Universität Ulm
Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. P. Möller

# pSTAT6 als potentieller prognostischer Biomarker im klassischen Hodgkin Lymphom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Steffen Konyen

Ulm 2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

2.Berichterstatter: PD Dr. Andreas Viardot

Tag der Promotion: 16. Januar 2015

**Für meine Familie**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis……..…....I
Abkürzungsverzeichnis…….……II

**1 Einleitung ..... 1**

**2 Material und Methoden ..... 4**

2.1 Gewebeproben ..... 4
2.2 Immunhistochemische Färbung ..... 5
2.2.1 Anfertigen von Gewebeschnitten ..... 5
2.2.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte ..... 5
2.2.3 Primär und sekundär Inkubation ..... 5
2.3 Mikroskopische Analyse und Markerquantifizierung ..... 6
2.4 Statistische Auswertung ..... 6

**3 Ergebnisse ..... 8**

3.1 Klinisch-pathologische Parameter des Gesamtkollektives ..... 8
3.2 Überlebenszeiten im Gesamtkollektiv ..... 9
3.3 Therapielinien des Gesamtkollektives ..... 9
3.4 Klinisch-pathologische Parameter in Bezug auf den pSTAT6-Status .... 11
3.5 pSTAT6-Status in Bezug auf *SOCS1*-Mutationsstatus ..... 14
3.6 Therapielinien in Bezug zum pSTAT6-Status ..... 14
3.7 Überlebenszeitanalyse ..... 15

**4 Diskussion ..... 18**

**5 Zusammenfassung ..... 24**

**6 Literaturverzeichnis ..... 25**

Lebenslauf ..... 29

## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Erklärung |
|---|---|
| Abb | Abbildung |
| ABVD | Doxorubicin (= Antrazykline), Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin |
| BEACOPP | Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin, Prednison |
| Bzw | Beziehungsweise |
| Ca | Circa |
| cHL | Classical hodgkin lymphoma |
| CREDOS | Cancer retrieval evaluation and documentation system |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FDG-PET | Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomografie |
| HGAL | Human germinal-center associated lymphoma protein |
| HRS-Zellen | Hodgkin-Reed-Sternbergzellen |
| IL | Interleukin |
| IPS | International prognostic score |
| JAK | Januskinase |
| LD | Lymphocyte-depleted subtype |
| LK | Lymphknoten |
| LMP-1 | latent membrane protein 1 |
| LR | Lymphocyte-rich subtype |
| MC | Mixed-cellularity subtype |
| n | Anzahl |
| n.a. | Not available |
| NLPHL | Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma |
| NS | Nodular sclerosis subtype |
| PMBL | Primär mediastinales B-Zell-Lymphom |
| Rad | Radiatio |
| S | Siehe |
| Sog | Sogenannte(n) |
| SOCS1 | Suppressor of cytokine signaling 1 |
| STAT | Signal Transducers and Activators of Transcription |

# 1 Einleitung

Hodgkin Lymphome lassen sich in zwei Subtypen einteilen. Den Großteil nimmt mit ca. 95% das klassische Hodgkin Lymphome ein (cHL). Die restlichen 5% der Fälle macht die noduläre lymphozytenprädominante Form der Hodgkin Lymphome aus (NLPHL= nodular lymphocyte predominant Hodgkin`s Lymphoma) (Tiacci et al. 2012). In dieser Arbeit legten wir das Hauptaugenmerk auf die klassische Form, die je nach Zellzusammensetzung in einen nodulär sklerosierenden Typ (NS= nodular sclerosing), einen gemischt-zelligen Typ (MC= mixed-cellularity subtype), einen lymphozytenreichen Typ (LR= lymphocyte-rich) und einen lymphozytenarmen Typ (LD= lymphocyte-deplete) subklassizfiziert werden kann (Tiacci et al. 2012).

Die Pathobiologie des klassischen Hodgkin Lymphoms ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es konnte mittlerweile geklärt werden, dass die sogenannten Hodgkin-Reed-Sternbergzellen (HRS-Zellen) die eigentlich bösartigen Zellen des Lymphoms sind und von B-Zellen aus den Keimzentren der Lymphknoten abstammen (Hansmann et al. 2003). Diese transformierten B-Zellen verlieren die typischen B-Zell-Charakteristika (Kuppers et al. 2012) und erfüllen Ihre normalen Funktionen nicht mehr, akquirieren aber – zumindest teilweise durch genetische Mutationen – neue Funktionen. Zum Beispiel können derartig veränderte HRS-Zellen dem programmierten Zelltod entgehen und im Gegensatz zum Normalzustand weiter überleben, proliferieren und zusätzliche Mutationen anhäufen (Kanzler et al. 1996). Ein besonderer histologischer Aspekt des cHL ist, dass die HRS-Zellen nur etwa 1% der Zellen im Tumorgewebe ausmachen (Kuppers 2009). Der größte Teil der Tumormasse wird aus diversen Zellen des Immunsystems gebildet. Dies sind zum Beispiel T-Tellen, B-Zellen, Plasmazellen, Neutrophile, Eosinophile und Mastzellen (Kuppers 2009). Dieses sogenannte „microenvironment“ wird einerseits als Antwort auf die abnormalen HRS-Zellen verstanden, andererseits scheint diese „inflammatory response“ für das Überleben und die Proliferation der HRS-Zellen wichtig zu sein (Kuppers 2009, Skinnider et al. 2002). Diese histologische Besonderheit stellt derzeit eine besondere technische Hürde in der molekulargenetischen Untersuchung der HRS-Zellen dar,

die entweder durch Morphologie-erhaltende Techniken (z.B. Immunhistochmie) oder Einzelzellisolation umgangen werden muss.

Der JAK/STAT-Signalweg spielt in der Onkogenese des cHL eine entscheidende Rolle (Kube et al. 2001, Guiter et al. 2004); (Proia et al. 2011). Normalerweise ermöglicht dieser Signalweg eukaryotischen Zellen extrazelluläre Signale von der Zellmembran in den Nukleus zu leiten. Angestoßen wird der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg durch Signalmoleküle wie zum Beispiel Cytokine, Interferone oder Hormone, die an membranständige Rezeptoren der Zelle binden. Der dabei entstandene Rezeptorkomplex führt intrazellulär zur Aktivierung der so genannten Janus-Kinasen (JAK), welche dann aktiviert, wiederum sogenannte Effektormoleküle aktivieren. Diese werden als STAT (signal transducer and activator of transcription) bezeichnet und dimerisieren durch Phosphorylierung. In diesem aktivierten Zustand werden diese in den Zellkern transloziert, binden hier an die DNA und fungieren als Transkriptionsfaktoren. Die Familie der STAT-Proteine umfasst mehrere Mitglieder die unter anderem Wachstum, Zelldifferenzierung und Überleben von B-Zellen orchestrieren. Eine weitere wichtige Protein-Familie, die die JAK/STAT-Kaskade reguliert, ist die Gruppe der SOCS-Proteine (Suppresor of cytokine signaling): durch Bindung der zentralen SH2-Domäne an das katalytische Zentrum der phosphorylierten Janus Kinasen hemmt SOCS1 den JAK/STAT-Signalweg, was eine geringere Aktivität zur Folge hat. Die Transkription der SOCS-Proteine wird wiederum durch den JAK/STAT-Pathway selbst vermittelt. Somit erfüllt dieses Protein auch die Funktion einer negativen Rückkopplung (Krebs et al. 2001).
Die Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs für die Pathogenese im cHL wird durch mehrere Aberrationen unterstrichen. Obwohl sich die klassische *JAK2*-Mutation im cHL nicht findet (Melzner et al. 2006) sind genomische *JAK2*-Ampifikationen in ca. 33% der Hodgkin-Fälle beschrieben (Joos et al. 2000). Des Weiteren ist *SOCS1* in ca. 42% der cHL Fälle mutiert – was zu einer weiteren konstitutiven Aktivierung beiträgt (Weniger et al. 2006). Zusammengenommen unterstreichen diese Veränderungen einerseits die Ähnlichkeit des cHL mit dem primär mediastinalen B-Zell Lymphom (PMBL), zum anderen scheint es in Fällen mit mutiertem *SOCS1* zur Anhäufung von aktivierten pSTAT-Molekülen zu kommen (Weniger et al. 2006). Obwohl das PMBL durch konstitutive Aktivierung von pSTAT6

gekennzeichnet ist und diese durch zuverlässige Immunhistochemie nachweisbar ist (Guiter et al. 2004, Ritz et al. 2009), fehlen diese derzeit im cHL.

Die Prognose bei klassischem Hodgkin Lymphom (cHL) ist im Vergleich zu anderen Krebsarten gut. Durch optimierte Therapiestrategien erleiden nur ca. 30% der Patienten in fortgeschrittenen Stadien nach 5 Jahren ein Rezidiv (Brice 2008). Daraus ergibt sich folgendes Dilemma: „zu viel“ Chemotherapie erhöht das Risiko von Organschäden und Spätkomplikationen, wohingegen „zu wenig“ Chemotherapie das Risiko für ein Rezidiv steigert. Dieses Problem illustriert die klinische Bedeutung von Biomarkern, die die Aggressivität von Tumoren vorhersagen und somit eine Intensivierung oder Reduktion der Therapie erlauben. Eine Strategie stellt die Verwendung von Biomarkern dar, die direkt mit der Tumorbiologie in den Tumorzellen nachweisbar sind.

