

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. D. Körholz)

**Untersuchungen zum Genexpressionsprofil und zur Chemotherapieresistenz von
Hodgkin-Lymphom-Zelllinien**

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

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

von Grit Brodt, geb. Weißflog
geboren am 20. November 1983 in Erlabrunn

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

Gutachter/Gutachterin: 1. Prof. Dr. med. D. Körholz
 2. PD Dr. med. G. Behre
 3. PD Dr. med. M. Hummel, Berlin

11.05.2010

21.03.2011

**meinem Ehemann Steffen
und meinem Sohn Jakob**

Referat

Im Rahmen multimodaler Therapieregime weist das Hodgkin-Lymphom (HL) heute eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% auf. Dennoch gibt es eine Reihe von Patienten, welche auf die initiale Chemotherapie nicht ansprechen oder binnen der ersten 3 Monate einen Progress entwickeln. Die Prognose dieser Patientengruppe verschlechtert sich dramatisch und liegt nur noch bei einer 5-Jahres-Überlebensrate von 17%.

Zielstellung dieser Arbeit war es, die möglichen Ursachen dieser Zytostatikaresistenz zu analysieren und Möglichkeiten ihrer Überwindung zu erarbeiten. Mittels molekularbiologischer und immunologischer Methoden wie Polymerasekettenreaktion (PCR) und Durchflusszytometrie wurde eine chemotherapiesensible mit einer chemotherapieresistenten HL-Zelllinie hinsichtlich des Genexpressionsmusters, des Oberflächenmolekülbesatzes und der Wirkung von Cisplatin auf die Zellviabilität verglichen. Anschließend wurde versucht die Chemotherapieresistenz mittels Ethacrynsäure (EA) und Roscovitin (ROSC) zu überwinden.

Die Expression einer Reihe von Genen mit möglicher Beteiligung an antiapoptischen Mechanismen, wie z.B. Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS), Interleukin-13-Rezeptor alpha 1 (IL13RA1), CD40 und Interleukin-5-Rezeptor alpha (IL5RA) konnte nur in der chemotherapieresistenten Zelllinie nachgewiesen werden. Ähnlich verhielt es sich mit dem Tumorentigen Preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) und der Expression von Glutathion-S-Transferasen (GST), welche auch in anderen Tumormodellen in Zusammenhang mit einer Zytostatikaresistenz gebracht wurden. Durch Inhibition der GST mittels Ethacrynsäure konnte die Sensitivität von HL-Zellen drastisch gesteigert werden. Die Koinkubation der chemotherapieresistenten HL-Zelllinie mit EA und ROSC führte zu einer weiteren Abnahme der Zellviabilität.

Die Identifikation dieser resistenzassoziierten Faktoren bietet nicht nur Angriffspunkte für neue Therapiekonzepte, beispielsweise durch den gezielten Einsatz von Ethacrynsäure, sondern könnte auch das frühzeitige Erkennen von Risikopatienten ermöglichen, für welche Therapieanpassungen erforderlich wären. Insgesamt könnte sich somit in Zukunft auch die Prognose des primär chemotherapieresistenten Hodgkin-Lymphoms verbessern.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Morbus Hodgkin	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Ätiologie	2
1.4	Pathogenese und Molekularbiologie	3
1.5	Morphologie	4
1.6	Klinisches Erscheinungsbild	6
1.7	Stadieneinteilung und Prognosefaktoren	6
1.8	Therapie	8
1.8.1	Radiotherapie	8
1.8.2	Chemotherapie	8
1.8.3	Chirurgie	9
1.9	Prognose	9
2	ZIELSTELLUNG	11
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Material	12
3.1.1	Geräte	12
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	12
3.1.3	Chemikalien	13
3.1.4	Fertige Lösungen und Reaktionssysteme	14
3.1.5	Verwendete Medikamente	14
3.1.6	Enzyme	14
3.1.7	Kits	15
3.1.8	Kultur- und Einfriermedien	15
3.1.9	Sonstige Puffer	15
3.1.10	Zelllinien	16

3.1.11	FACS-Antikörper	17
3.1.12	Oligonukleotide	18
3.2	Methoden	19
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	19
3.2.2	Zellbiologische Methoden	24
3.2.3	Immunologische Methoden	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Der Einfluss von Cisplatin auf das Tumorwachstum	32
4.2	Expression von Oberflächenmolekülen	34
4.3	Untersuchung des Genexpressionsprofils	37
4.3.1	Validierung differenziert exprimierter Gene mittels RT-PCR	38
4.3.2	Expression der Glutathion-S-Transferasen	39
4.4	Regulierbarkeit der Genexpression	40
4.4.1	Der Einfluss von 5-Azacytidin auf die Genexpression	40
4.4.2	Der Einfluss von konditionierten Zellkulturüberständen auf die Genexpression	41
4.5	Cisplatin- und Ethacrynsäuretitration der Zelllinie L-1236	42
4.6	Ethacrynsäure- und Roscovitintitration der Zelllinie L-1236	45
5	DISKUSSION	48
5.1	Cisplatin und seine Wirkung auf das Tumorwachstum	48
5.2	Der Oberflächenmolekülbesatz im Hinblick auf die Cisplatinempfindlichkeit	49
5.3	Genexpressionsprofil und Resistenzgene	51
5.4	5-Azacytidin und sein Einfluss auf die Genexpression	53
5.5	Die Wirkung der Medienüberstände auf das Genexpressionsmuster	54
5.6	Glutathion-S-Transferasen und ihre Bedeutung für die Chemotherapieresistenz	55

5.7	Überwindung der Chemotherapieresistenz mittels Ethacrynsäure	56
5.8	Der Zellzyklusinhibitor Roscovitin und seine Wirkung auf das Tumorstadium	58
6	Zusammenfassung	60
7	Literatur	61
8	Thesen	75

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

+ve	positive
°C	Grad Celsius
%	Prozent
∞	unendlich
μ	Mikro-
B	Belgien
bidest.	bidestilliert
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CD40L	CD40 Ligand
cDNA	komplementäre (copy) DNA
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
COPDAC	Cyclophosphamid, Vincristin, Predniso(lo)n, Dacarbazin
COPP	Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Predniso(lo)n
CT	Computertomographie
D	Deutschland
DAL-GPOH	Kooperative Therapieoptimierungsstudie zur Behandlung des Hodgkin-Lymphoms im Kindes- und Jugendalter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DHSG	Deutsche Hodgkin Studiengruppe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EA	Ethacrynsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED50	Effektive-Dosis 50
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	(lat.) und andere
EuroNet-PHL C1	Erste internationale Intergroup-Studie der EuroNet-Paediatric Hodgkin's Lymphoma Group für Kinder und Jugendliche mit klassischem Hodgkin-Lymphom
evtl.	eventuell
FACS	fluorescence activated cell scanning
FCS	fötales Kälberserum (fetal bovine calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	forward
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferasen
Gy	Gray
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen
HVS	Herpesvirus saimiri
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL5RA	Interleukin-5-Rezeptor alpha
IL13RA1	Interleukin-13-Rezeptor alpha 1
L	Ligand
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli-

M	Molar (Einheit der Konzentration, mol·l ⁻¹)
MACS®	Magnetic Cell Separation
MARCKS	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio	Million
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
OD	Optische Dichte
OEPA	Etoposid, Doxorubicin, Vincristin, Predniso(lo)n
Oligo d(T)	Oligodesoxythymidin
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-A-Protein
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration (in wässriger Lösung)
PI	Propidiumjodid
PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma
P/S	Penicillin/Streptomycin
R	Rezeptor
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROSC	Roscovitin
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR	reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
sog.	so genannten
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumorsuppressor-Gen 53
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
U	Umdrehung
U	Unit
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
usw.	und so weiter
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar (visible)
V	Volt
Vol.	Volumen
Wdh.	Wiederholung
XIST	X inactivation specific transcript
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Der Morbus Hodgkin

Der Morbus Hodgkin ist eine lymphatische Systemerkrankung die erstmals 1832 von Thomas Hodgkin, einem britischen Physiker und Pathologen, in London beschrieben wurde (Rosenfeld, 1993). Er beobachtete sieben Autopsiefälle in deren Vordergrund eine Vergrößerung und Infiltration von Lymphknoten und Milz stand. 1898 bzw. 1902 wurden von Sternberg bzw. Reed die typischen Riesenzellen beschrieben, die heute noch als Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRS) bezeichnet werden (Bonadonna, 2000). Seit 1966 werden die morphologischen Varianten des Hodgkin Lymphoms nach der Rye-Klassifikation eingeteilt (Brittinger, 2005). Durch die WHO-Klassifikation wurde diese Einteilung noch erweitert (s.u.).



Abbildung 1: Thomas Hodgkin, britischer Physiker und Pathologe (1798-1896)
(Quelle: <http://clendening.kumec.edu/dc/pc/h.html>)

1.2 Epidemiologie

Die weltweite Verteilung des Hodgkin-Lymphoms unterliegt deutlichen geographischen Schwankungen. Dies könnte als Hinweis auf eine Assoziation mit verschiedenen Umwelteinflüssen, z.B. Ernährungsgewohnheiten und Infektionen angesehen werden. In Industrieländern mit hohem sozioökonomischen Status ist ein bimodaler Altersgipfel zu beobachten. Der erste Gipfel liegt um das 25. Lebensjahr, der zweite jenseits des 55. Lebensjahres. In Ländern mit niedrigerem sozioökonomischen Status wurde dagegen eine Verschiebung des ersten Altersgipfels in das frühe Kindesalter beobachtet (Dörffel und Schellong, 2006). In Deutschland liegt die Inzidenz des Morbus Hodgkin bei 0,7 auf 100000 Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren. Der Altersmedian liegt in dieser Gruppe bei 12 Jahren. Das Verhältnis von Mädchen zu Jungen beträgt 1:1,7. Bei einem Erkrankungsalter unter dem 10. Lebensjahr sind Jungen deutlich häufiger betroffen (Verhältnis Mädchen:Jungen, 1:3,4). In höherem Erkrankungsalter ist dieser Unterschied kaum noch zu verzeichnen (Mädchen:Jungen 1:1,2) (Schellong, 1997). Unter dem 5. Lebensjahr ist die Erkrankung äußerst selten (Donaldson et al., 1999).

1.3 Ätiologie

Die Ätiologie des Morbus Hodgkin ist heute noch weitgehend ungeklärt. Von Bedeutung scheint aber eine Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zu sein, welches in der Hälfte der Fälle klonal in den Tumorzellen direkt nachgewiesen werden kann (Hjalgrim et al., 2000). In vitro führt die Infektion von B-Zellen mit EBV zu einer Immortalisierung dieser Zellen und zur Etablierung so genannter lymphoblastoider Zelllinien. In vivo kommt es zu einer Stimulierung der Zellen, einhergehend mit einer massiven Zytokinproduktion, welche zumindest für das umliegende Infiltrat beim Hodgkin-Lymphom verantwortlich ist. In wie weit jedoch die EBV-Infektion als mögliche Ursache beim Morbus Hodgkin zu erwägen ist, ist noch nicht ausreichend geklärt. Möglich ist, dass auch das Wachstum der Tumorzellen selbst durch autokrine Mechanismen unterstützt wird (Feller, 2004). Auf die Beteiligung genetischer Faktoren an der Pathogenese des Morbus Hodgkin deuten u.a. eine familiäre Häufung, mit einem bis zu siebenfach erhöhten Erkrankungsrisiko für Geschwister von in jungen Jahren erkrankten Personen, sowie eine Konkordanz bei eineiigen, jedoch nicht bei

zweieiigen Zwillingen hin (Mack et al., 1997). Eine weitere Bedeutung in der Ätiologie des Morbus Hodgkin haben angeborene und erworbene Immundefizienzen. So sind an HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) erkrankte Personen und Patienten nach allogenen Knochenmarktransplantationen besonders prädisponiert (Rowlings et al., 1999).

1.4 Pathogenese und Molekularbiologie

Die für das Hodgkin-Lymphom charakteristischen Zellen sind die großen einkernigen Hodgkin- und die mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen (Feller, 2004). Der Ursprung der HRS-Zellen war lange unklar. Erst durch DNA-Analysen konnte gezeigt werden, dass Immunglobulin(Ig)-Gen-Rearrangements in den Tumorzellen vorhanden sind. Somit konnte die Herkunft aus germinalen B-Zellen bestätigt werden (Küppers et al., 1994). Bis heute ist noch nicht vollständig geklärt, welche morphologischen Veränderungen die ursprünglich transformierte B-Zelle durchlaufen muss bevor sie eine HSR-Zelle wird. Es ist aber bekannt, dass diesen Zellen das typische Oberflächenexpressionsmuster (CD19, CD20, CD45, CD79a/b usw.) der normalen B-Zellen fehlt (Schwering et al., 2003). In klassischen Hodgkin-Lymphomen finden sich weniger als 1% der typischen HSR-Zellen (Wolf et al., 1996). Vielmehr besteht die Masse des Lymphoms aus sog. Bystander-Zellen. Diese entsprechen einem nichtneoplastischen entzündlichen Infiltrat aus Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Epitheloidzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Den von diesen Zellen sezernierten Zytokinen wird ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des Morbus Hodgkin zugeschrieben. Die Interleukine (IL)-1, -6 und -9 scheinen nicht nur als autokrine Wachstumsfaktoren für die HSR-Zellen zu fungieren, sondern auch als parakrine Faktoren das Wachstum der Bystander-Zellen zu stimulieren. Die IL-5, -2 und -3 sollen Eosinophile induzieren. Für die Immunsuppression werden Transforming growth factor β (TGF- β) und IL-10 sowie für die B-Symptomatik IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF), Lymphotoxin- α und IL-1 verantwortlich gemacht (Stein et al., 1999; Küppers et al., 2000; Skinnider und Mak 2002).

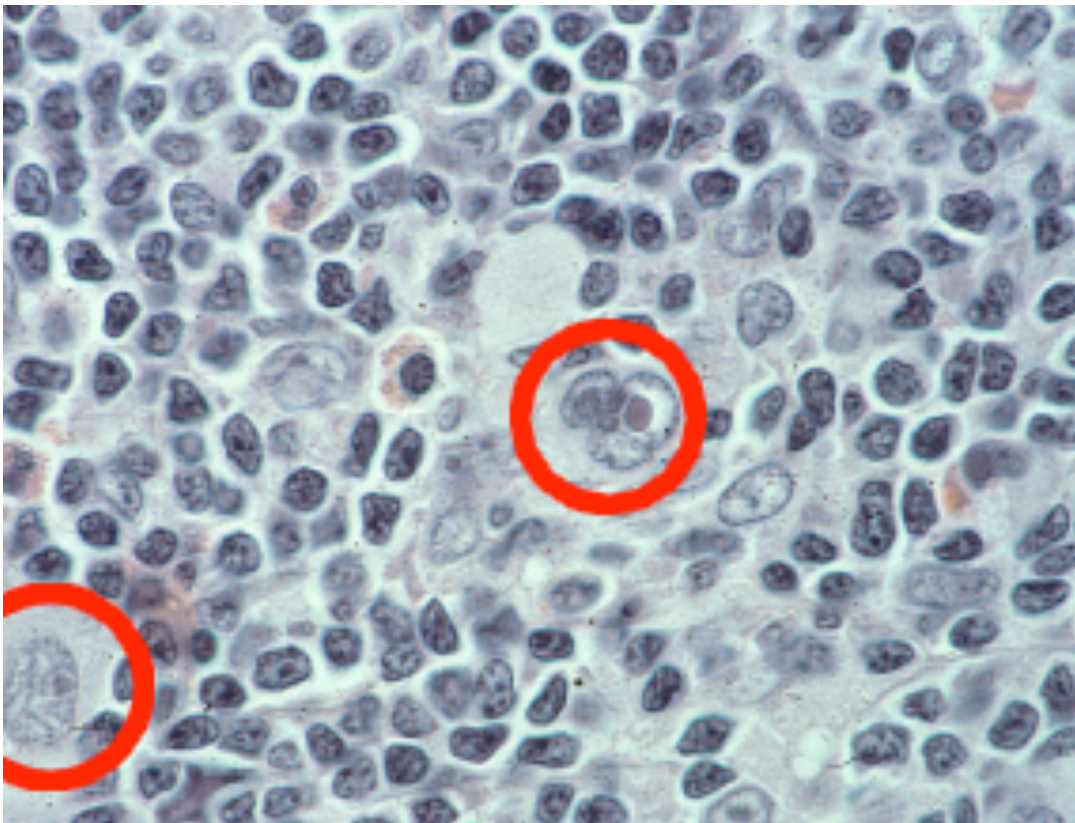


Abbildung 2: Mikroskopische Darstellung der für das Hodgkin-Lymphom typischen Hodgkin- (unten links) und Reed-Sternberg-Zellen (oben rechts).
(Quelle: www.lymphome.de/.../HaeufigkeitUndUrsache.jsp)

1.5 Morphologie

Die aktuelle WHO-Klassifikation der Hodgkin-Lymphome basiert auf der Rye-Klassifikation, welche mit dem nodulär lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom ergänzt wurde. Die einzelnen Subtypen werden nach der Anzahl der HSR-Zellen, der Art des Wachstums und durch die Zusammensetzung des begleitenden Infiltrates voneinander unterschieden.

Tabelle 1: Histologische Typen des Hodgkin-Lymphoms

noduläre lymphozytenprädominante Form	Infiltrat aus Lymphozyten mit nur wenigen atypischen Zellen; besondere Riesenzellen mit kleinen Nukleolen, werden aufgrund ihres zytologischen Bildes als H -(histiozytäre) Zellen oder als L -(lymphozytäre) Zellen bezeichnet; überwiegend noduläres Wachstumsmuster
klassisches Hodgkin-Lymphom	
nodulär-sklerosierender Typ	starke Sklerosierungstendenz führt zur Bildung von knotenförmigen Infiltratherden; je nach Gehalt an Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen unterscheidet man Typ 1 und Typ 2, bei Typ 2 ist der Gehalt höher als bei Typ 1
gemischtzelliger Typ	ähnliche Zusammensetzung wie der nodulär-sklerosierende Typ, aber Fehlen der Sklerosierungstendenz
lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom	ähnlich wie die nodulär lymphozytenprädominante Form überwiegend noduläres Wachstumsmuster; klassische Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen exprimieren im Gegensatz zur lymphozytenprädominanten Form CD 30
lymphozytenarmer Typ	Dominanz von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen, fließender Übergang zum anaplastischen großzelligem Non-Hodgkin-Lymphom

Bei der nodulär lymphozytenprädominanten Form fehlt die bei allen anderen Formen konstant auftretende Expression der Oberflächenantigene CD 15 und CD 30, während sich B-Zellantigene (z.B. CD 20 und CD 79a) auf der Oberfläche nachweisen lassen (Feller, 2004).

1.6 Klinisches Erscheinungsbild

Die Dauer der Anamnese kann zwischen wenigen Tagen und einigen Monaten liegen. In etwa 75% der Fälle liegt bei Kindern und Jugendlichen eine mediastinale Beteiligung vor, die zu Husten, venöser Einflusstauung und Atemnot führen kann. Systemische Krankheitszeichen wie Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß werden unter dem Begriff B-Symptomatik zusammengefasst und kommen insgesamt in 33% der Fälle vor. Besonders häufig findet man bei Hodgkin-Lymphom-Patienten immunologische Defizite, welche zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten führen. Paraneoplastische Syndrome wie das nephrotische Syndrom, Immunthrombozytopenie oder autoimmunhämolytische Anämie sowie Polymyositis oder subakut zerebelläre Degeneration sind nur in Einzelfällen beschrieben. Im Blutbild ist eine normochrome, normozytäre Anämie vorherrschend. Gelegentlich findet man eine Leukozytose und eine Eosinophilie, in fortgeschrittenen Fällen eine Lymphopenie. Bei Knochenmarkbeteiligung können ausgeprägte Panzytopenien vorliegen. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) ist in den meisten Fällen erhöht. Auch die Laktatdehydrogenase (LDH), Ferritin und Kupfer können im Serum gesteigert sein (Dörffel und Schellong, 2006).

1.7 Stadieneinteilung und Prognosefaktoren

1966 hat man sich auf die Ann-Arbor-Klassifikation geeinigt, wobei die Einteilung nach den befallenen Lymphknotenregionen erfolgt. Das Zwerchfell stellt hierbei eine wichtige Grenzstruktur dar.

