

# U-HO1

## Eine neue Zelllinie, abstammend von einem primär therapierefraktären klassischen Hodgkin-Lymphom

Stabile, permanente Zelllinien sind Modellsysteme für Krankheiten, die deren vielfältige funktionelle Analyse *in vitro* erlauben und in Xenograft-Modellen auch quasi-klinische Daten liefern können.

Obwohl das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) keine seltene Erkrankung ist, ist es doch offenbar schwer, stabile Tumorzelllinien zu generieren. Weltweit gibt es derzeit weniger als 10 gut charakterisierte HL-Zelllinien. Wir berichten über die Etablierung einer neuen cHL-Zelllinie, U-HO1, aus einem primär therapierefraktären cHL und liefern erste, diese Tumorzelllinie charakterisierende Daten.

### Kasuistik und Methoden

Bei dem zu diesem Zeitpunkt 20-jährigen A. Mader wurde 2002 ein cHL vom nodulär-sklerosierenden Typ diagnostiziert. Es bestanden ein mediastinaler Bulk und ein Ann-Arbor-Stadium IIB. Er erhielt Standard-Radiochemotherapie, relaborte aber 15 Monate später, erhielt darauf ein Salvage-Protokoll mit anschließender Hochdosis-therapie und autologer Stammzelltransplantation und rezidierte kurze Zeit später. Im April 2005, erneut, bekam er noch eine palliative Antikörper-/Chemotherapie und entwickelte maligne Pleuraergüsse. Aus einem solchen zur Zytodiagnostik eingesandten Erguss wuchs eine Zelllinie. Der Patient gab im Finalstadium seiner Erkrankung sein Einverständnis zur wissenschaftlichen Nutzung dieser Zelllinie, die dann U-HO1 bezeichnet wurde (Details s. [1]).

In der Folge wurde der Immunphänotyp mit dem der Hodgkin-Zellen im primär diagnostischen Gewebe verglichen. Es wurden eine klassische Zytogenetik, Multicolour-FISH, klassische komparative genomische Hybridisierung (CGH) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit

Gensonden durchgeführt. Außerdem wurde der Epstein-Barr-Virus- (EBV-)Status mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bestimmt und eine Analyse des *IgH*-Rearrangements vorgenommen.

### Ergebnisse

Unter den von uns in der oben genannten Arbeit festgelegten Zellkulturbedingungen wächst U-HO1 mit einer Verdopplungszeit von etwa 4 Tagen und bringt überwiegend mononukleäre Zellen hervor, dabei nur wenige mehrkernige Riesenzellen mit der Morphologie von Sternberg-Reed-Zellen. U-HO1 ist CD30<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup> und CD74<sup>+</sup>, hat keine Immunglobuline und ist HLA-A<sup>-</sup>, B<sup>-</sup>, C<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup> und CD20<sup>-</sup>, was einem cHL-Phänotyp entspricht. Die *IgH*-Sequenzierung ergab eine Immunglobulin-Schwerketteng-Genumlagerung unter Einbeziehung des *VH1-46*-Genelements. Die Mutationsrate betrug 17,3%, was für cHL typisch ist [2, 3]. EBV-DNA konnte nicht nachgewiesen werden. Die Karyotypisierung von U-HO1 basierend auf der ISCN 2005-Nomenklatur [4] ergab einen hyperdiploiden Karyotyp mit multiplen klonalen Aberrationen: 50,XY,del(1)(p13.2p31.1),der(2)t(2;10)(q35;q16.1)add(2)(p11.2).rev isenh(2)(p13p23),t(4;6)(p12;p11.1),t(5;22)(q35.1;q13.2),+der(6)t(4;6)(p12;p11.1)del(6)(q22.3q26),der(10)t(2;10)(q35;q26.1),+t(12;18)(p11.2;q11.2),del(15)(q11.2q15),+der(18)t(12;18)(p11.1;q11.2),+del(20)(q13.1),ins(21;15)(p11.2;q11.2q15),der(22)t(5;22)(q35.1;q13.2).ish t(9;19)(p24;?) [43]/50,sl,del(8)(q24.1)[6]/50,sl,del(7)(q36.3)[2]/50,sl,del(7)(q11.23)[2].