Auf der Suche nach einem solchem gewebebasiertem Biomarker mit pathophysiologischer Relevanz und möglicher prognostischer Bedeutung, untersuchten wir hier die Rolle des JAK/STAT Effektormoleküls pSTAT6 im cHL. Dazu etablierten wir eine pSTAT6-spezifische immunhistochemische Färbung an Primärtumorproben und untersuchten damit ein etabliertes Ulmer Kollektiv (Xu et al. 2012) mit bekannten klinikopathologischen Daten sowie Überlebensdaten. Unsere Ergebnisse sprechen für eine mögliche prognostische Bedeutung des pSTAT6-Status im cHL.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Gewebeproben

In dieser Arbeit verwendeten wir Gewebeproben von Lymphknoten welche im Zeitraum von 1992 – 2012 kryoasserviert wurden. Das sog. Ulmer Kollektiv ist vorbeschrieben (Xu et al. 2012), und die klinikopathologischen Parameter dieser Kohorte beinhalten: Alter bei Erstdiagnose, Geschlecht, eine histologische Unterteilung in die vier Subtypen (NS, MC, LR, LD), den EBV-Status, sowie die Anzahl der befallenen Lymphknoten. Die Stadieneinteilung erfolgte nach der Ann-Arbor-Klassifikation (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Stadieneinteilung des Hodgkin Lymphom nach der Ann-Arbor-Klassifikation

| | |
|---|---|
| Stadium I | Befall einer Lymphknotenregion oder eine extranodale Lokalisation |
| Stadium II | Befall von 2 oder mehr benachbarten Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells oder Befall von 2 extranodalen Lokalisationen auf einer Seite des Zwerchfells. |
| Stadium III | Befall von Lymphknotenregionen oder extranodalen Lokalisationen beiderseits des Zwerchfells |
| Stadium IV | Disseminierter oder diffuser Befall eines oder mehrer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall |

Für die nachfolgenden Kontingenzanalysen wurden die Patienten der Stadien I und II (=lokalisiert) und die der Stadien III und IV (=extendiert) in zwei Gruppen dichotomisiert.

Basierend auf dem jeweiligen Therapieschema wurden die Probanden in 6 Gruppen eingeteilt: ABVD, ABVD und Bestrahlung, BEACOPP, BEACOPP und Bestrahlung und andere Therapien. Patienten, bei denen das Therapieschema nicht bekannt war, wurden der Kategorie „andere Therapie“ zugeteilt. Diese Unterteilung der Therapieschemata erfolgte aufgrund signifikanter Unterschiede in Progressionsfreiheit und Gesamtüberleben (Viviani et al. 2011). Beim ABVD-Schema werden die Substanzen Doxorubicin (=Antrazykline), Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin angewendet, während beim BEACOPP-Protokoll Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Vincristin, Procarbazin und Prednison appliziert werden (Tam et al. 2011).

In der Kontingenzanalyse wurden die nach ihrem pSTAT6-Status klassifizierten Subgruppen nach Bestrahlungsstatus und Therapieprotokoll analysiert.

Abschließend untersuchten wir noch die Probanden mit Rezidiv im Vergleich zu denen ohne Rezidiv.
Hinsichtlich der gewebebasierten Charakteristika bedienten wir uns der bereits vorhandenen histo-pathologischen Primärbefunde. Der Rezidivstatus und die Überlebenszeiten wurden mit Hilfe des klinischen Dokumentationssystems (SAP, Universitätsklinikum Ulm) sowie der Datenbank CREDOS (Cancer retrieval evaluation and documentation system) des klinischen Krebsregisters Ulm erhoben.

## 2.2 Immunhistochemische Färbung

### 2.2.1 Anfertigen von Gewebeschnitten

Das Erstellen von Gefrierschnitten erfolgte unter Verwendung eines Kryomikrotoms. Die 2-5µm dicken Gefrierschnitte wurden auf sialynisierten Objektträgern aufgezogen und 5 Minuten in 4%-iger neutral gepufferter Formaldehyd-Lösung fixiert.

### 2.2.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die fixierten Kryoschnitte wurden nach Wässerung in physiologischer Kochsalzlösung direkt vorbehandelt. Dazu wurden die Objektträger für 20 Minuten in vorgeheiztem Tris-EDTA-Puffer bei pH 6,0 im Dampfgarer (Steamer) inkubiert.
Nach dieser Vorbehandlung wurden die Küvetten bei geöffnetem Deckel für 10 Minuten bei 4° Celcius abgekühlt. Die Weiterbehandlung erfolgte nach Spülung in destilliertem Wasser.

### 2.2.3 Primär- und Sekundär-Inkubationen

Für die immunhistologischen pSTAT6-Färbungen verwendeten wir einen ‚rabbit-anti-human'-pSTAT6-Antikörper welcher spezifisch die zu Tyr641-phosphorylierte Form von STAT6 erkennt. Dies wurde mit Hilfe von Zelllinien-basierten Vorstudien als Phospho-STAT6-spezifisch validiert (Ritz et al. 2009). Die Schnitte wurden mit diesem kommerziell erhältlichen Antikörper (Phospho-STAT6 (Tyr641) Antibody #9361; Cell Signaling Technology; Boston, Massachusetts, USA) mit einer 1:100 vorverdünnten Lösung mit einem Volumen von 100-150µl für 30 Minuten bei

Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Schnitte von pSTAT6-aktivierten Primär Mediastinalen B-Zell Lymphomen (Guiter et al. 2004) und IL4-vorbehandelten Zelllinien dienten als Positivkontrollen, Cytospins unbehandelter Zelllinien sowie Gewebeproben ohne Primärantikörperbehandlung als Negativkontrollen. Zur Visualisierung verwendeten wir eine Avidin-Biotin-Enzumbasierte Sustrat-Chromogenlösung (RED; Dako, Hamburg, Deutschland). Bei allen Schnitten wurde eine Hämatoxylin Gegenfärbung (4 min) durchgeführt und die Schnitte wurden wässrig mit Aquatex (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

## 2.3 Mikroskopische Analyse und Markerquantifizierung

Die initiale Analyse wurde mit Hilfe von einem Olympus BX51-Lichtmikroskop durchgeführt und Aufnahmen ausgewählter Bildfelder mittels einer angeschlossenen Digitalkamera dokumentiert (dot slide, Nikon, Düsseldorf, Germany). Bewertet wurde die nukleäre pSTAT6-Färbung in HRS-Zellen. Färbung in keiner oder maximal 10% der HRS-Zellen wurden als negativ definiert. Waren mehr als 10% der HRS-Zellen gefärbt wurde dieser Tumor als positiv gewertet.

## 2.4 Statistische Auswertung

Zur Beschreibung unterschiedlicher Assoziationen in Bezug auf den pSTAT6-Status kamen der Fisher`s exact test, der Chi-Quadrat-Test und der Student`s t-Test zum Einsatz. Das progressionsfreie Überleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Rezidiv bzw. Progress. Das Gesamtüberleben wurde definiert als das Zeitintervall zwischen Diagnose und Tod. Patienten, die zum Auswertungszeitpunkt am Leben waren oder für die vollständige Zeitintervalle nicht zur Verfügung standen, wurden zensiert. Die Unterschiede im Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben in Bezug zum pSTAT6-Status wurden durch die graphische Darstellung nach der Kaplan-Meier-Methode veranschaulicht und statistisch mit dem Log-Rank-Verfahren verglichen. Signifikanz wurde als $p< 0,05$ definiert. Die Auswertung erfolgten mit

Microsoft Excel (Microsoft Inc., Seattle, Washington, USA) sowie der Statistiksoftware Prism 5.0b (GraphPad Software Inc. San Diego, Kalifornien, USA).

Da zu vereinzelten Charakteristika nicht immer Daten für alle Patienten vorlagen wurden diese nur dann getestet, wenn ein signifikanter Einfluss der fehlenden Daten zuvor ausgeschlossen werden konnte.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Klinischpathologische Parameter des Gesamtkollektives

Das Patientenkollektiv wird in Tabelle 2 dargestellt. Das mediane Alter der 38 Männer und 46 Frauen bei Erstdiagnose liegt bei 27 Jahre; die Spannbreite des Alters zwischen 9 und 76 Jahren. Bei Erstdiagnose waren 86% der Patienten jünger als 45 Jahre. Die Darstellung der Altersverteilung in unserer Kohorte zeigt die für das cHL typische zweigipfelige Verteilung um das 25. und 60. Lebensjahr (s. Abb. 1).

