

Thomas Schwietz

Dr. med.

## **Genetische und funktionelle Analyse der Januskinase JAK2 in Zelllinien des primär mediastinalen B-Zell Lymphoms und klassischen Hodgkin Lymphoms**

Geboren am 07.08.1976 in Malapane

Staatsexamen am 27.10.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stefan Joos

Verschiedene Studien haben Hinweise erbracht, dass Veränderungen des JAK/STAT-Signalwegs wichtig für die Entstehung oder Entwicklung von myelo- und lymphoproliferativen Erkrankungen sind. In von den Lymphomentitäten primär mediastinales B-Zell Lymphom (PMBL) und Hodgkin Lymphom (HL) abgeleiteten Zelllinien MedB-1 und HDLM-2 wurden Amplifikationen auf Genebene sowie Überexpression mit konstitutiver Phosphorylierung auf Proteinebene der Tyrosinkinase JAK2 nachgewiesen. Diese Phosphorylierung von JAK2 kann zu einem von der Einwirkung von Zytokinen entkoppelten Proliferationssignal führen.

Mittels Mutationsanalyse der Gene *JAK2*, *STAT5a*, *STAT5b* und *STAT6* wurde nach einer möglichen Ursache der Überexpression und konstitutiven Phosphorylierung von JAK2 sowie nach weiteren Hinweisen für einen Entstehungsmechanismus der ungehemmten Proliferation innerhalb der JAK/STAT Signalkaskade gesucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil zunächst mittels Mutationsanalyse der Gene *JAK2*, *STAT5a*, *STAT5b* und *STAT6* nach möglichen Ursachen der Überexpression und der konstitutiven Phosphorylierung der Proteine in den HL abgeleiteten Zelllinien HDLM-2, KMH-2, L428, L540 und L1236 sowie den PMBL-Linien MedB-1 und K1106 gesucht. Im Gen *JAK2* konnte in der Zelllinie L1236 an Nukleotidposition 2519 in Exon 14 ein monoallelischer Basenaustausch von T→G in 3'-5'-Richtung bzw. A→C in 5'-3'-Richtung nachgewiesen werden. Dieser bewirkt einen Aminosäureaustausch von Cystein nach Tryptophan (C→W) an Position 675 der Aminosäuresequenz. Lokalisiert ist diese Aberration in der katalytischen Schleife der JH2 (*JAK2* homologen) Domäne des JAK2-Proteins. In Proben aus 53 gesunden Probanden konnte der Basenaustausch nicht gezeigt werden, so dass

von dem Vorliegen einer pathogenetisch wirksamen Mutation ausgegangen werden kann. Eine 3D-Modellierung der entsprechenden Domänen zeigte, dass es durch Interaktionen des neu entstandenen Tryptophans mit den aromatischen Ringen benachbarter Tryptophane wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der JH2 Domäne kommt.

Weiter zeigte die Sequenzierung von JAK2 in den Zelllinien MedB-1, KMH-2 und L1236 einen monoallelischen Basenaustausch von A→G an Nukleotidposition 2984 in Exon 17. Die Aminosäure Leucin an Aminosäureposition 830 bleibt jedoch bestehen, so dass ein sog. *stiller Austausch* vorliegt, der keine Konsequenz für das kodierte Protein hat.

Eine weitere interessante Aberration offenbarte die Sequenzierung von *STAT5a*. In den Zelllinien MedB-1, HDLM-2, L540 und L1236 konnte neben normalen Transkripten auch solche gefunden werden, denen monoallelisch Exon 18 und 19 fehlten. Dies könnte in einem Verlust des Transaktivierungspotentials sowie in einer verlängerten DNA-Bindungsaktivität resultieren, was Auswirkungen auf die Expression *STAT5a*-regulierter Gene zur Folge hätte und zu einer Veränderung der Zellzykluskontrolle führen könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung des JAK2-spezifischen Inhibitors AG490 auf das Proliferationsverhalten von Zelllinien untersucht. In einer Konzentration von 20µM führte AG490 in Zellen der PMBL abgeleiteten Linie MedB1 zu einer vollständigen Inhibition der Zellproliferation. Dies legt nahe, dass JAK2 eine bedeutende Rolle bei der Proliferationskontrolle dieser Zelllinie spielt und auch in primären Tumoren die Proliferation durch Störungen auf der Ebene des JAK/STAT- Signalwegs verursacht sein könnte.

Mittels immunzytochemischer Untersuchungen sollte im dritten Teil der Arbeit geklärt werden, ob es während der Inkubation mit AG490 zu einer subzellulären Delokalisation von JAK2-Protein und seinem nachgeschalteten Partner STAT5 kommt. In einer Subpopulation von Zellen ohne Zugabe von Inhibitor war zu frühen Zeitpunkten ein submembranöses *rimstaining* in allen untersuchten Proteinen zu erkennen, das sich zu späteren Zeitpunkten auflöste bzw. in eine diffusere Verteilung überging. Allerdings blieb im Rahmen dieser Arbeit offen, ob diese Effekte allein auf den Inhibitor, und nicht auf das Lösungsmittel Ethanol zurückgeführt werden können. Um dies weiter abzuklären sind weitere Untersuchungen notwendig.

Insgesamt sollte mit dieser Arbeit ein Beitrag zum besseren Verständnis der Tumorentstehung durch molekulare Veränderungen des JAK/STAT-Signalwegs geleistet werden. Der Aspekt einer zukünftigen gezielten Therapie bei PMBL und HL mit dem hier verwendeten Tyrosinkinaseinhibitor AG490 sollte Anlass geben, den bedeutsamen JAK/STAT-Signalweg weiter zu erforschen.