Ann-Arbor-Einteilung

Stadium 1	Befall einer einzelnen Lymphknotenregion (I) oder lokalisierter Befall eines einzelnen extralymphatischen Organs oder Bezirks (IE)
Stadium 2	Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells (II) oder lokalisierter Befall eines einzelnen

extralymphatischen Organs oder Bezirks und seiner (seines) regionären Lymphknotens mit oder ohne Befall anderer Lymphknotenregionen auf der gleichen Zwerchfellseite (IIE)

Stadium 3

Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III), evtl. zusätzlich lokalisierter Befall eines extralymphatischen Organs oder Bezirks (IIIE) oder gleichzeitiger Milzbefall (IIIS) oder gleichzeitiger Befall von beidem (IIIE+S)

Stadium 4

Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne gleichzeitigem Lymphknotenbefall; oder isolierter Befall eines extralymphatischen Organs mit Befall nichtregionärer Lymphknoten

Jedes Stadium wird in A- und B-Kategorien unterteilt, wobei A das Fehlen und B das Vorhandensein von definierten Allgemeinsymptomen (B-Symptomatik) beschreibt:

B-Symptomatik

- ungeklärter Gewichtsverlust von mehr als 10% in den letzten 6 Monaten
- ungeklärtes persistierendes oder rekurrendes Fieber über 38°C
- starker Nachtschweiß

Mit der klinischen Stadieneinteilung kann auch eine prognostische Aussage getroffen werden. So wird allgemein und in Hinsicht auf die Therapie zwischen frühen (I, II, IIIA) und fortgeschrittenen (IIIB und IV) Krankheitsstadien unterschieden. Als Risikofaktoren, die mit einer ungünstigeren Prognose einhergehen, gelten „Bulky disease“ (großer Mediastinaltumor mit einer Breite, die mehr als ein Drittel des inneren Thoraxdurchmessers in Höhe der Thorakalwirbel 5-6 beträgt; weiterhin Lymphome mit Durchmesser von über 10cm bei Erwachsenen), extranodaler Befall, B-Symptomatik, 3 und mehr betroffene Lymphknotenregionen, sowie hohe BSG und Anämie (Dörffel und

Schellong, 2006). Ferner wurden durch verschiedene Studiengruppen das männliche Geschlecht sowie das Vorhandensein einer Leukozytose als weitere Risikofaktoren deklariert (Smith et al., 2003). Auch die Tumormorphologie hat eine wesentliche Bedeutung für die Prognose der Patienten. So wurde in vielen Studien deutlich, dass die lymphozytenprädominante Form mit der günstigsten und die lymphozytenarme Form mit der ungünstigsten Prognose einhergeht (Jaffe et al., 2001, Gough, 1979, Keller et al., 1968).

1.8 Therapie

Seit 1978 erfolgt die Behandlung des Morbus Hodgkin im Kindes- und Jugendalter innerhalb von kooperativen Therapieoptimierungsstudien (DAL-GPOH). Die stadienadaptierte, multimodale Therapie, zusammengesetzt aus Bestrahlung und Chemotherapie, wurde in letzter Zeit noch durch die Option einer alleinigen chirurgischen Therapie ergänzt (Mauz-Körholz et al., 2007).

1.8.1 Radiotherapie

In der aktuellen europaweit durchgeführten EuroNet-PHL-C1-Therapiestudie wird die Bestrahlung in Abhängigkeit vom Therapieansprechen eingesetzt. Dazu werden einerseits die konventionellen Schnittbildverfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) und andererseits die Positronen-Emission-Tomographie (PET) eingesetzt. Patienten mit adäquatem Ansprechen nach zwei Zyklen Chemotherapie erhalten keine Radiotherapie. Bei allen anderen Patienten werden die initial betroffenen Lokalisationen gemäß der „Involved-field“-Technik mit 20Gray (Gy) bestrahlt. Patienten mit einem Resttumor von über 100ml nach zwei Zyklen Chemotherapie oder einer Tumorrückbildung von weniger als 75% erhalten eine Aufsättigung von 10Gy auf die betroffene Region, sofern das Restvolumen größer als 5ml ist (Nachmann et al., 2002; Schellong et al., 1986).

1.8.2 Chemotherapie

Nach der Erstdiagnose eines Hodgkin-Lymphoms werden die Patienten hinsichtlich ihres Krankheitsstadiums in Therapiegruppen eingeteilt. Therapiegruppe 1 umfasst die niedrigen Stadien I und IIA, Therapiegruppe 2 die Stadien IIB, IIE und IIIA. Therapiegruppe 3 umfasst weiter fortgeschrittene Stadien. Alle Patienten erhalten zu Beginn zwei Zyklen OEPA (Etoposid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison/Prednisolon). Patienten der Therapiegruppe 1 erhalten bei gutem Ansprechen der Chemotherapie keine weitere Therapie, alle anderen dieser Gruppe werden bestrahlt. Patienten der Therapiegruppe 2 werden nach anfänglicher Chemotherapie randomisiert und erhalten jeweils zwei Zyklen COPP (Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Prednison/Prednisolon) oder COPDAC (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison/Prednisolon und Dacarbazin). Auch hier werden nur die Patienten bestrahlt, die nach zwei Zyklen Chemotherapie kein adäquates Ansprechen zeigen. Patienten der Therapiegruppe 3 erhalten vier Zyklen COPP oder COPDAC. Für die Bestrahlung gelten die gleichen Richtlinien (Zusammenfassung EuroNet-PHL-C1).

1.8.3 Chirurgie

Die Hauptindikation zur chirurgischen Intervention im Rahmen des Morbus Hodgkin bestand bisher in der Diagnosesicherung mittels Biopsie. 1983 berichteten Miettinen et al. über 31 erwachsene Patienten mit retrospektiv diagnostiziertem lymphozytenprädominantem Hodgkin-Lymphom, welche nur durch Lymphknotenexstirpation therapiert wurden, da die initial durchgeführte Histologie das Gewebe als benigne klassifizierte. Sie konnten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 93% verzeichnen (Miettinen et al., 1983). 1984 wurde durch Hansmann et al. über weitere 24 Patienten berichtet, welche aus unterschiedlichen Gründen ebenso nur einer chirurgischen Therapie unterzogen wurden. Bei neun dieser Patienten konnte eine Langzeitremission erzielt werden (Hansmann et al., 1984). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit lymphozytenprädominantem Hodgkin-Lymphom in frühen Stadien (IA und IIA) durch Exstirpation der betroffenen Lymphknotenareale als alleinige Therapie eine Langzeitremission erreichen und eventuell geheilt werden können (Mauz-Körholz et al., 2007).

1.9 Prognose

In den letzten Jahrzehnten ist es gelungen, die Überlebensrate bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen deutlich zu steigern. Heute können über 90% der Betroffenen durch die Kombination von Radio- und Chemotherapie geheilt werden (Körholz et al., 2004). Dennoch gibt es eine beachtliche Zahl von Patienten, die auf die heutigen Therapieregime nicht ansprechen. So haben Patienten, die während der Erstbehandlung nicht in Remission kommen, Patienten, die unter laufender Therapie einen Progress entwickeln und Patienten, die binnen der ersten drei Monate nach Beendigung der Therapie einen Rückfall erleiden, nur noch eine 5-Jahres-ereignisfreie-Überlebensrate von 17% (Daten der DHSG). Eine Reihe von Risikofaktoren, assoziiert mit ungünstiger Prognose, wurden in verschiedenen Studien etabliert. So spielen das klinische Stadium und die Morphologie (Allemani et al., 2006), ein hoher Anteil von löslichem CD30 (Visco et al., 2006), das männliche Geschlecht (Liao et al., 2001; Smith et al., 2003), das Ansprechen auf die initiale Chemotherapie (Gallamini et al., 2006), die Expression von T-Zellmarkern auf den Tumorzellen (Asano et al., 2006), sowie das Vorhandensein von einzelnen molekularen Markern (Dukers et al., 2002; Sup et al., 2005; Hsi et al., 2006) eine entscheidende Rolle für die Langzeitprognose des Hodgkin-Lymphoms. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression bzw. Herunterregulation verschiedener Gene und einer Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika konnte durch vergangene Studien herausgearbeitet werden (Tew, 1994; McLellan und Wolf, 1999; Townsend und Tew, 2003; Staeger et al., 2008).

2 Zielstellung

Kinder und Jugendliche mit Hodgkin-Lymphomen besitzen unter den aktuellen Therapiestrategien gute Heilungschancen. Dennoch gibt es eine Gruppe von 10% der Patienten die primär chemo- und radiotherapierefraktär sind (Dörffel et al., 2003). Ursächlich dafür könnte sich u.a. ein besonderes Genexpressionsprofil der resistenten Tumorzellen zeigen. Die Identifikation solcher Resistenzgene könnte in Zukunft wichtig sein, um Patienten mit ungünstiger Prognose und einem erhöhten Risiko eines Rückfalls zu ermitteln und diese einer besonderen Therapieanpassung zugänglich zu machen. Die Zielstellung dieser Arbeit bestand im Vergleich zwischen chemotherapieresistenten und -sensiblen HL-Zelllinien hinsichtlich ihrer Unterschiede im Oberflächenantigenbesatz und im Genexpressionsprofil sowie die Identifikation von möglichen Resistenzgenen. Weiterhin sollte versucht werden, eine Überwindung dieser Chemotherapieresistenz zu erreichen. Ein neuer therapeutischer Ansatz könnte dadurch in Zukunft denkbar werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

Brutschrank BBD6220	Heraeus (Gera, D)
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Elektrophoresekammern	Bio-Rad (München, D)
Fluor-STMultimager	Bio-Rad (München, D)
Kryo-Einfriercontainer	Nalgene (Rochester, USA)
Lichtmikroskop (invers)	Carl Zeiss (Jena, D)
pH-Elektrode	WTW (Weilheim, D)
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik (Friedrichsdorf, D)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, D)
Spannungsgeräte	Bio-Rad (München, D)
Spektrophotometer DU® 640	Beckman Instrumente (München, D)
Steril-Bank Hera Safe	Heraeus (Hanau, D)
Thermocycler	Biometra (Göttingen, D) bzw. Eppendorf (Hamburg, D)
Vortex Genie®2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau, D)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden bei der vorliegenden Arbeit verwendet:

Einmal-Injektions-Kanülen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Kryo-Einfrierröhrchen	Nalgene (Rochester, USA)

Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße, Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Zellkulturflaschen/ -platten, Zentrifugen- röhrchen, serologische Pipetten, Spritzenvorsatzfilter	TPP® (Trasadingen, CH)

3.1.3 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden bei der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

Acrylamid (linear)	Ambion (Austin, USA)
Agarose	PEQ Lab (Erlangen, D)
Ammoniumacetat	Ambion (Austin, USA)
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Aqua bidest.	laboreigene Anlage
Biotin-11CTP	Enzo (New York, USA)
Biotin-16UTP	Roche (Mannheim, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
DEPC-Wasser	Ambion (Austin, USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethanol 80 Vol. %	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol 96 Vol. %	Fluka (Buchs, CH)
Isopropanol	Fluka (Buchs, CH)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Magnesiumacetat	Sigma (Heidelberg, D)
Magnesiumchlorid (25mM)	Promega (Mannheim, D)
Natriumchlorid 5x	Ambion (Austin, USA)
MES	Sigma (Heidelberg, D)
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma (Heidelberg, D)
RNaseZap®	Ambion (Austin, USA)
Tris/Acetat	Sigma (Heidelberg, D)
T7dT24 Primer 1µg/ml	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Tween 20	Calbiochem (Darmstadt, D)

3.1.4 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Reaktionssysteme verwendet:

dNTP-Mix (10mM)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
DNA Ladder Mix (GeneRuler™)	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Oligo (dT) ₁₈ Primer	Invitrogen (Karlsruhe, D)
PBS (phosphate buffered saline)	BioWhittaker (East Rutherford, USA)
peqGold TriFast	PeqLabBiotechnologie (Erlangen, D)
RPMI 1640	Biochrom AG (Berlin, D)
Trizol Reagent	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom AG (Berlin, D)

3.1.5 Verwendete Medikamente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Medikamente verwendet:

5-Azacytidin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Cisplatin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethacrynsäure	BioVision (Mountain View, USA)
Roscovitin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

3.1.6 Enzyme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Enzyme verwendet:

aTaq für RT-PCR	Promega (Mannheim, D)
E.coli DNA Ligase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
E.coli DNA Polymerase I	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Reverse Transkriptase (Superscript II)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
RNase H	Invitrogen (Karlsruhe, D)

3.1.7 Kits

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Kits verwendet:

Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen (Hilden, D)
GeneChip Expression Hybridization Control Kit	Affymetrix (Santa Clara, USA)
MEGAscript T7-Kits Transcription Kit	Ambion (Austin, USA)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)

3.1.8 Kultur- und Einfriermedien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Kultur- und Einfriermedien verwendet:

Kulturmedium	RPMI 1640 + 10% FCS + 1% P/S
Einfriermedium	10% DMSO in entsprechendem Kulturmedium
FCS (fetal calf serum)	Biochrom AG (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrom AG (Berlin, D)

3.1.9 Sonstige Puffer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Puffer verwendet:

Buffer (First Strand, 5x)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Buffer (Second Strand, 5x)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
DNA-Probenpuffer (6x)	Fermentas (St. Leon-Rot, D)
Fragmentierungspuffer	MES 2x, 5M NaCl (Natriumchlorid), 0,5M EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat), Tween (Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat) 20 (0,01% (v/v)), DEPC (Diethylene-Pyrocabonate)-Wasser

Hybridisierungspuffer	200mM Tris/Acetat, 500mM CH ₃ COOK (Kaliumacetat), 150mM (CH ₃ COO) ₂ Mg (Magnesiumacetat), DEPC-Wasser
TAE-Puffer, 50x (Laufpuffer für Agarosegele)	2M Tris-HCl pH 8.0, 1M Essigsäure, 50mM EDTA

3.1.10 Zelllinien

Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland bezogen.

L-1236

Die Zelllinie L-1236 wurde 1994 aus dem peripheren Blut eines 34 Jahre alten männlichen Patienten generiert, bei welchem ein Hodgkin-Lymphom vom gemischtzelligen Typ im Stadium IV diagnostiziert wurde. Nach anfänglich gutem Ansprechen auf die initiale Radiotherapie trat schon im folgenden Jahr ein Rezidiv der Erkrankung auf. Nach wiederholten Chemotherapien mit nur kurzzeitig anhaltender Remission verstarb der Patient schließlich nach dem dritten Rückfall 1994 an pulmonalen Komplikationen (Jox et al., 1998).

L-540

Die Zelllinie L-540 stammt aus dem Knochenmark einer 20-jährigen Hodgkin-Lymphom-Patientin vom Typ der nodulären Sklerose im Stadium IVB (Diehl et al., 1981).

3.1.11 FACS-Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Isotypkontrollen zur Durchführung von FACS-Analysen

Name	Klon	Isotyp	Markierung	Quelle
anti-human CD2	RPA-2.10	Maus IgG1 κ	FITC	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD3	SK7	Maus IgG1 κ	PerCP	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD4	RPA-T4	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD8	RPA-T8	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD23	M-L233	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD25	M-A251 2A3	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD40	5C3	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD56	B159	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD80	L370.4	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
anti-human CD154	5C8	Maus IgG1 κ	PE	BD-Biosciences (Heidelberg, D)
Maus IgG1	X40	Maus IgG1	PE	BD-Biosciences (Erembodegem-Aalst, B)
Maus IgG2a	X39	Maus IgG2a	FITC	BD-Biosciences (Erembodegem-Aalst, B)

Abkürzungen: PE (Phycoerythrin), FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PerCP (Perinidin-Chlorophyll-A-Protein)

3.1.12 Oligonukleotide

Tabelle 3: Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide

Vorwärts-Primer (5'-Primer) sind mit „for“, Rückwärts-Primer (3'-Primer) sind mit „rev“ gekennzeichnet.

Gen	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Produktgröße
GSTM1 for	CCT GTC TGC GGA ATC CGC AC	620bp
GSTM1 rev	GCT GAG TAT GGG CTC CTC AC	
GSTM2 for	GCT GAG TAT GGG CTC CTC AC	111bp
GSTM2 rev	TAG TGG CCA CCA GGA TCA CA	
GSTM4 for	GAA TCG ACA CCA ACC AGC AT	638bp
GSTM4 rev	CCC AGT CAA GTT GAT GCA GA	
GSTT1 for	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	255bp
GSTT1 rev	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	
IL 26 for	TGA GGT GTG GGT TGC TGT TA	273bp
IL 26 rev	TGC AGT TGA CCA AAA ACG TC	
IL5RA for	CAT TGA GCA TTG GTC CTG TG	229bp
IL5RA rev	GTA ATA CAT GCG CCA CGA TG	
IL13RA for	AAC TTC CCG TGT GAA ACC TG	579bp
IL13RA rev	AGT CGG TTT CCT CCT TGG TT	
MARCKS for	TCA TGT TAG CTG TAC CAG TCA GTG	174bp
MARCKS rev	TGC AAA CTT CAT GTG CTT CTG	
PRAME for	GCT GTG CTT GAT GGA CTT GA	454bp
PRAME rev	AAG GTG GGT AGC TTC CAG GT	
TP 53 for	GTT CCG AGA GCT GAA TGA GG	159bp
TP 53 rev	TCT GAG TCA GGC CCT TCT GT	
TRAIL for	AAG GAA GGG CTT CAG TGA CC	911bp
TRAIL rev	AGT TAG CCA ACT AAA AAG GCC C	

Gen	Primersequenz in 5'→3'-Richtung	Produktgröße
XIST for	CTC CAG GCC AAT GAG AAG AA	234bp
XIST rev	TGG CAC AGT CCA CCA AAT TA	

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Während der Arbeit mit RNA war immer darauf zu achten eine spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse der sehr anfälligen RNA durch RNasen zu verhindern. Dafür wurde zu Beginn der Arbeitsplatz sowie die Pipetten mit RNaseZap® behandelt und im weiteren Verlauf ausschließlich steril verpackte, gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Zur Isolation der RNA wurden die Zellen zunächst für 10min bei 200g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1ml TRIzol-Reagenz aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 5min auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe einer Spritze homogenisiert. Unlösliche Bestandteile, wie Polysaccharide, hochmolekulare DNA und extrazelluläre Membranen wurden bei 4°C und 12000g 10min lang zentrifugiert. 1ml des Überstandes wurde in ein neues 2ml-Röhrchen überführt, mit 0,2ml Chloroform versetzt und anschließend 15sec kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei Raumtemperatur wurde die wässrige und organische Phase durch Zentrifugation (4°C, 12000g, 15min) voneinander getrennt. Die oben liegende wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit 0,5ml Isopropanol versetzt. Nach kurzem Vortexen folgte eine 10-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Die gefällte RNA konnte dann durch Zentrifugation für 10min bei 12000g und 4°C pelletiert werden. Danach wurde der Überstand abgekippt und das Pellet mit Ethanol (80 Vol.%) gewaschen (Zentrifugation für 5min bei 7500g und 4°C). Zum Schluss wurde die RNA unter dem Abzug getrocknet und in 30-50µl DEPC-H₂O aufgenommen. Damit sich das Pellet

besser lösen konnte, wurde es anschließend noch für 10min bei 65°C inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren wurde mittels UV/VIS Spektrometer bei 260 bzw. 280nm unter Zuhilfenahme einer Quarzküvette durchgeführt. Eine Extinktion von 1 entsprach dabei 50µg/ml doppelsträngiger DNA und 40µg RNA/ml. Durch das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} wurde die Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt, wobei ein Quotient von 1,5-1,7 auf eine saubere Präparation schließen ließ.

cDNA-Synthese (reverse Transkription von mRNA)

Bei der cDNA Synthese wird die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Ein 20µl Ansatz enthielt 2µg RNA, gelöst in einem Volumen von 13µl ribonukleasefreiem Wasser, sowie einen RT-Master-Mix mit einem Volumen von 7µl. Dieser Ansatz inkubierte für 60min bei 37°C. Anschließend erfolgte durch Erhitzen auf 90°C für 5min die Inaktivierung des Enzyms.