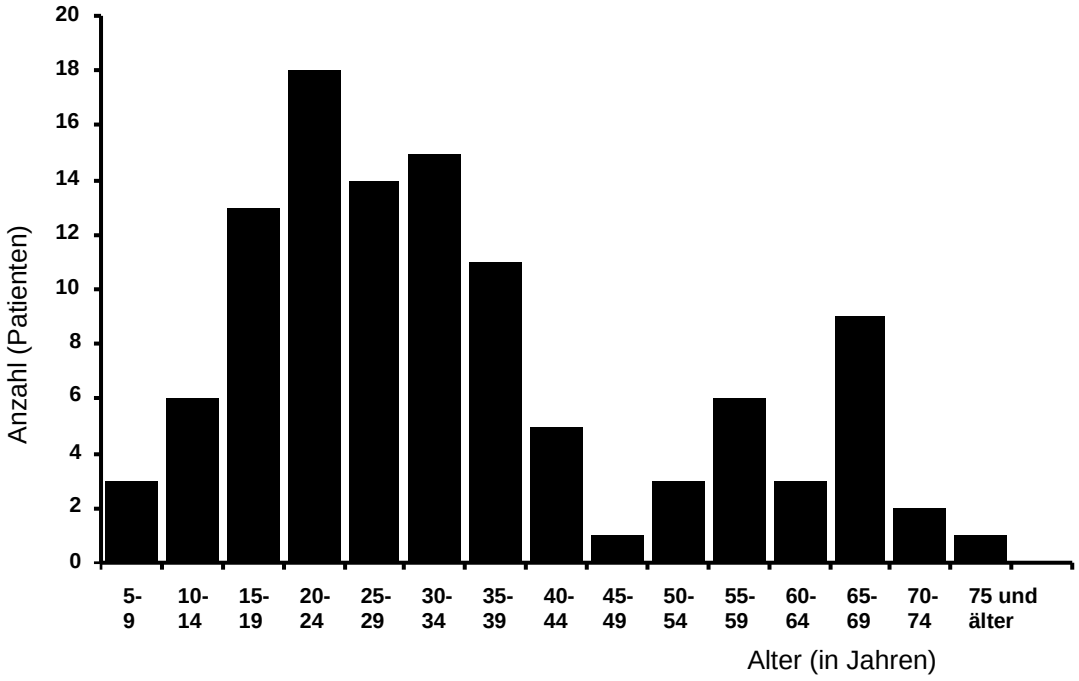


**Abbildung 1:** Altersverteilung der Studienkohorte bei Erstdiagnose. Zur Frequenzverteilung wurden die Alter bei Diagnosestellung in 5 Jahre umfassende Bins zusammengefasst. Das mediane Alter bei Erstdiagnose liegt bei 27 Jahren mit einer Spannbreite zwischen 9 und 76 Jahren. Insgesamt 84 Patienten. Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012.

Der dominierende histologische Typ war mit 57 Fällen der nodulär sklerosierende Typ, gefolgt vom lymphozytenreichen Typ mit 15 Fällen.

Bei 35% der Studienkohorte waren weniger als 3 Lymphknotenareale befallen.

Die meisten der Patienten waren im Stadium II, wobei das Verhältnis der Patienten zwischen den lokalisierten und den extendierten Stadien nahezu ausgewogen war ($n_{I+II}$ = 46 / $n_{III+IV}$ = 38).

## 3.2 Überlebenszeiten im Gesamtkollektiv

Betrachtet man die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier (s. Abb. 2) ist festzustellen, dass die Zahlen unserer Studienkohorte bezüglich progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben der aktuellen Literatur entsprechen (Viviani et al. 2011). Die ersten 4 Jahre nach Erstdiagnose sind als äußerst kritisch zu betrachten, da sich in dieser Spanne die meisten Ereignisse, im Sinne von Todesfall bzw. Rezidiv/Progress, finden. Innerhalb der ersten 14 Jahre erleiden ca. 20% der Patienten einen Progress und nach 17 Jahren überleben etwa 85% der Patienten.

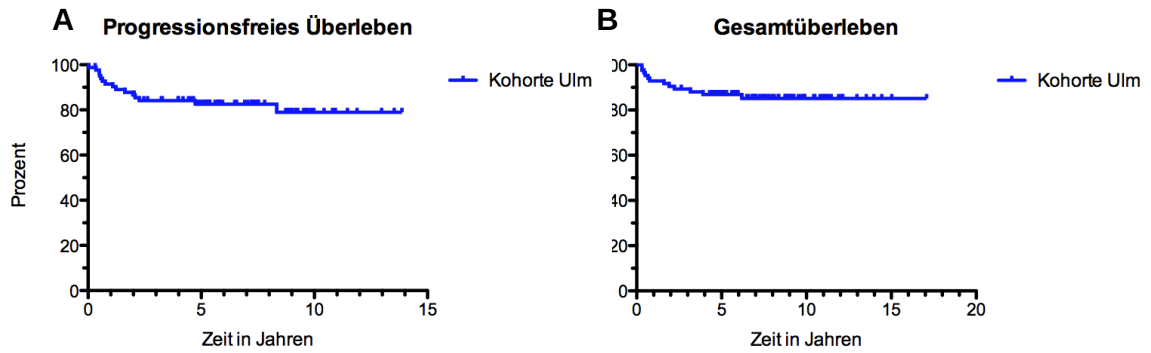


**Abbildung 2:** Die Überlebenskurven der gesamten Kohorte. Insgesamt 84 Patienten. Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012.
**A)** Progressionsfreies Überleben der gesamten Studienkohorte: progressionsfreies Überleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Rezidiv/Progress.
**B)** Gesamtüberleben der Studienkohorte: Gesamtüberleben wurde definiert als Zeitintervall zwischen Diagnose und Tod.

## 3.3 Therapie des Gesamtkollektives

Bei 70 Patienten des Gesamtkollektives wurden die gängigsten Therapieprotokolle angewendet. Darunter zählen die Schemata ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin) und BEACOPP (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin (= Vincristin), Procarbazin, Prednison) mit und ohne Radiatio. Vorherrschende Therapie war eine Behandlung nach dem ABVD-

Schema inklusive Bestrahlung (n=28). 14 Patienten wurden mit anderen Therapieprotokollen behandelt. Trotz moderner Therapieoptionen bekamen 15 Patienten ein Rezidiv, während 69 ohne Rückfall überlebten.

**Tabelle 2**: **Klinisch-pathologische Daten des Gesamtkollektives**

| Charakteristika | Anzahl der Patienten | (n = 84) % |
|---|---|---|
| **Alter in Jahren** | | |
| Median | 27 | |
| Spannbreite | 9-76 | |
| < 45 Jahre | 72 | 86 |
| ≥ 45 Jahre | 12 | 14 |
| **Geschlecht** | | |
| Männlich | 38 | 45 |
| Weiblich | 46 | 55 |
| **Histologie** | | |
| NS | 57 | 68 |
| MC | 10 | 12 |
| LR | 15 | 18 |
| LD | 2 | 2 |
| **EBV-Status** | | |
| Negativ | 63 | 75 |
| Positiv | 13 | 15 |
| n.a. | 8 | 10 |
| **Lymphknotenstatus** | | |
| < 3 LK-Areale | 29 | 35 |
| ≥ 3 LK-Areale | 55 | 65 |
| **Ann-Arbor-Stadium** | | |
| I | 4 | 5 |
| II | 42 | 50 |
| III | 21 | 25 |
| IV | 17 | 20 |
| **Therapie** | | |
| ABVD | 5 | 6 |
| ABVD+Radiatio | 28 | 33 |
| BEACOPP | 19 | 23 |
| BEACOPP+Radiatio | 18 | 21 |
| Andere Therapie | 14 | 17 |
| **Rezidiv** | | |
| Ja | 15 | 18 |
| Nein | 69 | 82 |

n= Anzahl; NS= nodulair sklerosis subtype; MC= mixed-cellularity subtype; LR= lymphozyte-rich subtype; LD= lymphozyte-depleted subtype; EBV= Epstein-Barr-Virus; LK= Lymphknoten; ABVD= Therapieprotokoll mit Doxorubicin (=Antrazykline), Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin; BEACOPP= Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Oncovin (= Vincristin), Procarbazin und Prednison. Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012.

## 3.4 Klinisch-pathologische Parameter in Bezug auf den pSTAT6-Status

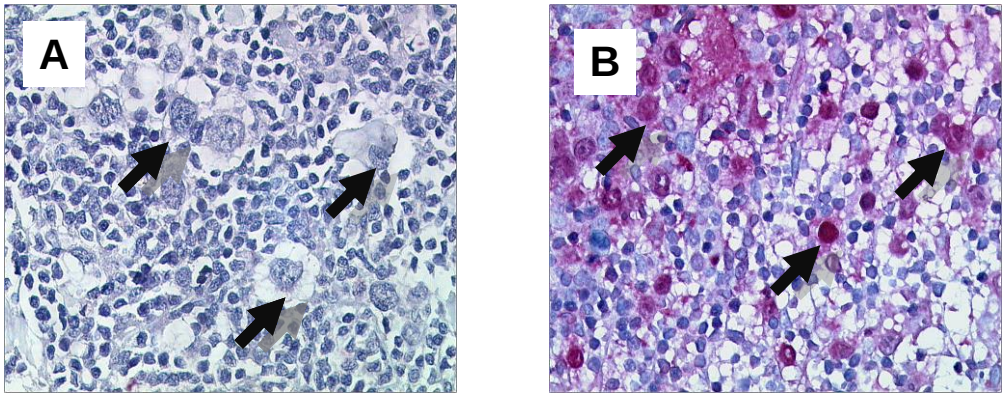


**Abbildung 3:** pSTAT6-Immunhistochemie. In Bild **A)** ist ein pSTAT6-negatives Präparat zu sehen. Die Pfeile zeigen auf ungefärbte Kerne der malignen Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen, während Bild **B)** ein pSTAT6-positives Präparat zeigt: hier zeigen die Pfeile auf deutlich angefärbte Tumorzellen.