Dieses zytogenetische Profil blieb über diverse Passagen stabil. Nur Chromo-

som 16 variiert in der Größe und/oder weist Translokationen mit anderen Chromosomen auf, wobei jedes Mal die Banden 16q11 oder 16q12 involviert waren. Die In-situ-Hybridisierung CGH ergab einen unspektakulären Grad von Alterationen: Abgesehen von Veränderungen in telomerischen und zentromerischen Regionen waren nur 1p13–p31 und 4q31.3–qter unter- und 2p13–p23, 6pter–q22, die gesamten Chromosomen 12 und 18 und 20pter–q13.1 überrepräsentiert. Die FISH-Analyse ergab eine etwa 6fache Amplifikation von *REL* und *BCL-11A*.

### Gebrauch von U-HO1 als Werkzeug

Transfektionsexperimente zeigten, dass U-HO1 leicht transfizierbar ist, wenn man das Transfektionsgerät Nucleofector-1 (Amaxa, Köln) einsetzt. Zum Beispiel benutzen wir zu diesem Zweck die Plasmide pcDNA4TOzeo (Invitrogen) und psiRNA-hH1GFPzeo (Invivogen, SanDiego, USA). Kurz gesagt wurden 10<sup>6</sup> Zellen und 5 µg DNA in frisch angesetzter Nucleofectorlösung gemischt (Nucleofector Kit V) und mit dem Program X-01 behandelt. Bei beiden Plasmiden war die Mortalitätsrate kleiner 10%. Die Transfektionseffizienz lag dagegen bei 67%, wie es die FACS-Analyse von „green fluorescent protein“ (GFP) bestätigte. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 10 µg/ml Zeozin im Medium als Selektionsagens bis zu 4 Wochen auf die Expression des betreffenden Plasmids selektioniert.

### Diskussion

Mit U-HO1 haben wir eine neue stabile cHL-Zelllinie, die in allen bislang geprüften Aspekten cHL-typisch ist. Sie hat einen weniger komplexen Karyotyp als die

P. Möller · A. Mader · T.F.E. Barth · S. Brüderlein

### U-HO1. Eine neue Zelllinie, abstammend von einem primär therapierefraktären klassischen Hodgkin-Lymphom

#### Zusammenfassung

Die Hodgkin-Zelllinie U-HO1 wurde isoliert aus dem malignen Pleuraerguss eines 23-jährigen männlichen Patienten, der am Endstadium eines therapierefraktären klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) vom nodulär-sklerosierenden Typ litt. Seit ihrer Etablierung im Jahr 2005 weist die Zelllinie *in vitro* stabile Charakteristika auf. Unter standardisierten Zellkulturbedingungen beträgt die Verdopplungszeit etwa 4 Tage. In Suspension bildet U-HO1 typische Sternberg-Reed-Zellen, ist EBV- wie HLA-ABC-negativ und HLA-D- wie CD74-positiv. Auf der Oberfläche wird CD15 zusammen mit CD30 exprimiert, CD19 und CD20 fehlen. Die Karyotypisierung zeigte einen hyperdiploiden Karyotyp mit multiplen klonalen Aberrationen. Am auffälligsten ist ein verlängertes Chromo-

som 2, der(2)t(2;10)(q35;q16.1)add(2)(p13). Die CGH-Analyse ergab Imbalancen: ish cgh dim(1)(p13p31)(p12q21), enh(2)(p13p23), dim(4)(q31.3qter), enh(6)(q22q27), enh(12), enh(18), enh(20)(q13.1pter). Die FISH-Analyse zeigte eine 6-fache Amplifikation von *REL* und *BCL-11A*, d. h., U-HO1 ist in jeder bisher untersuchten Hinsicht prototypisch für das cHL. Zytogenetisch hat sich U-HO1 im Vergleich mit anderen HL-Zelllinien als wesentlich stabiler erwiesen, sodass wahrscheinlich ist, dass sich der ausgeprägte Phänotyp eines primär therapierefraktären cHL allein aufgrund der U-HO1-Imbalancen entwickelt.