RT-Master-Mix:

RT Puffer (5x)	4µl
Oligo d(T) ₁₈ Primer (0,5µg/µl)	1µl
dNTPs Mix (10nM)	1µl
Superscript II RT (200U/µl)	1µl

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion, erstmalig von der amerikanischen Arbeitsgruppe Saiki et al. 1985 beschrieben, ist eine Methode zur in vitro Vermehrung definierter DNA-Stücke mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase (Saiki et al., 1985). Sie erlaubt den schnellen und empfindlichen Direktnachweis kleinster Mengen DNA oder RNA. Der Einsatz dieser Methode hat heute fast alle Bereiche in Medizin und Wissenschaft, einschließlich pränatale Diagnostik, forensische Medizin, Gewebetypisierung für Organtransplantationen sowie mikrobiologische Diagnostik revolutioniert (Innis et al., 1990, Persing et al., 1993).

Durchführung

Die PCR bestand aus drei wesentlichen Schritten. Ein PCR-Zyklus begann mit einer thermischen Denaturierung, bei der der zu amplifizierende DNA-Strang bei 94°C aufgeschmolzen wurde. In einem nächsten, dem so genannten Annealing-Schritt, konnten sich die sequenzspezifischen Primer (Oligonukleotide) bei 60°C an den aufgetrennten DNA-Strang anlagern. In dem abschließenden Elongationsschritt wurde die Temperatur nochmals auf 72°C erhöht, da sich hier das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, welche für die Primerverlängerung eingesetzt wurde, befand.

Der 25µl Ansatz enthielt:

PCR Puffer (10x)	2,50 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,50 µl
dNTP Mix (10mM)	0,50 µl
sense-Primer (25µM)	0,25 µl
antisense-Primer (25µM)	0,25 µl
Taq Polymerase (5U/µl)	0,20 µl
Aqua bidest.	17,80 µl
cDNA	2,00 µl

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

1. Schritt	95°C	5min
2. Schritt	95°C	30sec
3. Schritt	60°C	30sec
4. Schritt	72°C	1min
5. Schritt	n-fache Wiederholung der Schritte 2-4	
6. Schritt	72°C	7min
7. Schritt	4°C	∞

Je nach Expression des betreffenden Gens wurde die Zyklenzahl zwischen 30 und 35 variiert.

Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe des Agarosegels können die PCR-Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Entsprechend der zu erwartenden Fragmentlängen wurden hier meist Gele mit einer Konzentration von 1-2% gegossen. Die dafür benötigte Agarosemenge wurde in einem Glas abgewogen, mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) suspendiert und anschließend durch ein Mikrowellengerät zum Kochen gebracht. Da es beim Kochen zu einem Flüssigkeitsverlust und damit zu einer Konzentrierung der Pufferlösung kam, wurde nach dem Erhitzen erneut gewogen und die fehlende Flüssigkeitsmenge mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,7 μ g/ml Endkonzentration) versetzt und in eine Gelkammer mit darin befindlichen Kamm gegossen. Die verschiedenen Proben wurden in einem 6x DNA-Ladepuffer aufgenommen und in dem Agarosegel mit 5V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einer variablen Laufzeit von 30-60min konnte das Gel mit Hilfe des Fluor-S™ Multimager fotografiert werden.

DNA-Microarray-Analyse

RNA Isolation

Die Isolation von RNA wurde wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt.

c-DNA Synthese

In einem Gesamtvolumen von 11 μ l wurden 10 μ g Gesamt-RNA und 1 μ g eines T7-(dT)₂₄-Primers bei 70°C für 10min inkubiert. Um ein schnelleres Abkühlen zu erreichen wurde der Ansatz anschließend auf Eis gelagert. Danach wurden 7 μ l eines Reaktionsmixes bestehend aus 4 μ l (5x) First Strand Buffer, 2 μ l (0,1M) DTT, 1 μ l (10mM) dNTPs und 2 μ l der reversen Transkriptase (Superscript II RT) zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde dem Ansatz 130 μ L des Zweit-Strang-Gemisches, bestehend aus 30 μ L (5x) Second Strand Buffer, 3 μ L (10mM) dNTP-Mix, 1 μ L (10U/ μ L) E.coli Ligase, 4 μ L (10U/ μ L) E.coli Polymerase I, 1 μ L (2U/ μ L) RNaseH und 91 μ L DEPC-Wasser hinzugefügt und das Gemisch bei 16°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 μ L einer 0,5M EDTA-Lösung gestoppt. Die Aufreinigung der cDNA wurde durch die Zugabe von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) nach dem Verfahren der Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die gereinigte cDNA wurde mit dem entsprechenden Volumen Ammoniumacetat, Ethanol (96 Vol.%, 2,5 Volumenteile) und 0,5 μ L linearem Acrylamid vermischt. Die ausgefällte cDNA wurde im Anschluss für 30min bei 16°C zentrifugiert und danach mit 0,5ml kaltem Ethanol (80 Vol.%) gewaschen. Abschließend wurde die cDNA in 3 μ l DEPC-Wasser resuspendiert.

In vitro-Transkription

Die in vitro-Transkription der cDNA erfolgte mit Hilfe des MEGAscript T7-Kits (Ambion, USA), 3,75 μ l Biotin-11CTP (10mM) und 3,75 μ l Biotin-16UTP (10mM). Nach einer 6-stündigen Inkubation bei 37°C wurde die synthetisierte cDNA mit Hilfe des RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und in 50 μ l DEPC Wasser eluiert.

Fragmentierung der cRNA

Die Fragmentierung der cRNA erfolgte durch die Zugabe von 4µl Fragmentierungspuffer in 16µl der Biotin-markierten cRNA (1µg/µl) und anschließender Inkubation für 35min bei 95°C.

Hybridisierung

Die Hybridisierung der Microarrays erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Affymetrix®, USA).

Auswertung der Genexpressionsdaten

Die Daten, welche bei der primären Bilderfassung gewonnen wurden, wurden mit Hilfe der Microarray Suite 5.0 Software auf einen Wert von 500 skaliert und anschließend in eine entsprechende Textdatei überführt. Die Auswertung der dadurch erhaltenen Werte erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel®. Verglichen wurden Daten von Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zusammen mit publizierten Daten (GEO Datensatz GSE 2361) von normalen Geweben (Ge et al., 2005). Dazu wurden jeweils zwei Datensätze (Datensatz 1 und 2) von HL-Zelllinien verwendet und mit Hilfe des Programms Gene Set Enrichment Analysis untersucht (Subramanian et al., 2005).

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Zellkultur

Für die im Rahmen dieser Arbeit geschilderten Experimente wurden ausschließlich die beiden Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236 (Wolf et al., 1996) und L-540 (Diehl et al., 1981) verwendet. Alle Zellen wurden in RPMI 1640 zugesetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PS) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchte von 95% kultiviert. Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank und unter Verbrauch steril abgepackter Materialien. Je nach

Wachstum der Zellen wurden sie 2-3 mal pro Woche im Verhältnis 1:2 gesplittet. Dabei wurde vom Inhalt einer Zellkulturflasche die Hälfte der Suspension in eine neue Flasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt.

Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Zuhilfenahme der Neubauerzählkammer. Durch das Anpressen eines Deckgläschens entstanden an den Rändern Newton'sche Ringe. Nach sorgfältigem Resuspendieren wurden 10 μ l einer Probe mit 90 μ l einer Trypanblau-Lösung versetzt (Verdünnungsfaktor = 10) und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau dringt nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran ein und färbt diese blau. So konnten lebende von toten Zellen unterschieden werden. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet:

Zellzahl pro ml = Zellzahl pro Großquadrat x 10⁴ x Verdünnungsfaktor

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst durch Überführen in ein 15ml-Falcon-Röhrchen und Zentrifugation für 10min bei 200g geerntet. Anschließend wurde das Pellet mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) gewaschen (10min bei 200g). Zum Schluss wurden die Zellen in einer entsprechenden Menge Einfriermedium (RPMI 1640 mit 1% DMSO und 10%FCS) aufgenommen und in Kryo-Röhrchen überführt. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu ermöglichen wurden diese erst bei -80°C eingefroren, bevor nach wenigen Tagen der Transfer in flüssigen Stickstoff stattfand.

Das Auftauen von gefrorenen Zellen erfolgte im 37°C warmen Wasserbad. Sobald nur noch ein kleiner Eisklumpen zu sehen war wurden die Zellen in ein 15ml Falcon-Röhrchen, gefüllt mit RPMI1640, überführt und bei 200g für 10min abzentrifugiert. Durch diesen Waschschrift konnte das restliche DMSO entfernt werden. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet konnte in frisches Medium aufgenommen werden.

Proliferationstest (MTT)

Als Proliferationstest wurde das Cell Proliferation Kit I von Roche nach den Angaben des Herstellers verwendet. Durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, sowie mit Hilfe von NADH und NADPH in den vitalen Zellen, kommt es zur Farbstoffumbildung durch die Reduktion von MTT, einem gelben Tetrazoliumsalz, zum blauen Formazan. Dieser Farbumschlag ist zur Wachstums-, Stoffwechsel- und Überlebensrate der Zellen proportional.

Zur Durchführung des Tests wurde eine definierte Anzahl von Zellen in eine 96er Lochplatte ausgesät (50000 Zellen pro Vertiefung). Nach einer Wachstumsphase von 72h bei 37°C wurden 10µl MTT pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4h wurde die Farbstoffumbildung durch Zugabe von 100µl Solubilisierungslösung (SDS- (Natriumdodecylsulfat) und HCl- (Chlorwasserstoff) haltig) gestoppt. Nach weiteren 24h Inkubationszeit zum Lösen der Kristalle wurde die Absorption im Mikro-Plattenleser bei einer Wellenlänge von 560nm und einer Referenzwellenlänge von 655nm gemessen.

Titration von Cisplatin zur Quantifizierung der Chemotherapieempfindlichkeit

Zur Quantifizierung der Empfindlichkeit der verwendeten Zelllinien gegenüber Chemotherapeutika wurde eine 96er Lochplatte zum Aussäen der Zellen verwendet. In den Reihen 1-10 befand sich eine definierte Menge an Zellen (50000 Zellen resuspendiert in 50µl Medium). Die Reihen 11 und 12 dienten als Kontrolle, in denen jeweils nur Zellen in Medium ohne Cisplatin vorhanden waren. Durch das Lösen des Cisplatins in sterilem Wasser wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100µg/ml hergestellt. Nach durchgeführter Titration lagen demnach Cisplatinkonzentrationen von 50µg bis 0,1µg in den Vertiefungen vor. Nach einer Wachstumszeit der ausgesäten Zellen von 4h konnten die durch die Titration entstandenen, in ihren Konzentrationen unterschiedlichen Lösungen auf die Zellen gegeben werden. Anschließend folgte eine Inkubation für 48h bei 37°C im Brutschrank. Zur Analyse der Wirkung des Cisplatins auf die Tumorzellen wurde der Proliferationstest (MTT) der Firma Roche nach den Angaben des Herstellers verwendet (s.o.).

Titrationenversuche mit Ethacrynsäure und Cisplatin

Für die Titration von Ethacrynsäure und Cisplatin wurde eine 24er Lochplatte verwendet. Das gelöste Cisplatin lag in einer Stammkonzentration von 100 μ g/ml vor. Durch die anschließende Titration wurden Cisplatinkonzentrationen von 50 μ g/ml bis 6,25 μ g/ml hergestellt. Für die Titration von Ethacrynsäure wurde eine 50mM Ethacrynsäurestammlösung verwendet. In den einzelnen Vertiefungen der 24er Lochplatten wurden anschließend Ethacrynsäurekonzentrationen von 100 μ M bis 6,25 μ M vorgelegt. In den jeweils letzten Vertiefungen der Reihen befand sich nur Cisplatin bzw. Ethacrynsäure. Zum Schluss wurden die Zellen in die jeweiligen Vertiefungen ausgesät (500 000 Zellen pro Vertiefung) und 24h inkubiert.

Quantitative Bestimmung der toten Zellen mittels FACS

Die Zellen wurden 24h im Brutschrank bei 37°C mit den einzelnen Zytostatika inkubiert. Anschließend wurden die Inhalte der 24 Vertiefungen in FACS-Röhrchen überführt, mit 2ml PBS gewaschen und bei 1500rpm für 5min zentrifugiert. Zum Schluss wurde jedes Zellpellet in 300 μ l PBS aufgenommen und mit 15 μ l Propidiumjodid gefärbt. Die Anzahl toter Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt.

Titrationenversuche mit Ethacrynsäure und Roscovitin

Bei diesem Experiment fand eine 24er Lochplatte Verwendung. Es wurden analog zum vorherigen Experiment Ethacrynsäurekonzentrationen zwischen 100 μ M und 6,25 μ M hergestellt. Durch die Titration von Roscovitin entstanden Konzentrationen zwischen 90 μ M und 30 μ M. Zum Schluss wurden 500 000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und 24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Analyse der Daten diente ebenfalls das Durchflusszytometer. Im Rahmen einer Färbung mit Propidiumjodid wurde die Anzahl toter Zellen ermittelt (s.o.).

Berechnung der ED50

Die Berechnung der ED50 erfolgte mit Hilfe des Programms ED50plus v1.0 (<http://www.softlookup.com>).

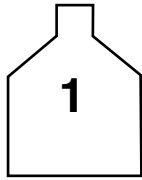
Inkubation der Zelllinien mit 5-Azacytidin

Für dieses Experiment wurde ausschließlich 5-Azacytidin der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, D) verwendet. Ziel war es, den Einfluss des Azacytidins als Inhibitor der DNA- bzw. RNA-Methyltransferasen auf die oben genannten Zelllinien mittels PCR zu untersuchen. Um in einer Zellkulturflasche eine Endkonzentration von $5\mu\text{M}$ zu erreichen, wurden $61,05\text{mg}$ des in Pulverform vorliegenden Azacytidins mit Hilfe der Feinwaage abgewogen und in 5ml RPMI 1640 resuspendiert. Anschließend wurden $10\mu\text{l}$ dieser Lösung in $90\mu\text{l}$ RPMI 1640 gemischt und so eine Verdünnung der Stammlösung von 1:10 erreicht. Zum Schluss wurde in jede 10ml -Zellkulturflasche eine Menge von $10\mu\text{l}$ der verdünnten Lösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurde aus den Zellen RNA isoliert, cDNA synthetisiert und eine PCR durchgeführt (siehe 3.2.1).

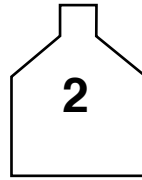
Inkubation von Zelllinien mit konditionierten Medien

Diese Experiment diente der Analyse einer möglichen Veränderung des Genexpressionsmusters der verschiedenen Zelllinien durch Inkubation mit den konditionierten Medienüberständen der jeweils anderen Zelllinie. Zum Ansatz dieses Versuches verwendeten wir ausschließlich 25cm^2 -Zellkulturflaschen. Die ersten beiden Flaschen enthielten zusätzlich zu den Zellen nur 10ml frisches RPMI 1640 Medium. Die zweiten Flaschen dienten als Kontrolle und wurden mit 5ml frischem und 5ml verbrauchtem Medium der selben Zelllinie gefüllt. Zum Schluss wurde zu den Zellen der dritten Flaschen ebenfalls 5ml frisches, aber auch 5ml konditioniertes Medium der jeweils anderen Zelllinie überführt. Um eine Verschleppung von Zellen direkt zu vermeiden, wurde das verbrauchte Medium mit einer 5ml Pipette abgezogen und über eine Spritze mit $22\mu\text{m}$ Filter in die neue Zellkulturflasche gepresst. Nach einer

Inkubationszeit von mindestens 1 Woche wurde RNA aus den Zellen isoliert und eine PCR durchgeführt (siehe 3.2.1).



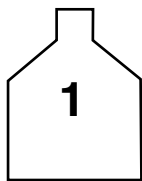
L-1236 mit 10ml
frischem Medium



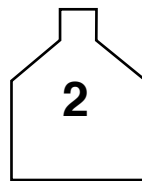
L-1236 mit 5ml frischem
und 5ml altem Medium
von L-1236



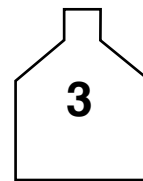
L-1236 mit 5ml
frischem und
5ml altem
Medium von
L-540



L-540 mit 10ml
frischem Medium



L-540 mit 5ml frischem
und 5ml altem Medium
von L-540



L-540 mit 5ml
frischem und
5ml altem
Medium von
L-540

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Inkubation von Zelllinien mit konditionierten Medien

Die jeweils ersten Flaschen der beiden Zelllinien L-1236 und L-540 enthielten die Zellen gelöst in 10ml frischem Medium. Die zweiten Flaschen enthielten die Zellen gelöst in 5ml frischem und 5ml verbrauchtem Medium der jeweils identischen Zelllinie. Die dritten Flaschen enthielten die Zellen der jeweiligen Linie, 5ml frisches Medium und zusätzlich 5ml konditioniertes Medium der jeweils anderen Zelllinie. Nach einer Inkubationszeit von einer Woche wurde eine PCR durchgeführt und nach Veränderungen in der Genexpression gesucht.

3.2.3 Immunologische Methoden

Durchflusszytometrie (FACS)

Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem es möglich ist, die Merkmale von verschiedenen Subpopulationen von Zellen zu analysieren. Ihr liegen die unterschiedlichen Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Einzelzellen zugrunde. In einer gemischten Zellpopulation werden bestimmte Zellen erst durch Behandlung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, oder mit spezifischen Antikörpern und anschließend mit markierten Anti-Immunglobulin-Antikörpern gekennzeichnet. Danach wird dieses Zellgemisch in eine Salzlösung mit deutlich größerem Volumen durch eine Düse gedrückt. Der dadurch entstehende feine Flüssigkeitsstrahl, in dem die Zellen nacheinander aufgereiht sind, passiert einen Laser. Dabei kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung. An die Zellen gebundene Farbstoffmoleküle werden zur Fluoreszenz angeregt. Durch Photodetektoren wird sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht gemessen. Das Streulicht lässt Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zellen zu. Die Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung von markierten Antikörpern und somit über das Oberflächenexpressionsprofil der einzelnen Zellen. Die gemessenen Daten werden dann auf einen Computer übertragen und können mit entsprechender Software ausgewertet werden (CellQuest Pro Software). Sind die Zellen nur mit einem einzigen Fluoreszenzfarbstoff markiert worden, erscheinen die Daten als Histogramm der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl. Bei Verwendung von mehreren Antikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen erscheinen die Daten als Streu- oder Konturendiagramm, in dem die Fluoreszenz des ersten Antikörpers gegen die des zweiten aufgetragen wird.

Durchführung

Nach der Zählung der Zellen mit Hilfe der Zählkammer wurde aus der Zellsuspension eine geeignete Menge (ca. 1Mio Zellen) entnommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 200g für 10min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgten die Zugabe von 50 μ l PBS und die Färbung mit 10 μ l der jeweiligen Antikörper bzw. der dazugehörigen Isotypenkontrollen. Dieses Gemisch inkubierte bei 4°C für 20min im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml PBS gewaschen, für 5min bei 200g zentrifugiert und nochmals in 1ml PBS gelöst. Mittels Durchflusszytometer konnten die Zellen nun analysiert werden. Die Messungen wurden mittels FACScan der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, D) durchgeführt.

Auswertung der Daten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der CellQuest PRO Software (Becton Dickinson). Die Bildbearbeitung wurde anschließend durch das Programm winmdi2.9 durchgeführt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die immunologischen und genetischen Eigenschaften einer chemotherapiesensiblen und einer chemotherapieresistenten Zelllinie gegenübergestellt werden. Unter Verwendung der etablierten Zelllinien L-1236 und L-540 wurde zu Beginn der Einfluss von Cisplatin auf das Tumorwachstum sowie der unterschiedliche Oberflächenantigenbesatz mittels FACS-Analyse untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe der PCR das Genexpressionsprofil der beiden Zelllinien dargestellt. Anschließend wurden mögliche Resistenzgene identifiziert und versucht, die Chemotherapieresistenz mit Hilfe eines neuen Therapeutikums zu überwinden.