Abbildung 3 zeigt Beispiele für einen Fall mit pSTAT6-negativen (Abb. 3A) und einen mit pSTAT6-positiven HRS-Zellen (Abb. 3B). Die mikroskopische Auswertung der pSTAT6-Färbung des Gesamtkollektives zeigte 31 (37%) pSTAT6-negative und 53 (63%) pSTAT6-positive Fälle. Das mediane Erkrankungsalter der pSTAT6-negativen Gruppe liegt bei 30, das der positiven bei 26 Jahre. Im t-Test ergab sich hierbei kein signifikanter Unterschied (*p=0,46*).

Auch die Verteilung der Patienten, die bei Erstdiagnose jünger als 45 Jahren waren, weist keinen signifikanten Zusammenhang in Bezug auf den pSTAT6-Status auf: der deutlich größere Anteil beider Fraktionen hat das 46. Lebensjahr bei Erstdiagnose noch nicht erreicht (pSTAT6-negativ = 81% vs. pSTAT6-positv n=89%).

Die Geschlechterverteilung innerhalb der nach pSTAT6-Status stratifizierten Subgruppen war gleichmäßig, so dass sich auch hier kein signifikanter Unterschied fand.

**Tabelle 3: Kontingenztabelle nach immunhistologischem pSTAT6-Status in HRS-Zellen im klassischen Hodgkin Lymphom.**

| Charakteristika | pSTAT 6 negativ (n=31) | % | pSTAT 6 positiv (n=53) | % | p-Wert |
|---|---|---|---|---|---|
| **Alter in Jahren** | | | | | |
| Median | 30 | | 26 | | 0,46 |
| Spannbreite | 7-76 | | 12-73 | | |
| < 45 Jahre | 25 | 81 | 47 | 89 | 0,35 |
| ≥ 45 | 6 | 19 | 6 | 11 | |
| **Geschlecht** | | | | | |
| Männlich | 17 | 55 | 24 | 45 | 0,5 |
| Weiblich | 14 | 45 | 29 | 55 | |
| **Histologie** | | | | | |
| NS | 16 | 52 | 41 | 77 | 0,05 |
| MC | 5 | 16 | 5 | 10 | |
| LR | 8 | 26 | 7 | 13 | |
| LD | 2 | 6 | 0 | 0 | |
| NS vs. All | 16 / 17 | | 41/12 | | 0,03 |
| **EBV-Status*** | | | | | |
| Negativ | 21 | 72 | 42 | 89 | 0,07 |
| Positiv | 8 | 28 | 5 | 11 | |
| **Lymphknotenstatus** | | | | | |
| < 3 LK-Areale | 15 | 48 | 14 | 26 | 0,06 |
| > 3 LK-Areale | 16 | 52 | 39 | 74 | |
| **Stadium** | | | | | |
| I | 2 | 7 | 2 | 4 | 0,32 |
| II | 19 | 61 | 23 | 43 | |
| III | 6 | 19 | 15 | 28 | |
| IV | 4 | 13 | 13 | 25 | |
| Lokalisiert | 21 | 68 | 25 | 47 | 0,07 |
| Disseminiert | 10 | 32 | 28 | 53 | |
| **Therapie** | | | | | |
| ABVD | 1 | 3 | 4 | 7 | 0,06 |
| ABVD+Radiatio | 16 | 52 | 12 | 23 | |
| BEACOPP | 4 | 13 | 15 | 28 | |
| BEACOPP+Radiatio | 7 | 22 | 11 | 21 | |
| Andere Therapie | 3 | 10 | 11 | 21 | |
| **Rezidiv** | | | | | |
| Ja | 6 | 19 | 9 | 17 | 0,78 |
| Ja | 25 | 81 | 44 | 83 | |

n= Anzahl; NS= nodulair sclerosis subtype; MC= mixed-cellularity subtype; LR= lymphozyte-rich subtype; LD= lymphozyte-depleted subtype; EBV= Epstein-Barr-Virus; LK= Lymphknoten; ABVD= Therapieprotokoll mit Doxorubicin (=Antrazykline), Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin; BEACOPP= Bleomycin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Oncovin (= Vincristin), Procarbazin und Prednison; vs.= versus; All= MC, LR, LD. Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012.
*Daten nicht für alle Fälle verfügbar

Histologisch betrachtet war der am häufigsten vorkommende Typus in beiden Gruppen der nodulär sklerosierende Typ, wobei sich dabei eine signifikante Korrelation zwischen dem pSTAT6-Status und den einzelnen histologischen Subtypen abzeichnete: Stellt man den dominierenden nodulär sklerosierenden Typ gegen alle anderen histologischen Subtypen, so zeichnet sich ab, dass pSTAT6-positive Hodgkin Lymphome im Vergleich zu negativen Lymphomen signifikant häufiger vom nodulär sklerosierendem Typ sind (*p=0,03*).

Bezüglich des EBV-Status konnten wir einen Trend nachweisen, der besagt, dass pSTAT6-positive Patienten seltener EBV-infiziert sind, als Patienten der pSTAT6-negativen Subgruppe (*p=0,07*). Dennoch überwiegt der Anteil an nicht-infizierten Patienten in beiden Gruppen (pSTAT6-negativ 72% vs. pSTAT6-positiv 89%). Einen signifikanten Zusammenhang zwischen Outcome und EBV-Infektion innerhalb der nach pSTAT6 stratifizierten Subgruppen konnten wir nicht darstellen: die rezidivierten bzw. progredienten Patienten sind in beiden Subgruppen überwiegend EBV-negativ getestet worden. In der pSTAT6-negativen Gruppe erlitten 2 EBV-positive Fälle ein Rezidiv bzw. einen Progress während die restlichen 6 EBV-positiven Fälle kein Fortschreiten der Krankheit verzeichnete. In der pSTAT6 positiven Gruppe waren alle 5 EBV-positiven Fälle rezidivfrei (*p= 0,48*).

In Bezug auf den Lymphknotenstatus konnten wir keinen Einfluss des pSTAT6-Status in unserer Kohorte nachweisen. Die Untersuchungen haben ergeben, dass in beiden Kollektiven, ungeachtet des pSTAT6-Status, meist drei oder mehr Lymphknotenareale befallen waren, und keine signifikante Korrelation besteht.

Nach Zuteilung der Patienten in die vier Stadien der Ann-Arbor-Klassifikation zeigte sich, dass sich die Patienten in der pSTAT6-negativen, als auch in der pSTAT6- positiven Gruppe gleichermaßen auf die einzelnen Stadien verteilten und dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Phänotypen gab. In beiden Patientenkollektiven fand sich der größte Anteil im Stadium II (pSTAT6-negativ 61% vs. pSTAT6-positiv 43%), während dem Stadium I die wenigsten Patienten zugeteilt waren (pSTAT6-negativ 6% vs. pSTAT6-positiv 4%). Unterteilt man die Ann-Arbor-Klassifikation in low-grade Stadien (lokalisiert) und high-grade Stadien (disseminiert), und betrachtet dann das Kollektiv dieser beiden Gruppierungen hinsichtlich ihrer Anfärbbarkeit auf pSTAT6, zeigt sich, dass die pSTAT6-negativen Fälle im Trend häufiger in den niedrigeren Stadien zu finden

sind als die pSTAT6-positiven (pSTAT6-negativ= 68% vs. pSTAT6-positiv= 47%; *p= 0,07*).

### 3.5 pSTAT6-Status in Bezug auf *SOCS1*-Mutationen

*SOCS1*-Muationen wurden in Punktmutationen (sog. Minor-Gruppe) und nicht-Punktmutationen, (sog. Majorgruppe) eingeteilt. Wir untersuchten die Abhängigkeit des pSTAT6-Status vom *SOCS1*-Mutationsstatus. Hypothese war, dass bei mutierten *SOCS1* Fällen ein hoher Anteil an pSTAT6-positiven HRS-Zellen zu finden sein sollte. Jedoch zeigte sich weder im Hinblick auf mutiertes versus Wildtype *SOCS1*-Gen noch im Hinblick auf die Major bzw. Minor-Gruppe ein signifikanter Zusammenhang. Die verschiedenen Mutationen verteilten sich unabhängig von der immunhistochemischen Anfärbbarkeit auf pSTAT6 innerhalb des Patientenkollektivs.

**Tabelle 4**: **pSTAT6-Status in Bezug auf Wildtype und Mutationen im *SOCS1*-Gen.**

| | **WT** (n= 33) | | **Mut** (n= 51) | | **Major** (n= 12) | | **Minor** (n= 39) | | **p WT vs Mut** | **p WT vs. Major vs. Minor** | **p WT vs. Major** | **p WT vs. Minor** | **p Major vs. Minor** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | % | n | % | n | % | n | % | | | | | |
| **pSTAT6 negativ** | 14 | 42 | 17 | 33 | 2 | 17 | 15 | 38 | 0,49 | 0,28 | 0,16 | 0,81 | 0,29 |
| **pSTAT6 positiv** | 19 | 38 | 34 | 67 | 10 | 83 | 24 | 62 | | | | | |

Der *SOCS1*-Mutationsstatus war bei allen Fällen (n= 84) unseres Kollektivs bekannt. *SOCS1*= suppressor of cytokine signalling 1; WT= wild type; Mut= mutiertes *SOCS1*-Gen; Major= Majormutation; Minor= Minormutation; n= Anzahl. Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012.

