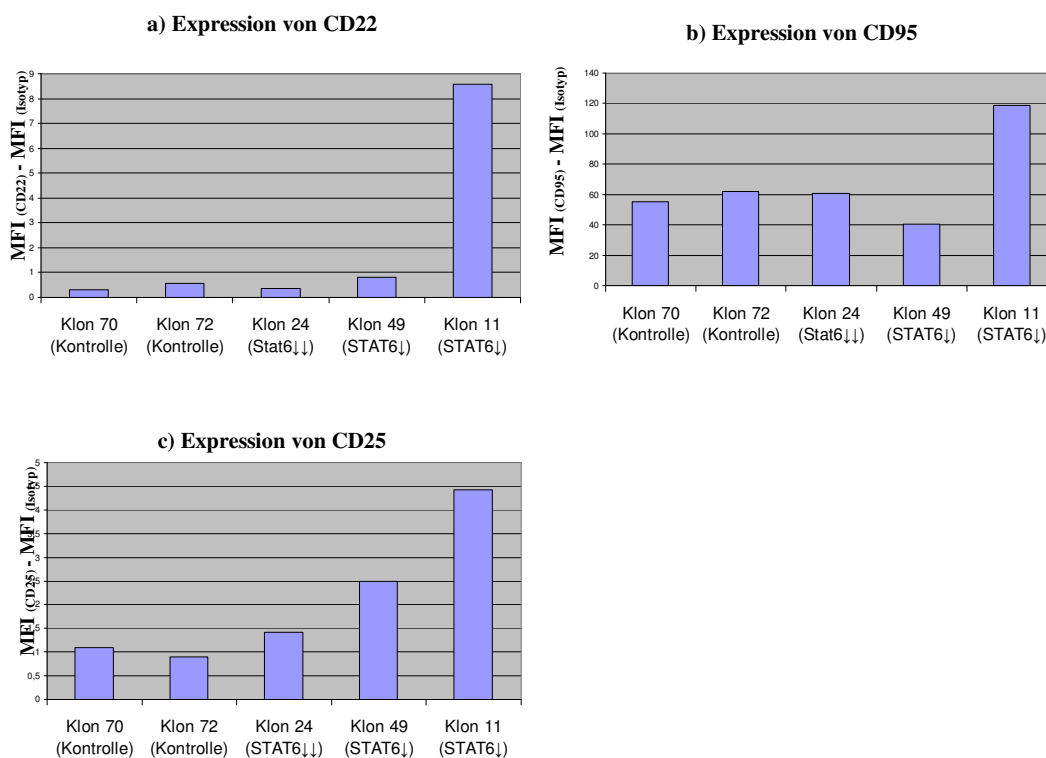


Abbildung 10: Der STAT6si Klon 11 zeigt ein teilweise abweichendes Expressionsmuster der analysierten Zelloberflächenmarker. Für den Klon 11 ergab sich eine signifikante Steigerung der Expression von CD22 sowie CD25 im Sinne einer mehr als zweifachen Abweichung in der MFI im Vergleich zu der IgG-Isotyp-Kontrolle. Die Diagramme zeigen die Werte für die Δ MFI der Zelloberflächenmarker a) CD22, b) CD95 sowie c) CD25 für die unterschiedlichen L428-Zellklone. Die mit pSUPERneoSTAT6si-transfizierten L428-Zellen mit gehemmter STAT6-Expression (Klone 24, 49 sowie 11) wurden im Vergleich zu den mit pSUPERneo-transfizierten L428-Kontrollen (Klone 70 sowie 72) analysiert. Dargestellt ist je ein repräsentativer Versuch von drei unabhängigen Analysen.

3.6. Expression von STAT6 in den STAT6si-transfizierten cHL-Zellen

Die pSUPERneoSTAT6si-transfizierten L428-Klone wurden im Vergleich mit den pSUPERneo-transfizierten Kontrollen hinsichtlich der Expression von STAT6 im Western-Blot analysiert. Berücksichtigt wurden Zell-Lysate unterschiedlicher Zellpassagedauer der STAT6si-Klone, um einem möglichen Einfluss auf die Proteinexpression Rechnung zu tragen. Untersucht wurden Zellklone früher Zellpassage von 3 Monaten im Vergleich zu Zellklonen mit späterer Zellpassage von 6,5 Monaten bzw. 7,5 Monaten. Eine zweite Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen β -Aktin diente dem Abgleich des Proteingehaltes in den Spuren. In Abbildung 9 wurde folgendes Expressionsmuster nachgewiesen:

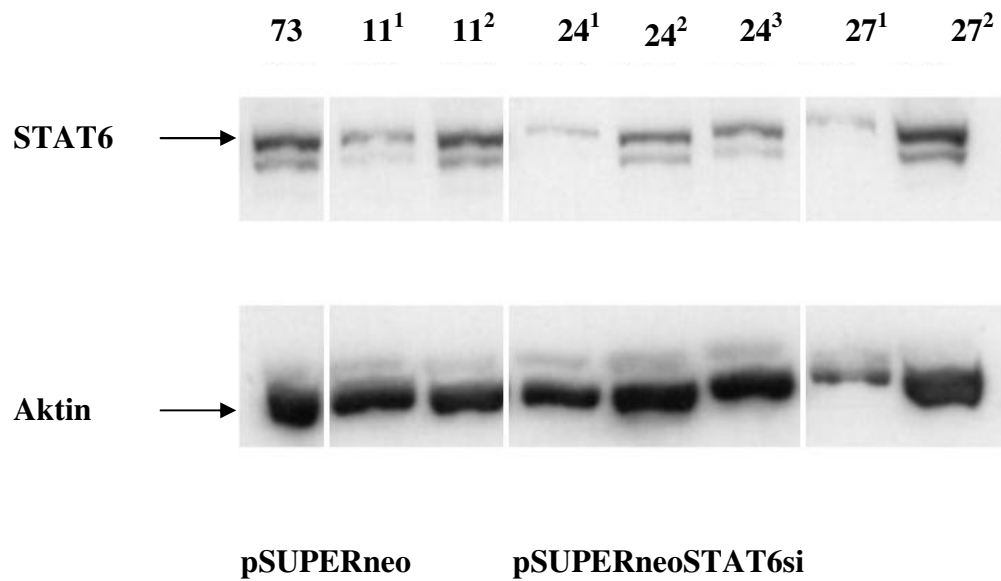
STAT6 wurde in allen Zellklonen in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. Auffallend waren Unterschiede im Grad der STAT6-Expression zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Zell-Lysaten der pSUPERneoSTAT6si-Klone.

Betrachtet wurden zu allererst isoliert die Zell-Lysate kürzerer Zellpassagezeit (3 Monate). Die Aktinfärbung diente als interner Standard und ermöglichte erst einen Vergleich der Proben untereinander. Es ließ sich ein überzeugender Effekt im Sinne einer Reduktion des Levels der STAT6-Expression für die Klone 24¹ sowie 32¹ im Vergleich zu den Kontrollklonen 70 und 73 zeigen. Für die Klone 11¹, 27¹ sowie 49¹ wurde die Aussagekraft der Western-Blot-Analysen durch die teils etwas heterogene Expression von β -Aktin als Zeichen eines ungleichmäßigen Proteingehaltes in den Spuren eingeschränkt. Insbesondere für die Klone 49¹ sowie 11¹ ließ aber sich tendenziell eine Reduktion der STAT6-Expression annehmen.

Im Vergleich der pSUPERneoSTAT6si-Klone untereinander fielen deutliche Unterschiede im Grad der STAT6-Expression zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Zell-Lysaten auf. Zeigten sich die Klone 32¹, 24¹ früher Passage deutlich in ihrer STAT6-Expression im Vergleich zu den Kontrollen reduziert, so war dieser Effekt bei den pSUPERneoSTAT6si-Zellen späterer Passagen (Klone 32², 24² sowie 24³) nicht mehr nachweisbar.

Ein Unterschied in der STAT6-Expression dieser pSUPERneoSTAT6si-Klone späterer Passagen im Vergleich zu den pSUPERneo-Kontrollen (Klone 70 sowie 73) bestand nicht mehr. Eine ebenfalls den Kontrollen vergleichbare STAT6-Expression zeigten die Klone 27² sowie 11². Der Klon 49² wies trotz längerer Passagedauer immer noch eine verminderte STAT6-Expression auf.

a)



b)

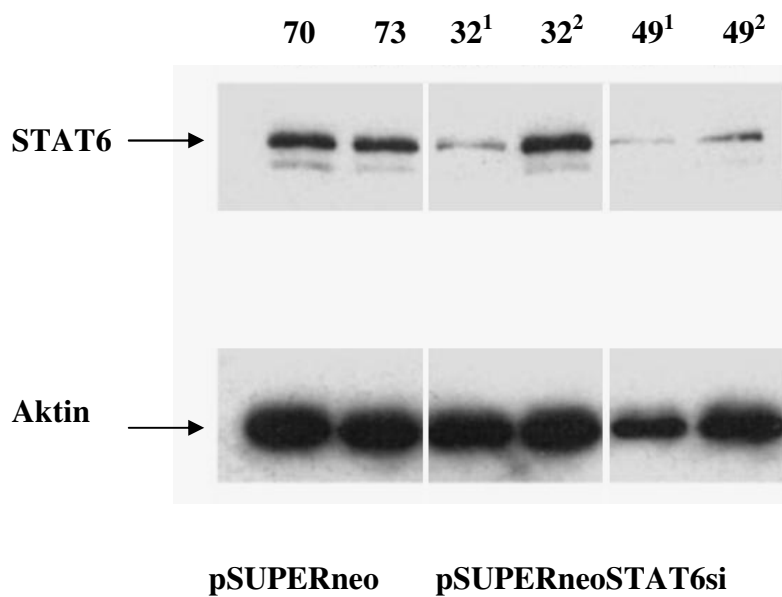


Abbildung 9: Expression von STAT6 in den pSUPERneo-transfizierten Zellklonen: a) Klone 11, 24 und 27, b) Klone 32 und 49 sowie in den pSUPERneo-transfizierten Kontrollklonen c) Klone 70 und 73). Zell-Lysate unterschiedlicher Zellpassagedauer wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen STAT6 untersucht. Verdeutlicht wurde dies bei den betreffenden Klonen durch hochgestellte Zahlen (¹ frühe Passage: 3 Monate, ² späte Passage: 3 Monate + 3,5 Monate, ³ späte Passage: 3 Monate + 4,5 Monate). β -Aktin diente dem Abgleich des Proteingehaltes in den Spuren.