4.1 Der Einfluss von Cisplatin auf das Tumorwachstum

Cisplatin ist ein sehr verbreitetes Zytostatikum, welches heute vor allem im Rahmen der Therapie von Hoden-, Ovarial-, Bronchial-, Harnblasen- und Zervixkarzinomen sowie bei Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals Anwendung findet. Es wird als Infusion verabreicht und kommt fast ausschließlich in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zum Einsatz. Für eine mögliche Resistenzentwicklung spielen unter anderem intrazelluläre Konzentrationen an Glutathion und die zahlreichen SH-Gruppen tragenden Metallproteine eine wichtige Rolle (Voigt et al., 2006).

In diesem Experiment sollte grundsätzlich ein mögliches Ansprechen der beiden Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236 und L-540 auf Cisplatin untersucht und mit Hilfe des MTT-Proliferationstests dargestellt werden. Nach dem Aussäen der Zellen und Inkubation mit Cisplatin für 24h bei 37°C im Brutschrank wurde der MTT-Proliferationstest nach den Angaben des Herstellers angewendet. Dieser Test ermöglicht eine Analyse der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen der vitalen Zellen und macht so eine Bestimmung der Stoffwechsel-, Wachstums- und Überlebensrate der Zellen möglich. Wie im unten stehenden Balkendiagramm dargestellt, wurde eine deutlich höhere Empfindlichkeit der Zelllinie L-540 gegenüber Cisplatin beobachtet, wobei L-1236-Zellen auch bei hohen Cisplatin-Konzentrationen noch hohe Überlebenswerte im MTT-Proliferationstest zeigten. In beiden Zelllinien war jedoch eine Zunahme dieser Werte und demnach indirekt auch eine Zunahme der Überlebensrate bei sinkenden Cisplatin-Konzentrationen zu verzeichnen.

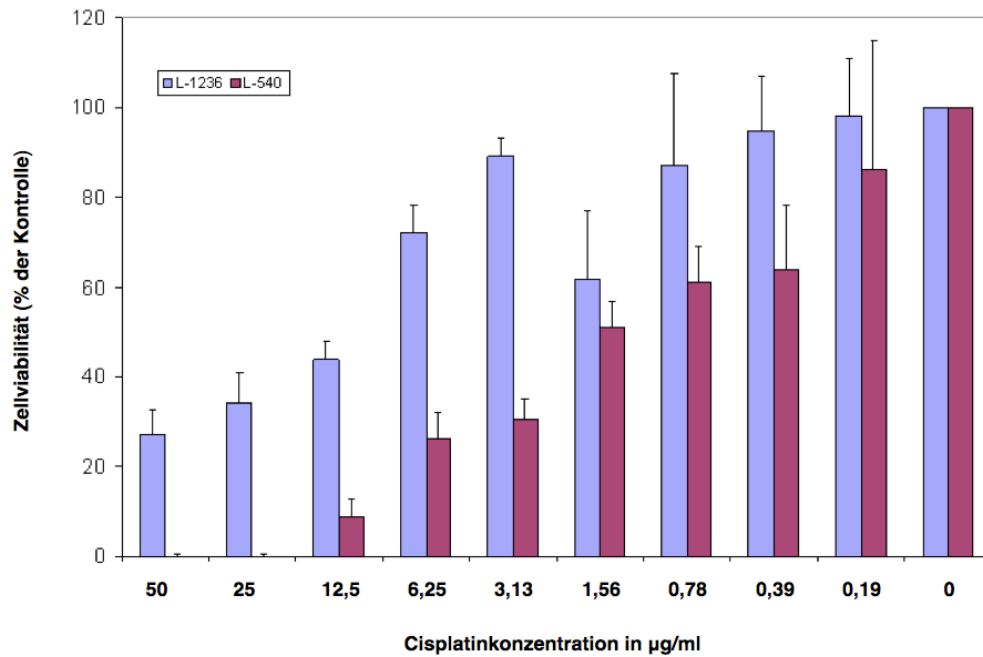


Abbildung 4: Cisplatin-Titration für die Zelllinien L-1236 und L-540

Dargestellt sind die Ergebnisse des MTT-Tests in Form der Zellviabilität nach einer 48-stündigen Inkubation mit Cisplatin. Es lagen Cisplatinkonzentrationen von 50 µg/ml bis 0 µg/ml vor. Es wurden 4-fach Bestimmungen von beiden Zelllinien durchgeführt. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken aufgetragen.

Mit Hilfe der ED50 (Effektive Dosis 50%) kann die Konzentration an Cisplatin ermittelt werden, bei der noch 50% der Zellen am Leben sind. Wie im unten stehenden Diagramm verdeutlicht, konnte man bei der chemotherapieempfindlichen Zelllinie L-540 sehen, dass schon bei einer Cisplatinkonzentration von 3,69 µg/ml nur noch 50% der Zellen am Leben waren. Bei der chemotherapieresistenten Zelllinie L-1236 wurde dieser Zustand erst bei einer Cisplatinkonzentration von 21,085 µg/ml erreicht.

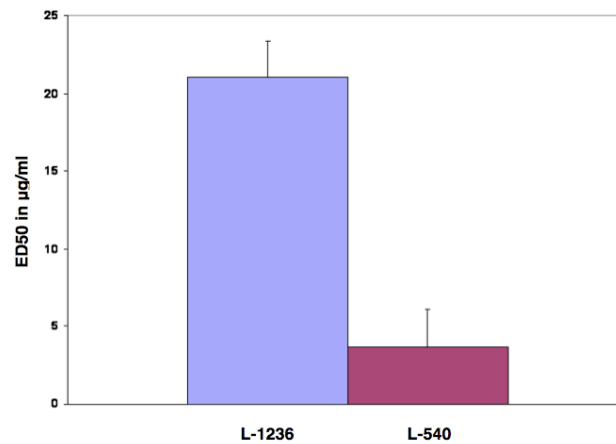


Abbildung 5: Darstellung der ED50-Werte aus den in Abb. 4 gezeigten Daten

Die ED50 (Effektive Dosis 50%) wurde mit Hilfe des Programms ED50plus v1.0 (<http://www.softlookup.com>) berechnet und ist in µg/ml angegeben. Zur Ermittlung der Standardabweichung wurden alle Werte der 4-fach Bestimmungen mit einbezogen.

4.2 Expression von Oberflächenmolekülen

Zur Untersuchung der Expression von Oberflächenantigenen auf beiden Zelllinien wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt. Zur Anregung der Fluoreszenz wurden sowohl Phycoerythrin (PE) -markierte als auch Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Antikörper verwendet. Die Daten wurden anschließend mittels CellquestPro (Becton Dickinson) und winmdi2.9 (Verity Software House, Inc.) ausgewertet.

Die FACS-Analyse ergab, dass nach Abzug der Isotypenkontrolle 83,49% der L-1236-Zellen CD80 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Auch CD40 konnte bei 20,80% der Zellen nachgewiesen werden. CD23 war bei 84,54% der L-1236-Zellen vorhanden. Für die Zelllinie L-540 wurde keines dieser Oberflächenantigene nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass das Oberflächenexpressionsprofil der Zelllinie L-1236 dem von aktivierten B-Zellen (CD80, CD40, CD23+ve) entspricht.

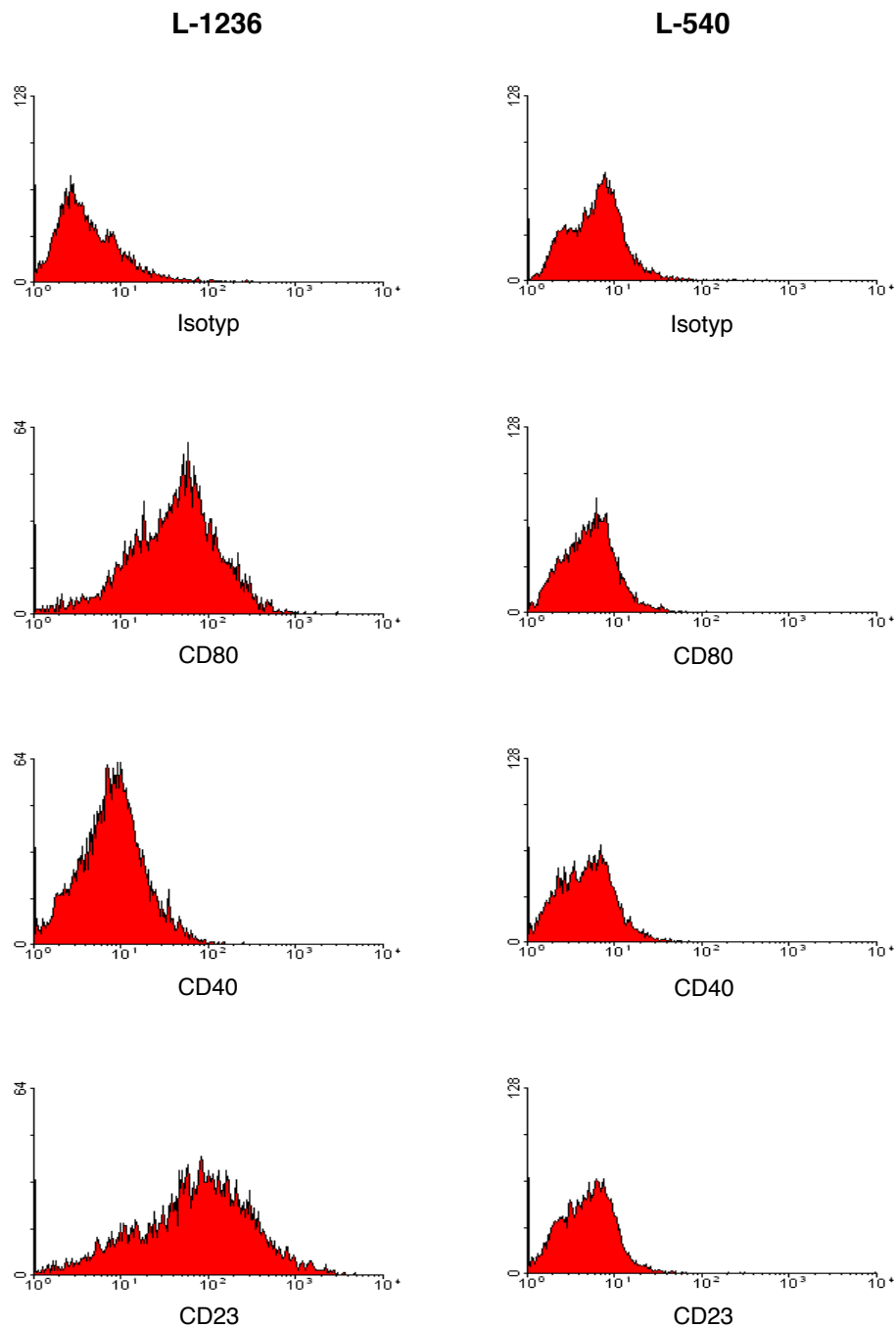


Abbildung 6: FACS-Analyse

Nach der Färbung mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Zellen der beiden Linien im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Oberflächenmolekülexpression untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der CellQuest PRO Software (Becton Dickinson). Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen. Bei L-1236 konnte eine Expression von CD80, CD40 und CD23 nachgewiesen werden. Bei L-540 war keiner dieser Marker nachweisbar (Bildbearbeitung mittels winmdi2.9 software).

Weiterhin wurden die für T-Zellen typischen Marker CD2, CD4 und CD25 in beiden Zelllinien untersucht. Bei L-540 konnte eine Expression von CD2 bei 38,66% und eine Expression von CD25 bei 80,42% der Zellen nachgewiesen werden. Bei L-1236-Zellen war weder CD2 noch CD25 nachweisbar. Beide Zelllinien wiesen nur eine geringe Expression von CD4 auf.

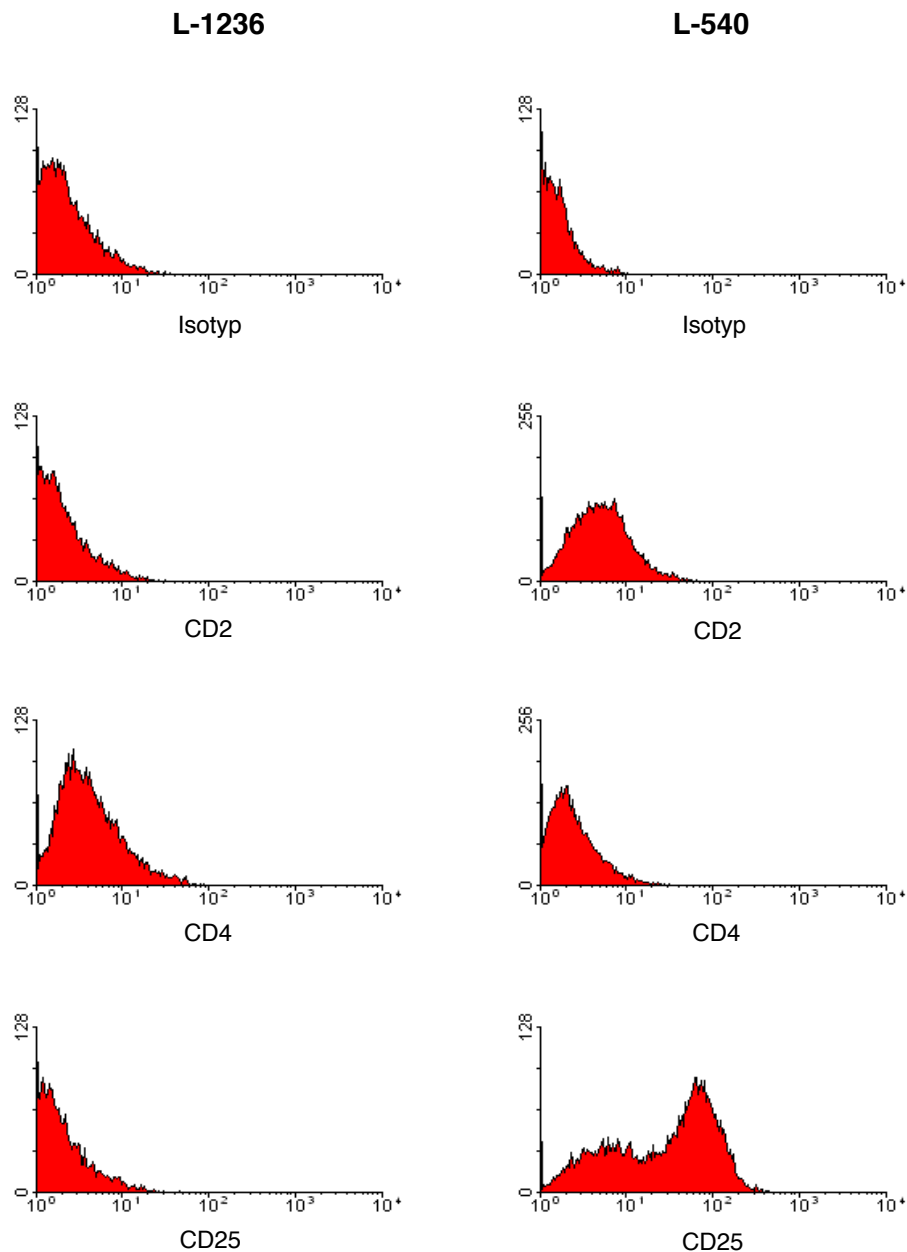


Abbildung 7: FACS-Analyse

Nach der Färbung mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Zellen der beiden Linien im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Oberflächenmolekülexpression untersucht. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen. Bei den L-540-Zellen konnte bei 38,66% eine CD2- und bei 80,42% eine CD25-Expression nachgewiesen werden.

4.3 Untersuchung des Genexpressionsprofils

Um nach Unterschieden in der Genexpression von zytostatikaresistenten und zytostatikasensiblen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zu suchen, wurde eine RNA-Microarray-Analyse durchgeführt. Gene Set Enrichment Analysen wurden verwendet um das für Hodgkin-Lymphome typische Genexpressionsprofil zu charakterisieren (Subramanian et al., 2005). Hierzu wurden Daten von Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zusammen mit publizierten Daten (GEO Datensatz GSE 2361) von normalen Geweben (Ge et al., 2005) verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass bei der Zelllinie L-1236 Gene wie MARCKS, IL13RA1, IL5RA und PRAME deutlich überexprimiert waren. Das Gen XIST konnte nur bei der Zelllinie L-540 nachgewiesen werden. Um diese Ergebnisse zu validieren wurde anschließend bei solchen Genen, welche eine derart deutliche Über- bzw. Unterexpression zeigten, eine PCR durchgeführt.

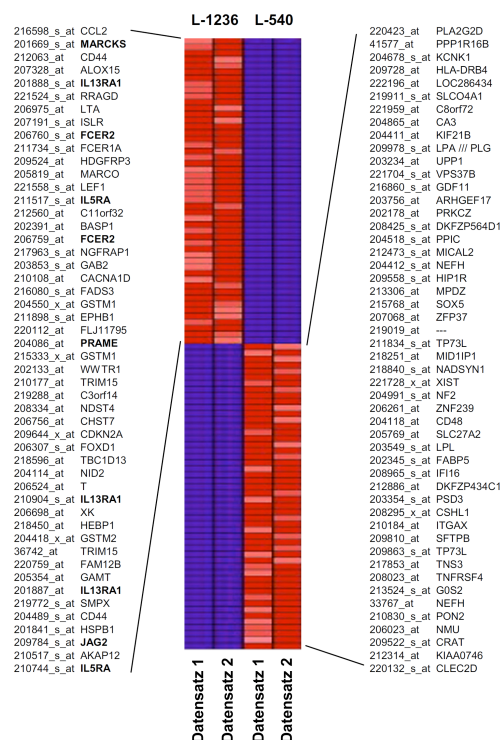


Abbildung 8: DNA-Microarray-Analyse

Identifikation von unterschiedlich exprimierten Genen in den Zelllinien L-1236 und L-540 unter Verwendung von zwei unabhängigen Datensätzen. Die Top 50 der hoch- bzw. herunterregulierten SONDENSÄTZE sind dargestellt. Die SONDENSÄTZE wurden mithilfe des Programms Gene Set Enrichment Analysis identifiziert.

4.3.1 Validierung differenziert exprimierter Gene mittels RT-PCR

Im Einklang damit, mögliche Gene zu identifizieren, welche im Zusammenhang mit einer Chemotherapieresistenz stehen könnten, wurden die beiden Zelllinien L-1236 und L-540 hinsichtlich der Unterschiede ihres Genexpressionsmusters mittels PCR untersucht. Einige der untersuchten Gene, zum Beispiel IL13RA1, wurden in großen Mengen in L-1236 exprimiert und fehlten in L-540. Auch IL5RA war nur in L-1236 vorhanden. Das Tumorantigen PRAME, welches einen attraktiven Angriffspunkt für zukünftige Immuntherapien bieten könnte, wurde ebenfalls nur in der Zelllinie L-1236 exprimiert. Ein weiteres, Gen das nur in L-1236 vorhanden war, ist MARCKS. Es ist dafür bekannt, dass es nach B-Zellaktivierung, wie zum Beispiel nach einer EBV-Infektion, induziert wird. Es wurde erst kürzlich als Marker für Chemotherapieresistenz identifiziert (Birkenbach et al., 1993; Righetti et al., 2006).

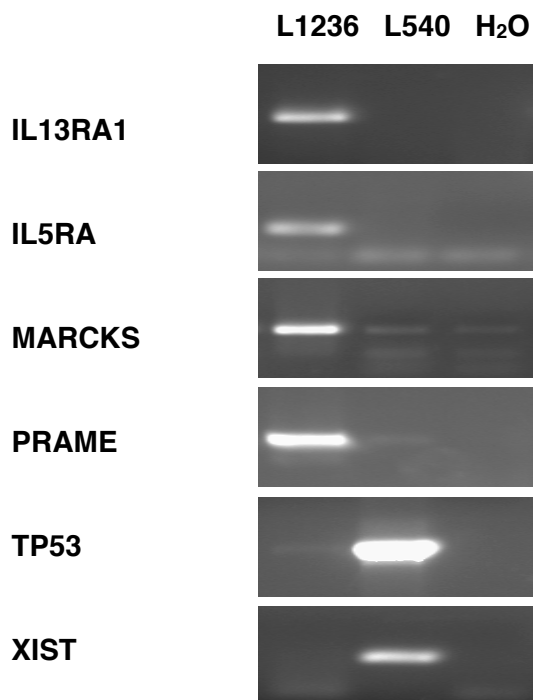


Abbildung 9: PCR zum Nachweis differenziert exprimierter Gene

Zur Validierung der Ergebnisse der DNA-Microarray-Analyse wurde mittels RT-PCR die Expression ausgewählter Gene überprüft. In Spur 1 ist jeweils die Zelllinie L-1236, in Spur 2 die Zelllinie L-540 dargestellt. Spur 3 zeigt die Negativ-Kontrolle, welche nur Wasser enthielt. Gene wie MARCKS, IL13RA1, IL5RA und PRAME waren nur in der Zelllinie L-1236 nachweisbar. Weitere Gene wie TP53 und XIST waren nur in der Zelllinie L-540 nachweisbar.