### 3.6 Die Therapiemodalitäten der pSTAT6-positiven und -negativen Untergruppen

Bei der Untersuchung der heterogenen Therapiemodalitäten fanden sich zwei wesentliche Unterschiede innerhalb der nach pSTAT6 stratifizierten Subgruppen: die Kontingenzanalyse nach den Standard-Therapieprotokollen (ABVD und BEACOPP mit/ohne Radiatio) versus den andere Therapieoptionen zeigte zwar keinen signifikanten Unterschied (*p=0,24*), die Analyse unter den Standard-

Therapieprotokollen mit und ohne Radiatio selbst war allerdings signifikant unterschiedlich in den nach pSTAT6-Status definierten Subgruppen. Genauer fand sich dabei, dass der Anteil der Patienten mit Radiatio in der pSTAT6-negativen Gruppe 82% (n=23) vs. 55% (n=23) in der pSTAT6-positiven Gruppe signifikant unterschiedlich ist (p=0,02). Das bedeutet, dass in der pSTAT6-negativen Gruppe 27% mehr Patienten bestrahlt wurden. Konsequenterweise untersuchten wir daraufhin die rezidivierten bzw. progredienten Patienten bezüglich einer Assoziation zwischen pSTAT6-Status und ihrem Bestrahlungsstatus. Hierbei konnten wir keinen signifikanten Unterschied feststellen: In der pSTAT6-negativen Subgruppe wurden alle 6 Rezidive bestrahlt, in der pSTAT6-positiven Gruppe waren es 6 von 9 Patienten (*p= 0,48*).

Generell zeigte sich trotz der heterogenen Behandlung in den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Rezidivneigung (*p=0,78*): in der pSTAT6-positiven Gruppe rezidivierten 17% der Fälle (n=9) gegenüber 19% (n=6) der pSTAT6 negativen Gruppe.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass sich die klinisch-pathologischen Parameter der pSTAT6-positiven und -negativen Subgruppen nicht in Bezug auf Alter, Geschlecht, Histologie, EBV-Status, Lymphknotenstatus und Ann-Arbor-Klassifikation unterscheiden.

### 3.7 Überlebenszeitanalyse der nach pSTAT6 stratifizierten Untergruppen

Bei Betrachtung der Kaplan-Meier-Kurven stellt sich heraus, dass im Zeitraum der ersten 3 Jahre nach Erstdiagnose hinsichtlich der Progressionsfreiheit (s. Abbildung 4) die Fälle der pSTAT6-positiven Gruppe einen aggressiveren Verlauf zeigte (pSTAT6-positiv =19% mit Rezidiv/Progress) als die Patienten aus der negativen Gruppe (pSTAT6-negativ= 12% mit Rezidiv/Progress)**.** Im Studienkollektiv war bei den Patienten aus der pSTAT6 positiven Gruppe die nach 3 Jahren progressfrei überlebten auch während eines Follow-up von 14 Jahren kein Fortschreiten der Krankheit zu verzeichnen. Bei der pSTAT6-negativen Gruppe kam es hingegen nach 8 Jahren ohne Progress immer noch zum Fortschreiten der Krankheit.

Die Überlebenszeitanalyse (siehe Abb. 5) der Studienkohorte hat ergeben, dass Patienten mit pSTAT6-positivem Status innerhalb der ersten 4 Jahre nach Erstdiagnose rascher verstarben (18% Todesfälle) als pSTAT6-negative, bei denen die ersten 4 Jahre zu über 95% überlebt wurden. Die 82% der Patienten mit positivem pSTAT6-Status, die diese ersten 4 Jahre überlebt haben, überlebten die nachfolgende Zeit bis 15 Jahren nach Erstdiagnose nahezu alle. Das Kollektiv mit pSTAT6-negativem Status verzeichnet einen günstigeren Verlauf der Überlebenskurve: 4 Jahre nach der Erstdiagnose, waren etwa 5% der Patienten in dieser Gruppe verstorben, wobei ab diesem Zeitpunkt die Sterblichkeitsrate während eines Follow-ups von weiteren 13 Jahren konstant bei 0% lag.

Zusammenfassend konnten wir folgende Assoziation von pSTAT6-Status und Outcome festellen: die Kohorte der pSTAT6-positiven Patienten neigte im Zeitraum von 14 Jahren weniger zur Progression, zeigte aber in den ersten 4 Jahren nach Erstdiagnose eine höhere Sterberate.

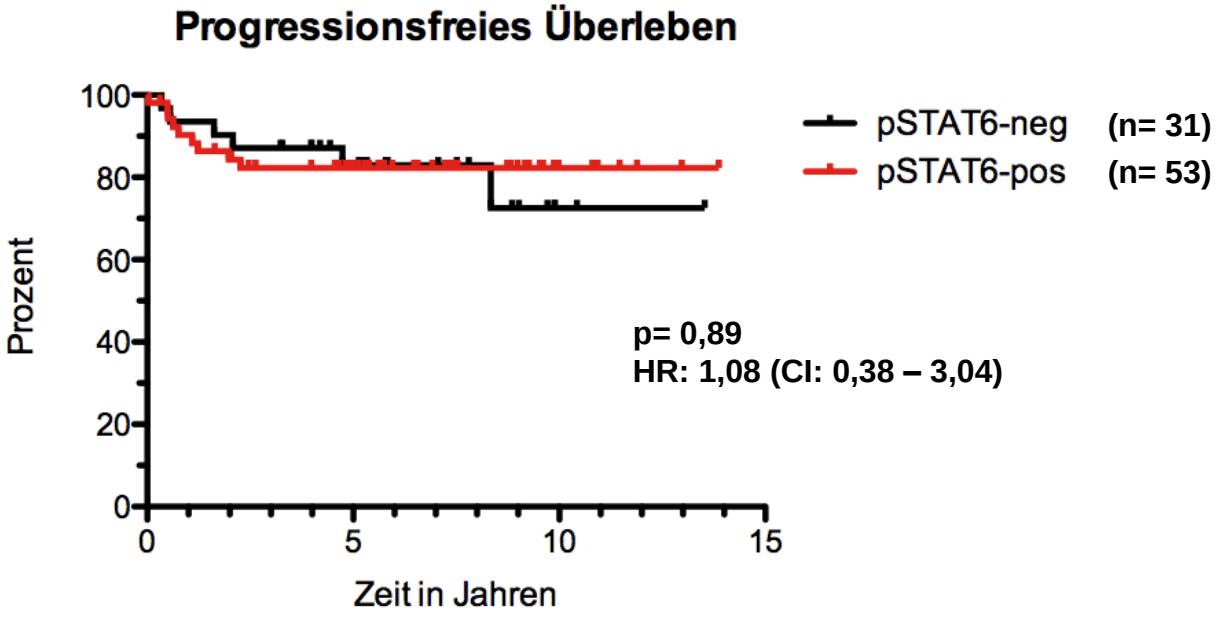


**Abbildung 4: Progressionsfreies Überleben in den nach pSTAT6 stratifizierten Subgruppen.** Progressionsfreies Überleben wurde definiert als das Zeitintervall zwischen Diagnose und Progress/Rezidiv. Das Kollektiv umfasst insgesamt 84 Patienten mit klassischem Hodgkin Lymphom. (n= Anzahl; HR= Hazard ratio; CI= Konfidenzintervall; p= Signifikanzwert; pSTAT= phosphorylated signal transducer and activator of transcription). Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012

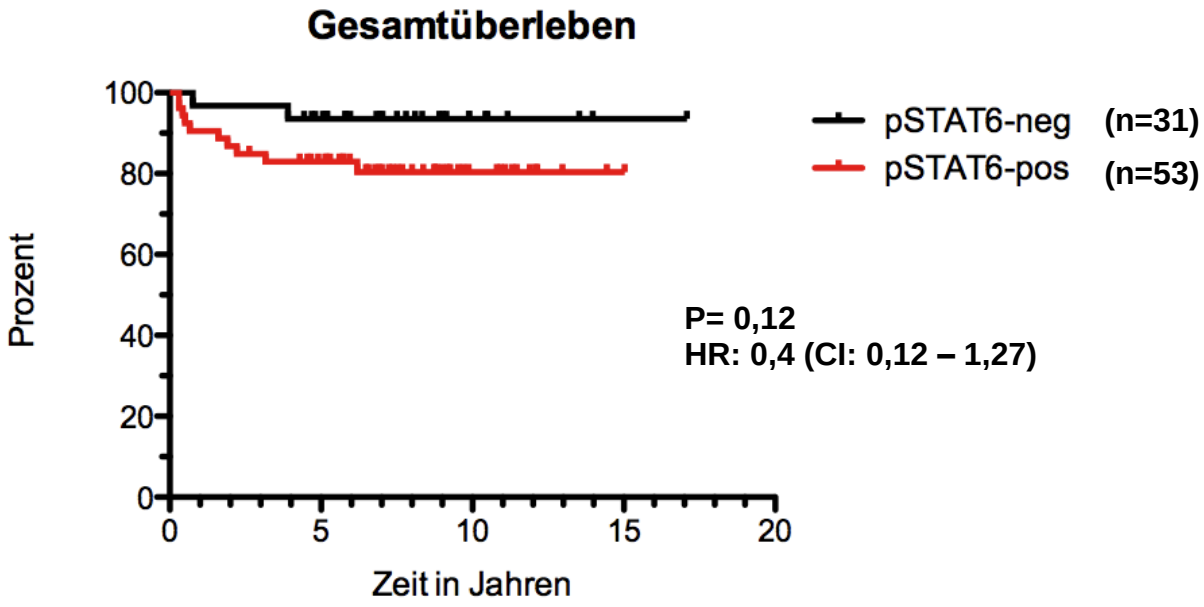


**Abbildung 5: Gesamtüberleben in den nach pSTAT6 stratifizierten Subgruppen.** Als Gesamtüberleben wurde definiert als das Zeitintervall von Diagnose bis Tod. Das Kollektiv umfasst insgesamt 84 Patienten mit klassischem Hodgkin Lymphom. (n= Anzahl; HR= Hazard ratio; CI= Konfidenzintervall; p= Signifikanzwert; pSTAT= phosphorylated signal transducer and activator of transcription). Ulmer Kollektiv, Datenerhebung von 1992 bis 2012.