Um die Aussagekraft der STAT6-Expressionsstärke in den pSUPERneoSTAT6si- transfizierten L428-Klonen sowie den pSUPERneo transfizierten L428-Kontrollklonen zu vertiefen, wurde eine Titrationsreihe durchgeführt. Dabei wurden die verwendeten Zellklone in zwei Stufen verdünnt. Verglichen wurde der Kontrollklon 72 mit einem pSUPERneoSTAT6si-Klon früher Zellpassage (L428 Klon 32), der sich im Vorversuch in der STAT6-Expression reduziert gezeigt hatte. Es ergab sich folgendes Expressionsmuster in Abbildung 10:

Im Vergleich der Titrationsreihe des pSUPERneo-Kontrollklons 72 zeigte der pSUPERneoSTAT6si-Klon 32 eine deutlich herabgesetzte Expression von STAT6.

Vergleicht man ergänzend die Ergebnisse des Proliferations-Assays (s. Kapitel 3.3.) mit dem Grad der STAT6-Expression, so zeigt sich, dass obwohl die Dosis von STAT6 gering reduzierbar war, ein dominanter Hemmeffekt für die Proliferation der Zellen bestand. Unabhängig von dem Level der STAT6-Expression in den Western-Blot-Analysen waren alle untersuchten pSUPERneoSTAT6si-Zellklone deutlich in ihrem Wachstum gehemmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die identifizierten L428-pSUPERneoSTAT6si-Zellen in früher Passage durch eine deutlich geringere Expression von STAT6 als die pSUPERneo-Zellen charakterisiert waren. Bei den pSUPERneoSTAT6si-Zellen späterer Passagen näherte sich das STAT6-Expressionsmuster dem der pSUPERneo-Kontrollklone an. Allerdings bestand unabhängig von dem Level der STAT6-Expression in den Western-Blot-Analysen ein dominanter Hemmeffekt auf die Proliferation der pSUPERneoSTAT6si-Zellen im Vergleich zu den pSUPERneo-Kontrollen (s. Kapitel 3.3.).

Möglicherweise wurden die L428-pSUPERneoSTAT6si-Zellen zu früh einer funktionellen Analyse unterworfen, ohne dass die Zellen reine Klone darstellten und von Zellen überwachsen wurden, die nur G418 resistent waren. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass zusätzliche Veränderungen der L428-pSUPERneoSTAT6si-Zellen vorlagen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden.

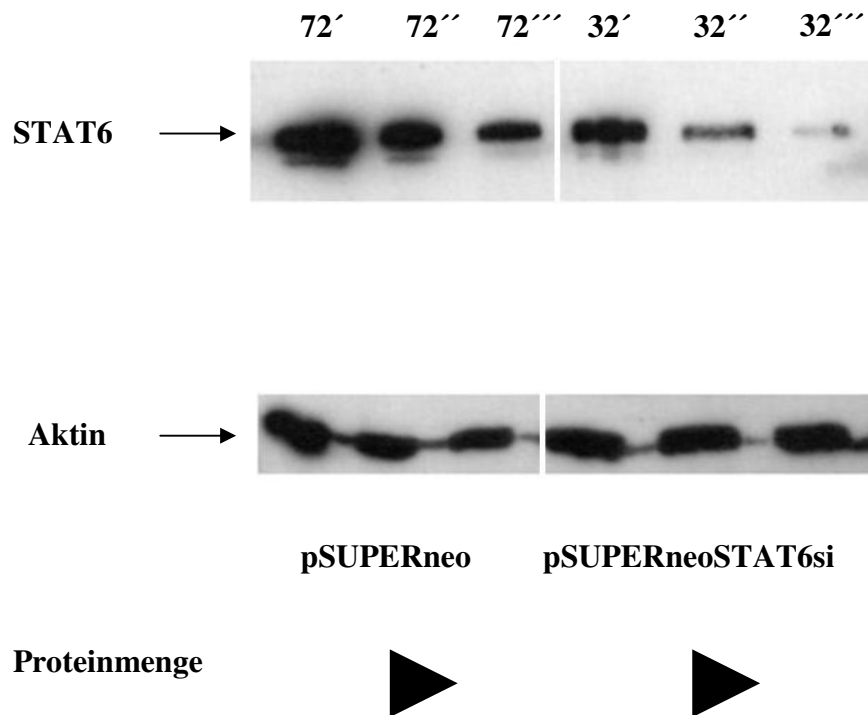


Abbildung 10: Titrationsreihe des pSUPERneoSTAT6si-transfizierten Zellklons (L428 Klon 32) sowie einem pSUPERneo-transfizierten Kontrollklon (L428 Klon 72). Zell-Lysate wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen STAT6 untersucht. Die verwendeten Zellklone wurden in verschiedenen Proteingehalten eingesetzt (Proteingehalt der Spuren: '30 µg, ''10µg, ''' 3,3 µg). Eine zweite Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen β-Aktin diente dem Abgleich des Proteingehaltes in den Spuren. Bei dem Klon 32 wurde Zell-Lysat einer frühen Passage (3 Monate) verwendet.

4. Diskussion

In H/RS-Zellen konnte eine konstitutive Aktivierung verschiedener Signalkaskaden nachgewiesen werden, darunter der in dieser Arbeit untersuchte Jak/STAT-Signalweg (Cochet *et al.*, 2006; Holtick *et al.*, 2005; Kapp *et al.*, 1999; Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b). Für die STAT-Familienmitglieder STAT3 und STAT6 konnte eine permanente Aktivierung im cHL gezeigt werden (Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 b). Für STAT3, STAT6 und bedingt auch STAT5 ließ sich mittlerweile eine essentielle Rolle für die Proliferation der cHL-Zellen zeigen (Baus und Pfitzner, 2006; Kube *et al.*, 2001; Holtick *et al.*, 2005; Skinnider *et al.*, 2002 b; Weniger *et al.*, 2006). Es war daher von besonderem Interesse, den Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges und der Pathogenese des cHL besser verstehen zu lernen.

Ziel aller Forschungsbemühungen bleibt es, neue und effizientere Strategien in der Therapie des Hodgkin-Lymphoms zu entwickeln, die auf dem Verständnis der molekularen Ursache der Erkrankung basieren. Insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien oder bei Rezidivkrankungen ist eine höhere bis gleichwertige Tumorstärke bei geringerer Begleitoxizität erstrebenswert. Inwieweit die Jak/STAT-Signalkaskade einen möglichen Angriffspunkt für zukünftige therapeutische Ansätze darstellt ist noch nicht vollständig geklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher mittels der Technik der RNA-Interferenz durch Inhibition von STAT6 in Hodgkin-Zelllinien die Bedeutung von STAT6 für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms näher zu untersuchen.

4.1. Die Methode der Nukleofektion ermöglicht die Transfektion der cHL-Zelllinien L591 und L1236

In dem methodischen Teil der vorliegenden Arbeit gelang es mit Hilfe der Methode der Nukleofektion als optimierte Variante der Elektroporation eine neue Transfektionsmöglichkeit für die untersuchten cHL-Zelllinien zu etablieren. Insbesondere die cHL-Zelllinien L1236 sowie L591 waren zu Beginn dieser Arbeit mit den herkömmlichen Elektroporationsmethoden nicht zu transfizieren.

In dieser Arbeit wurden für den jeweiligen Zelltyp eine Vielzahl von Transfektionspuffern und Elektroporationsprogrammen kombiniert, um maximale Transfektionseffizienzen zu erreichen. Die Ergebnisse der Optimierungsversuche in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass mittels der optimierten Methode der Nukleofektion für die schwer zu transfizierenden Zelllinien L591 (Puffer V, Programm A-23) sowie L1236 (Puffer R, Programm A-23) eine Möglichkeit des Einbringens von Fremd-DNA besteht. Im Vergleich zu den Transfektionseffizienzen der Elektroporation zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Nukleofektion für die Zelllinien L591 sowie L1236 (vgl. Tabelle 15, 16 und 17). Die Zelllinie L1236 reagierte insgesamt empfindlicher als die Zelllinie L591 sowohl auf Nukleofektion als auch Elektroporation bei einem hohen Anteils toter Zellen.

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Versuchsreihen lagen noch keine Angaben des Herstellers in Bezug auf die untersuchten cHL-Zelllinien vor. Der Hersteller Amaxa empfiehlt mittlerweile unter anderem auch die Verwendung von Puffer V in Kombination mit Programm T-01 für die Zelllinie L1236.

Die gewonnenen Ergebnisse dienen unserer Arbeitsgruppe als Grundlage für weiterführende Experimente mit Hodgkin-Zelllinien. Nils Schoof analysierte in seiner Arbeit den Effekt der Inhibition des Hitzeschockproteins HSP90 auf die STAT-Aktivierung in Hodgkin-Zelllinien (Schoof, 2008; Schoof *et al.*, 2009).