Umgekehrt fanden sich aber auch einige Gene, die in höheren Mengen in L-540 exprimiert wurden. Darunter z.B. TRAIL, welches als Induktor der Apoptose in Tumorzellen bekannt ist (Evdokiou et al., 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Gene XIST und IL26 ausschließlich in L-540 exprimiert wurden und in L-1236 fehlten. Das Tumorsuppressorgen TP53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseinduktion und der DNA-Reparatur beteiligt sind und konnte nur bei den L-540-Zellen nachgewiesen werden.

4.3.2 Expression der Glutathion-S-Transferasen

Angeknüpft an die Ergebnisse der Microarrays (Abbildung 9), wurde die Expression von GSTM1, GSTM2, GSTM4 und GSTT1 in den beiden verwendeten Zelllinien analysiert. GSTM1 wurde nur in L-1236 exprimiert und fehlte bei L-540. GSTT1 wurde in beiden Zelllinien exprimiert, war aber in L-1236 stärker vorhanden als in L-540. GSTM4 konnte in vergleichbarer Menge in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. GSTM2 konnte in keiner der beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

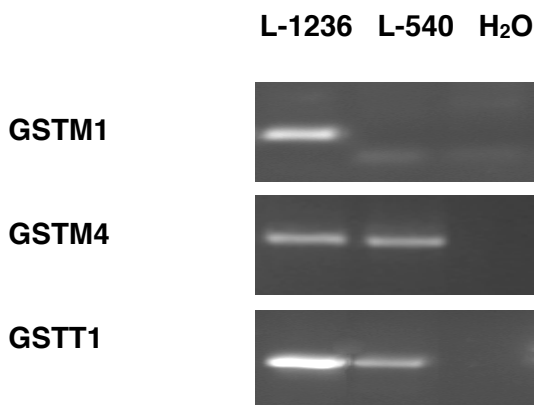


Abbildung 10: Genexpressionsprofil der GST bei den Zelllinien L-1236 und L-540

Zum Nachweis der Glutathion-S-Transferasen und deren unterschiedlicher Ausprägung in den Zelllinien L-1236 und L-540 wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. In Spur 1 sind die L-1236-Zellen, in Spur 2 die L-540-Zellen repräsentativ dargestellt. Spur 3 zeigt die Negativ-Kontrolle, welche nur Wasser enthielt. GSTM1 wurde nur in der Zelllinie L-1236 exprimiert. GSTT1 wurde in größeren Mengen in der Zelllinie L-1236 nachgewiesen. GSTM4 war in beiden Zelllinien in vergleichbarer Menge nachweisbar.

4.4 Regulierbarkeit der Genexpression

Basierend auf den oben genannten Ergebnissen wurde nun versucht die Regulation der untersuchten Gene zu beeinflussen. Hierzu dienten Experimente mit dem Methylierungsinhibitor Azacytidin bzw. der Inkubation mit verschiedenen Medienüberständen.

4.4.1 Der Einfluss von 5-Azacytidin auf die Genexpression

Azacytidin ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Cytidin und wird in der Behandlung von bösartigen Tumoren des blutbildenden Systems eingesetzt (Thieme, 2007). Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass 5-Azacytidin fähig ist eine Differenzierung der Zellen oder eine Veränderung im Genexpressionsmuster von kultivierten Zelllinien zu induzieren (Bodner et al., 1981; Clough et al., 1982; Christman et al., 1983).

Im Anklang an diese Tatsache versuchten wir durch eine Inkubation der Zelllinien L-1236 und L-540 eine mögliche Veränderung in der Genexpression zu erreichen und beobachteten im Besonderen den Einfluss des Azacytidins auf die mit der Chemotherapieresistenz in Zusammenhang stehenden Gene. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass nur eine einzige Veränderung des Expressionsmusters sichtbar wurde. Unter dem Einfluss von Azacytidin wurde eine PRAME-Expression in den L-540-Zellen induziert, welche unter normalen Umständen nur bei der Zelllinie L-1236 zu beobachten war. Alle anderen untersuchten Gene zeigten in beiden Zelllinien keine Unterschiede des Genexpressionsmusters durch den Einfluss des Azacytidins.



Abbildung 11: Darstellung der PRAME-Expression unter Einfluss von Azacytidin

Um eine Veränderung des Genexpressionsmusters der Zelllinien L-1236 und L-540 unter dem Einfluss von Azacytidin darzustellen, wurde nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen eine PCR durchgeführt. In Spur 1 sind die L-1236-Zellen, in Spur 2 die L-540-Zellen aufgetragen. Spur 3 zeigt als Negativ-Kontrolle Wasser. Unter dem Einfluss von Azacytidin wurde eine PRAME-Induktion in der Zelllinie L-540 beobachtet.

4.4.2 Der Einfluss von konditionierten Zellkulturüberständen auf die Genexpression

Nach längerer Koinkubation von L-1236 und L-540-Zellen und anschließender Separation der Zellen mittels Magnetic Cell Separation (MACS®), unter Verwendung des Markers CD80, wurde eine MARCKS-Expression in der Zelllinie L-540 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zur Validierung dieser Erkenntnis wurde der Einfluss konditionierter Medienüberstände der jeweils anderen Zelllinie auf mögliche Veränderungen im Genexpressionsmuster untersucht. Unter gewöhnlichen Zellkulturumständen war eine MARCKS-Expression nur bei der Zelllinie L-1236 zu verzeichnen, wohingegen sie bei den L-540-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Es wurde jedoch festgestellt, dass durch die Übertragung und anschließende Inkubation des konditionierten Mediums der Zelllinie L-1236 auf die L-540-Zellen eine leichte MARCKS-Expression sichtbar wurde. Demnach scheint eine Induzierbarkeit des MARCKS-Gens durch bestimmte Stoffe in den Mediumüberständen wahrscheinlich. IL26 wurde in der Zelllinie L-1236 auf ähnliche Weise induziert.

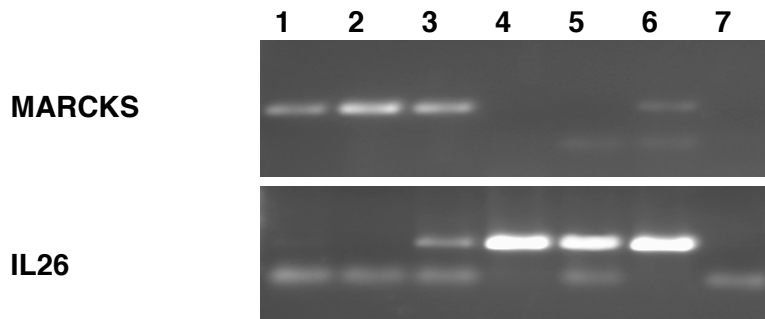


Abbildung 12: Ergebnisse des Medium-Experiments

Um die Regulierbarkeit der Genexpression in beiden Zelllinien zu untersuchen, wurden beide Zelllinien für 1 Woche mit den konditionierten Mediumüberständen der jeweils anderen Zelllinie inkubiert. Anschließend wurde eine PCR durchgeführt. Spur 1 enthielt die Zellen der Linie L-1236 mit 10ml frischem Medium. Spur 2 enthielt L-1236-Zellen mit 5ml frischem und 5ml verbrauchtem Medium der selben Linie. Spur 3 enthielt die Zellen der Linie L-1236 mit 5ml frischem und 5ml konditioniertem Medium der Linie L-540. Spur 4 enthielt L-540-Zellen mit 10ml frischem Medium. Spur 5 enthielt L-540-Zellen mit 5ml frischem und 5ml altem Medium der L-540-Zellen. Spur 6 enthielt L-540-Zellen mit 5ml frischem und 5ml konditioniertem Medium der L-1236-Zellen. Spur 6 enthielt als Negativ-Kontrolle nur Wasser. Nach der Inkubation mit konditionierten Medien zeigten L-540-Zellen eine MARCKS- und L-1236-Zellen eine IL-26-Induktion.

4.5 Cisplatin- und Ethacrynsäuretitration der Zelllinie L-1236

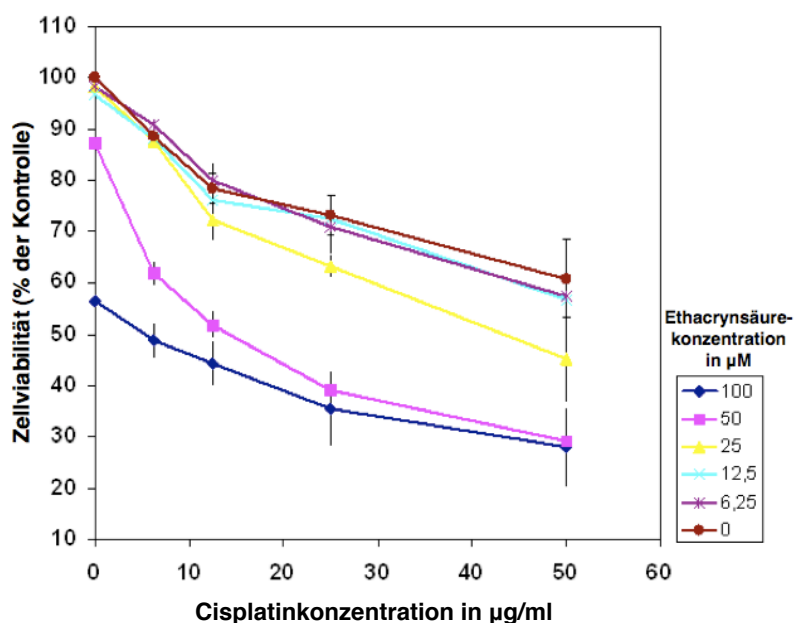
Nach der Identifikation der möglichen Resistenzgene GSTM1 und GSTT1 und der vorhandenen Überexpression in der Zelllinie L-1236 wurde nun versucht einen geeigneten Inhibitor dieser Proteine zu finden. Wie von einigen Autoren beschrieben, ist Ethacrynsäure als Inhibitor der Glutathion-S-Transferasen bekannt und findet heute hauptsächlich als Diuretikum in der Medizin Einsatz (Maher und Schreiner 1965, Ploemen et al., 1993, Tew et al., 1997, Alisky und Tuttle 2003, Zhao und Wang 2006). Angeknüpft an diese Tatsache wurde der Einfluss von Cisplatin und Ethacrynsäure auf das Tumorwachstum der chemotherapieresistenten Zelllinie L-1236 untersucht. Zur Quantifizierung der Apoptoserate der Zellen wurde eine Propidiumjodid-Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die Daten mittels Durchflusszytometrie erfasst und mit Hilfe der CellQuestPro Software ausgewertet. Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, welche für kationische Farbstoffe wie Propidiumjodid (PI) nicht durchlässig ist. Im Rahmen des Zelltodes wird die Zellmembran zerstört und somit kann PI in die Zelle eindringen und an den Kerninhalt binden (Levin 1995, Majno und Joris 1995).

Entscheidend für die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen im FACS ist die kurze Anfärbedauer von maximal 5-10min. In dieser Zeit nehmen tote Zellen PI vollständig, lebende dagegen einen nur kaum messbaren Anteil auf (Jacobs und Pipho 1983, Belloc et al., 1994). Aus unten stehender Tabelle wird sichtbar, dass bei hohen Konzentrationen von Cisplatin und Ethacrynsäure gemeinsam die Zahl lebender Zellen mit 27,97% am geringsten war. Mit sinkender Ethacrynsäurekonzentration bei gleich bleibender Cisplatinkonzentration war eine Zunahme der Zahl lebender Zellen bis auf 60,86% zu verzeichnen (50µg/ml Cisplatin). Weiterhin war zu beobachten, dass eine Reduktion der Ethacrynsäurekonzentration um 50% bei gleich bleibend hoher Cisplatinkonzentration eine Zunahme der Zahl lebender Zellen von durchschnittlich 7,4% zur Folge hatte, während eine Verringerung der Cisplatinkonzentration um 50% bei gleich bleibend hoher Ethacrynsäurekonzentration nur mit einer Zunahme der Lebendzellzahl von durchschnittlich 6,9% einherging. Damit wird deutlich, dass die Auswirkungen einer Ethacrynsäurereduktion auf die Zellüberlebensrate höher sind als die einer Cisplatinreduktion.

Tabelle 4: Ergebnisse der Titrationsversuche mit Ethacrynsäure und Cisplatin

In einer 24er Lochplatte wurden die ausgesäten Zellen der beiden Linien L-1236 und L-540 (500000 Zellen pro Vertiefung) 24h mit den jeweiligen Zytostatika inkubiert. Es lagen Cisplatinkonzentrationen von 50 μ g/ml bis 6,25 μ g/ml und EA-Konzentrationen von 100 μ M bis 6,25 μ M vor. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Die Tabelle enthält die Mittelwerte aus zwei Experimenten in Form der Zellviabilität (% der Kontrolle).

	Ethacrynsäure					
Cisplatin	100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M	0 μ M
50 μ g/ml	27,97	29,17	45,18	56,74	57,48	60,86
25 μ g/ml	35,59	39,06	63,18	72,62	71,02	73,24
12,5 μ g/ml	44,42	51,87	72,28	76,17	79,98	78,34
6,25 μ g/ml	48,87	61,89	87,63	88,09	90,91	88,58
0 μ g/ml	56,51	87,63	98,33	96,7	98,21	100

**Abbildung 13: Titrationsversuche mit Ethacrynsäure und Cisplatin**

Darstellung der Werte aus Tabelle 4 in Form eines Liniendiagramms. Aus den Einzelwerten beider Experimente wurde der Standardfehler berechnet und in Form von Fehlerbalken aufgetragen. Es ist sichtbar, dass bei hohen Cisplatin- und EA-Konzentrationen gemeinsam die Zahl lebender Zellen mit 27,97% am geringsten war. Mit sinkender EA-Konzentration bei gleich bleibender Cisplatinkonzentration war eine Zunahme der Zahl lebender Zellen bis auf 60,86% zu verzeichnen (50 μ g/ml Cisplatin).

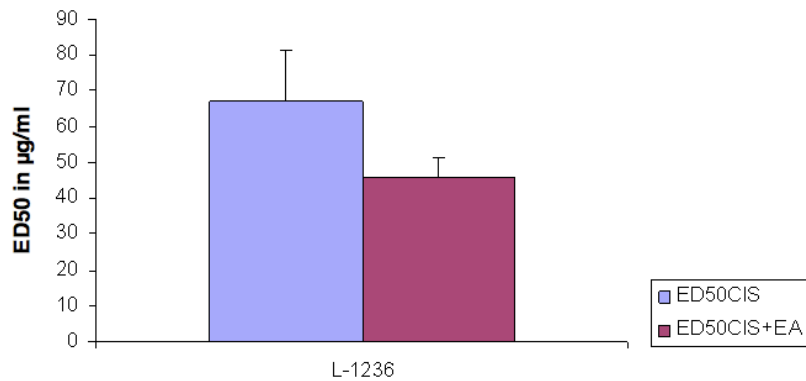


Abbildung 14: ED50 für Cisplatin in An- und Abwesenheit von Ethacrynsäure

Die ED50 von Cisplatin allein liegt bei 67,18µg/ml (blauer Balken). Eine ED50 von 45,9µg/ml spiegelt den synergistischen Effekt einer Koinkubation von Cisplatin und Ethacrynsäure wieder (rosa Balken). Zur Berechnung der ED50 wurde das Programm ED50plus v1.0 verwendet. Es wurden die Einzelwerte aus beiden Experimenten herangezogen. Der Standardfehler wurde in Form von Fehlerbalken aufgetragen.

Durch die Berechnung der ED50 wurde nochmals der unterstützende antiproliferative Effekt der Ethacrynsäure deutlich. Die ED50 von Cisplatin allein lag bei 67,18µg/ml, wobei im Vergleich die ED50 von Cisplatin bei einer gleichzeitigen Koinkubation mit Ethacrynsäure (50µM) bei 45,9µg/ml lag. Durch den synergistischen Effekt beider Medikamente konnte die Konzentration, bei der nur noch 50% der Zellen lebensfähig sind, um 21,3µg/ml gesenkt werden.

Durch die Wirkung von Ethacrynsäure (100µM) allein waren noch 56,51% der Zellen und durch die Wirkung von Cisplatin (50µg/ml) allein noch 60,86% der Zellen am Leben. Durch die Koinkubation beider Zytostatika konnte die Zellviabilität auf 27,97% gesenkt werden .

4.6 Ethacrynsäure- und Roscovitintitration der Zelllinie L-1236

In vergangener Zeit wurde der Zellzyklusinhibitor Roscovitin immer wieder als potenter Wirkstoff gegen verschiedene Tumorentitäten dargestellt (Staege et al., 2004, Tirado et al., 2005). Im Einklang mit diesen Resultaten wurde die Wirkung des Glutathion-S-Transferaseinhibitors Ethacrynsäure gemeinsam mit Roscovitin bei der chemotherapieresistenten Zelllinie L-1236 untersucht. Durch die alleinige Wirkung des Zellzyklusinhibitors Roscovitin (90 μ M) waren nach einer Inkubationszeit von einem Tag noch 62,84% der Zellen am Leben, während durch die Wirkung von Ethacrynsäure (100 μ M) allein nur noch 56,51% der Zellen am Leben waren. Die Zellviabilität konnte durch eine Koinkubation beider Medikamente (Roscovitin 90 μ M und Ethacrynsäure 50 μ M) auf 29,54% gesenkt werden.

Tabelle 5: Titrationsversuche mit Ethacrynsäure und Roscovitin

In einer 24er Lochplatte wurden die ausgesäten Zellen der beiden Linien L-1236 und L-540 (500000 Zellen pro Vertiefung) 24h mit den jeweiligen Zytostatika inkubiert. Es lagen Roscovitinkonzentrationen von 90 μ M bis 30 μ M und Ethacrynsäurekonzentrationen von 100 μ M bis 6,25 μ M vor. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Die Tabelle enthält die Mittelwerte aus zwei Experimenten in Form der Zellviabilität (% der Kontrolle).

	Ethacrynsäure					
Roscovitin	100 μ M	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M	0 μ M
90 μ M	42,46	29,54	66,94	64,32	63,96	62,84
60 μ M	45,71	53,06	74,35	71,42	70,35	71,03
30 μ M	54,03	77,24	76,3	76,55	77,19	77,37
0 μ M	56,51	87,19	98,33	96,7	98,21	100

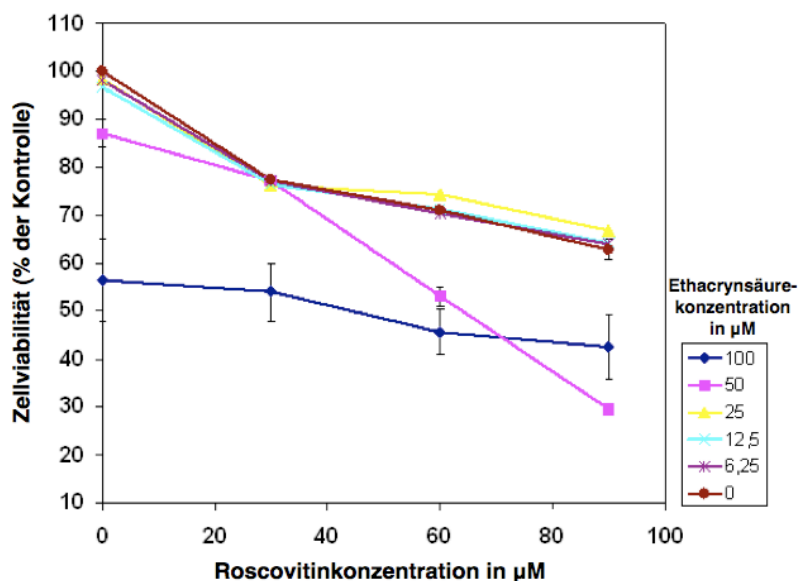


Abbildung 15: Titrationsversuche mit Ethacrynsäure und Roscovitin

Die Werte aus Tabelle 5 sind in Form eines Liniendiagramms dargestellt. Es wurden zwei Experimente durchgeführt und aus den Einzelwerten der Standardfehler berechnet, welcher in Form von Fehlerbalken aufgetragen ist. Die Zellviabilität konnte durch eine Koinkubation beider Medikamente (Roscovitin 90µM und Ethacrynsäure 50µM) auf 29,54% gesenkt werden.