# 4 Diskussion

Bei der Analyse unseres Kollektivs untersuchten wir insgesamt 84 cHL-Proben, von denen 63% pSTAT6-positiv waren. Unsere Daten zeigten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem pSTAT6-Status und ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern. Dennoch zeichnete sich ein Trend ab, nach dem pSTAT6 ein Potential als prognostischer Biomarker haben könnte.

Bis zum heutigen Zeitpunkt hat sich noch kein Biomarker in der Onkolgie etabliert, der den Krankheitsverlauf, das Ansprechen auf die Therapie und die Prognose von Patienten mit cHL von der Erstdiagnose an genau vorher sagen kann. Am ehesten durchgesetzt hat sich bisher nur der Internationale Prognose Score (IPS) (Hasenclever et al. 1998). Dabei werden sieben klinische und serologische Kriterien beachtet, für deren Erfüllung es jeweils einen Punkt gibt. Mit diesem sog. ‚score' kann man für die Hodgkin-Patienten, vor allem für die, mit fortgeschrittener Erkrankung, je nach Punktezahl eine progressionsfreie Zeit ermitteln. Dennoch gelingt es auch mit dieser Methode nicht effizient eine sichere Prognose für alle Patienten zu benennen, was die klinische Relevanz des IPS limitiert.
Die molekularen Mechanismen des cHL werden immer besser verstanden, und die Möglichkeit einer gewebebasierten Prognostik, mit deren Hilfe man Krankheitsverlauf und Therapieansprechen der Patienten besser vorhersagen kann, ist vielversprechend. Eine Vielzahl an potentiell geeigneten Biomarkern wurde bereits in Studien erforscht. So postulierten Diepstra et al., dass eine verringerte membranöse HLA Klasse II Expression auf HRS-Zellen mit einem verkürzten progressionsfreiem Überleben assoziiert ist. Den gleichen Zusammenhang ergaben die Resultate der Arbeitsgruppe Doussis-Anagnostopoulou et al., die die Expression der Topoisomersase II in HRS-Zellen untersuchten. Ferner wurde dem von Natkunam et al. entdecktem Keimzell-Marker HGAL-Protein (‚Human germinal-center-associated Lymphoma Protein') prognostische Potenz zugeschrieben. (Diepstra et al. 2007, Doussis-Anagnostopoulou et al. 2008, Natkunam et al. 2005, Sup et al. 2005). Leider konnten diese Marker von anderen Forschungsgruppen bisher nicht erfolgreich und unabhängig validiert werden.

Als radiologischer Marker wurde das FDG-PET bereits in England und Dänemark in kleinen nicht-randomisierten Studien identifiziert: dabei konnte gezeigt werden, dass vor Allem der negativ prädiktive Wert des FDG-PET bei Patienten nach 2 Zyklen Chemotherapie einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt (Hutchings et al. 2006).

STAT6 beeinflusst als Downstream-Target im JAK/STAT-Signalweg die Proliferation von eukaryoten Zellen. Die Aktivierung des Proteins wurden schon mit diversen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Guiter et al. 2004, Ritz et al. 2009, Melzner et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Min Wie hat das Protein bereits in Verbindung mit Brustkrebs genauer untersucht und festgestellt, dass eine endogene Expression von STAT6 eine entscheidende Rolle bei der Prolieferation von Zellen spielt (Wei et al. 2013). Außerdem wurden bereits in einer Exom-Sequenzierungs-Analyse in 55 primären DLBCL (diffuses großzelliges B-Zell Lymphom) Mutationen in STAT6 beschrieben (Lohr et al. 2012) was die Relevanz von STAT6 in Lymphomen unterstreicht. Skinnider et al. haben eine konstitutive Aktivierung von dem hier untersuchten STAT6 im cHL beschrieben (Skinnider et al. 2002). Unsere Ergebnisse illustrieren, dass sich die pSTAT6-positiven und -negativen Fälle unabhängig von unseren klinisch-pathologischen Kriterien - ausgenommen der histologischen Subklassifizierung - nicht unterscheiden. Diese Tatsache spricht dafür, dass pSTAT6 ein potentieller, von den genannten klinisch-pathologischen Parametern unabhängiger Biomarker ist (s. Tab. 3). Die Kontingenzanalyse bezüglich der vier Stadien der Ann-Arbor-Klassifikation und dem pSTAT6-Status ergab keine signifikanten Korrelationen. Nach dichotomer Zuteilung der Patienten in ein lokalisiertes und ein disseminiertes Stadium zeigte sich jedoch, dass die pSTAT6 positiven Patienten signifikant häufiger dem disseminierten Stadium zugeteilt wurden, wie die pSTAT6 negativen (pSTAT-negativen 33% vs. pSTAT6-positiven 53%). (*p=0,047*). Diese Verteilung könnte eine Erklärung dafür sein, dass die pSTAT6-positiven Patienten in den ersten 4 Jahren nach Erstdiagnose eine höhere Sterberate und eine stärkere Neigung zur Progression aufweisen.

Korrelationen zwischen der Histologie des cHL und dem Outcome sind in der Literatur beschrieben: bei kontroverser Diskussion liegen Daten vor, die besagen,

dass Patienten mit cHL vom nodulär sklerosierenden Typ eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit einem anderem histologischen Subtyp (MacLennan et al. 1989, von Wasielewski et al. 2003). Bei der Kontingenzanalyse unserer Kohorte bestand zwischen dem histologischen Subtyp und dem pSTAT6-Status eine signifikante Korrelation: dabei fand sich, dass pSTAT6-positive Patienten häufiger den nodulär sklerosierenden Typ haben als andere histologische Subtypen (*p= 0,03*). Bei unserer Analyse bezüglich des Gesamtüberlebens über einem Zeitraum von 15 Jahren nach Erstdiagnose schneiden die Patienten mit positivem pSTAT6–Status mit einem Anteil verstorbener Patienten von 18% schlechter ab, als die mit negativem Status, bei denen im gleichen Zeitraum nur 5% verstorben sind. Diese Zusammenhänge unterstreichen den prognostischen Wert der immunhistochemischen Färbung nach pSTAT6.

Die EBV-Infektion ist ein ursächlicher Faktor in der Pathogenese des cHL (Depil et al. 2004). So wurde zum Beispiel das viral kodierte Onkogen LMP-1 durch seine Eigenschaften schon mehrfach bei EBV-assoziierten Neoplasien identifiziert und nimmt bei der B-Zell-Transformation eine essentielle Stellung ein. LMP-1 hat zum Beispiel das Potential antiapoptotische Gene hochzuregulieren, bzw. proapoptotische Gene herunterzuregulieren (Dirmeier et al. 2005, D'Souza et al. 2000, Grimm et al. 2005). Bisherige Studien haben gezeigt, dass es eine Verknüpfung zwischen dem JAK/STAT-Signalweg und einer EBV-Infektion gibt (Hinz et al. 2002, Young et al. 2003). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass LMP-1 den JAK/STAT-Weg aktiviert, was sich durch Akkumulation der Proteine STAT3 und 5 wiederspiegelte (Dirmeier et al. 2005). Unserem Wissen nach liegen keine Daten zur speziellen STAT6-Aktivierung durch eine EBV-Infektion vor. Auch in unserem Kollektiv zeigte sich der Trend, dass EBV-positive cHL seltener pSTAT6-positiv sind (p=0,07), was Grund zu der Annahme lässt, dass sich der spezielle JAK/STAT-Signalweg, der STAT6 als Downstream-Target hat, sich einer Aktivierung durch LMP-1, also der EBV-Infektion, entziehen kann. Für das unterschiedliche Outcome unserer nach pSTAT6 stratifizierten Subgruppen ist die signifikante Korrelation zwischen EBV-Infektion und pSTAT6-Status wahrscheinlich nicht von Bedeutung, da das generelle Outcome der

Hodgkin-Patienten mit einer EBV-Infektion in der Literatur kontrovers diskutiert wird (Keegan et al. 2005) (Flavell et al. 2003) (Naresh et al. 2000).