4.2. Die Bedeutung von STAT6 für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zu der noch unzureichend erforschten Frage geleistet werden, welche Bedeutung STAT6 für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms hat. Die im methodischen Teil dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse sollten genutzt werden durch Nukleofektion von spezifisch gegen STAT6 gerichteter shRNA eine gezielte Hemmung der Expression von STAT6 in Hodgkin-Zelllinien zu erreichen. Die STAT6-defizienten Zellklone sollten im Anschluss in verschiedenen Versuchen bezüglich der Zellverdopplungszeit, der Apoptoseeigung und der Expression B-Zell-spezifischer Oberflächenmarker analysiert werden. Dafür erfolgte die Transfektion von cHL-Zellen der Zelllinien L428, L591 sowie L1236

mit einem STAT6si-exprimierenden Vektor. Im Anschluss daran gelang es lediglich für die Zelllinie L428 eine repräsentative Auswahl an STAT6-defizienten Zellklonen zu etablieren, die für folgende Versuche und funktionelle Charakterisierung zur Verfügung standen. Weder für die Zelllinie L591 noch L1236 ließen sich entsprechende Ergebnisse erzielen. In Bezug auf die Zelllinie L1236 fiel auf, dass keine STAT6-defizienten Klone wohl aber Kontrollklone gewonnen werden konnten als möglichen indirekten Hinweis auf die essentielle Rolle von STAT6 in dieser Zelllinie.

Ähnliche Effekte konnten bereits in anderen Arbeiten für die Transfektion der Zelllinie L1236 mit pSUPERneoSTAT3si beschrieben werden (Holtick *et al.*, 2005) sowie für die Analyse des NF- κ B-Signalweges im cHL (Bargou *et al.*, 1997). Dieser Befund ist als Hinweis zu deuten, dass auch STAT6 direkt in die Zellproliferation und Überleben der L1236-Zellen involviert sein könnte. Für die Zelllinie L591 konnten weder Kontrollklone noch STAT6-defiziente Zellklone gewonnen werden. Insgesamt konnten dementsprechend weitere Funktionsanalysen lediglich mit der Zelllinie L428 durchgeführt werden.

In Anknüpfung an diese Ergebnisse denkbar wäre es in Anbetracht der hohen STAT6-Expression in den Hodgkin-Zelllinien den Versuch zu unternehmen, durch Wiederholung der Nukleofektion die Effizienz der Methode weiter zu erhöhen und so vielleicht auch für diese Zelllinien STAT6-defiziente Klone zu gewinnen oder aber durch Transfektion von siRNA ohne klonale Selektion die Wirkung von STAT6 zu untersuchen. Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeiten wurden solche Analysen von N. Schoof in der Arbeitsgruppe durchgeführt und in seiner Promotionsschrift dargelegt (Schoof, 2008). Die Expression von STAT3 und STAT6 wurde von N. Schoof anders als in der vorliegenden Arbeit mittels transienter RNA-Interferenz in der cHL-Zelllinie L428 gehemmt. Hintergrund war die Möglichkeit, so einen klonalen Selektionsprozess zu umgehen, der mit sekundären Effekten Veränderungen neben der Hemmung von STAT6 und STAT3 verbunden sein könnte und damit eine Überlagerung der spezifischen Effekte der Reduktion dieser Transkriptionsfaktoren zu verhindern. Ein Nachteil in der Methodik liegt sicherlich darin, dass sich die siRNA-induzierten Effekte anders als bei den stabilen Klonen bereits nach einem kurzen Beobachtungszeitraum verringern, viele auf RNA-Interferenz basierende Effekte allerdings erst nach einigen Tagen analysiert werden können (Ngo *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde von N. Schoof die Transfektion der siRNAs 48h nach der ersten Transfektion wiederholt, um so die Effektivität zu steigern (Schoof, 2008).

Eine andere Möglichkeit wäre statt der Nukleofektion eine lentivirale Transduktion durchzuführen mit dem Ziel einer effektiveren Reduktion von STAT6 wie unter anderem durch Baus und Pfitzner erfolgt (Baus, 2005; Baus und Pfitzner, 2006).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde in der Literatur eine bedeutsame Rolle von STAT-Proteinen für das Wachstumsverhalten der malignen Zellen im Hodgkin-Lymphom beschrieben (Benekli *et al.*, 2003; Hirano *et al.*, 2000). Insbesondere für das STAT-Familienmitglied STAT3 finden sich Hinweise für eine wichtige Rolle als Regulator von Proliferation und Überleben von verschiedenen Tumorzelllinien und insbesondere auch in cHL-Zelllinien (Alas *et al.*, 2003; Amin *et al.*, 2004; Burke *et al.*, 2001; Catlett-Falcone *et al.* 1999; Holtick *et al.*, 2005; Kube *et al.*, 2001). Anders als für STAT3 existierten bei Beginn dieser Arbeit keine Veröffentlichungen, die den Zusammenhang zwischen der konstitutiven Aktivierung von STAT6 und dem deregulierten Wachstumsverhalten der cHL-Zellen belegen konnten. Die IL-13-Abhängigkeit der cHL-Zellen war als ein indirekter Hinweis auch auf die mögliche Bedeutung einer STAT6-Aktivierung für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms zu werten.

Es sollte daher durch den Einsatz spezifischer shRNA der Einfluss einer Hemmung von endogenem STAT6 auf die Zellverdopplungszeiten von cHL-Zellen *in vitro* untersucht werden.

Die verschiedenen pSUPERneoSTAT6si-Zellklone der Zelllinie L428 wurden im Vergleich zu den pSUPERneo-Kontrollen in Bezug auf ihre Zellverdopplungszeiten über 96h verglichen. Es konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch konstitutiv aktives STAT6 für die Proliferation der Zelllinie L428 notwendig sein kann (vgl. [Abbildung 5](#)). Die Arbeitsgruppe um Baus und Pfitzner bestätigten diese Ergebnisse einer Hemmung der Proliferation von cHL-Zellen durch spezifisch gegen STAT6 gerichtete siRNA. Sie konnten für die Hodgkin-Zelllinie L1236 nach lentiviraler Transduktion eine deutliche Hemmung des Wachstums von STAT6-shRNA-exprimierende Zellen zeigen, allerdings bei fehlendem Effekt auf die Proliferation der Zelllinien L428 und L540. Insgesamt erreichten sie eine effektive Reduktion der Menge an STAT6 in den Zelllinien L428 sowie L1236 durch Verwendung eines lentiviralen Expressionssystems. In der Zelllinie L591 konnte die Expression von STAT6 nicht vollständig inhibiert werden (Baus, 2005; Baus und Pfitzner, 2006).

Ergänzend konnte N. Schoof aus unserer Arbeitsgruppe in seiner Promotionsschrift eine Proliferationshemmung sowohl für die STAT6-siRNA-transfizierten Zellen als auch STAT3-siRNA-transfizierten Zellen nachweisen. Wie bereits erwähnt erfolgte abweichend zu dieser Arbeit eine transiente Transfektion der cHL-Zelllinie L428. Die Zellproliferation der siRNA-transfizierten cHL-Zelllinie L428 wurde zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens mittels

³H-Thymidin-Einbau gemessen. Ein additiver Effekt durch gleichzeitige Hemmung von STAT3 und STAT6 ließ sich nicht zeigen (Schoof, 2008). Die Analysen zur Proliferationshemmung wurden allerdings bereits 72h nach der zweiten transienten Transfektion durchgeführt, so dass die Effekte der Proliferationshemmung gering ausgeprägt waren (Schoof, 2008).

Durch Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion von cHL-Zellen mit dem shRNA-exprimierenden Vektor bei einigen der etablierten pSUPERneoSTAT6si-Zellklonen zu einer Abnahme der STAT6-Expression im Vergleich zu den pSUPERneo-Kontrollen führte (vgl. [Abbildung 11](#) und [12](#)). Möglicherweise lag die Ursache für die insgesamt eher geringgradig hemmbaren STAT6-Expression in der Reduktion des shRNA-Effektes über die Passagezeit. Denkbar wäre auch, dass keine reinen pSUPERneoSTAT6si vorlagen, die aufgrund des Wachstumsnachteils gegenüber pSUPERneo-Zellen überwachsen wurden.

Korreliert man die Ergebnisse der Zellverdopplungszeiten (vgl. [Abbildung 5](#)) mit dem Grad der Proteinmenge von STAT6 in den Western-Blot-Analysen (vgl. [Abbildung 11](#) und [12](#)), so zeigt sich ein dominanter Hemmeffekt für die Proliferation der Zellen trotz gering reduzierter Dosis von STAT6. Alle untersuchten Zellklone der L428 mit reduzierter STAT6-Proteinmenge waren deutlich in ihrem Proliferationsverhalten gehemmt, unabhängig von dem Ausmaß der Reduktion der Proteinmenge von STAT6 in den Western-Blot-Analysen.

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte von Holtick et al. 2005 für STAT3 ein von unseren Ergebnissen für STAT6 abweichendes Verhalten gezeigt werden. Für STAT3 zeigte sich eine dosisabhängige Beziehung zwischen der STAT3-Expression im Western-Blot und der Zellverdopplungszeit. Je stärker die Proteinmenge von STAT3 im Western-Blot reduziert war, desto stärker war auch das Proliferationsverhalten der Zellklone beeinträchtigt (Holtick *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den weiteren Western-Blot-Analysen für die untersuchten Zellklone der Zelllinie L428 eine Abhängigkeit der STAT6-Expression von der Dauer der Zellpassage. Nach längerer Kultivierungszeit von 6,5 Monaten kehrte die STAT6-Expression zum Ursprungsniveau zurück (vgl. [Abbildung 11](#)). Hier müsste in der Perspektive untersucht werden, ob die Zellen epigenetische Veränderungen aufweisen.