#### Schlüsselwörter

Klassisches Hodgkin-Lymphom · Tumorzelllinien · Mutationsrate · CGH · FISH

### U-HO1. A new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma

#### Abstract

The Hodgkin cell line U-HO1 was established from a malignant pleural effusion of a 23-year-old male patient during the end stage of refractory nodular sclerosing classical Hodgkin lymphoma (cHL). Since its establishment in 2005, U-HO1 has maintained stable characteristics *in vitro* and has a doubling time of about 4 days under standard culture conditions. U-HO1 forms typical Reed/Sternberg cells in suspension, is EBV negative, lacks HLA-ABC- but expresses HLA-D- proteins/CD74 and surface exposes CD15 together with CD30 in the absence of CD19 and CD20. Karyotype analysis of U-HO1 revealed a hyperdiploid karyotype with multiple clonal aberrations. Most significant is an elongated chromosome 2, der(2)t(2;10)(q35;q16.1)add

(2)(p13). CGH analysis revealed the following imbalances: ish cgh dim(1)(p13p31)(p12q21), enh(2)(p13p23), dim(4)(q31.3qter), enh(6)(q22q27), enh(12), enh(18), enh(20)(q13.1pter). FISH analysis showed about six-fold amplification of *REL* and *BCL-11A*, thus, U-HO1 is prototypical for cHL in every aspect tested so far. Compared to other HL cell lines, U-HO1 proved far less genetically aberrant suggesting that U-HO1's imbalances suffice to cause the full-blown phenotype of primary refractory cHL.

#### Keywords

Classical Hodgkin-lymphoma · Tumor cell lines · Mutation rate · CGH · FISH

anderen etablierten Linien wie HDLM-2, KM-H2, L 428, L 540, L 1236 und SUP-HD1 [5, 6]. Dennoch entstammt diese Linie einem vor dem Hintergrund der modernen, sehr effektiven Hodgkin-Therapie primär therapierefraktären cHL, sodass die funktionelle Ausstattung von U-HO1 dem voll entwickelten hochmalignen Phänotyp entspricht. Das heißt, das primäre Therapieversagen hat wohl weniger zu tun mit den Aberrationen der anderen Hodgkin-Zelllinien, die U-HO1 nicht hat, als mit irgendeiner gemeinsamen Eigenschaft aller bislang existierenden Linien, von denen keine aus einer Primärläsion sondern alle aus Tumormaterial oder Ergussflüssigkeit aus dem Terminalstadium generiert wurden (V. Diehl, pers. Mitteilung).

Die Originalpublikation [1] ist vom Verlag freigegeben worden, online verfügbar und kann über eine Stichwortsuche „U-HO1“ und „Andreas Mader“ gefunden und heruntergeladen werden. Die U-HO1 Zelllinie steht allen Wissenschaftlern zur nichtkommerziellen Forschung frei zur Verfügung und kann über das Ressourcenzentrum Braunschweig (H.G. Drexler) mit der einzigen Auflage bezogen werden: Die oben angeführte Originalarbeit muss bei jeder aus U-HO1 resultierenden Publikation zitiert werden. Das sind wir Andreas Mader schuldig.

#### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. P. Möller

Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Ulm, Albert-Einstein-Allee 11, 89081 Ulm  
peter.moeller@uniklinik-ulm.de

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

#### Literatur

1. Mader A, Brüderlein S, Wegener S et al. (2007) U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res* 119: 204–210
2. Tamaru J, Hummel M, Zemlin M et al. (1994) Hodgkin's disease with a B-cell phenotype often shows a VDJ rearrangement and somatic mutations in the VH genes. *Blood* 84: 708–715
3. Küppers R (2003) Somatic hypermutation and B cell receptor selection in normal and transformed human B cells *Ann NY Acad Sci* 987: 173–179
4. ISCN (2005) An international system for human cytogenetic nomenclature. Shaffer LG, Tommerup NS (eds), Karger, Basel
5. Drexler HG (2005) Guide to leukemia-lymphoma cell lines, DMSZ Braunschweig, 2005 eBook on CD
6. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y, MacLEod RA (2003) False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 17: 416–426