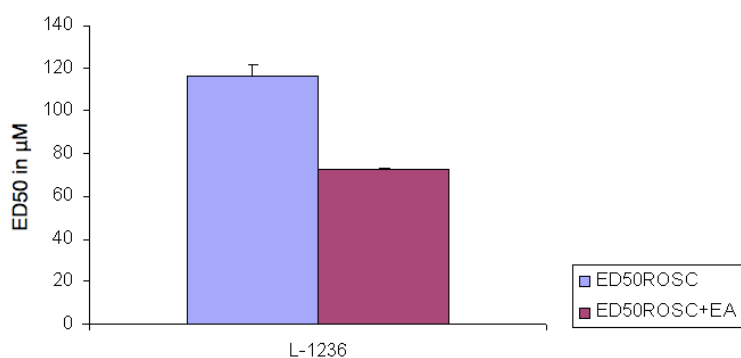


Abbildung 16: ED50 von Roscovitin und Ethacrynsäure + Roscovitin

Die ED50 von Roscovitin (116,36µM) konnte durch Koinkubation mit EA in einer Konzentration von 50µM auf 72,73µM gesenkt werden. Zur Berechnung der ED50 wurde das Programm ED50plus v1.0 verwendet. Es wurden die Einzelwerte aus beiden Experimenten herangezogen. Der Standardfehler wurde in Form von Fehlerbalken aufgetragen.

Auch hier erfolgte eine Berechnung der ED50-Werte. Der Mittelwert der ED50 von Roscovitin allein betrug $116,36\mu\text{M}$, während die ED50 durch den gleichzeitigen Einsatz von Roscovitin und Ethacrynsäure, in einer Konzentration von $50\mu\text{M}$, auf $72,73\mu\text{M}$ abfiel.

Durch die Wirkung von beiden Medikamenten gemeinsam, konnte die ED50, also diejenige Konzentration bei der noch 50% der Zellen am Leben waren, um $43,94\mu\text{M}$ gesenkt werden.

5 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand eine vergleichende Gegenüberstellung von etablierten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Ziel war es, Unterschiede hinsichtlich der Chemotherapieempfindlichkeit und deren mögliche Ursachen zu identifizieren und diese anschließend zu überwinden. Zunächst wurden aus Daten der Genexpressionsanalyse, die aus vergangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zusammengestellt wurden, die beiden Zelllinien ausgewählt, welche die größten Unterschiede hinsichtlich ihres Genexpressionsmusters aufwiesen. So wurden im Verlauf alle Experimente mit den Zelllinien L-1236 und L-540 durchgeführt.

5.1 Cisplatin und seine Wirkung auf das Tumorwachstum

Cisplatin ist ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum. Dessen Wirkung beruht auf einer Hemmung der DNA-Replikation durch Ausbildung von Querverknüpfungen zwischen den beiden DNA-Strängen der Tumorzellen, welche dadurch funktionsuntüchtig werden. Der Zellstoffwechsel kommt so zum Erliegen und die Zelle leitet die Apoptose ein (Lippert, 1999). In der Behandlung des Hodgkin-Lymphoms kommt Cisplatin hauptsächlich in der Therapie von Rezidiven im Rahmen einer Hochdosischemotherapie zum Einsatz (Linch et al., 1993; Josting et al., 2000 ; Schmitz et al., 2002).

Im Verlauf der Titration von Cisplatin konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie L-540 ein deutlich besseres Ansprechen gegenüber einer Inkubation mit Cisplatin besitzt als die Zelllinie L-1236. Mit Hilfe der ED50 wurde deutlich, dass schon bei einer geringen Cisplatinkonzentration von 3,69 µg/µl nur noch 50% der L540 Zellen am Leben waren, wobei bei der Zelllinie L-1236 dieser Zustand erst bei einer Cisplatinkonzentration von 21,085µg/µl erreicht wurde. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu kürzlich veröffentlichten Publikationen, welche belegen, dass Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit Vorliegen einer Expression von T-Zellmarkern (CD3, CD4, CD8 usw.) mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Asano et al., 2006). Dieses T-Zell ähnliche Expressionsmuster ist für die chemotherapiesensible Zelllinie L-540 charakteristisch. Da das Ansprechen auf die initiale Chemotherapie ein entscheidender, aber nicht der einzige prognosebestimmende Faktor bei Patienten mit Hodgkin-Lymphomen ist, kann somit nicht allein von der Chemotherapieempfindlichkeit direkt auf die Prognose

geschlossen werden. Ein ganzheitliches Betrachten der jeweiligen Patienten unter Einbezug des Erkrankungsalters und -stadiums sowie der Tumorhistologie scheinen ebenso wichtige Faktoren in Hinblick auf prognostische Aussagen zu sein. Eine weitere Erklärung könnte die geringere Expression von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80) an der Zelloberfläche sein. Diese verminderte Expression könnte mit einer niedrigeren immunstimulatorischen Aktivität der Hodgkin-Lymphom-Zellen assoziiert sein, wie dies auch für andere Modelle gezeigt wurde (Staege et al., 2002). Wie im weiteren Verlauf sichtbar werden konnte, exprimieren die chemotherapieresistenten L-1236-Zellen deutlich größere Mengen CD80 als die sensiblen L-540-Zellen.

5.2 Der Oberflächenmolekülbesatz im Hinblick auf die Cisplatinempfindlichkeit

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede hinsichtlich des Oberflächenmolekülbesatzes der beiden Zelllinien diente die FACS-Analyse. Dies ist ein Verfahren, welches sich die unterschiedlichen Fluoreszenz- und Streulichtqualitäten der Einzelzellen zu Nutze macht. Somit ist es möglich, die Eigenschaften von verschiedenen Subpopulationen von Zellen zu analysieren.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde deutlich, dass die Zelllinie L-1236 das Oberflächenexpressionsprofil von aktivierten B-Zellen besitzt und demnach eine hohe Expression von CD23, CD40 und CD80 aufweist. Bei der Zelllinie L-540 konnte keiner dieser Marker in entsprechender Menge nachgewiesen werden. Insgesamt wurde somit deutlich, dass Zellen, die den Phenotyp von aktivierten B-Zellen besitzen, eine geringere Sensibilität gegenüber Cisplatin aufweisen (L-1236, ED50: 21,085µg/ml) und Zellen ohne merkliche CD80 Expression deutlich besser auf das Chemotherapeutikum ansprechen (L-540, ED50 3,69µg/ml).

CD80 ist ein homodimeres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Man findet es ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen, die das T-Zell-Wachstum anregen können. Der Rezeptor von CD80 auf der T-Zelle ist CD28, welcher ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Eine Bindung von CD80 an seinen Rezeptor bewirkt eine Kostimulation der klonalen Vermehrung nativer T-Zellen und damit eine T-Zell vermittelte Immunantwort (Gonzalo et al., 2001). Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, Hodgkin-Lymphom-Zellen zu vernichten und finden somit auch Einsatz in der klinischen Behandlung von EBV-positiven Hodgkin-Lymphomen (Bollard et al., 2004). Weiterhin sind allogene T-Zellen fähig, einen Graft-versus-Tumor-Effekt bei Patienten

mit einem Hodgkin-Lymphom zu induzieren (Peggs et al., 2005). Dennoch finden sich in der Literatur zahlreiche Veröffentlichungen welche eine negative Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer großen Zahl von T-Zellen in den befallenen Lymphknoten und der Prognose postulieren (Oudejans et al., 1997; Alvaro-Naranjo et al., 2005). Offenbar sind die infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen nicht fähig das Tumorwachstum zu kontrollieren, vermutlich aufgrund einer Suppression durch regulatorische T-Zellen (Gandhi et al., 2006; Smith et al., 2006; Marshall et al., 2004). Die Rolle der T-Zell vermittelten Immunantwort bleibt demnach weiter unklar.

Neben der Aktivierung von T-Zellen ist CD40 ein Molekül welches für seine antiapoptotische Aktivität bekannt ist (Voorzanger-Rousselot and Blay, 2004). Die Kombination von IL13 mit CD40L führt zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoseinhibition von humanen B-Lymphozyten (Lomo et al., 1997). Einhergehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte auch hier gezeigt werden, dass eine Expression von CD40 mit einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin assoziiert ist.

CD2 und CD4 sind Zelladhäsionsmoleküle, welche als T-Zellmarker bekannt sind und in Hodgkin-Lymphomen eher eine Minderheit repräsentieren. Eine T-Zellmarkerexpression korreliert nicht mit einer EBV-Positivität oder klinischen Parametern wie Erkrankungsalter, Krankheitsstadium, Vorhandensein einer B-Symptomatik oder ausgeprägtem Befund (Tzankov et al., 2005). Dennoch wurde in vergangener Zeit eine mögliche Assoziation zwischen der Expression von T-Zellmarkern und einer damit verbundenen ungünstigen Prognose untersucht. Diese konnte aber aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht signifikant gestützt werden (Tzankov et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nur die Zelllinie L-540, assoziiert mit höherer Sensibilität gegenüber Cisplatin, CD2 und CD25 exprimiert. Bei L-1236-Zellen konnte keines der beiden Oberflächenantigene nachgewiesen werden. CD4 war bei beiden Zelllinien nur in geringem Maße vorhanden. Zumindest in diesen Zellen konnte somit kein Zusammenhang zwischen der Expression von T-Zellmarkern und dem Vorliegen einer Chemotherapieresistenz nachgewiesen werden.

5.3 Genexpressionsprofil und Resistenzgene

Um mögliche Resistenzgene zu identifizieren, welche unter anderem verantwortlich für das geringere Ansprechen der Zelllinie L-1236 auf das Chemotherapeutikum Cisplatin sein könnten, wurde das Genexpressionsprofil beider Zelllinien ausgehend von Befunden der Microarray-Analyse mittels RT-PCR vergleichend untersucht. Die Zellen der Linie L-1236 exprimieren einige Gene, welche für ihre antiapoptotische Aktivität bekannt sind, zum Beispiel IL13RA1, IL5RA, CD40 und MARCKS (Juan et al., 2005). IL13 ist bekannt für seine immunsuppressiven und antiinflammatorischen Effekte sowie als potenter Inhibitor der Apoptose (Manna et al., 1998). Weiterhin werden die IL13-Rezeptoren häufig in Hodgkin-Lymphom-Zellen exprimiert (Skinnider and Mak, 2002). Auch das Zelladhäsionsmolekül CD40 ist für seine antiapoptotische Aktivität bekannt (Voorzanger-Rousselot and Blay, 2004). Die Kombination von IL13 und CD40L ist in der Lage, einen deutlichen Anstieg der Apoptoseinhibition zu erreichen (Lomo et al., 1997). Erst kürzlich wurde das Gen MARCKS als Marker für chemotherapieresistente Zelllinien identifiziert (Righetti et al., 2006). Im Fall von den hier verwendeten L-1236 und L-540-Zellen konnte gezeigt werden, dass nur die cisplatinresistente Zelllinie L-1236 eine MARCKS-Expression zeigt, während dieses Gen in L-540-Zellen nicht vorhanden war. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer MARCKS-Expression und der geringen Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin kann somit vermutet werden. Allerdings konnte eine funktionelle Bedeutung der MARCKS-Expression in den chemotherapieresistenten L-1236-Zellen nicht nachgewiesen werden, so dass der direkte Zusammenhang zwischen der Expression dieses Gens und einer Chemotherapieresistenz nicht erwiesen ist (Staege et al., 2008). Weiterhin wurde in Ovarialkarzinomzellen nach MARCKS-Überexpression ebenfalls keine Modulation der Chemotherapieresistenz beobachtet (Righetti et al., 2006). In beiden Fällen könnte MARCKS ein interessanter Surrogat-Marker für chemotherapieresistente Zellen sein. Bemerkenswert ist auch die Induktion von MARCKS nach einer B-Zellaktivierung, wie zum Beispiel nach einer EBV-Infektion (Birkenbach et al., 1993).

Die chemotherapiesensiblen L-540-Zellen exprimieren eine größere Menge an proapoptotischen Genen wie zum Beispiel TRAIL (Staege et al., 2008). In vergangener Zeit wurde bekannt, dass eine zytostatische Therapie Osteosarkomzellen für die TRAIL-induzierte Apoptose sensibilisiert (Evdokiou et al., 2002). Ein Zusammenhang

zwischen der TRAIL-Expression und einer höheren Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika scheint somit möglich.

Einen weiteren interessanten Unterschied im Expressionsmuster zeigte das Gen XIST. Im Rahmen von einigen klinischen Hodgkin-Lymphom-Studien wurde das männliche Geschlecht mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert (Liao et al., 2001; Smith et al., 2003). Die chemotherapieresistenten L-1236-Zellen wurden von einem männlichen Spender gewonnen, wobei die Zelllinie L-540 von einer weiblichen Patientin stammt. Beide Zelllinien haben einen Karyotyp mit 2 X-Chromosomen. Wie erwartet, zeigen L-540-Zellen eine XIST-Expression, während diese bei L-1236 nicht nachgewiesen werden konnte. Normalerweise wird XIST in geringen Mengen in undifferenzierten embryonalen Stammzellen exprimiert. Nach der Differenzierung wird XIST ausschließlich vom inaktiven X-Chromosom exprimiert (Panning et al., 1997). Die fehlende Expression von XIST in L-1236-Zellen macht deutlich, dass beide X-Chromosomen aktiv sind. Die Herunterregulation von XIST scheint mit einer Chemotherapieresistenz in Ovarialkarzinomzellen assoziiert zu sein (Huang et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie bekannt, dass eine Hochregulation von XIST gleichbleibend war mit einer längeren Zeit bis zum Eintritt eines Progresses. Es bleibt jedoch weiter unklar ob eine verloren gegangene XIST-Expression in direktem Zusammenhang mit der Chemotherapieresistenz steht oder ob eine Reaktivierung von X-assoziierten Genen ursächlich für diese Resistenz ist.

TP53 ist ein weiteres Gen, welches nur in L-540-Zellen exprimiert wird. Es ist als „Wächter des Genoms“ bekannt und verantwortlich, nach DNA-Schäden die Expression von Genen, welche an der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseinduktion und der DNA-Reparatur beteiligt sind, zu regulieren (Lane, 1992). Mutationen bzw. ebenso eine Überexpression des TP53-Gens ist assoziiert mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Mantelzelllymphomen (Louie et al., 1995). Weiterhin wurde deutlich, dass das gleichzeitige Fehlen der TP53-Expression und eine verloren gegangene Expression des Oberflächenmoleküls CD15 mit einem geringerem Gesamtüberleben sowie einer verminderten Zeit bis zum Progress bei Kindern mit klassischem Hodgkin-Lymphom einhergeht (Dinand et al., 2008). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann gesagt werden, dass der Verlust der TP53-Expression bei der Zelllinie L-1236 als Faktor einer Resistenz gegenüber Cisplatin denkbar sein

könnte. Aussagen zur Prognose von Hodgkin-Lymphom-Patienten mit fehlender TP53-Expression können im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht getroffen werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Genexpressionsprofile von chemotherapieresistenten und -sensiblen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien sehr große Unterschiede aufweisen. Ob solche Gene wie XIST, MARCKS, CD40 oder IL13RA im Verlauf der Zeit als prognostische Marker eingesetzt werden können, wird die Zukunft zeigen. Mit Sicherheit stellen sie aber eine interessante Möglichkeit dar, Risikopatienten frühzeitig zu erfassen und unter besondere Beobachtung zu stellen bzw. einer modifizierten Therapie zugänglich zu machen. Die höhere Expression von kostimulatorischen Molekülen bei der Zelllinie L-1236 weist darauf hin, dass auch in vivo solche resistenten Zellen einen möglichen Angriffspunkt für eine Immuntherapie darstellen könnten, zum Beispiel im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation (Peggs et al., 2005). Ein weiteres Zielobjekt für zukünftige Immuntherapien bietet das Gen PRAME, welches als Antigen für melanomspezifische zytotoxische T-Zellen identifiziert wurde (Griffioen et al., 2006). In verschiedenen Studien wurde eine Expression von PRAME mit einer schlechten Prognose der Tumorpatienten in Zusammenhang gebracht (Oberthuer et al., 2004; Partheen et al., 2006). Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass eine Immuntherapie in Zukunft ein viel versprechender Ansatz, besonders in der Behandlung von Patienten mit chemotherapieresistenten Hodgkin-Lymphomen, darstellen könnte.

5.4 Azacytidin und sein Einfluss auf die Genexpression

Azacytidin ist ein Cytidinanalogon, welches als Agens zur Behandlung von malignen Tumoren entwickelt wurde (Li et al., 1970; VonHoff et al., 1976; Glover et al., 1987). Zusätzlich zu seinen zytotoxischen Effekten ist es in der Lage die Differenzierung von malignen Zellen in vitro zu induzieren (Taylor and Jones, 1979; Creusot et al., 1982; Christman et al., 1983; Gambari et al., 1984). Azacytidin inhibiert die DNA-Methyltransferase, ein Enzym welches in Säugetierzellen für die Methylierung neu synthetisierter DNA verantwortlich ist. Das Resultat dieser Hemmung ist eine Hypomethylierung der DNA und damit auch eine Veränderung der Gentranskription und -expression (Taylor and Jones, 1979; Creusot et al., 1982; Christman et al., 1983). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass keine wesentlichen

Unterschiede in der Genexpression, insbesondere der erhofften Herunterregulation der Resistenzgene, durch den Einfluss von Azacytidin zu beobachten waren. Einzig im Gen PRAME wurde nach der Inkubation eine Veränderung im Expressionsmuster beobachtet. Erst nach der Behandlung mit 5-Azacytidin zeigten die L-540-Zellen eine PRAME-Expression. Da PRAME aber im Zusammenhang mit einer ungünstigen Prognose steht, stellt die Induktion dieses Gens keinen Vorteil dar. Es ist bekannt das PRAME bei vielen malignen Tumoren überexprimiert wird, im Verlauf einer zytostatischen Therapie aber kontinuierlich abnimmt (Matsushita et al., 2001). Eine ansteigende PRAME-Expression wurde nur bei Patienten mit einem Rezidiv beobachtet. Es ist demnach nützlich eine minimale Resterkrankung oder frühzeitig ein Rezidiv zu diagnostizieren (Matsushita et al., 2001). Weiterhin könnten durch die Expression von PRAME Tumorzellen immunologisch angreifbar gemacht und somit neue Therapieregime etabliert werden. Dieses Ergebnis könnte als Ansatz genutzt werden, um in Zukunft weitere aufbauende Experimente rund um die PRAME-Induktion durchzuführen.