Ursächlich für den Einfluss der Zellpassagedauer auf die STAT6-Expression könnte auch die essentielle Rolle von STAT6 für die cHL-Zellen sein. Zu Bedenken wäre sicherlich die Möglichkeit, dass keine reinen Zellklone, sondern Subklone mit unterschiedlicher STAT6-Defizienz vorlagen. Mit der Dauer der Kultivierung würden Zellen mit normalem STAT6-Niveau einen deutlichen Proliferationsvorteil aufweisen und die anderen Subklone verdrän-

gen. An weiterführenden Experimenten zur Klärung des Sachverhaltes wären Verdünnungsreihen der Zellklone denkbar. Anschließend könnten sich Southern-Blot-Analysen und Untersuchungen zur Expression von shRNA in diesen Zellklonen.

Im cHL findet man charakteristischer Weise eine Deregulierung multipler Signalwege (Garcia J *et al.*, 2003). NF- κ B im Zusammenspiel mit Notch oder c-Jun/Jun-B sowie MEK/ERK (Mathas *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 2003) wurden als dereguliert beschrieben. Durch die Inhibition von NF- κ B-Signalwegen mittels dominant-negativem I κ B α wurde die Proliferation von cHL-Zellen beeinträchtigt (Bargou *et al.*, 1997).

Die Diskriminierung welchen relativen Beitrag jeweils deregulierte STAT-, NF- κ B- oder MEK/ERK-Signalwege an der Proliferation und Regulation von Zielgenen leisten, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Vorherige Arbeiten konnten zeigen, dass eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen STATs und NF- κ B sowie anderen Transkriptionsfaktoren bestehen könnte (Litterst und Pfitzner, 2001; Yoshida *et al.*, 2004). Außerdem konnten verschiedene Zielgene beschrieben werden, bei denen STAT3 und NF- κ B Bindungsstellen teilen oder deren korrespondierenden Promotorregionen starke Ähnlichkeiten aufwiesen (Ohmori *et al.*, 1997).

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Hodgkin-Lymphomzellen ist die Resistenz gegenüber proapoptotischen Stimuli. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher auch für STAT6 zu untersuchen, ob es durch eine Hemmung mittels spezifischer siRNA zu einer Sensibilisierung der cHL-Zellen gegenüber STS-oder CD95-vermittelten Apoptose kommt. Die STAT6si-exprimierenden Zellklone wurden im Vergleich zu den Kontrollklonen über 24h mit STS behandelt, sowie in einem weiteren Versuchsansatz mit dem agonistischen α -CD95-Antikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten für Annexin-V-FITC als Marker für frühe Apoptosestadien.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten allerdings, dass trotz Hemmung von STAT6 in L428-Zellen die Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose bestehen blieb (vgl. Tabelle 19 sowie Abbildung 6). Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit ähnliche Befunde wie für die CD95-vermittelte Apoptose auch für die Resistenz der H/RS-Zellen gegenüber Staurosporin-vermittelter Apoptose erhoben. Es bestand lediglich eine Tendenz der Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität für Annexin nach STS-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollklonen (s. Tabelle 18 sowie Abbildung 6). Nicht vollständig geklärt werden konnte außerdem die Frage, ob die Reduktion von STAT6 in der Zelllinie L428 nicht ausreichte, die bestehende Resistenz gegenüber STS-oder CD95-vermittelter Apoptose aufzuhe-

ben. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegten weiterhin, dass die STAT6si-Klone bereits ohne STS- oder α -CD95-Behandlung eine relativ höhere Spontanapoptoserate aufwiesen als die Kontrollklone. Das könnte ein möglicher Hinweis darauf sein, dass STAT6 einen Effekt auf die Apoptoseneigung hat, der unabhängig von den bisher untersuchten Mechanismen ist.

Eine permanente Aktivierung des STAT-Familienmitglied STAT6 im klassischen Hodgkin-Lymphom ist mit autokriner Sekretion von IL-13 assoziiert (Kapp *et al.* 1999; Skinnider *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002 a). In einigen HL-Zelllinien (L428, HDLM2) konnte gezeigt werden, dass sich mit einem neutralisierenden IL-13-Antikörper durch Inhibition der IL-13-vermittelten Signalkaskade Apoptose auslösen ließ (Trieu *et al.*, 2004). Komponenten des IL-13-Rezeptors in B-Zellen können allerdings neben STAT6 auch STAT3 und STAT5 aktivieren (Rolling *et al.*, 1996), so dass die Induktion von Apoptose durch Blockade des IL-13-Rezeptors durch die Inhibition mehrerer Transkriptionsfaktoren und nicht singular STAT6 bedingt sein könnte. Die Tatsache, dass eine alleinige Hemmung von STAT6 durchaus ausreicht, Apoptose in cHL-Zellen zu induzieren, konnte nach neueren Erkenntnissen mittels STAT6-spezifischen siRNA für die Hodgkin-Zelllinie L1236 gezeigt werden (Baus, 2005). Baus und Pfitzner konnten allerdings ebenso wenig wie unsere Ergebnisse eine Induktion von Apoptose durch STAT6-spezifische siRNA für die Zelllinie L428 zeigen. Sie führten das auf die Menge von konstitutiv aktivem STAT1 in L1236-Zellen zurück mit proapoptotischer Wirkung nach STAT6-Depletion sowie auf möglicherweise unterschiedliche Zielgene von STAT6 in beiden Zelllinien (Baus, 2005). Interessant war außerdem, dass Baus und Pfitzner zeigen konnten, dass die Apoptose-Induktion nach STAT6-Depletion in der Zelllinie L1236 durch Caspasen vermittelt wurde (Baus, 2005).

Im cHL fehlt eine B-Zell-typische Genexpression in den H/RS-Zellen (Schwering *et al.*, 2003). In verschiedenen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie L428 eine mangelnde Expression von CD19, CD20, CD21, CD22 sowie des Leukozytenmarkers CD45 aufweisen, wohingegen eine Expression von CD30, CD40 sowie CD45 auf diesen Zellen nachzuweisen ist (Drexler, 1992; Küppers, 2002; Kuzu *et al.*, 1993; Poppema, 1996; Schwering *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, ob die Hemmung von STAT6 mittels STAT6-spezifischer siRNA in cHL-Zellen eine B-Zell-typische Expression von Zelloberflächenmarkern wiederherstellen kann, darunter B-Lymphozyten- sowie Hämatopoese-spezifische Marker. Untersucht wurde die Expression von CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD40, CD45 sowie CD54 durch Inkubation der

Hodgkin-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Außerdem wurde ergänzend nach der Expression von CD95/ Fas/ Apo-1 in L428 cHL-Zellen geschaut, da H/RS eine Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose aufwies (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Maggio *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Hemmung von STAT6 mittels STAT6-spezifischer siRNA in den cHL-Zellen nicht zu einer Wiederherstellung der Expression B-Zell-spezifischer Oberflächenmoleküle führte (vgl. Tabelle 20 sowie Abbildung 9). Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit über die Expression von Oberflächenmarkern in cHL-Zellen mit gehemmter STAT6-Expression kein Zusammenhang zwischen B-Zell-typischer Genexpression in den H/RS-Zellen und einer permanenten Aktivierung von STAT6 herstellen.

Die Expression von CD40 sowie CD54 wird in cHL-Zellen durch NF- κ B reguliert (Hinz *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied zwischen dem Expressionsniveau dieser Proteine in den STAT6si-Zellklonen im Vergleich zu den Kontrollklonen festgestellt werden. Die Hemmung von STAT6 scheint demzufolge keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B zu haben, ein Befund der bereits auch für die Hemmung von STAT3 erhoben werden konnte (Holtick *et al.*, 2005). Für das cHL konnte außerdem in vorherigen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass der B-Zell-Rezeptor selbst in H/RS-Zellen nicht exprimiert ist (Re *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2001; Torlakovic *et al.*, 2001).

Insgesamt weist der Einfluss von STAT6 auf die Zellverdopplung auf eine essentielle Rolle dieses STAT-Familienmitgliedes in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphomes hin.

Allerdings waren die mittels der Methodik dieser Arbeit gewonnenen Zellen nicht sinnvoll zur weiteren Analyse von STAT6-vermittelten Effekten einsetzbar. Anders als initial geplant, gelang es lediglich für die Hodgkin-Zelllinie L428 und nicht für die Hodgkin-Zelllinien L1236 und L591 weiterführende Untersuchungen durchzuführen. Die cHL-Zelllinien weisen durch die Entstehung aus unterschiedlichen cHL-Subidentitäten eine gewisse Heterogenität auf, so dass die gewonnenen Ergebnisse nicht ohne weitere Bestätigung in anderen Zelllinien oder aber Primärmaterial auf das gesamte cHL übertragen werden können. Die cHL-Zelllinien bieten die Möglichkeit zur Erforschung dieser Erkrankung, da es bisher kein Tiermodell zur Verfügung steht. Gewonnene Ergebnisse sollten aber immer an primärem Tumorgewebe von cHL-Patienten validiert werden.

Auch erschien eine weiterführende funktionelle Interpretation insbesondere aufgrund der

Ergebnisse der Western-Blot-Analysen nicht sinnvoll. Es stand insgesamt nur eine limitierte Anzahl an STAT6-defizienten Zellklonen zu Verfügung, die repräsentative Aussagen erschwerte. Zusätzlich ging die STAT6-Expression der meisten Zellklone im Western-Blot nach längerer Zellpassagezeit auf das Ausgangsniveau zurück (vgl. [Abbildung 9 und 10](#)) und standen damit sinnvollen weiteren Analysen nur begrenzt zur Verfügung.