Ein weiteres Ergebnis unserer Studie ist, dass Patienten mit negativem pSTAT6-Status den statistischen Trend aufweisen einen Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens zu haben (*p=0,12*; Abb. 5). Nur 4% der Patienten mit negativem pSTAT6-Status versterben innerhalb der ersten 15 Jahre nach Erstdiagnose, während es in der Gruppe ohne aktiviertes STAT6 18% sind. Unserem Wissen nach ist diese Studie die erste, die das phosphorylierte STAT6 Protein mit dem Outcome und der Prognose beim cHL vergleicht. Allerdings sind unsere Ergebnisse durch den retrospektiven Charakter der Studie begrenzt. Ein potentieller Confounder sind die heterogenen Therapiemodalitäten unseres Patientenkollektives. Größere, prospektive Studien werden nötig sein, um unsere Hypothesen zu bestätigen.

Die molekularen Mechanismen, weshalb die Patienten unserer Studienkohorte mit aktiviertem STAT6 bezüglich Gesamtüberleben im Nachteil und hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens im Vorteil sind, sind noch zu klären. In unserer Studie konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen dem pSTAT6-Status und den von uns ausgewählten Charakteristika mit prognostischer Potenz dargestellt werden (Alter, Geschlecht, EBV-Status, Ann-Arbor-Stadium). Da sich nach momentaner Datenlage die Tatsache bestätigt, dass STAT6 in die Onkogenese von soliden Tumoren, Leukämien und Lymphomen involviert ist (Bruns et al. 2006), überrascht es nicht, dass in unsere Studie die Patienten mit positiven pSTAT6-Status langfristig gesehen einen aggressiveren Verlauf haben wie die pSTAT6-negativen. Zu dieser Datenlage passt allerdings nicht, dass der positive pSTAT6-Status innerhalb unserer Kohorte vor einem Progress zu schützen scheint. Jedoch findet man in der Literatur auch Daten, die mit dieser Hypothese konform sind. So hat die Arbeitsgruppe um Wei am Beispiel des Mammakarzinoms gezeigt, dass eine endogene STAT6-Expression mit einer niedrigeren Proliferationsrate einhergeht und hier eine wichtige Position in der Kontrolle des Zellwachstums einnimmt (Wei et al. 2013).

Die Arbeitsgruppe um Prof. Möller (Weniger et al.) hat Mutationen im *SOCS1*-Gen, das für den Tumorsuppressor SOCS-1 codiert, im cHL untersucht. Dabei wurden in über 40% der cHL-Proben *SOCS-1*-Mutationen in den HRS-Zellen ihrer Kohorte beschrieben. Ferner wurde eine hochsignifikante Korrelation zwischen den *SOCS1*-Mutationen und einer Akkumulation von aktiviertem STAT5 in HRS-Zellen festgestellt. Diese Zusammenhänge haben uns dazu veranlasst, auch unser Kollektiv auf *SOCS1*-Mutationen mit dem pSTAT6-Status zu vergleichen. Dabei konnten wir die hochsignifikante Korrelation zwischen SOCS1 und pSTAT5 nicht bestätigen: beim Vergleich der beiden Phänotypen pSTAT6-negativ und -positiv fanden sich weder zwischen *SOCS1*-Muationen generell, noch zwischen den einzelnen Mutationsformen Minor- und Majormutation signifikante Korrelationen. Dies bedeutet, dass die beschriebene *SOCS1*-Mutation keinen Einfluss auf den JAK/STAT-Signalweg ausübt, der pSTAT6 als Downstream-Target hat.

Die Auswertung der Überlebenszeiten nach Kaplan-Meier müssen jedoch kritisch betrachtet werden: zwar haben wir dargestellt, dass es hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit einen Vorteil für pSTAT6-negative und bezüglich des progressionsfreien Überlebens einen Vorteil für pSTAT6 positive Patienten gibt, dennoch wäre es interessant gewesen, die Überlebenszeiten nicht nur nach pSTAT6-Status zu stratifizieren sondern auch nach den einzelnen Therapieregimen aufzuschlüsseln. Hierbei könnte eine unabhängige oder idealerweise prospektive Studie Abhilfe schaffen, bei der nach pSTAT6 stratifizierte Kohorten bezüglich Therapie und Outcome miteinander verglichen werden.

Neueste Studien haben gezeigt, dass STAT-Moleküle ein durchaus effizientes Ziel therapeutischer Strategien bei malignen Erkrankungen sein können (Sansone et al. 2012, Derenzini et al. 2013). So wurde am Beispiel des klassischen Hodgkin Lymphoms beschrieben, dass mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin die Aktivierung von STAT3-Molekülen verhindert wurde mit der Folge, dass die Lymphome besser auf eine medikamentös eingeleitete Apoptose reagiert haben (Holtick et al. 2005). Unter Berücksichtigung dieser Daten und dem von uns bemerktem Trend zu schlechterem Outcome pSTAT6-positiver cHL-Patienten,

könnte eine medikamentöse Blockade der STAT6-Moleküle ein interessanter Ansatz für die Erforschung weiterer Therapiestrategien sein.

Zusammengefasst konnten wir eine robuste pSTAT6-Färbung etablieren. Diese zeigte pSTAT6 in HRS-Zellen in 63% der untersuchten Tumorproben. Der pSTAT6-Status ist in unserem Kollektiv mit proportionalen Unterschieden assoziiert, die zwar keine Signifikanz zeigten aber dennoch ein prognostisches Potential aufweisen. Dazu werden weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig sein.

# 5 Zusammenfassung

Beim klassischen Hodgkin Lymphom (cHL) ist einer der wichtigsten Pathomechanismen das von Zytokinen vermittelte Zusammenspiel zwischen den malignen Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen und den reaktiven Zellen welche diese umgeben. Dabei kommt dem JAK/STAT (Janus Kinase / signal transducer and activator of transcription)-Signalweg mit der Aktivierung durch Phosphorylierung der STAT-Transkriptionsfaktoren (signal transducer and activator of transcription) eine besondere Bedeutung zu. In dieser Studie untersuchten wir die prognostische Bedeutung von pSTAT6 (phosphoryliertem STAT6) im klassischen Hodgkin Lymphom.

An insgesamt 84 immunhistochemisch gefärbten Tumorproben von cHL-Patienten identifizierten wir 53 (63%) Fälle mit phosphoryliertem STAT6. Beim Vergleich der histologischen Subtypen waren pSTAT6-positive Patienten signifikant häufiger vom nodulär sklerosierenden Typ (*p=0,05*). Bei der Kontingenzanalyse fanden sich keine weiteren signifikanten Assoziationen zwischen dem pSTAT6-Status und ausgewählten klinischpathologischen Parametern. Auch in Bezug auf den *SOCS1* (Suppressor of cytokine signaling-1)-Mutationsstatus gab es keine Assoziation zum pSTAT6-Status. Beim progressionsfreiem Überleben zeichnete sich ein Vorteil für die pSTAT6-positven Patienten ab: zwar neigte diese Subgruppe tendenziell früher zum Progress, zeigte aber 3 Jahre nach Erstdiagnose mit einer Progressrate von 0% einen langfristig stabileren Krankheitsverlauf (*p=0,89*). Hinsichtlich des Gesamtüberlebens waren dagegen die Patienten ohne aktiviertes STAT6 tendenziell im Vorteil: über einen Zeitraum von 15 Jahren verstarben hier nur 4% der Patienten, während im Kollektiv der pSTAT6-positiven Patienten den gleichen Zeitraum 18% nicht überlebten (*p= 0,12*).

In der hier untersuchten Kohorte fand sich pSTAT6 in 63% der cHL-Proben, zeigte aber keine signifikante Assoziation in Bezug auf das progressionsfreie Überleben oder das Gesamtüberleben. Um das Potential von pSTAT6 als Biomarker im cHL zu erarbeiten, werden weitere Untersuchungen notwendig sein, zu denen die hier etablierte robuste gewebebasierte Nachweismethode einen Beitrag leistet.

# 6 Literaturverzeichnis


1. Brice P: Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. Br.J.Haematol., 141: 3-13 (2008)

2. Bruns H A, Kaplan M H: The role of constitutively active Stat6 in leukemia and lymphoma. Crit.Rev.Oncol.Hematol., 57: 245-253 (2006)

3. Depil S, Morales O, Auriault C: Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Ann.Biol.Clin.(Paris), 62: 639-648 (2004)

4. Derenzini E, Younes A: Targeting the JAK-STAT pathway in lymphoma: a focus on pacritinib. Expert Opin.Investig.Drugs, 22: 775-785 (2013)

5. Diepstra A, van Imhoff G W, Karim-Kos H E, van den Berg A, te Meerman G J, Niens M, Nolte I M, Bastiaannet E, Schaapveld M, Vellenga E, Poppema S: HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. J.Clin.Oncol., 25: 3101-3108 (2007)

6. Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, Schultheiss U, Briseno C, Gires O, Kieser A, Eick D, Sugden B, Hammerschmidt W: Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. Oncogene, 24: 1711-1717 (2005)

7. Doussis-Anagnostopoulou I A, Vassilakopoulos T P, Thymara I, Korkolopoulou P, Angelopoulou M K, Siakantaris M P, Kokoris S I, Dimitriadou E M, Kalpadakis C, Matzouranis M, Kaklamanis L, Panayiotidis P, Kyrtsonis M C, Androulaki A, Patsouris E, Kittas C, Pangalis G A: Topoisomerase IIalpha expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. Clin.Cancer Res., 14: 1759-1766 (2008)

8. D'Souza B, Rowe M, Walls D: The bfl-1 gene is transcriptionally upregulated by the Epstein-Barr virus LMP1, and its expression promotes the survival of a Burkitt's lymphoma cell line. J.Virol., 74: 6652-6658 (2000)

9. Flavell K J, Billingham L J, Biddulph J P, Gray L, Flavell J R, Constandinou C M, Young L S, Murray P G: The effect of Epstein-Barr virus status on outcome in age- and sex-defined subgroups of patients with advanced Hodgkin's disease. Ann.Oncol., 14: 282-290 (2003)

10. Grimm T, Schneider S, Naschberger E, Huber J, Guenzi E, Kieser A, Reitmeir P, Schulz T F, Morris C A, Sturzl M: EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. Blood, 105: 3263-3269 (2005)

11. Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland M L, Le Gouvello S, Gaulard P, Leroy K, Castellano F: Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood, 104: 543-549 (2004)

12. Hansmann M L, Willenbrock K: Pathology of Hodgkin's lymphoma. Verh.Dtsch.Ges.Pathol., 87: 53-57 (2003)

13. Hasenclever D, Diehl V: A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N.Engl.J.Med., 339: 1506-1514 (1998)

14. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C: Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. J.Exp.Med., 196: 605-617 (2002)

15. Holtick U, Vockerodt M, Pinkert D, Schoof N, Sturzenhofecker B, Kussebi N, Lauber K, Wesselborg S, Loffler D, Horn F, Trumper L, Kube D: STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrphostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. Leukemia, 19: 936-944 (2005)

16. Hutchings M, Loft A, Hansen M, Pedersen L M, Buhl T, Jurlander J, Buus S, Keiding S, D'Amore F, Boesen A M, Berthelsen A K, Specht L: FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. Blood, 107: 52-59 (2006)

17. Joos S, Kupper M, Ohl S, von Bonin F, Mechtersheimer G, Bentz M, Marynen P, Moller P, Pfreundschuh M, Trumper L, Lichter P: Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. Cancer Res., 60: 549-552 (2000)

18. Kanzler H, Kuppers R, Hansmann M L, Rajewsky K: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. J.Exp.Med., 184: 1495-1505 (1996)

19. Keegan T H, Glaser S L, Clarke C A, Gulley M L, Craig F E, Digiuseppe J A, Dorfman R F, Mann R B, Ambinder R F: Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. J.Clin.Oncol., 23: 7604-7613 (2005)

20. Krebs D L, Hilton D J: SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. Stem Cells, 19: 378-387 (2001)

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

22. Küppers R: The biology of Hodgkin's lymphoma. Nat.Rev.Cancer., 9: 15-27 (2009)

23. Küppers R, Engert A, Hansmann M L: Hodgkin lymphoma. J.Clin.Invest., 122: 3439-3447 (2012)

24. Lohr J G, Stojanov P, Lawrence M S, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann Y W, Slager S L, Novak A J, Dogan A, Ansell S M, Link B K, Zou L, Gould J, Saksena G, Stransky N, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez J C, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Hernandez-Lemus E, Schwarz-Cruz y Celis A, Imaz-Rosshandler I, Ojesina A I, Jung J, Pedamallu C S, Lander E S, Habermann T M, Cerhan J R, Shipp M A, Getz G, Golub T R: Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 109: 3879-3884 (2012)

25. MacLennan K A, Bennett M H, Tu A, Hudson B V, Easterling M J, Hudson G V, Jelliffe A M: Relationship of histopathologic features to survival and relapse in nodular sclerosing Hodgkin's disease. A study of 1659 patients. Cancer, 64: 1686-1693 (1989)

26. Melzner I, Bucur A J, Bruderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth T F, Leithauser F, Möller P: Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. Blood, 105: 2535-2542 (2005)

27. Melzner I, Weniger M A, Menz C K, Moller P: Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. Leukemia, 20: 157-158 (2006)

28. Naresh K N, Johnson J, Srinivas V, Soman C S, Saikia T, Advani S H, Badwe R A, Dinshaw K A, Muckaden M, Magrath I, Bhatia K: Epstein-Barr virus association in classical Hodgkin's disease provides survival advantage to patients and correlates with higher expression of proliferation markers in Reed-Sternberg cells. Ann.Oncol., 11: 91-96 (2000)

29. Natkunam Y, Lossos I S, Taidi B, Zhao S, Lu X, Ding F, Hammer A S, Marafioti T, Byrne G E,Jr, Levy S, Warnke R A, Levy R: Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation. Blood, 105: 3979-3986 (2005)

30. Proia D A, Foley K P, Korbut T, Sang J, Smith D, Bates R C, Liu Y, Rosenberg A F, Zhou D, Koya K, Barsoum J, Blackman R K: Multifaceted intervention by the Hsp90 inhibitor ganetespib (STA-9090) in cancer cells with activated JAK/STAT signaling. PLoS One, 6: e18552 (2011)

31. Ritz O, Guiter C, Castellano F, Dorsch K, Melzner J, Jais J P, Dubois G, Gaulard P, Möller P, Leroy K: Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. Blood, 114: 1236-1242 (2009)

32. Sansone P, Bromberg J: Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. J.Clin.Oncol., 30: 1005-1014 (2012)

33. Skinnider B F, Elia A J, Gascoyne R D, Patterson B, Trumper L, Kapp U, Mak T W: Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood, 99: 618-626 (2002)

34. Sup S J, Alemany C A, Pohlman B, Elson P, Malhi S, Thakkar S, Steinle R, Hsi E D: Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. J.Clin.Oncol., 23: 3773-3779 (2005)

35. Tam C S, Herschtal A, Seymour J F: ABVD versus BEACOPP for Hodgkin's lymphoma. N.Engl.J.Med., 365: 1544-1546 (2011)

36. Tiacci E, Doring C, Brune V, van Noesel C J, Klapper W, Mechtersheimer G, Falini B, Kuppers R, Hansmann M L: Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. Blood, 120: 4609-4620 (2012)

37. Viviani S, Zinzani P L, Rambaldi A, Brusamolino E, Levis A, Bonfante V, Vitolo U, Pulsoni A, Liberati A M, Specchia G, Valagussa P, Rossi A, Zaja F, Pogliani E M, Pregno P, Gotti M, Gallamini A, Rota Scalabrini D, Bonadonna G, Gianni A M, Michelangelo Foundation, Gruppo Italiano di Terapie Innovative nei Linfomi, Intergruppo Italiano Linfomi: ABVD versus BEACOPP for Hodgkin's lymphoma when high-dose salvage is planned. N.Engl.J.Med., 365: 203-212 (2011)

38. von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, Hubner K, Hansmann M L, Diehl V, Georgii A, von Wasielewski R: Nodular sclerosing Hodgkin disease: new grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. Blood, 101: 4063-4069 (2003)

39. Wei M, Liu B, Gu Q, Su L, Yu Y, Zhu Z: Stat6 cooperates with Sp1 in controlling breast cancer cell proliferation by modulating the expression of p21(Cip1/WAF1) and p27 (Kip1). Cell.Oncol., 36: 79-93 (2013)

40. Weniger M, Melzner I, Menz C, Wegener S, Bucur A, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth T, Möller P: Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. Oncogene, 25: 2679-2684 (2006)

41. Xu C, Plattel W, van den Berg A, Ruther N, Huang X, Wang M, de Jong D, Vos H, van Imhoff G, Viardot A, Möller P, Poppema S, Diepstra A, Visser L: Expression of the c-Met oncogene by tumor cells predicts a favorable outcome in classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica, 97: 572-578 (2012)

42. Young L S, Murray P G: Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene, 22: 5108-5121 (2003)

## Lebenslauf

| **Persönliche Daten** | |
|---|---|
| Name, Vorname | Konyen, Steffen |
| Geburtsdatum und -ort | 08.01.1982 in Ulm |

| **Ärztliche Tätigkeit** | |
|---|---|
| Seit 05/2013 | Weiterbildung zum Facharzt Anästhesie Klinikum Stuttgart, Bad Cannstatt |
| **Studium** | |
| 10/2006 – 11/2012 | Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm, 2. Staatsexamen (2,0) |
| **Forschung** | |
| Seit 11/2012 | Dissertation, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Ulm, Prof. Dr. Peter Möller |
| **Praktisches Jahr** | |
| 08/2011 – 12/2011 | Urologie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm |
| 12/2011 – 02/2012 | Unfallchirurgie,Bundeswehrkrankenhaus |
| 02/2012 – 04/2012 | Allgemeinchirurgie, College of Medicine and Pharmacy Hue, Vietnam |
| 04/2012 – 07/2012 | Innere Medizin, Spital Davos, Schweiz |
| **Zivildienst/Arbeit** | |
| 08/2001 – 05/2002 | Zivildienst als Rettungshelfer im Rettungsdienst des DRK Heidenheim |
| 06/2002 | Ausbildung zum Rettungsssanitäter |
| 07/2006 – 07/2006 | Hauptamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter im Rettungsdienst des DRK Heidenheim |
| **Schulische Ausbildung** | |
| 1988 – 1992 | Grundschule Steinheim a. A. |
| 1992 – 2001 | Schillergymnasium Heidenheim. Abschluss: Abitur |