5.5 Die Wirkung der Medienüberstände auf das Genexpressionsmuster

Ziel dieser Experimente war es, den Einfluss von konditionierten Zellkulturmedien der einen Zelllinie durch Inkubation mit der jeweils anderen zu untersuchen. Im Fokus der Beobachtungen stand die Veränderung des Genexpressionsmusters durch sezernierte Inhaltsstoffe der Zellen mittels PCR. Man vermutete eine mögliche Induzierbarkeit der Resistenzgene von L-1236 in den L-540-Zellen nach einer Inkubation mit dem konditioniertem Medium. Es konnte beobachtet werden, dass nach einer Inkubationszeit von einer Woche die Zelllinie L-540 eine Expression des MARCKS-Gens zeigte. Unter normalen Zellkulturbedingungen mit immer frischem Medium war die Expression dieses Gens nur bei den L-1236-Zellen zu sehen (Righetti et al., 2006). Diese Tatsache lässt vermuten, dass eine Genexpression durch bestimmte Stoffe, welche die Zellen in ihr Medium sezernieren, induziert werden kann. Gegenteilige Effekte, das heißt eine Herunterregulation von Genen, waren nicht zu beobachten. Kritisch muss man jedoch anmerken, dass die Möglichkeit einer Verschleppung von Zellen und demnach einer falsch positiven PCR dennoch gegeben ist. Um dies zu verhindern, wurde unter streng sterilen Bedingungen gearbeitet und ein 22µm Spritzenfilter verwendet. Dieser ist laut Hersteller nicht für Zellen durchlässig und trennt

diese vom reinen Medium. Die Bedeutung einer MARCKS-Induktion in den L-540-Zellen ist bisher noch unklar. Generell wird eine MARCKS-Expression mit einer Resistenz gegen herkömmliche Chemotherapeutika in Verbindung gebracht (Shu-Hui et al., 2005; Righetti et al., 2006). Um dies zu prüfen, könnte in Zukunft die Cisplatinempfindlichkeit der sonst sensiblen L-540-Zellen nach einer Inkubation mit den verbrauchten Mediumüberständen der L-1236-Zellen und nach nachgewiesener MARCKS-Expression untersucht werden. Für den Fall einer Minderung der Chemotherapieempfindlichkeit könnte es Gegenstand der Forschung sein die sezernierten Stoffe im konditionierten Medium zu identifizieren, welche für diese MARCKS-Induktion verantwortlich sind. So könnten neue Therapieansätze und Möglichkeiten der Überwindung der Chemotherapieresistenz möglich werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL26 auf ähnliche Weise in den L-1236-Zellen induzierbar war. Unter normalen Zellkulturumständen, mit immer frischem Medium, zeigten nur die L-540-Zellen eine IL26-Expression (Foell et al., 2008). IL26 wird in T-Zellen nach einer Infektion mit dem Herpesvirus saimiri (HVS) induziert und scheint in das autokrine Wachstum und die spontane Proliferation von T-Zellen, nach einer solchen Immortalisierung, involviert zu sein (Knappe et al., 2000). Allerdings wurde die Expression von T-Zellmarkern als ungünstiger prognostischer Parameter identifiziert (Niedobitek et al., 2002). Die Bedeutung dieser IL-26-Induktion in der Zelllinie L-1236 bleibt demnach unklar. Dennoch handelt es sich um einen interessanten Aspekt, dass eine IL-26-Expression nicht nur durch eine HVS-Immortalisierung der HL-Zellen, sondern auch durch in das Medium sezernierte Stoffe induzierbar zu sein scheint.

5.6 Glutathion-S-Transferasen und ihre Bedeutung für die Chemotherapieresistenz

Glutathion-S-Transferasen sind eine Familie von Phase II Detoxifikationsisoenzymen deren Funktion es ist, zelluläre Makromoleküle vor Attacken durch reaktive Elektrophile zu schützen (Hayes and Pulford, 1995). Die bekannteste biologische Funktion der Glutathion-S-Transferasen ist die Entgiftung von Xenobiotika (Beckett and Hayes, 1993). Glutathion-S-Transferaseaktivität ist in fast allen Geweben des menschlichen Körpers nachweisbar. Die Expression der verschiedenen Isoenzyme ist jedoch organspezifisch (Whalen and Boyer, 1998). Ebenso haben Alter und Geschlecht Einfluss auf den jeweiligen Glutathion-S-Transferasestatus (Singhal et al., 1992). Die

Entwicklung einer Chemotherapieresistenz spielt eine entscheidende Rolle beim Fehlschlagen einer zytostatischen Behandlung. Glutathion-S-Transferasen sind an der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Zytostatika, Insektiziden, Herbiziden und Antibiotika beteiligt (Tew, 1994; McLellan and Wolf, 1999; Tang and Tu, 1994; Ranson et al., 1997). Weiterhin sind sie über zwei Wege in die Entstehung einer Zytostatikaresistenz involviert. Einerseits über die direkte Detoxifikation, andererseits arbeiten sie als Inhibitor des MAP-Kinase-Wegs. Daher ist es nicht überraschend, dass Glutathion-S-Transferasen in vielen Tumoren in reichlicher Zahl vorhanden sind und eine nachgewiesene Assoziation zwischen einer Glutathion-S-Transferaseexpression und der Sensibilität gegenüber alkylierenden Substanzen besteht (Tew et al., 1996). Basierend auf diesen Tatsachen untersuchten wir die Zelllinien L-1236 und L-540 mittels PCR auf die Expression von Glutathion-S-Transferasen. Das Isoenzym GSTM1 konnte in der resistenten Zelllinie L-1236 nachgewiesen werden, fehlte jedoch bei den sensiblen L-540-Zellen. Für GSTT1 konnte eine höhere Aktivität ebenfalls bei L-1236 festgestellt werden, wobei es bei den L-540-Zellen nur in geringem Maße vorhanden war. Im Einklang mit den oben genannten Ergebnissen kann man sagen, dass auch im Rahmen dieser Arbeit eine GSTM1- und GSTT1-Expression in der Zelllinie L-1236 als möglicher Faktor der Resistenz wahrscheinlich gemacht werden konnte. Aussagen zu einem direkten Zusammenhang zwischen der Expression der Glutathion-S-Transferasen und einer Resistenz gegenüber Zytostatika können so jedoch nicht getroffen werden. Dennoch bietet diese Erkenntnis neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Patienten mit chemotherapieresistenten Hodgkin-Lymphom (siehe unten).

5.7 Überwindung der Chemotherapieresistenz mittels Ethacrynsäure

Die Überexpression der Glutathion-S-Transferasen in verschiedenen Tumorentitäten und deren möglicher Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika wurde in vergangener Zeit immer wieder von verschiedenen Autoren beschrieben (Townsend und Tew 2003; Tew 1994; Ranson et al. 1997; McLellan und Wolf 1999; Tang und Tu 1994). Durch einige Studien wurde Ethacrynsäure als ein geeigneter Inhibitor der Glutathion-S-Transferasen identifiziert (Alisky and Tuttle, 2003; Maher and Schreiner, 1965; Tew et al., 1997; Zhao and Wang, 2006; Ploemen et al., 1993). Basierend auf den oben genannten Erkenntnissen wurde

versucht die Glutathiontransferaseaktivität auszuschalten und dadurch eine Minderung der Chemotherapieresistenz in der Zelllinie L-1236 zu erreichen. Im Einklang mit diesen Beobachtungen entdeckten einige Forscher eine Steigerung der antineoplastischen Effekte von Ethacrynsäure durch Koinkubation mit anderen Zytostatika (Alisky and Tuttle, 2003; Tew et al., 1988; Nagourney et al., 1990). So wurde gezeigt, dass Ethacrynsäure den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika wie Cisplatin, Chlorambucil, Melphalan, Mitomycin C und Adriamycin in vitro potenzieren kann (Tew et al., 1988; Hansson et al., 1991; Xu and Singh, 1992).

Im klinischen Einsatz spielt Ethacrynsäure als potentes Schleifendiuretikum, welches erstmals 1962 durch Schultz et al. in der Literatur beschrieben wurde, eine Rolle (Schultz et al., 1962). Unter dem Handelsnamen Edecrin® wird es zur Therapie von Bluthochdruck und Ödemen, bedingt durch Herz-, Leber- oder Nierenversagen, eingesetzt. Wesentliche Nebenwirkungen sind Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Gichtanfälle, verschwommenes Sehen, Hörstörungen, Müdigkeit, Hautausschlag und eine verminderte Glukosetoleranz.

Angelehnt an oben genannte Erkenntnisse wurde versucht, im Rahmen einer gemeinsamen Titration von Cisplatin und Ethacrynsäure die Chemotherapieresistenz der Zelllinie L-1236 zu überwinden. Es konnte eine Steigerung der Chemotherapieempfindlichkeit bei den L-1236-Zellen festgestellt werden. Die höchste Zahl toter Zellen war bei der höchsten gemeinsamen Cisplatin- und Ethacrynsäurekonzentration zu verzeichnen. Sowohl Cisplatin als auch Ethacrynsäure allein konnten nicht annähernd eine solch hohe Zahl toter Zellen erreichen. Damit konnte der potenzierende Effekt einer kombinierten Wirkung von Cisplatin und Ethacrynsäure auf die Tumorzellen dargestellt werden.

Beim Betrachten der ED₅₀ fällt auf, dass für die Zelllinie L-1236 abweichende Cisplatinkonzentrationen in den verschiedenen Experimenten erreicht wurden (siehe oben 4.1 ED₅₀ von Cisplatin bei L-1236: 21,085 µg/m; 4.5 ED₅₀ von Cisplatin bei L-1236: 67,18 µg/ml). Da bei den verschiedenen Versuchen unterschiedliche Methoden angewendet wurden, sind die Werte jedoch nicht direkt vergleichbar. Unter 4.1 wurde der MTT-Test und unter 4.5 eine Färbung mit Propidiumjodid angewendet. Da der MTT-Test nicht nur die Viabilität, sondern auch die Proliferation misst, können vor allem in den niedrigen Konzentrationen, bei denen die Zellen nicht mehr wachsen, aber auch noch nicht tot sind, unterschiedliche Werte der ED₅₀ vorliegen.

Kritisch angemerkt werden muss jedoch die ototoxische Wirkung von Cisplatin, welche durch eine Kombination mit Ethacrynsäure noch verstärkt wird und somit zu irreversiblen Hörschaden führen kann (Ding et al., 2007). Weiterhin darf die diuretische Wirkung und damit die Gefahr der Exsikkose nicht außer Acht gelassen werden. Die therapeutisch empfohlenen Mengen zur Ausschwemmung von Flüssigkeit liegen bei 50-150mg pro Tag. Fraglich ist somit auch, ob die antiproliferative Wirkung schon in so verhältnismäßig geringen Mengen einsetzt bzw. ob der Körper in der Lage ist, den bei höheren Mengen stattfindenden Wasser- und Elektrolytverlust zu tolerieren. Zusammenfassend kann man demnach sagen, dass eine Kombination von Cisplatin und Ethacrynsäure in der Lage ist, die Chemotherapieresistenz in der Zelllinie L-1236 zu überwinden. Die Kombination beider Chemikalien könnte somit einen neuen Ansatz in der Therapie des zytostatikaresistenten Hodgkin-Lymphoms bieten. In wie weit aber die klinische Anwendung in hohen Dosen hinsichtlich der Verträglichkeit realisierbar ist, bleibt bisher noch unklar und könnte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

5.8 Der Zellzyklusinhibitor Roscovitin und seine Wirkung auf das Tumorwachstum

Der Zellzyklusinhibitor Roscovitin ist ein potenter Wirkstoff mit einer antiproliferativen Wirkung auf eine große Zahl von Tumoren (Staege et al., 2004, Tirado et al., 2005). Roscovitin ist nicht nur in der Lage einen Zellzyklusarrest zu induzieren, sondern auch Zellen gegenüber herkömmlichen Zytostatika zu sensibilisieren (Coley et al., 2007; Foell et al., 2008). Aufbauend auf diesen Daten wurde eine mögliche Steigerung der Apoptoserate der zytostatikaresistenten Zelllinie L-1236 nach einer Koinkubation mit Roscovitin und dem Glutathion-S-Transferaseinhibitor Ethacrynsäure untersucht.

Die Zellviabilität wurde durch die Kombination beider Chemikalien durchschnittlich um 17,23% gesenkt. Ein interessantes Ergebnis erbrachte die Kombination von 90 μ M Roscovitin und 50 μ M Ethacrynsäure, bei der entgegen aller Erwartungen im Gegensatz zu der Kombination 90 μ M Roscovitin und 100 μ M Ethacrynsäure die Zellviabilität um 12,92% abnahm. Bei niedrigeren Ethacrynsäurekonzentrationen stieg die Zellviabilität wieder an. Eine mögliche Ursache der verringerten Wirkung von Ethacrynsäure in hohen Konzentrationen (100 μ M) könnte darin bestehen, dass in diesen Regionen nur die ohnehin sehr resistenten Zellen überleben und dadurch nur ein kaum erkennbarer Effekt auf die Gesamtzahl der Tumorzellen zu beobachten war.

Eine Einwirkung von Artefakten kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dennoch scheint die Wirkung der Kombination beider Chemikalien auf die sonst chemotherapieresistenten L-1236-Zellen deutlich stärker zu sein als nur durch den Einsatz von Roscovitin. Dieser synergistische Effekt könnte in Zukunft besonders für Patienten mit chemotherapieresistenten Hodgkin-Lymphom eine interessante Alternative zu den herkömmlichen Therapiestrategien sein. Inwieweit sich die Nebenwirkungen beider Chemikalien potenzieren und welche Dosen nötig wären, um in vivo einen ähnlichen antiproliferativen Effekt zu erreichen bleibt bis heute unklar. Erste klinische Phase-II-Studien zu dem Einsatz von Roscovitin als Zytostatikum in der Behandlung von fortgeschrittenem Mammakarzinom und verschiedenen Lungentumoren laufen derzeit in den USA an. In Deutschland spielt Roscovitin bisher nur als experimenteller Therapieansatz in der Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie eine Rolle.

Die kombinierte Anwendung von Roscovitin und Ethacrynsäure bei primär chemotherapieresistenten Hodgkin-Lymphomen bietet einen interessanten Therapieansatz und könnte zukünftig Gegenstand weiterer Forschung sein.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Oberflächenbesatz und das Genexpressionsprofil von chemotherapiesensiblen und -resistenten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien vergleichend untersucht. Ziel war es, mögliche Ursachen dieser Zytostatikaresistenz und gegebenenfalls Wege zur Überwindung dieser Resistenz zu finden.

Es konnten deutliche Unterschiede im Genexpressionsprofil sensibler und resistenter Zellen gefunden werden. So waren Gene wie IL13RA1, IL5RA, CD40 und MARCKS, welche auch in anderen Tumormodellen im Zusammenhang mit antiapoptotischer Aktivität gesehen werden, in resistenten L-1236-Zellen deutlich überexprimiert, während sie bei L-540-Zellen fehlten. Ebenso konnte PRAME, ein Gen welches bei Tumorpatienten mit einer schlechten Prognose assoziiert ist und ein immunologisch interessantes Tumorantigen darstellt, nur in den chemotherapieresistenten Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von Glutathion-S-Transferasen, welche wesentlich an der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen beteiligt sein könnten, war ebenfalls in der Zelllinie L-1236 deutlich gesteigert. Die antiproliferative Wirkung von Cisplatin auf das Tumorwachstum konnte durch Koinkubation mit Ethacrynsäure, einem Inhibitor der Glutathion-S-Transferasen, potenziert werden. Diese Kombination zeigte auch bei den chemotherapieresistenten L-1236-Zellen eine deutliche Steigerung der Apoptoserate. Ein synergistischer antiproliferativer Effekt des Zellzyklusinhibitors Roscovitin und des Glutathion-S-Transferaseinhibitors Ethacrynsäure konnte bei den chemotherapieresistenten L-1236-Zellen beobachtet werden.

Durch die Identifikation von resistenzassoziierten Genen beim Morbus Hodgkin könnten Risikopatienten frühzeitig erkannt und einer besonderen Behandlung zugeführt werden. Weiterhin bieten diese Gene auch Angriffspunkte für zukünftige Therapieansätze. Durch den Einsatz von Ethacrynsäure zusammen mit herkömmlichen Chemotherapeutika könnte bei Erkrankten mit initialer Zytostatikaresistenz ein besseres Therapieansprechen erreicht werden. Ob eine Steigerung der Heilungsrate insbesondere für diese Patientengruppe erreicht werden kann, bedarf der Klärung durch weitere Studien.

7 Literatur

Alisky JM, Tuttle TF (2003) Ethacrynic acid can be effective for refractory congestive heart failure and ascites. *South Med J* 96:1148-50.

Allemani C, Sant M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Coebergh JW; EURO CARE Working Group (2006) Hodgkin disease survival in Europe and the U.S.: prognostic significance of morphologic groups. *Cancer* 107:352-60.

Alvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvado-Usach MT, Bosch-Príncipe R, Reverter-Branchat G, Jaén-Martínez J, Pons-Ferré LE (2005) Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leuk Lymphoma* 46:1581-91.

Asano N, Oshiro A, Matsuo K, Kagami Y, Ishida F, Suzuki R, Kinoshita T, Shimoyama Y, Tamaru J, Yoshino T, Kitamura K, Fukutani H, Morishima Y, Nakamura S (2006) Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol* 24:4626-33.

Beckett GJ, Hayes JD (1993) Glutathione-S-transferases: biomedical applications. *Adv Clin Chem* 30:281-380.

Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F (1994) A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17:59-65.

Birkenbach M, Josefsen K, Yalamanchili R, Lenoir G, Kieff E (1993) Epstein-Barr virus-induced genes: first lymphocyte-specific G protein-coupled peptide receptors. *J Virol* 67:2209-20.

Bodner AJ, Ting RC, Gallo RC (1981) Induction of differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by nucleosides and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 67:1025-30.

Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, Gahn B, Huls MH, Rousseau A, Sixbey J, Gresik MV, Carrum G, Hudson M, Dilloo D, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE (2004) Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med* 200:1623-33.

Bonadonna G (2000) Historical review of Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 110:504-11.

Brittinger G (2005) Von Thomas Hodgkin zur WHO Klassifikation. *Die medizinische Welt* 56:539-45.

Christman JK, Mendelsohn N, Herzog D, Schneiderman N (1983) Effect of 5-azacytidine on differentiation and methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res* 43:763-9.

Clough DW, Kunkel LM, Davidson RL (1982) 5-azacytidine-induced reactivation of a herpes simplex thymidine kinase gene. *Science* 216:70-3.

Coley HM, Shotton CF, Kokkinos MI and Thomas H (2007) The effects of the CDK inhibitor seliciclib alone or in combination with cisplatin in human uterine sarcoma cell lines. *Gynecol Oncol* 105:462-69.

Creusot F, Acs G, Christman JK (1982) Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem* 257:2041-48.

Diehl V, Kirchner HH, Schaadt M, Fonatsch C, Stein H, Gerdes J, Boie C (1981) Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 101:111-24.

Dinand V, Mailk A, Unni R, Arya LS, Pandey RM, Dawar R (2008) Proliferative index and CD15 expression in pediatric classical Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 50:280-3.

Ding D, Jiang H, Wang P, Salvi R (2007) Cell death after co-administration of cisplatin and ethycrynic acid. *Hear Res* 226:129-39.

Dörffel W, Lüders H, Rühl U, Albrecht M, Marciniak H, Parwaresch R, Pötter R, Schellong G, Schwarze EW, Wickmann L (2003) Preliminary results of the multicenter trial GPOH-HD 95 for the treatment of Hodgkin's disease in children and adolescents: analysis and outlook. *Klin Padiatr* 215:139-45

Dörffel W, Schellong G: Morbus Hodgkin. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (Hrsg.) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer, Heidelberg, 2006, S. 752-65.

Donaldson SS, Hudson M, Oberlin O, Bramswig JH, Schellong G: pediatric Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM (eds): *Hodgkin's disease*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, pp. 531-62.

Dukers DF, Meijer CJ, ten Berge RL, Vos W, Ossenkuppele GJ, Oudejans JJ (2002) High numbers of active caspase 3-positive reed-sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin disease predict favorable clinical outcome. *Blood* 100:36-42.

Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, Findlay DM (2002) Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 99:491-504.

Feller AC: Hodgkin-Lymphom. In: Böcker W, Denk H, Heitz Ph U (Hrsg): *Pathologie*, 3. Auflage. Urban & Fischer, Jena, München, 2004, S. 562-64.

Foell JL, Max D, Giersberg C, Körholz D, Staeger MS (2008) Sensitivity of Hodgkin's Lymphoma Cell Lines to the Cell Cycle Inhibitor Roscovitine. *Anticancer Res* 28:887-894.

Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A, Capodanno I, Luminari S, Vitolo U, Sancetta R, Ianitto E, Trentin L, Stelitano C, Taverna S, Biggi A, Castagnoli A, Versari A, Gregianin M, Pelosi E, Torchio P, Levis A (2006) The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin disease. *Haematologica* 91:475-81.

Gambari R, del Senno L, Barbieri R, Viola L, Tripodi M, Raschellà G, Fantoni A (1984) Human leukemia k-562 cells: induction of erythroid differentiation by 5-azacytidine. *Cell Diff* 14:87-97.

Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, Elliott S, Gill D, Marlton P, Seymour J, Khanna R (2006) Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 108:2280-9.

Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H (2005) Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics* 86:127–141.