4.3. Ausblick

Erkenntnisse über die molekularen Ursachen, die zur Entwicklung des Hodgkin-Lymphoms führen, könnten in Zukunft spezifischere Therapien ermöglichen mit möglichst höherer bis gleichwertiger Tumorwirksamkeit und geringerer Begleittoxizität. Derzeitige therapeutische Ansätze umfassen den Einsatz von neutralisierenden Antikörpern wie TRAIL-R1-Antikörper, anti-CD20- (Rituximab), anti-CD30-Antikörper (SGN-30, MDX-60) oder IL-13-Antikörper (CAT-354), die gegen proliferationsfördernde oder antiapoptotische Signale vermittelnde Rezeptoren oder Proteine gerichtet sind. Eine Inhibition des NF κ B-Signalweges durch Substanzen wie Arsentrioxid oder eine Inhibition des 26S-Proteasoms durch Bortezomib, MG132, über das unter anderem der NF κ B-Inhibitor I κ B abgebaut wird, sind andere erfolgsversprechende Ansätze (Re *et al.*, 2005). Sogenannte „small molecules“ haben mittlerweile einen festen Stellenwert in der Therapie bestimmter Tumorentitäten, darunter insbesondere der in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) eingesetzte Proteintyrosinkinasehemmer Imatinib (Glivec) (Fabbro *et al.*, 2002).

Welchen Stellenwert ein spezifischer therapeutischer Angriff am Jak/STAT-Signalweg in der zukünftigen Therapie des Hodgkin-Lymphoms haben könnte, lässt sich derzeit noch nicht sicher voraussagen.

Ausgehend nach den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war insbesondere die Identifizierung von transkriptionellen Zielen von STAT6. Durch Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Analyse von L428-Zellen, die mit siRNA gegen STAT6 transfiziert wurden gelang es N. Schoof Zielgene von STAT6 im cHL zu identifizieren und teilweise zu validieren, die mit dem malignen Phänotyp der Zellen in Zusammenhang stehen könnten. Unter diesen Genen

sind vor allem der Transkriptionsfaktor IRF4, die IL-13-Rezeptorunterheit IL13Ra1, die Rezeptortyrosinkinase EphB1 und die Proteinphosphatase PTPRK zu nennen, die dementsprechend potentielle Ziele einer Therapie darstellen könnten (Schoof, 2008). In Einklang mit anderen Veröffentlichungen stützen die vorliegende Arbeit sowie die Ergebnisse von N. Schoof die Bedeutung, die in der Identifizierung funktionell wichtiger STAT-regulierter Gene und ihrer Charakterisierung als diagnostische oder prognostische Faktoren oder Ziel für neuere spezifischere Therapien liegt.

Im Mittelpunkt neuerer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe steht das *Heat-shock protein* 90 (HSP90), das in Hodgkin-Zellen überexprimiert vorliegt und in Zusammenhang mit der Stabilisierung von Protoonkogenen und aberranten Signalwegen gebracht wird (Whitesell und Lindquist, 2005). Für den HSP90-Inhibitor Geldanamycin und sein Derivat 17-AAG konnten antiproliferative Effekte sowie eine Sensitivierung für apoptotische Stimuli aufgezeigt werden (Broemer *et al.*, 2004; Georgakis *et al.*, 2006). Im Vorfeld hatten Cochet *et al.* zeigen können, dass eine Downregulation von mindestens drei JAKs notwendig war, um eine Proliferationshemmung von Tumorzellen zu erreichen. Die Arbeitsgruppe um Schoof bestätigte eine Destabilisierung von Jaks durch Inhibition von HSP90 in Hodgkin-Zelllinien mit Einfluss auf die STAT-Aktivierung (Cochet *et al.*, 2006; Schoof *et al.*, 2009). Ein Knock-down von HSP90 mittels RNA-Interferenz führte ebenso wie eine Inhibition durch 17-AAG zu einer verminderten Zellproliferation sowie über eine verminderten Proteinexpression verschiedener Januskinasen zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung von STAT1,-3,-5 und 6 (Schoof, 2008; Schoof *et al.*, 2009).

Die Inhibition von HSP90 stellt damit ein aussichtsreiches mögliches Target einer spezifischeren Therapie des Hodgkin-Lymphoms oder anderer Tumorentitäten mit deregulierter Jak/STAT-Aktivierung dar. Es wurden bereits oral verfügbare HSP90-Inhibitoren entwickelt, deren Nutzen für eine Therapie und klinische Einsetzbarkeit noch evaluiert werden müssen (Kasibhatla *et al.*, 2007). Der Einsatz von 17-AAG ist derzeit unter anderem bei verschiedenen Lymphomentitäten in klinischer Erprobung (Buglio *et al.*, 2007).

5. Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, durch den Einsatz von spezifisch gegen STAT6 gerichteter shRNA die pathophysiologische Bedeutung von STAT6 für ausgewählte Hodgkin-Zelllinien näher zu charakterisieren. Im ersten Teil der Arbeit wurden die methodischen Grundlagen für eine Transfektion der untersuchten Hodgkin-Zelllinien optimiert. Die Technik der Nukleofektion als spezielle Variante der Elektroporation erwies sich für die schwer transfizierbaren Hodgkin-Zelllinien als den herkömmlichen Methoden überlegen. Mit Hilfe der gewonnenen Kenntnisse konnten Zellen der Zelllinie L428 mit reduzierter STAT6-Expression etabliert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die pSUPERneoSTAT6si-Zellklone hinsichtlich des Proliferationsverhaltens, der Apoptoseeigung, dem Expressionsmuster von B-Zell-spezifischen Oberflächenmarkern sowie der STAT6-Expression im Western-Blot charakterisiert. Es konnte für die Hodgkin-Zelllinie L428 gezeigt werden, dass STAT6 essentiell für die Proliferation ist und eine Inhibition von STAT6 zu einem Wachstumsnachteil der Tumorzellen führt. Die bestehende Resistenz der malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms gegenüber Staurosporin-sowie CD95/Fas/Apo-1-vermittelter Apoptose konnte durch die Inhibition von STAT6 in den untersuchten Zellklonen nicht beeinflusst werden. Das Fehlen einer B-Zell-typischen Genexpression in Hodgkin-Zellen wurde zum Anlass genommen, den möglichen Einfluss einer Hemmung von STAT6 auf das Expressionsmuster ausgewählter B-Zelllinien spezifischer Oberflächenmarker zu analysieren. Insgesamt konnte in den L428-pSUPERneoSTAT6si-Zellen keine Wiederherstellung des charakterischen B-Zell-typischen Phänotyps nachgewiesen werden. Für die Mehrzahl der untersuchten pSUPERneoSTAT6si-Zellen wurde im Vergleich zu den pSUPERneo-Kontrollen zunächst eine herabgesetzte STAT6-Expression nachgewiesen, die jedoch bei höherer Passagenzahl verloren ging. In Zusammenhang mit neueren Daten der Arbeitsgruppe und publizierten Daten stützt die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass konstitutiv aktiviertes STAT6 wichtig für das Hodgkin-Lymphom ist, ebenso wie die Identifizierung funktionell wichtiger STAT-regulierter Gene und ihre Charakterisierung als diagnostische oder prognostische Faktoren oder mögliche Ziele für neuere spezifischere Therapien.

6. Literaturverzeichnis

Abelev GI (2000): Differentiation mechanisms and malignancy.

Biochemistry 65, 107-116

Alas S, Bonavida B (2003): Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis.

Clin Cancer Res 9, 31-326

Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, Leventaki V, Das P, Rasidakis GZ, Cutler C, Medeiros LJ, Lai R (2004): Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma.

Oncogene 23, 5426-5434

Andreason GL (1993): Electroporation as a technique for the transfer of macromolecules into mammalian cell lines.

J Tissue Culture Methods 15, 56-62

Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihanek M, Tseng J, Spellberg JP, Elias CG 3rd (1998): STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13.

J Immunol 161, 5027-5038

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

J Clin Invest 100 (12), 2961-2969

Batzler WU, Giersiepen K, Hentschel S, Husmann G, Kattsch P, Katalinic A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier C, Bertz J, Haberland J, Wolf U:

Cancer in Germany, 2003-2004. Incidence and Trends. Sixth edition.

Robert-Koch-Institute and Association of Population-based Cancer Registries in Germany, Berlin 2008

Baus D: Die Bedeutung des JAK/STAT-Signalweges für die Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms.

Fachbereich Biowissenschaften, Diss. Frankfurt am Main 2005

Baus D, Pfitzner E (2006): Specific function of STAT3, SOCS1 and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classic Hodgkin lymphoma cells.

Int J Cancer 118, 1404-1413

Benekli M, Baer M, Baumann H, Wetzler M (2003): Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias.

Blood 101, 2940-2954

Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB (2003): Curcumin inhibits constitutive and IL-induced STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells.

J Immunol 171, 383-3871

Birnboim H.C., Doly J. (1979): A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl Acids Res 7, 1513

Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebt SM (2003): Discovery of JSI-124 (cucurbitacin), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice.

Cancer Res 63, 1270-1279

Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, De Lena M (1975): Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP.

Cancer 63, 252-259

Bonecci R, Sozzani S, Stine JT, Luini W, D'Amico G, Allavena P, Chantry D, Mantovani A (1998): Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: An amplification circuit of polarized T helper 2 responses.

Blood 92, 2668-2671

Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000): STATs in oncogenesis.

Oncogene 19, 2474-2488

Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R (2006): Molecular biology of Hodgkins and Reed/Sternberg cells in Hodgkins lymphoma.

Int J Cancer 118 (8), 1853-1861

Broemer M, Krappmann D, Scheidereit C (2004): Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation.

Oncogene 23, 5378-5386

Bromberg J (2002): STAT proteins and oncogenesis

J Clin Invest 109, 1139-1142

Bromberg J, Darnell JE (2000): The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function.

Oncogene 19, 2468-2473

Bromberg J, Wrzeszczynska M, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. (1999): STAT3 as an oncogene.

Cell 98, 295-303

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002): A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells.

Science 296 (5567), 550-553

Buettner R, Mora LB, Jove R (2002): Activated STAT signalling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention.

Clin Cancer Res 8, 945-954

Buglio D, Georgakis G, Younes A (2007): Novel small-molecule therapy of Hodgkin lymphoma.

Expert Rev Anticancer Ther 7 (5), 735-740

Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J (2001): Inhibition of constitutively active STAT3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells.

Oncogene 20, 7925-7934

Cappeci MR (1980): High efficient transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.

Cell 22, 479-488

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciebertto G, Mosaiki L, Fernandez-Luna JL, Nuzez G, Dalton WS, Jove R (1999): Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells.

Cell 10, 105-115

Chang KL, Albuja PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM (1993): High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Steinberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru.

Blood 81, 496-501

Chen HL, Lee JM, Zong YS, Borowitz M, Ng MH, Ambinder RF, Hayward SD (2001): Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors.

J Virol 75, 2929-2937

Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. 5.Auflage, Urban&Fischer Verlag, München/Jena 2004

Cochet O, Frelin C, Peyron JF, Imbert V (2006): Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin-lymphoma- derived cell lines supports cell survival. *Cell Signal* 18, 449-455

Dagert M, Ehrlich SD (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6, 23-28

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

Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P (1994): Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 179, 135-143

De Vita VT, Hellmann S, Rosenberg SA: Cancer, Principles and practise of oncology. Fifth edition. Lippincott Company, London 1997, 2243-2279

De Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries JE (1993): Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function on human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 151, 6370-6381

Diehl V (2002): Therapie des Morbus Hodgkin- Erfahrungen der Deutschen Hodgkin-Studiengruppe über vier Studiengenerationen. *Dtsch Ärztebl*, 25, 1760-1768

Diehl V, Kirchner HH, Burcher 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, 615-632

Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulis B, Hasenclever D, Tesch H, Herrmann R, Dörken B, Müller-Hermelink HK, Döhnke E, Loeffler M, German Hodgkin Lymphoma Group (2003): Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkins disease.

N Engl J Med 348, 2386-2395

Diehl V, Klimm B, Re D (2005): Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next?

Eur J Haematol Suppl 66, 6-13

Drexler HG (1992): Recent results on the biology of Hodgkin and Reed Sternberg cells. Biopsy material.

Leuk Lymphoma 8, 283-313

Durrant I (1994): Enhanced chemiluminescence detection of horseradish peroxidase labelled probes.

Methods Mol Biol 31, 147-161

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.

Nature 411, 494-498

Fabbro D, Parkinson D, Matter A (2002): Protein tyrosine kinase inhibitors: new treatment modalities?

Curr Opin Pharmacol 2 (4), 374-381

Falini B, Bigerna B, Pasqualucci L, Fizzoti M, Martelli MF;Pileri S, Pinto A, Carbone A, Venturi S, Pacini R, Cattoretti G, Pescarmona E (1996): Distinctive expression pattern of the BCL- protein in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease.

Blood 87, 465-471

Falk MH, Tesch H, Stein H (1987): Phenotype versus immunoglobulin and T-cell receptor genotype of Hodgkin-derived cell lines: activation of immature lymphoid cells in Hodgkin's disease.

Int J Cancer 40, 262-269

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofectin: a highly efficient lipid-mediated DNA- transfection procedure.

Proc Natl Acad Sci USA 84, 7413-7417

Fire A, Montgomery MK, Xu S (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*.

Proc Natl Acad Sci USA 95, 1502-1507

Foss HD, Herbst H, Oelmann E, Samol J, Grebe M, Blankenstein T, Matthes J, Qin ZH, Falini B, Pileri S et al. (1993): Lymphotoxin, tumor necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin-and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin's disease cases.

Br J Haematol 84, 627-635

Foss HD, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopulos I, Hummel H, Stein H (1999): Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin.

Blood 94, 3108-3113

Fouillard L (1996): Physical method for gene transfer: An alternative to viruses.

Hematol Cell Ther 38, 214-216

Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, Shirogane T, Nishida K, Nahajima K, Hibi M, Hirano T (1998): STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition.

EMBO J 17, 6670-6677

Gandhi MK (2004): Epstein-Barr-Virus-associated Hodgkin`s lymphoma-review

Br J Haematol 125, 267-281

Garcia J, Camacho F, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas c, Castano A, Diez A, Flores T, Martin C, Martinez M, Mazarra F, Menarguez J, Mestre M, Mollejo M, Saez A, Sanchez L, Piris M (2003): M. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbour alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays.

Blood 101, 681-689

Garcia R, Bowmann TL, NIU G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Faitclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A (2001): Constitutive activation of STAT3 by the Scr and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells.

Oncogene 20, 2499-2513

Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A (2006): The heat shock protein 90 inhibitor 17AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9.

Clin Cancer Res 12, 584-590

Gershoni JM, Palade GE (1983): Protein blotting: Principles and applications.

Biochem 131, 1-15

Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, Pallesen G, Gully ML, Khan ML, O'Grady J, Hummel M, Preciado MV, Knecht H, Chan JK, Claviez A (1997): Epstein-Barr-virus-associated Hodgkin`s disease: epidemiologic characteristics in international data.

Int J Cancer 70, 375-382

Gouilleux GV, Gouilleux F, Desaint C, Claisse GF, Capiod JC, Delobel J, Weber-Nordt R, Dusanto-Fourt I, Dreyfus F, Croner B, Prin L (1996): STAT related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukaemia patients.

Blood 87, 1692-1697

Graham FL, van der Eb AJ (1973): A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.

Virology 52, 456-467

Greaves MF (1986): Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes.

Science 234, 697-704

Gruss HJ, Brach MA, Drexler HG, Bonifer R, Bertelsmann RH, Hermann F (1992): Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells.

Cancer Res 52, 3353-3360

Hannon GJ (2002): RNA interference

Nature 418, 244-251

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C, De Falini B, Gatter KC (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.

Blood 84, 1361-1392

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

Biochem J 334, 297-314

Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C (1979): Properties of detergents.

Methods Enzymol 56, 734-749

Herbst H (1996): Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease.

Semin Cancer Biol 7, 183-189

Hibi M, Nakajima K, Hirano T (1996): IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system.

J Mol Med 74, 1-12

Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C (2001): Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in H-RS cells.

Blood 97, 2798-2807

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

Oncogene 19, 2548-2556

Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang J, Madsen J, Rosdahl N, Konradsen HB, Storm HH, Melbye M (2003): Characteristics of Hodgkin's Lymphoma after Infectious Mononucleosis.

N Engl J Med 349, 1324-1332

Hodgkin T (1832): On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen.

Med Chir Trans 17, 68-114

Hoeck J, Woisetschlager M (2001): STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts.

J Immunol 166, 4507-4515

Hoffbrand AV, Pettit JE, Hoelzer D: Roche Grundkurs Hämatologie (Ex Libris Band 5), 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin/Wien 1997

Holtick U, Vockerodt M, Pinkert D, Schoof N, Sturzenhofecker B, Kussebi N, Lauber K, Wesselborg S, Loffler D, Horn F, Trumper L, Kube D (2005): STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of typhostin AG17 which confers sensitization for apoptosis.

Leukemia 19 (6), 963-944

Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, Kadin ME (2002): Ligand-independent signalling by overexpressed CD30 drives NFκB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.

Oncogene 21, 2493-2503

Izumi KM, Kieff ED (1997): The Epstein-Barr-virus oncogene product latent membrane protein engages the tumor necrosis factor receptor associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and active NF- κ B.

Proc Natl Acad Sci USA 94, 12592-12597

Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK (1999): World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report.

Am J Clin Pathol 111, 8-12

Jarrett AF, Armstrong AA, Alexander E (1996): Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma.

Ann Oncol 7, 5-10

Jundt F, Anagnostopoulos I, Forster R, Mathas S, Stein H, Dorken B (2002): Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma.

Blood 99, 3398-3403

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

Blood 87, 3429-3436

Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ (1996): STAT6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of TH2 cells.

Immunity 4, 313-319

Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Kagi D, Ho A, Hessel A, Tipsword M, Williams A, Mirtsos C, Itie A, Moyle M, Mak TW (1999): Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells.

J Exp Med 189, 1939-1946

Kashkar H, Kronke M, Jurgensmeier JM (2002): Defective Bax activation in Hodgkin B-cell lines confers resistance to staurosporine-induced apoptosis.

Cell Death Differ 9 (7), 750-757

Kashkar H, Haefs C, Shin H, Hamilton-Dutoit SJ, Salvesen GS, Kronke M, Jurgensmeier JM (2003): XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells.

J Exp Med 198 (2), 341-347

Kasibhatla SR, Hong K, Biamonte MA, Busch DJ, Karijan PL, Sensintaffar JL, Kamal A, Lough RE, Brekken J, Lundgren K, Grecko R, Timony GA, Ran Y, Mansfield R, Fritz LC, Ulm E, Burrows FJ, Boehm MF (2007): Rationally designed high-affinity 2-amino-halopurine heat shock protein 90 inhibitors that exhibit potent antitumor activity.