Glover AB, Leyland-Jones BR, Chun HG, Davies B, Hoth DF (1987) Azacytidine: 10 years later. *Cancer Treat Rep* 71:737-746.

Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ (2001) Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J Immunol* 166:1-5.

Gough J (1979) Hodgkin's disease; a correlation of histopathology with survival. *Int J Cancer* 5:273-81.

Griffioen M, Kessler JH, Borghi M, van Soest RA, van der Minne CE, Nouta J, van der Burg SH, Medema JP, Schrier PI, Falkenburg JH, Osanto S, Melief CJ (2006) Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy. *Clin Cancer Res* 12:3130-6.

Hansmann ML, Zwingers T, Böske A, Löffler H, Lennert K (1984) Clinical features of nodular paragranuloma (Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular). *J Cancer Res Clin Oncol* 108:321-30.

Hansson J, Berhane K, Castro VM, Jungnelius U, Mannervik B, Ringborg U (1991) Sensitization of human melanoma cells to the cytotoxic effect of melphalan by the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid. *Cancer Res* 51:94-8.

Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445-600.

Hjalgrim H, Askling J, Sørensen P, Madsen M, Rosdahl N, Storm HH, Hamilton-Dutoit S, Eriksen LS, Frisch M, Ekbohm A, Melbye M (2000) Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J Natl Cancer Inst* 92:1522-8.

Hsi ED, Sup SJ, Alemany C, Tso E, Skacel M, Elson P, Alonso MA, Pohlman B (2006) MAL is expressed in a subset of Hodgkin lymphoma and identifies a population of patients with poor prognosis. *Am J Clin Pathol* 125:76-82.

Huang KC, Rao PH, Lau CC, Heard E, Ng SK, Brown C, Mok SC, Berkowitz RS, Ng SW (2002) Relationship of XIST expression and responses of ovarian cancer to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 1:769-76.

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, 1990.

Jacobs DB, Pipho C (1983) Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods* 62:101-8.

Jaffe ES, Harris LN, Stein H, Vardiman JW: Tumours of haematopoietic and lymphoid Tissues. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics. IARC Press, Lyon, 2001, pp. 240-53.

Josting A, Diehl V, Engert V (2000) Behandlung und Prognose primär progredienter und rezidivierender Hodgkin Lymphome. *Der Onkologe* 6:1178-88.

Jox A, Zander T, Kornacker M, Kanzler H, Küppers R, Diehl V, Wolf J (1998) Detection of identical Hodgkin-Reed Sternberg cell specific immunoglobulin gene rearrangement in a patient with Hodgkin's disease of mixed cellularity subtype at primary diagnosis and in relapse two and a half years later. *Ann Oncol* 9:283-287.

Juan SH, Yen JJ, Lee HM, Huang HM (2005) IL-5 inhibits apoptosis by upregulation of c-myc expression in human hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* 1042:481-87.

Keller AR, Kaplan HS, Lukes RJ, Rappaport H (1968) Correlation of histopathology with other prognostic indicators in Hodgkin's disease. *Cancer* 22:487-99.

Körholz D, Claviez A, Hasenclever D, Kluge R, Hirsch W, Kamprad F, Dörffel W, Wickmann L, Papsdorf K, Dieckmann K, Kahn T, Mauz-Körholz C, Dannenberg C, Pötter R, Brosteanu O, Schellong G, Sabri O (2004) The concept of the GPOH-HD 2003 therapy study for pediatric Hodgkin's disease: evolution in the tradition of the DAL/GPOH studies. *Klin Padiatr* 216:150-6.

Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML (1994) Hodgkin's disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from the histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B-cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10962-6.

Küppers R, Re D, Wolf J, Diehl V (2000) Zellbiologie des Morbus Hodgkin. *Der Onkologe* 6:1134-41.

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-6.

Levin S (1995) A toxicologic pathologist's view of apoptosis or is used to call it necrobiosis, but now I'm singing the apoptosis blues. *Toxicol Pathol* 23:533-9.

Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, Reineke LM (1970) Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res* 30:2760-69.

Liao Z, Ha CS, Vlachaki MT, Hagemeister F, Cabanillas F, Hess M, Tucker S, Cox JD (2001) Mantle irradiation alone for pathologic stage I and II Hodgkin's disease: long-term follow-up and patterns of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:971-7.

Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, Moir D, Hancock B, Mc Millan A, Chopra R, Milligan D, Hudson GV (1993) Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: results of a BNLI randomised trial. *Lancet* 341: 1051-4.

Lippert B: Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. 1.Aufl. Helvetica Chimica Acta, Zürich, 1999.

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* 89:4415-24.

Louie DC, Offit K, Jaslow R, Parsa NZ, Murty VV, Schluger A, Chaganti RS (1995) P53 overexpression as a marker of poor prognosis in mantle cell lymphomas with t(11;14)(q13,q32). *Blood* 86:2892-9.

Mack TM, Cozen W, Shibata DK, Weiss LM, Nathwani BN, Hernandez AM, Taylor CR, Hamilton AS, Deapen DM, Rappaport EB (1997) Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med* 332:413-8.

Maher JF, Schreiner GE (1965) Studies on ethycrynic acid in patients with refractory edema. *Ann Intern Med* 62:15-29.

Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. an overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.

Manna SK, Aggarwal BB (1998) IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor-kappa B, activation protein-1, and apoptosis. *J Immunol* 161:2863-72.

Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA (2004) Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 103:1755-62.

Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M, Okamoto S, Ogasawara M, Ikeda Y, Kawakami Y (2001) Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Br J Haematol* 112:916-26.

Mauz-Körholz C, Gorde-Grosjean S, Hasenclever D, Shankar A, Dörffel W, Wallace WH, Schellong G, Robert A, Körholz D, Oberlin O, Hall GW, Landman-Parker J (2007) Resection alone in 58 children with limited stage, lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma-experience from the European network group on pediatric Hodgkin lymphoma. *Cancer* 110:179-85.

McLellan LI, Wolf CR (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat* 2:153-64.

Miettinen M, Franssila KO, Saxén E (1983) Hodgkin's disease, lymphocytic predominance nodular. increased risk for subsequent non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 51:2293-300.

Nachman JB, Spoto R, Herzog P, Gilchrist GS, Wolden SL, Thomson J, Kadin ME, Pattengale P, Davis PC, Hutchinson RJ, White K; Children's Cancer Group (2002) Randomized comparison of low-dose involved-field radiotherapy and no radiotherapy for children with Hodgkin's disease who achieve a complete response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 20:3765-3771.

Nagourney RA, Messenger JC, Kern DH, Weisenthal LM (1990) Enhancement of anthracycline and alkylator cytotoxicity by ethycrynic acid in primary cultures human tissues. *Cancer Chemother Pharmacol* 26:318-22.

Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M (2004) The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 10:4307-13.

Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Ossenkoppele GJ, van Heerde P, Baars JW, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC, van Diest PJ, Middeldorp JM, Meijer CJ (1997) Activated cytotoxic t cells as a prognostic marker in Hodgkin's disease. *Blood* 89:1376-82.

Panning B, Dausman J, Jaenisch R (1997) X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* 90:907-16.

Partheen K, Levan K, Osterberg L, Horvath G (2006) Expression analysis of stage III serous ovarian adenocarcinoma distinguishes a sub-group of survivors. *Eur J Cancer* 42:2846-54.

Peggs KS, Hunter A, Chopra R, Parker A, Mahendra P, Milligan D, Craddock C, Pettengell R, Dogan A, Thomson KJ, Morris EC, Hale G, Waldmann H, Goldstone AH, Linch DC, Mackinnon S (2005) Clinical evidence of a graft-versus-Hodgkin's-lymphoma effect after reduced-intensity allogeneic transplantation. *Lancet* 365:1934-41.

Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ: *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, 1993.

Ploemen JH, Bogaards JJ, Veldink GA, van Ommen B, Jansen DH, van Bladeren PJ (1993) Isoenzyme selective irreversible inhibition of rat and human glutathione s-transferases by ethycrynic acid and two brominated derivatives. *Biochem Pharmacol* 45:633-9.

Ranson H, Prapanthadara L, Hemingway J (1997) Cloning and characterization of two glutathione s-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem J* 324:97-102.

Righetti SC, Perego P, Carenini N, Corna E, Dal Bo L, Cedrola S, La Porta CA, Zunino F (2006) Molecular alterations of cells resistant to platinum drugs: role of PKC α . *Biochim Biophys Acta* 1763:93-100.

Rosenfeld L: Thomas Hodgkin. Morbid Anatomist & Social Activist. Madison Books, Lanham, New York, London, 1993.

Rowlings PA, Curtis RE, Passweg JR, Deeg HJ, Socié G, Travis LB, Kingma DW, Jaffe ES, Sobocinski KA, Horowitz MM (1999) Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 17:3122-7.

Schellong G, Brämswig J, Ludwig R, Gerein V, Jobke A, Jürgens H, Kabisch H, Stollmann B, Weinel P, Gadner H, Schwarze E-W, Wannenmacher M (1986) Kombinierte Behandlungsstrategie bei über 200 Kindern mit Morbus Hodgkin: Abgestufte Chemotherapie, Involved Field-Bestrahlung mit erniedrigten Dosen und selektive Splenektomie. Ein Bericht der kooperativen Therapiestudie DAL-HD-82. *Klin Pädiat* 198:37-146.

Schellong G: Morbus Hodgkin im Kindesalter. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg): *Kompendium internistische Onkologie*. Teil 2, 2. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 1693-1711.

Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, Boissevain F, Zschaber R, Müller P, Kirchner H, Lohri A, Decker S, Koch B, Hasenclever D, Goldstone AH, Diehl V, German Hodgkin's Lymphoma Study Group, Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (2002) Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stemcell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomised trial. *Lancet* 359:2065-71.

Schultz EM, Cragoe EJ Jr, Bicking JB, Bolhofer WA, Sprague JM (1962) Alpha, beta-unsaturated ketone derivatives of aryloxyacetic acids, a new class of diuretics. *J Med Pharmaceut Ch* 91:660-62.

Schwering I, Bräuninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, 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* 101:1505-12.

Singhal SS, Saxena M, Awasthi S, Ahmad H, Sharma R, Awasthi YC (1992) Gender related differences in the expression and characteristics of glutathione s-transferases of human colon. *Biochim Biophys Acta* 1171:16-26.

Skinnider BF, Mak TW (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99:4283-97.

Smith C, Cooper L, Burgess M, Rist M, Webb N, Lambley E, Tellam J, Marlton P, Seymour JF, Gandhi M, Khanna R (2006) Functional reversion of antigen-specific CD8+ T cells from patients with Hodgkin lymphoma following in vitro stimulation with recombinant polyepitope. *J Immunol* 177:4897-906.

Smith RS, Chen Q, Hudson MM, Link MP, Kun L, Weinstein H, Billett A, Marcus KJ, Tarbell NJ, Donaldson SS (2003) Prognostic factors for children with Hodgkin's disease treated with combined-modality therapy. *J Clin Oncol* 21:2026-33.

Staege MS, Lee SP, Frisan T, Mautner J, Scholz S, Pajic A, Rickinson AB, Masucci MG, Polack A, Bornkamm GW (2002) MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4550-5.

Staege MS, Hutter C, Neumann I, Foja S, Hattenhorst UE, Hansen G, Afar D, Burdach SE (2004) DNA Microarrays reveal relationship of Ewing family tumors to both endothelial and fetal neural crest-derived cells and define novel targets. *Cancer Res* 64:8213-21.

Staege MS, Banning-Eichenseer U, Weissflog G, Volkmer i, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D (2008) Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol* 36:886-96.

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

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550.

Sup SJ, Alemañy CA, Pohlman B, Elson P, Malhi S, Thakkar S, Steinle R, Hsi ED (2005) Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol* 23:3773-9.

Tang AH, Tu CP (1994) Biochemical characterization of drosophila glutathione s-transferases D1 and D21. *J Biol Chem* 269:27876-84.

Taylor S, Jones P (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17:771-9.

Tew KD, Bomber AM, Hoffman SJ (1988) Ethacrynic acid and piriprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res* 48:3622-25.

Tew KD (1994) Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54:4313-20.

Tew KD, Monks A, Barone L, Rosser D, Akerman G, Montali JA, Wheatly JB, Schmidt DE Jr (1996) Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the national cancer institute drug screening program. *Mol Pharmacol* 50:149-59.

Tew KD, Dutta S, Schultz M (1997) Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents. *Adv Drug Deliv Rev* 26:91-104.

Thieme Chemistry: Römpp online. Version 3.1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007 (18.09.2009)

Townsend DM, Tew KD (2003) The role of glutathione-s-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22:7369-75.

Tirado OM, Mateo-Lozano S, Notario V (2005) Roscovitine is an effective inducer of apoptosis of Ewing's sarcoma family tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 65:9320-27.

Tzankov A, Bourgau C, Kaiser A, Zimpfer A, Maurer R, Pileri SA, Went P, Dirnhofer S (2005) Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* 18:1542-9.

Visco C, Nadali G, Vassilakopoulos TP, Bonfante V, Viviani S, Gianni AM, Federico M, Luminari S, Peethambaram P, Witzig TE, Pangalis G, Cabanillas F, Medeiros LJ, Sarris AH, Pizzolo G (2006) Very high levels of soluble CD30 recognize the patients with classical Hodgkin's lymphoma retaining a very poor prognosis. *Eur J Haematol* 77:387-94.

Voigt W, Dietrich A, Schmoll HJ (2006) Cisplatin und seine Analoga. *Pharmazie in unserer Zeit* 35:134-43.

VonHoff D, Stark M, Muggia F (1976) 5-azacytidine, a new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 85:237-245.

Voorzanger-Rousselot N, Blay JY (2004) Coexpression of CD40 and CD40L on B lymphoma and carcinoma cells: an autocrine anti-apoptotic role. *Leuk Lymphoma* 45:1239-45.

Whalen R, Boyer TD (1998) Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis* 18:345-58.

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.

Xu BH, Singh SV (1992) Effect of buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on cytotoxic activity of mitomycin C analogues BMY 25282 and BMY 25067. *Cancer Res* 15:6666-70.

Zhao G, Wang X (2006) Advance in antitumor agents targeting glutathione-S-transferase. *Curr Med Chem* 13:1461-71.

8 Thesen

1. Der antiproliferative Effekt von Cisplatin auf das Wachstum von Tumorzellen ist bei der Zelllinie L-1236 deutlich geringer als bei der Linie L-540, so dass die Linie L-1236 als Modell für chemotherapieresistente Hodgkin-Lymphom-Zellen angesehen werden kann.
2. Chemotherapiesensible L-540-Zellen und -resistente L-1236-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Oberflächenmolekülbesatzes.
3. Die Expression von CD80, CD40 und CD23 ist in chemotherapieresistenten L-1236-Zellen höher als in chemotherapiesensiblen L-540-Zellen.
4. Die Expression von CD2 und CD25 ist in chemotherapieresistenten L-1236-Zellen niedriger als in chemotherapiesensiblen L-540-Zellen.
5. Chemotherapiesensible L-540-Zellen und chemotherapieresistente L-1236-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Genexpressionsmusters.
6. Antiapoptotische Gene wie MARCKS, IL13RA1, IL5RA und CD40 werden nur von der chemotherapieresistenten Zelllinie L-1236 exprimiert.
7. Proapoptotische Gene wie TP53 werden nur von der chemotherapiesensiblen Zelllinie L-540 exprimiert.
8. Die Inkubation mit Azacytidin führt zu einer PRAME-Induktion in der Zelllinie L-540.
9. Die Inkubation mit L-1236-konditioniertem Medium führt zur einer MARCKS-Induktion in der Zelllinie L-540.
10. Die Inkubation mit L-540-konditioniertem Medium führt zu einer IL26-Induktion in der Zelllinie L-1236.

11. Die Glutathion-S-Transferase GSTM1 wird nur von der chemotherapieresistenten Zelllinie L-1236 exprimiert.
12. Ethacrynsäure kann die antiproliferative Wirkung von Cisplatin in der chemotherapieresistenten Zelllinie L-1236 potenzieren.
13. Durch Koinkubation von Roscovitin und Ethacrynsäure kann bei chemotherapieresistenten L-1236-Zellen die Zahl apoptotischer Zellen gesteigert werden.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Grit Brodt, geb. Weißflog
Geburtsdatum:	20.11.1983
Geburtsort:	Erlabrunn
Anschrift:	Nordstraße 60 04105 Leipzig
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

1990-1994	Grundschule Lauter
1994-1996	Gymnasium Aue II
1996-2001	Pestalozzi-Gymnasium Aue
2001-2002	Clemens-Winkler-Gymnasium Aue mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

03/2003	Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen
03/2005	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
03/2009	Staatsexamen

Praktisches Jahr:

02/2008 - 06/2008	Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Krankenhauses Martha-Maria Dörlau, CA Dr. med. Richter
06/2008 - 09/2008	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin bzw. Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Halle, CA Prof. Dr. med. Körholz bzw. Prof. Dr. med. Grabitz
09/2008 - 01/2009	Klinik für Innere Medizin des Krankenhauses Martha-Maria Dörlau, CA PD Dr. med. Schütte

Wissenschaftlicher Werdegang:

10/2006	Beginn der Promotion im pädiatrisch-onkologischem Forschungslabor des Landesentrums für Zell- und Gentherapie unter der Betreuung von PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger
---------	--

Publikationen:

Staeger MS, Banning-Eichenseer U, Weißflog G, Volkmer i, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D (2008) Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. Exp Hematol 36:886-96

Abstracts:

Staege, M. S., U. Banning, G. Weißflog, G. Richter, S. Burdach, C. Mauz-Körholz, J. Föll und D. Körholz. Zytostatikaresistenz und Genexpression beim Hodgkin-Lymphom. Jahrestagung der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und Kinderchirurgie, 30.-31.03.2007. Halle. Kinder- und Jugendmedizin. 7:A24-25 (2007).

Staege, M. S., G. Weißflog, S. Burdach und D. Körholz. Differences in the gene expression profile of chemotherapy sensitive and resistant Hodgkin's lymphoma cell lines. XX. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, 06.-09.06.2007, Wilsede. Klin. Pädiatr. 219:193 (2007)

Max, D., G. Weißflog, C. Hutter, J. Kaftan, C. Mauz-Körholz, D. Körholz und M. S. Staege. Characterization of tumour associated and tissue specific gene expression profiles. The 8th international conference of anticancer research, 17.-22.10.2008, Kos, Griechenland. Anticancer Res. 28:3496-349 (2008).

Max, D., G. Weißflog, C. Hutter, J. Kaftan, C. Mauz-Körholz, D. Körholz und M. S. Staege. Charakterisierung von tumorassoziierten und gewebespezifischen Gen-Expressionsprofilen. Jahrestagung der Sächsisch-Thüringischen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin und Kinderchirurgie, 03.-04.04.2009, Dresden. Kinder- und Jugendmedizin 9:A23 (2009).

Max, D., G. Weißflog, C. Hutter, J. Kaftan, C. Mauz-Körholz, J. Föll, D. Körholz und M. S. Staege. Identification of putative cancer/testis antigens by comparative gene expression profiling. 2nd European congress of immunology, 13.-16.09.2009, Berlin. Eur. J. Immunol. 39:S525 (2009).

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und alle wörtlichen oder sinngemäß übernommenen Textstellen als solche kenntlich gemacht habe.

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

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe nur diesen einen Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht und keinen Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland gestellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger für die Überlassung dieses interessanten Themas, die fachliche und freundliche Unterstützung, zahlreiche Ratschläge und Gespräche sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Dem Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Prof. Dr. med. D. Körholz, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an seiner Klinik.

Weiterhin sei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Kinderklinik der Martin-Luther-Universität für die freundliche Aufnahme und entspannte Atmosphäre herzlich gedankt. Ines Volkmer danke ich für ihre Geduld während meines Einstiegs in den Laboralltag, die Prozessierung der Microarrays und die immer freundliche Beantwortung meiner Fragen. Corinna Giersberg möchte ich für die nette und kompetente Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen danken. Daniela Max, Manuela Hesse, Dajana Reuter, Caspar Kühnöl und Benjamin Schmiedel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in allen Belangen während der Durchführung dieser Arbeit.

Gedankt sei Frau Dr. med. vet. Katharina Kluge für die gründliche und schnelle Durchsicht meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meiner Familie und meinem Ehemann Steffen für die hilfreiche und liebevolle Unterstützung.