J Med Chem 50 (12), 2767-2778

Khanna R und Burrows SR (2000): Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases.

Annu Rev Microbiol 54, 19-48

Kile BT, Nicola NA, Alexander WS (2001): Negative regulators of cytokine signalling.

Int J Hematol 73, 292-298

Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002): Signaling through the JAK/STAT-pathway, recent advances and future challenges.

Gene 285, 1-24

Kube D, Vockerodt M (2001): Transient gene expression and MACS enrichment.

Methods Mol Biol 174, 155-164

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

Blood 98, 762-770

Küppers R (2002): Molecular biology of Hodgkin's lymphoma.

Adv Cancer Res 84, 277-312

Küppers R, Rajewsky K (1998): The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease.

Annu Rev Immunol 16, 471-493

Küppers R, Hansmann ML (2005): The Hodgkin and Reed/Sternberg cell.

Int J Biochem Cell Biol 37, 511-517

Küppers R, Kanzler H, Hansmann ML, Rajewsky K (1996): Single cell analysis of Hodgkin/Reed-Sternberg cells.

Ann Oncol 4, 27-30

Kuzu I, Delsol G, Jones M, Gatter KC, Mason DY (1993): Expression of the Ig-associated heterodimer (mb-1 and B29) in Hodgkin's disease.

Histopathology 22, 141-144

Lam KP, Kühn R, Rajewsky K (1997): In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death.

Cell 90, 1073-1083

Lämmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature (Lond.) 227, 680-685

Leonard WJ, O'Shea JJ (1998): Jaks and STATs: biological implications.

Annu Rev Immunol 16, 293-322

Levy DE, Darnell JE (2002): Stats: transcriptional control and biological impact.

Nat Rev Mol Cell Biol 3, 51-662

Litterst CM, Pfitzner E (2001): Transcriptional activation by STAT6 requires the direct interaction with NCoA-1.

J Biol Chem 276, 45713-45721

Liu YJ, Grouard G, de Bouteiller O, Banchereau J (1996): Follicular dendritic cells and germinal centers.

Int Rev Cytol 166, 139-179

Lomo J, Blomhoff HK, Jacobsen SE, Krajewski S, Reed JC, Smeland EB (1997): Interleukin-13 in combination with CD40 ligand potently inhibits apoptosis in human B lymphocytes: Upregulation of Bcl-xl and Mcl-1.

Blood 89, 4415-4424

Lurquin PF (1997): Gene transfer by electroporation.

Mol Biotechnol 7, 5-35

Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T et al. (1994): Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak 1 with the interleukin-6 signal transducer gp130.

Science 263, 89-92

Maggio E, van Den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S (2003): Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma.

Am J Pathol 162, 29-35

Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korpjahn P, Anagnostopoulos I, Lamert H, Demel G, Theil J, Wirth T, Stein H (2000): Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription.

Blood 95, 1443-1450

Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mehta-Grigoriou F, Stein H, Dorken B, Scheidereit C (2002): Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappaB.

EMBO 21, 4104-4113

Mathew A, MacLean JA, DeHaan Z, Tager AM, Green FH, Luster AD (2001): Signal transducer and activator of transcription 6 controls chemokine production and T helper cell type 2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation.

J Exp Med 193, 1087-1096

McCutchan JH, Pagano JG (1968): Enhancement of the infectivity of simian virus 40 desoxy-ribonucleic acid with diethylamino-ethyl-dextran.

J Natl Cancer Inst 41, 351-356

Mc Kenzie AN, Culpepper JA, DeWaal Malefyt R, Briere F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S, de Vries JE, Banchereau J, Zurawski G (1993): Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell-function.

Proc Natl Acad Sci USA 90, 3735-3739

Meydan N, Gruneberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Dreedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM (1996): Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2-inhibitor.

Nature 379, 645-648

Miller RW, Beebe GW (1974): infectious mononucleosis and the empirical risk of cancer.

JNCI 50, 315-321

Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, Minty C, Casellas P, Loison G, Lupker J, Shire D, Ferrara P, Caput D (1993): Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses.

Nature 326, 248-250

Morrison JA, Gulley ML, Pathmanathan R, Raab-Traub N (2004): Differential signalling pathways are activated in the Epstein-Barr-virus associated malignancies nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin lymphoma.

Cancer Res 64, 5251-5260

Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B (2004): The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcriptional factor STAT3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells.

Mol Cancer Res 2, 170-182

Neumann E, Schäfer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.

EMBO J 1, 841-845

Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM (2006): A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer.

Nature 441 (7089), 106-110

Nielsen M, Kaltoft K, Nordahl M, Ropke C, Geisler C, Mustelin T, Dobson P, Svejgaard A, Odum N (1997): Constitutive activation of a slowly migrating isoform of STAT3 in mycosisfungoides: tyrphostin AG490 inhibits STAT3 activation and growth of mycosisfungoides tumor cell lines.

Proc Natl Acad Sci USA 94, 6764-6769

Ning ZQ, Li J, McGuinness M, Arceci RJ (2001): STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity.

Oncogene 20, 4528-4536

Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H (1999): Gene therapy with dominant-negative STAT3 suppresses growth of the murine melanoma B1 tumor in vivo.

Cancer Res 59, 5059-5063

Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA (1997): Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB.

J Biol Chem 272, 14899-14907

O`Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD (2002): Cytokine signalling in 2002: new surprises in the JAK/STAT pathway.

Cell 109, 121-131

Paddison PJ, Coudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells.

Genes Dev 16 (8), 948-958

Poppema S: Immunology of the Hodgkin`s disease. In Clinical Haematology: hrsg. v. Caen J, Hershko C, Hoffbrand AV, Linch DC, Metcalf D, Weatherall DJ.

Bailliere Tindal, London 1996, 447-457

Possinger K, Regierer AC: Facharzt Hämatologie Onkologie.

1. Auflage, Urban und Fischer, München 2007

Re D, Müschen M, Ahmadi T, Wickenhaser C, Staatschek-Jox A, Holtick U, Diehl V, Wolff J (2001): Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells.

Cancer Res 61, 2080-2084

Re D, Thomas RK, Zander T, Diehl V (2005): Problems and promises of targeted therapy for Hodgkin`s lymphoma.

Nat Clin Pract Oncol 2(1), 2-3

Reed D (1902): On the pathological changes in Hodgkin`s disease, with special reference to its relationship to tuberculosis.

J Hopkins Hosp Rev 10, 133-196

Rolling C, Treton D, Pellegrini S, Galanaud P, Richard Y (1996): Il4 and Il13 receptors share the gamma c chain and activate STAT6, STAT3 and STAT5 proteins in normal human B cells.

FEBS Lett 393, 53-56

Rosdahl N, Larsen DO, Clemmensen J (1974): Hodgkin`s disease in patients with previous mononucleosis. 30 years experience.

Br Med J 2, 253-256

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2 Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA 1989

Schaadt M, Diehl V, Kalden JR, Schmidt N, Laskewitz E (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), 185-190

Schoof N: Onkogenomische Aspekte Zytokin-assoziiierter Signaltransduktion.

Fachbereich Biologie, Diss. Göttingen 2008

Schoof N, von Bonin F, Trümper L, Kube D (2009): HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin Lymphoma cells.

Cell Communication and Signaling 7:17

Schwering I, Bräuniger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann M, Dalla-Favera R, Rajewsky K, Küppers R (2003): Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma.

Blood 101, 1505-1512

Sharp PA (2001): RNA interference.

Genes Dev 15 (5), 485-490

Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle VW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G (1996): Lack of IL4-induced TH2-response and IgE class switching in mice with disrupted STAT6 gene.

Nature 380, 630-633

Skinnider BF, Mak TW (2002): The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma.

Blood 99, 4283-4297

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

Blood 97, 250-255.

Skinnider BF, Kapp U, Mak TW (2002 a): The role of interleukin 13 in classical Hodgkin's lymphoma.

Leuk Lymphoma 43, 1203-1210

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

Blood 99, 618-626

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Consten R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harbarth J (2004): Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs.

Nature 432 (7014), 155-156

Sriuranpong V, Park Ji, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkin JS (2003): Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system.

Cancer Res 63, 2948-2956

Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvenoinen O, Barbieri G, Pellegrini S et al. (1994): Association and activation of Jak-tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components.

Science 263, 92-95

Stein H, Marafioti T, Foss HD, Lauren H, Hummel M, Anagnostopoulos I, Wirth I, Demmel G, Falini B (2001): Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin's disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription.

Blood 97, 496-501

Sternberg C (1898): Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates.

Heilkunde 19, 21-90

Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1996): Essential role of STAT6 in IL-4 signalling.

Nature 380, 627-30

Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA (2000): NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL4R-STAT6 pathway.

Nat. Immunol. 1, 515-520

Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, Schultze J, Draube A, Vockerodt M, Re D, Diehl V, Wolf J (2002): Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells.

Am J Pathol 160, 1521-1528

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, 11-18.

Tijsterman M und Plasterk RH (2004): Dicers at RISC; the mechanism of RNAi.

Cell 117 (1), 1-3

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications.

Proc Natl Acad Sci 76, 4350-4354

Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J (2001): The transcription factor PU.1. necessary for B-cell-development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease.

Am J Pathol 159, 1807-1814

Trieu Y, Wen XY, Skinnider BF, Bray MR, Li Z, Claudio JO, Masih-Khan E, Zhu YX, Trudel S, McCart JA, Mak TW, Stewart AK (2004): Soluble interleukin-13Ralpha2 decoy receptor inhibits Hodgkin's lymphoma growth in vitro and in vivo.

Cancer Res 4, 3271-3275

Vockerodt M, Soares M, Kanzler H, Küppers R, Kube D, Hansmann ML (1998): Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged V (H) genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease.

Blood 92, 2899-2907

Vockerodt M, Belge G, Kube D, Irsch J, Siebert R, Tesch H, Diehl V, Wolf J, Bullerdiek J, Staratschek-Jox A (2002): An unbalanced translocation involving chromosome 14 is the probable cause for loss of potentially functional rearranged immunoglobulin heavy chain genes in the Epstein-Barr virus positive Hodgkin's lymphoma-derived cell line L591.

Br J Haematol 119, 640-646

Watanabe K, Yamashita Y, Nakayama A, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, Mari N (2000): Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease.

Histopathology 36, 353-361

Weber M, Möller K, Welzeck M, Schorr J (1995): Effect of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells.

BioTechniques 19, 930

Weiss U, Zobelein R, Rajewsky K (1992): Accumulation of somatic mutants in the B cell compartment after primary immunization with a T cell-dependent antigen.

Eur J Immunol 22, 511-517

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

Oncogene 25, 2679-2684

Whitesell L, Lindquist SL (2005): HSP90 and the chaperoning of cancer.

Nat Rev Cancer 5 (10), 761-772

WHO: Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.

IARC Press, Lyon 2003

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, 3418-3428

Wood K, Roff M, Hay R (1998): Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B.

Oncogene 16, 2131-2139

Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ (2000): The biology of Stat4 and STAT6.

Oncogene 19, 2577-2584

Yoshida Y, Kumar A, Koyama Y, Peng H, Arman A, Boch JA, Auron PE (2004): Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism.

J Biol Chem 279, 1768-1776

Yu H, Jove R (2004): The STATs of cancer-new molecular targets come of age.

Nat Rev Cancer 4 (2), 97-105

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.

Cell 101 (1), 25-33

Zang-Gandor M. (1997): Improved transfection of CHO cells using endotoxin-free plasmid DNA.

QIAGEN News 1997 No. 4, 1

Zheng B, Fiumara P, Li YV, Georgakis G, Snell V, Younes M, Vauthey JN, Carbone A, Younes A (2003): MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin's disease: a signalling pathway shared by CD30, CD40 and RANK that regulates cell proliferation and survival.

Blood 102, 1019-1027

Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE (2001): STAT6 is necessary and sufficient for IL-4's role in TH2 differentiation and cell expansion.

J Immunol 166, 7276-7281

Zubler RH (1997): key differentiation steps in normal B cells and in myeloma cells.

Semin Haematol 34, 13-22

Zurawski G, de Vries E (1994): Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B-cells, but not on T-cells.

Immunol Today 15, 19-22

7. Anhang: Abkürzungsverzeichnis

Neben den international gültigen physikalischen Einheiten und chemischen Symbolen werden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
A. bidest	Wasser zweifach destilliert
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCL	<i>engl.: B-cell lymphoma</i>
BOB1	<i>engl.: B-cell-specific coactivator</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl.: bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>engl.: cluster of differentiation</i>
C. elegans	Caenorhabditis elegans (Nematode)
cFLIP	<i>engl.: cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
cHL	<i>engl.: common Hodgkin Lymphoma</i>
d.h.	das heißt
DHSG	Deutsche Hodgkin-Lymphom-Studiengruppe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>)
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>engl.: enhanced chemiluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>engl.: enhanced green fluorescent protein</i>
engl.	Englisch
ERK	<i>engl.: extracellular signal-related kinase</i>
et al.	und andere (<i>lat.: et alii</i>)
etc.	und so weiter (<i>lat.: et cetera</i>)
Fa.	Firma

FACS	<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSC	<i>engl.: forward scatter</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>engl. green fluorescent protein</i>)
ggf.	gegebenenfalls
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GnRH	<i>engl.: gonadotropin-releasing-hormon</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde (<i>engl.: hour</i>)
HD	<i>engl.: Hodgkin`s disease</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`2-ethansulfonsäure
HL	Hodgkin-Lymphom
H/RS-Zellen	Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen
HSP 90	<i>engl.: Heat-shock protein 90</i>
HTLV	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
JAK	Janus-Kinasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LD	Lymphozytäre Verarmung-histol. Begriff
LMP1	latentes Membranprotein 1-EBV-Protein
LL	<i>engl.: lower left</i>
LPHL	Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
LR	<i>engl.: lower right</i>
MC	gemischte Zellularität (<i>engl.: mixed cellularity</i>)
MDC	<i>engl.: macrophage-derived chemokine</i>
MEK	<i>engl.: MAP/ERK kinase</i>
MH	Morbus Hodgkin
Notch1	<i>engl.: neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
Nr.	Nummer
NFκB	<i>engl.: nuclear factor kappa-B</i>
NS	nodulär-sklerosierend- (histol.Begriff)

OCT2	<i>engl.: octamer-binding transcription factor-2</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAX	<i>engl.: paired box protein 5</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PMSF	Phosphomethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
RISC	<i>engl.: RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.: ribonucleic acid</i>)
rpm.	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
s.	siehe
SDS	Na-Dodecylsulfat (<i>engl.: sodium-dodecylsulfate</i>)
shRNA	<i>engl.: short hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>engl.: small-interfering ribonucleic acid</i>
SOCS	<i>engl.: suppressor of cytokine signaling</i>
SSC	<i>engl.: side scatter</i>
STAT	<i>engl.: signal transducers and activators of transcription</i>
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle
TARC	<i>engl.: thymus and activation-related chemokine</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.: tris buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>engl.: transforming growth factor</i>
TM	<i>engl.: trademark</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF`s	TNF-assozierte Faktoren
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u/o	und/oder

VCA	virales Kapsidantigen
vgl.	vergleichend
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Gewicht pro Volumen (<i>engl.: weight/volume</i>)
WHO	<i>engl.: World Health Organisation</i>
XIAP	<i>engl.: x-linked inhibitor of apoptosis</i>
z.B.	zum Beispiel

Danksagungen

- Als erstes ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Kube für die Überlassung des interessanten Themas sowie den fachlichen Beistand und die wissenschaftliche Betreuung beim Entstehen dieser Arbeit .
- Prof. Dr. Lorenz Trümper danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie durchführen zu können.
- Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. rer. nat. Diana Pinkert-Leetsch für Ihre überaus hilfreiche und auch freundschaftliche Unterstützung während der Zeit im Labor, aber auch noch danach in Göttingen und Stuttgart. Mit viel, viel Geduld und fachlicher Kompetenz war Sie stets zur Stelle, wenn ich Hilfestellungen oder Ratschläge brauchte.
- Frau Dr. rer.nat. Martina Vockerodt danke ich besonders für einige sehr wertvolle Tipps und Kniffe im Laboralltag. Insbesondere die Durchführung und Auswertung der Facs-Analysen wären ohne Ihre Hilfe nicht möglich gewesen.
- Frederike von Bonin und Dr. rer. nat. Benjamin Stuerzenhofecker danke ich für die Bereitwilligkeit, mir bei Problemen und Fragen zur Seite zu stehen und das ein oder andere aufmunternde Wort.
- Weiterhin möchte ich mich bei allen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeiter/innen meiner Arbeitsgruppe sowie der Abteilung Hämatologie und Onkologie für die freundliche Aufnahme in das Labor und kleine Hilfestellungen bedanken, die den Laboralltag doch um einiges erleichtert haben.

Lebenslauf

Am 08. März 1980 wurde ich, Kathrin Matthias, in Neustadt am Rübenberge geboren. Von 1986-1990 besuchte ich die Grundschule der Hans-Böckler-Schule in Neustadt und anschließend noch bis 1992 die Orientierungsstufe an der gleichen Schule. Danach wechselte ich an das Gymnasium Neustadt, an dem ich 1999 mein Abitur absolvierte.

Zum Wintersemester 1999 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen auf. Im September 2001 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab, im September 2002 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und schließlich im März 2005 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Während dieser Zeit habe ich während diverser Famulaturen in der Neurologie, der Inneren Medizin, der Allgemeinmedizin, der Pathologie sowie der Gynäkologie praktische Erfahrungen sammeln können, darunter auch bei einem Auslandsaufenthalt in Eastbourne, England. Das Praktische Jahr absolvierte ich in der Abteilung für Herz- und Gefäßchirurgie am Inselspital in Bern, Schweiz und in der Abteilung für Innere Medizin am Evangelischen Krankenhaus Weende in Göttingen sowie das Wahlterial in der Abteilung Neurologie am Universitätsklinikum in Göttingen. Ende April 2006 absolvierte ich den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Meine Dissertation zu dem Thema: „Die Analyse der Rolle von STAT6 im klassischen Hodgkin-Lymphom“ begann ich studiumsbegleitend nach einer Einarbeitungszeit von zwei Monaten im Februar 2003 an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Hämatologie und Onkologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Lorenz Trümper. Dabei oblag mir die Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Dieter Kube. Von September bis Dezember 2003 war ich zusätzlich in genannter Abteilung als hilfswissenschaftliche Kraft tätig. Nach Abschluss meines Studiums begann ich von Oktober 2006 an meine klinische Ausbildung als Assistenzärztin in der Inneren Medizin am Katharinenhospital in Stuttgart, einem Haus der Maximalversorgung. Ich konnte sowohl Erfahrungen in der Abteilung für Allgemeine Innere Medizin, Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie als auch insbesondere in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie sammeln. Zusätzlich konnte ich am Katharinenhospital meine sechsmonatige Intensivweiterbildungszeit auf der internistischen Intensivstation absolvieren. Zum Juli 2009 wechselte ich als Assistenzärztin zur weiteren Ausbildung an die Medizinische Hochschule Hannover in die Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation.