

**Molekulare Mechanismen
in der Pathogenese
des klassischen Hodgkin-Lymphoms**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Markus Schneider
aus Essen

September 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Shirley Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie des HLs.....	1
1.2 Klassifizierung des HLs	2
1.3 Zelluläre Herkunft der HRS- und LP-Zellen	3
1.3.1 Frühe B-Zell-Entwicklung	4
1.3.2 Die Keimzentrumsreaktion	5
1.3.3 Abstammung und Klonalität der HRS-Zellen	7
1.3.4 Abstammung und Klonalität der LP-Zellen	8
1.4 Verlust des B-Zell-Phänotyps der HRS-Zellen.....	9
1.5 Genetische Läsionen in HRS-Zellen.....	11
1.6 Deregulierte Signalwege in HRS-Zellen	14
1.7 Interaktionen der HRS-Zellen mit dem Mikromilieu.....	15
1.8 Epstein-Barr-Virus in der cHL-Pathogenese.....	16
1.9 Therapie des cHLs	17
1.10 MYC.....	18
1.11 CEBPB.....	21
1.12 Zielsetzung.....	22
2 Material & Methoden	24
2.1 Zellkultur	24
2.1.1 Kultivierung von Zellen	24
2.1.2 Zellzahlbestimmung	25
2.1.3 Sortierung von Zellen mittels FACS.....	25
2.1.4 Retrovirale Arbeitstechniken.....	25
2.1.4.1 Produktion von Viruspartikeln.....	25
2.1.4.2 Virustitration	26
2.1.4.3 Infektion mit Viruspartikeln	26
2.1.4.4 Sortierung von infizierten Zellen mittels FACS	27
2.1.4.5 Durchflusszytometrische Analyse des Wachstumsverhaltens infizierter Zellen	27
2.1.4.6 Annexin V-Färbung	27
2.1.4.7 Proliferationsassay.....	28

2.2	Arbeiten mit Primärgewebe	29
2.2.1	Primäre Lymphknotenbiopsate.....	29
2.2.2	Färbung von Gewebeschnitten.....	29
2.2.3	Lasermikrodissektion zur Isolierung von Zellen aus Gewebeschnitten	30
2.3	RNA-Arbeitstechniken	31
2.3.1	RNA-Isolierung.....	31
2.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	31
2.3.3	cDNA-Synthese.....	32
2.4	DNA-Arbeitstechniken	32
2.4.1	Isolierung genomischer DNA.....	32
2.4.2	Klonierungsarbeiten	32
2.4.2.1	Oligonukleotid-Hybridisierung.....	33
2.4.2.2	DNA-Phosphorylierung.....	34
2.4.2.3	Dephosphorylierung von DNA	34
2.4.2.4	Restriktionsverdau	34
2.4.2.5	Ligation	34
2.4.2.6	Hitzeschock-Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen.....	35
2.4.2.7	Plasmid-Präparation.....	35
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.4.3.1	Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA	36
2.4.3.2	PCR zur Validierung gefundener Mutationen in der Exom-Sequenzierung	37
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.4.5	Gelextraktion von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten	42
2.4.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	42
2.4.7	Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden.....	42
2.4.8	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	43
2.4.9	Quantitative Echtzeit-PCR.....	43
2.4.10	Gesamtgenomamplifizierung.....	45
2.4.11	Exom-Sequenzierung.....	46
2.5	Protein-Arbeitstechniken	47
2.5.1	Proteinisolation.....	47
2.5.2	Bestimmung der Protein-Konzentration.....	48
2.5.3	SDS-Page	48
2.5.4	Western Blot	48

3	Ergebnisse.....	51
3.1	Etablierung eines lentiviralen Systems zur shRNA-vermittelten Herabregulation von Genen in cHL-Zelllinien.....	51
3.2	Die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHL	58
3.2.1	Validierung der erhöhten Ausprägung von MYC in cHL-Zelllinien	59
3.2.2	Erfolgreiche Herabregulation von MYC durch die lentiviral-vermittelte Ausprägung von shRNAs	62
3.2.3	Verringerte Proliferation von Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 mit MYC-Herabregulation.....	67
3.2.4	Auswirkung der MYC-Herabregulation auf das Überleben der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1	70
3.2.5	Auswirkung der MYC-Herabregulation auf die Proliferation der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1	74
3.2.6	Auswirkung der MYC-Herabregulation auf die Ausprägung von MYC-Zielgenen, die zum Phänotyp der HRS-Zellen beitragen.....	77
3.3	Die Rolle von CEBPB in der Pathogenese des cHLs.....	82
3.3.1	Validierung der erhöhten Ausprägung von CEBPB in den cHL-Zelllinien.....	83
3.3.2	Erfolgreiche Herabregulation von CEBPB in den cHL-Zelllinien	85
3.3.3	Auswirkung der Herabregulation von CEBPB in den cHL-Zelllinien auf bekannte CEBPB-Zielgene.....	93
3.3.4	Einfluss der CEBPB-Herabregulation auf die Proliferation und das Überleben der cHL-Zelllinien	97
3.3.5	Auswirkung der CEBPB-Herabregulation auf die Expression von B-Zellgenen in den cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1	98
3.4	Arbeiten zur umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen in HRS-Zellen des cHLs	102
3.4.1	Mikrodissektion und WGAs von HRS- und NT-Zellen primärer cHL-Fälle.....	102
3.4.2	Exom-Sequenzierung der WGA-Produkte von HRS- und NT-Zellen primärer Fälle des cHLs	105
3.4.3	Analyse der genetischen Läsionen der HRS-Zellen der einzelnen cHL-Fälle	108
3.4.4	Analyse rekurrent somatisch mutierter Gene in den HRS-Zellen der cHL-Fälle..	111
4	Diskussion.....	115
4.1	Etablierung eines lentiviralen Systems zur shRNA-vermittelten Herabregulation von Genen in cHL-Zelllinien.....	115
4.2	Die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHLs.....	116

4.3	Die Rolle von CEBPB in der Pathogenese des cHLs.....	123
4.4	Arbeiten zur umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen in HRS-Zellen des cHLs	129
5	Zusammenfassung.....	137
6	Literaturverzeichnis	139
7	Anhang.....	153
7.1	Publikationen.....	153
7.1.1	Originalpublikationen.....	153
7.1.2	Buchkapitel und Leserbriefe	153
7.2	Danksagung	154
7.3	Lebenslauf	155
7.4	Eidesstattliche Erklärungen	157

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ASCT	Autologe Stammzell-Transplantation
BCR	B-Zell-Rezeptor
bHLHZip	Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
C-Region	Konstante Region der Ig-Ketten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
et al.	et altera (lat. und andere)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FDC	Follikuläre dendritische Zellen
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierungen
GC	Keimzentrum
GEP	Genexpressionsprofil
GES	Genexpressionsstudie
HIV	Humanen Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase
HRS-Zellen	Hodgkin und Reed-Sternberg-Zellen
ICD	Internationale statische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IFRT	Involved field radiotherapy
Ig	Immunglobulin
IGV	Integrative Genomics Viewer
L&H-Zellen	Lymphozytische und/oder histiozytische Zellen
LDHL	Lymphozytenarmes Hodgkin-Lymphom
LPHL	Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
LP-Zellen	Lymphozytenprädominante Zellen
LRHL	Lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom
LTR	Long terminal repeat
MCHL	Gemischtzelliges Hodgkin-Lymphom
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MOI	Multiplicity of infection
NSHL	Nodulär-sklerosierendes Hodgkin-Lymphom
NT-Zellen	Nicht-Tumor-Zellen
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
RSS	Rekombinationssignalsequenzen
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SDS-Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
SHM	Somatischen Hypermutation

SIV	Simian Immunodefizienz Virus
SNPs	Einzelnukleotid-Polymorphismen
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween 20
TNF	Tumornekrosefaktor
VAF	Allelfrequenz der Variante
V-Region	Variable Region der Ig-Ketten
VSV	Vesikular Stomatits Virus
WGA	Gesamtgenomamplifizierung
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Umprogrammierung der HRS-Zellen (Küppers, 2009)	11
Abbildung 2: <i>CEBPB</i> -Ausprägung in sortierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428 nach Infektion mit pGIPZ-Viren.....	54
Abbildung 3: <i>CEBPB</i> -Ausprägung in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 an Tag 4 nach der Infektion mit pGIPZ-Viren	54
Abbildung 4: <i>MYC</i> -Ausprägung in mit pGIPZ-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428, L-1236 und SUP-HD1, sowie der Zelllinie 293T nach Infektion mit pGIPZ-Viren	55
Abbildung 5: Sortierungsstrategie infizierter Zellen am Beispiel der Infektion der cHL-Zelllinie L-428 mit einem LeGO.G-Vektor	57
Abbildung 6: „ <i>Heat Map</i> “ der <i>MYC</i> -Expression von cHL-Zelllinien, HRS-Zellen primärer cHL-Fälle, LP-Zellen primärer NLPHL-Fälle und normalen B-Zellpopulationen (Daten entnommen aus (Tiacci <i>et al.</i> , 2012))	59
Abbildung 7: <i>MYC</i> -Ausprägung in cHL-Zelllinien	60
Abbildung 8: <i>MYC</i> -Ausprägung in cHL-Zelllinien	61
Abbildung 9: <i>MYC</i> -Ausprägung in der cHL-Zelllinie L-428 im Vergleich zu den Burkitt-Lymphom- Zelllinien Raji und DAUDI	62
Abbildung 10: <i>MYC</i> -Ausprägung in sortierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428, und U-HO1 an Tag 3 und 6 nach den Infektionen mit LeGO.G-Viren	64
Abbildung 11: <i>MYC</i> -Ausprägung in der cHL-Zelllinie L-428 an Tag 3 nach Infektion mit LeGO.G-Viren	65
Abbildung 12: <i>MYC</i> -Ausprägung in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 an Tag 3 und 6 nach den Infektionen.....	66
Abbildung 13: <i>MYC</i> -Ausprägung in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie KM-H2 an Tag 3 und Tag 6 nach der Infektion	67
Abbildung 14: Schlechteres kompetitives Wachstum von Zellen, die shRNAs gegen <i>MYC</i> ausprägen, im Vergleich zu nicht infizierten Zellen in den cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 ..	69
Abbildung 15: Verminderte Proliferation von Zellen mit <i>MYC</i> -Herabregulation der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1	70
Abbildung 16: Verringeretes Überleben der Zellen der cHL-Zelllinie L-428 mit <i>MYC</i> -Herabregulation.....	72
Abbildung 17: Verbessertes Überleben der Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 mit <i>MYC</i> -Herabregulation.....	73
Abbildung 18: Leicht verminderte Proliferation in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 durch <i>MYC</i> -Herabregulation.....	76
Abbildung 19: Deutlich verminderte Proliferation in Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 durch <i>MYC</i> -Herabregulation.....	77

Abbildung 20: Ausprägung von MYC-Zielgenen nach MYC-Herabregulation in Zellen der cHL-Zelllinie L-428	79
Abbildung 21: Ausprägung von MYC-Zielgenen nach MYC-Herabregulation in Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1	81
Abbildung 22: „Heat Map“ der CEBPB-Expression von cHL-Zelllinien, HRS-Zellen primärer cHL-Fällen, LP-Zellen primärer NLPHL-Fällen und normalen B-Zellpopulationen (Daten entnommen aus (Tiacchi <i>et al.</i> , 2012))	82
Abbildung 23: CEBPB-Ausprägung in cHL-Zelllinien	83
Abbildung 24: CEBPB-Ausprägung in cHL-Zelllinien	85
Abbildung 25: CEBPB-Ausprägung in den cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 nach Infektion mit LeGO.G-Viren.....	87
Abbildung 26: CEBPB-Ausprägung in den cHL-Zelllinien SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2 nach Infektion mit LeGO.G-Viren.....	88
Abbildung 27: CEBPB-Ausprägung in der cHL-Zelllinie L-1236 an Tag 3 nach der 1. Infektion mit LeGO.G-Viren	89
Abbildung 28: Ausprägung der CEBPB-Isoformen in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie L-1236	90
Abbildung 29: Ausprägung der CEBPB-Isoformen in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428	91
Abbildung 30: Ausprägung der CEBPB-Isoformen in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2	92
Abbildung 31: Ausprägung von CEBPB-Zielgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 nach Herabregulation von CEBPB	94
Abbildung 32: Ausprägung von CEBPB-Zielgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 nach Herabregulation von CEBPB	95
Abbildung 33: Ausprägung von CEBPB-Zielgenen in Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1 nach Herabregulation von CEBPB	96
Abbildung 34: Der Einfluss von CEBPB in den cHL-Zelllinien auf das kompetitive Wachstumsverhalten von infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen.....	98
Abbildung 35: Ausprägung von B-Zellgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 nach Herabregulation von CEBPB	99
Abbildung 36: Ausprägung von B-Zellgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 nach Herabregulation von CEBPB	100
Abbildung 37: Ausprägung von B-Zellgenen in Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1 nach Herabregulation von CEBPB	101
Abbildung 38: Ergebnis der Multiplex-PCR zur Überprüfung der WGA des 1. Falles.....	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien und Wachstumsbedingungen	24
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper zur immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten.....	30
Tabelle 3: Für die Klonierung verwendete Plasmide	33
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung shRNA-kodierender pViG- und LeGO.G-Vektoren	33
Tabelle 5: Verwendete Bakterienstocks mit pGIPZ.Plasmiden von GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)	36
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide in der Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA	
Tabelle 7: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA	37
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur Validierung ausgewählter Mutationen der Fälle 2921, 3049 und 3306	39
Tabelle 9: Reaktionsansätze der 1. Runde der „ <i>semi-nested</i> “-Multiplex-PCR zur Validierung ausgewählter Mutationen der Fälle 2921, 3049 und 3306	41
Tabelle 10: Reaktionsansätze der 2. Runde der „ <i>semi-nested</i> “-Multiplex-PCR zur Validierung ausgewählter Mutationen des Falls 2921, 3049 und 3306	41
Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung der Plasmide	43
Tabelle 12: Verwendete TaqMan [®] -Assays.....	45
Tabelle 13: Verwendete Primer in <i>SYBR Green</i> -qPCR.....	45
Tabelle 14: Verwendete Antikörper im Western Blot.....	50
Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Fälle und Erfolg der WGAs.....	105
Tabelle 16: Sequenzierstatistiken der zusammenanalysierten WGA-Einheiten der HRS- und NT-Zellen von jedem untersuchten cHL-Fall.....	107
Tabelle 17: Anzahl der genetischen Läsionen der HRS-Zellen der einzelnen Fälle	109
Tabelle 18: Ergebnisse der Validierungen ausgewählter in der Exom-Sequenzierung identifizierter somatischer Mutationen in den HRS-Zellen der cHL-Fälle 1, 2 und 3.....	112
Tabelle 19: Mutationsanalyse der in HRS-Zellen bekannten rekurrent somatisch mutierten Gene mit Daten der Exom-Sequenzierung der HRS-Zellen primärer cHL-Fälle.....	113
Tabelle 20: Anzahl rekurrent somatisch mutierter Gene in den HRS-Zellen primärer cHL-Fälle.....	114

1 Einleitung

Das Hodgkin-Lymphom (HL) ist eines der häufigsten Formen maligner Lymphome in der westlichen Welt. Die Erkrankung wurde erstmals im Jahre 1832 vom englischen Arzt Thomas Hodgkin in seinem Werk mit dem Titel „*On some Morbid Appearances of the Adsorbent Glands and Spleen*“ beschrieben (Hodgkin, 1832). Im Jahre 1856 verwendete Samuel Wilks zum ersten Mal den Begriff „*Hodgkin Disease*“ bei der Beschreibung weiterer Fälle mit ähnlichem Krankheitsbild und prägte damit bis heute den Namen für diese Art der malignen Lymphome (Geller, 1984). Allerdings wurde nach der Identifizierung des lymphoidalen Ursprungs der Erkrankung diese von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in HL unbenannt und wird in der aktuellen Ausgabe der „Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ (ICD) ICD-10, Version 2015 im Kapitel „Bösartige Neubildungen des lymphatischen, blutbildenden und verwandten Gewebes, als primär festgestellt oder vermutet“ aufgelistet (Graubner, 2014). Symptomatisch tritt beim HL eine ausgeprägte schmerzlose Lymphknotenschwellung auf. In 40% der Fälle haben die Patienten zusätzlich unspezifische Merkmale wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber, die sogenannten B-Symptome. Die pathognomonischen Tumorzellen des HLs, die mononukleären Hodgkin- und multinukleären Reed-Sternberg-Zellen, wurden erstmalig im Jahr 1898 von Carl Sternberg und 1902 von Dorothy Reed beschrieben (Sternberg, 1898; Reed, 1902). Beide Zelltypen und ihre entsprechenden Zellkerne sind außergewöhnlich groß, wodurch gerade bei den Reed-Sternberg-Zellen auch der Begriff der Riesenzelle verwendet wird. Eine besondere Form der Hodgkin- und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen sind die lymphozytenprädominanten (LP)-Zellen, die im Jahr 1966 von Lukes und Butler erstmals als lymphozytische und/oder histiozytische (L&H) Zellen beschrieben wurden (Lukes & Butler, 1966). Die LP-Zellen sind generell kleiner als HRS-Zellen und zeigen lobulierte und gefaltete Kerne mit kleinen Nukleolen. Aufgrund ihres Aussehens werden LP-Zellen auch als Popcorn-Zellen bezeichnet (Mason *et al.*, 1994). Eine Besonderheit des HLs ist, dass das Tumorgewebe nur zu ca. 1% aus den HRS-Zellen bzw. LP-Zellen besteht. Zum größeren Teil besteht das Tumorgewebe aus einem gemischten zellulären Infiltrat, welches T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile und Mastzellen beinhaltet (Pileri *et al.*, 2002). Hervorgerufen wird dieses zelluläre Infiltrat vermutlich durch eine deregulierte Immunreaktion und der Interaktion der HRS- oder LP-Zellen mit diesen Leukozyten mittels verschiedener Chemokine und Zytokinen. Es wird angenommen, dass das so entstehende Mikromilieu eine wichtige Rolle in der Entwicklung des HLs hat (Küppers, 2012).

1.1 Epidemiologie des HLs

Die weltweite Inzidenz des HLs betrug im Jahre 2012 bei Männern 1,1 Erkrankungen und bei Frauen 0,7 Erkrankungen pro 100000 Personen (Ferlay J, 2013). Die regionale Inzidenz

schwankt und zeigt große Unterschiede zwischen Industriestaaten und Entwicklungsländern. So war die Inzidenz in den Industriestaaten mit 2,3 und 1,9 Erkrankungen pro 100000 Personen für Männer und Frauen wesentlich größer als in den Entwicklungsländern, in denen die Inzidenzen für Männer und Frauen 0,8 und 0,5 Erkrankungen pro 100000 Personen betrug (Ferlay J, 2013). Die Altersverteilung der Erkrankten bei Primärdiagnose ist bimodal. Ein erstes Häufigkeitsmaximum liegt bei einem Alter von 25 – 29 Jahren und ein zweites Maximum tritt ab einem Alter von 60 Jahren auf (Engert, 2015). Viele weitere Faktoren scheinen einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zu haben, wie z.B. das Geschlecht, da generell mehr Männer als Frauen betroffen sind. Weitere Faktoren sind der soziale Lebensstandard, mit mehr Erkrankungen in höheren Sozialschichten, und der ethnologische Hintergrund, mit mehr Erkrankungen von Weißen gegenüber Schwarzen und Lateinamerikanern (Engert, 2015). Bestimmte Viruserkrankungen können auch das Risiko ein HL zu bekommen erhöhen. Personen, die sich statt in ihrer Kindheit im frühen oder spätem erwachsenem Alter mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infizieren und daraufhin in manchen Fällen eine infektiöse Mononukleose entwickeln, weisen ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko auf ein HL zu entwickeln (Rosdahl *et al.*, 1974; Munoz *et al.*, 1978). Auch genetische Faktoren können das Erkrankungsrisiko erheblich erhöhen. So weisen eineiige Zwillinge ein deutlich größeres Risiko auf gemeinsam zu erkranken als zweieiige Zwillinge (Mack *et al.*, 1995). Zusätzlich weisen manche Familien aufgrund diverser Mechanismen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines HLs auf. Zum Beispiel zeigte eine Studie an 44 Familien mit erhöhtem Risiko, dass die rezessive Vererbung von Merkmalen auf den Chromosomen 4p, 2, 4q, 7, 11 und 17 mit der Entwicklung eines HLs assoziiert ist (Goldin *et al.*, 2005). Viele weitere genetische Faktoren, wie z.B. Polymorphismen in bestimmten Genen, scheinen mit dem Erkrankungsrisiko für HL assoziiert zu sein und auch das HLA-System scheint das Erkrankungsrisiko für HL zu beeinflussen (Engert, 2015).

1.2 Klassifizierung des HLs

In der aktuellen WHO-Klassifizierung wird das HL in fünf verschiedene Typen unterteilt, basierend auf klaren Unterschieden in der Histologie des Tumorgewebes und dem immunhistochemischen Merkmalen der Tumorzellen (Graubner, 2014):

- Noduläres lymphozytenprädominantes HL (LPHL)
Das LPHL macht ungefähr 5% der HL-Fälle aus. Charakteristisch ist das Auftreten von LP-Zellen, die eine ausgeprägte Rosettierung mit follikulären T-Zellen, die CD57 und PD-1 ausprägen, zeigen. Das zelluläre Infiltrat besteht größten Teils aus B-Zellen (Engert, 2015).

- Nodulär-sklerosierendes (klassisches) HL (NSHL)
 Typisch für das NSHL sind knotige Infiltrate, die von Kollagenarben/-fasern getrennt werden. Das Mikromilieu besteht aus kleinen Lymphozyten und anderen Nicht-Tumor (NT)-Zellen wie z.B. Histozyten und Eosinophilen. Als Besonderheit können sogenannte Lakunarzellen mit großem, gelappten Kernen auftreten, die eine besondere Variante der HRS-Zellen darstellen. Es ist die häufigste Form des HLs und macht 60-75% der HL-Fälle aus, wobei vor allem junge Frauen betroffen sind (Engert, 2015).
- Gemischtzelliges (klassisches) HL (MCHL)
 Das MCHL tritt in 15-20% der HL-Fälle auf und betrifft vor allem ältere und häufiger männliche Patienten. Die HRS-Zellen haben eine klassische Morphologie und sind umgeben von einem gemischten zellulären Infiltrat aus verschiedenen Immunzellen, wie z.B. kleine Lymphozyten, Eosinophile, Neutrophile, Plasmazellen und Histozyten. Charakteristisch ist das Fehlen von Strukturen, die für andere Formen des HLs typisch sind, wie z.B. Kollagenfasern. Die HRS-Zellen sind besonders häufig mit EBV infiziert (Engert, 2015).
- Lymphozytenarmes (klassisches) HL (LDHL)
 Das LDHL ist die seltenste Form des HLs und tritt nur in ca. 1% der Fälle auf. Es zeichnet sich durch eine relativ hohe Anzahl an HRS-Zellen im Tumorgewebe aus. Ein weiteres Merkmal ist die Abwesenheit von kleinen Lymphozyten unter den NT-Zellen (Engert, 2015).
- Lymphozytenreiches (klassisches) HL (LRHL)
 Ca. 5% der HL-Fälle sind ein LRHL. Diese Form des HLs zeigt eine Prävalenz von B-Zellen im histologischen Bild, die nodulär oder seltener diffus verteilt sind. Die HRS-Zellen ähneln morphologisch den LP-Zellen des LPHL, weisen aber immunhistochemisch die typischen Merkmale von HRS-Zellen auf (Engert, 2015).

Aufgrund von morphologischen, klinischen und molekularen Merkmalen werden das NSHL, MCHL, LDHL und das LRHL zusammengefasst und als klassisches HL (cHL) bezeichnet. Somit wird das LPHL vom cHL abgegrenzt. Zum Beispiel prägen die LP-Zellen, die Tumorzellen des LPHL, auf ihrer Oberfläche CD20 und einen B-Zell-Rezeptor (BCR) aus, wohingegen die HRS-Zellen, die Tumorzellen des cHLs, im Allgemeinen für beide Faktoren negativ sind. Die HRS-Zellen zeichnen sich dagegen durch die Expression von CD30 und in vielen Fällen von CD15 aus (Engert, 2015).

1.3 Zelluläre Herkunft der HRS- und LP-Zellen

Durch den Nachweis von umgelagerten und somatisch mutierten Immunglobulin (Ig) V-Genen wurde der Ursprung der HRS- und LP-Zellen von Keimzentren (GC)-erfahrenen

B-Zellen eindeutig gezeigt (Küppers *et al.*, 1994; Kanzler *et al.*, 1996b; Bräuninger *et al.*, 1997; Marafioti *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1997; Marafioti *et al.*, 2000; Bräuninger *et al.*, 2003).

1.3.1 Frühe B-Zell-Entwicklung

Die B-Zellen entwickeln sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Ihre Entwicklung ist gekennzeichnet durch einen schrittweisen Umlagerungsprozess der Ig-Gene, der in der Bildung eines funktionellen und individuellen BCR endet. Der BCR besteht aus den beiden Signalmolekülen CD79a und CD79b und einem Antikörper, der aus zwei identischen schweren Ig-Ketten und zwei identischen leichten Ig-Ketten, die kovalent mit einander verbunden sind, gebildet wird. Die schweren und leichten Ig-Ketten bestehen wiederum aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Region. Die C-Region bestimmt den Isotyp und damit auch die Effektorfunktion des Antikörpers und wird von dem C μ -, dem C δ -, dem C ϵ -, einem der zwei C α - oder einem der vier C γ -Gene kodiert (Murphy, 2008). Abhängig vom Entwicklungsstadium der B-Zelle werden unterschiedliche Isotypen auf ihrer Oberfläche ausgeprägt. Die V-Regionen des Antikörpers bestimmen die Spezifität des Antikörpers und bestehen in der schweren Kette aus je einem V-, D-, und J-Segment. Die V-Region der leichten Kette ist dagegen nur aus je einem V- und J-Segment aufgebaut. Im Menschen gibt es 40 V-, 27 D- und 6 J-Segmente der schweren Kette, die funktional sind (Corbett *et al.*, 1997; Murphy, 2008). Für die leichte Kette gibt es zwei unterschiedliche Loci, entweder Kappa (κ) oder Lambda (λ) leichten Ketten, die 40 V κ - und 5 J κ - bzw. 30 V λ - und 4 J λ -Gensegmente enthalten (Murphy, 2008). Die Genumlagerung erfolgt sequenziell, indem zunächst auf der schweren Kette ein zufälliges D- und ein zufälliges J-Segment verknüpft werden. Danach erfolgt die Rekombination des DJ-Segmentes an ein zufällig ausgewähltes V-Segment (Blackwell & Alt, 1984; Rajewsky, 1996). Nach Überprüfung der Funktionalität dieser VDJ-Rekombination durch den Versuch der Ausprägung eines prä-BCRs mittels der Verwendung einer Ersatz-Leichtkette, die aus den Proteinen VpreB und $\lambda 5$ besteht, und den Signalmolekülen CD79a und CD79b, wird bei einer unproduktiven VDJ-Rekombination die V- zu DJ-Segmentumlagerung auf dem zweiten Allel der schweren Ketten eingeleitet. Bei einer produktiven Umlagerung wird mit der Rekombination der leichten Kette fortgefahren (Melchers *et al.*, 1995; Meffre *et al.*, 2000). Dabei erfolgt zunächst die Rekombination auf dem Ig κ -Locus und wenn beide Allele unproduktiv sind wird der λ -Locus verwendet (Rajewsky, 1996). Die Umlagerung der Gensegmente wird durch die Enzyme RAG-1 und RAG-2 eingeleitet, die flankierende Rekombinationssignalsequenzen (RSS) der Gensegmente erkennen und einen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Doppelstrangbruch zwischen den beiden zu verknüpfenden Gensegmenten einfügen (McBlane *et al.*, 1995). Bei der anschließenden Reparatur dieses Doppelstranges und der Verknüpfung der beiden Gensegmente mit Hilfe verschiedener Proteine kommt es an den Verknüpfungsstellen durch Exonukleaseaktivität zum Verlust einzelner Basen und zum Einbau von nicht Keimbahn-

kodierten N-Nukleotiden durch das Enzym Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT). Zusätzlich können bei der Auflösung von Haarnadelstrukturen der DNA, die während der Reparatur entstehen, palindromische Sequenzen, sogenannte P-Nukleotide, auftreten (Tonegawa, 1983; Murphy, 2008). Durch die zufällige Rekombination der Gensegmente, dem Verlust von Nukleotiden und den Einfügen der N- und P- Nukleotide erhält jede B-Zelle einen einzigartigen BCR, der als klonaler Marker von B-Zellen verwendet werden kann. Schafft es die B-Zelle hingegen nicht einen produktiven BCR zu generieren, stirbt sie durch Apoptose (Rajewsky, 1996). Zusätzlich wird der BCR auf Autoreaktivität überprüft und ggf. eine erneute Umlagerung der leichten Kette, die sogenannte Rezeptor-Editierung, durchgeführt, um einen nicht-autoreaktiven BCR herzustellen (Retter & Nemazee, 1998; Casellas *et al.*, 2001). Ist dies nicht erfolgreich, wird die B-Zelle durch Anergie reaktionsunfähig gemacht oder sie wird durch Apoptose eliminiert (Goodnow *et al.*, 1988; Rajewsky, 1996). B-Zellen die einen produktiven BCR generiert haben und die Selektionsprozesse erfolgreich überstehen, verlassen das Knochenmark und zirkulieren als naive B-Zellen zwischen Blut und den sekundären lymphatischen Organen (Rajewsky, 1996).

1.3.2 Die Keimzentrumsreaktion

Ein weiterer wichtiger Prozess in der Entwicklung der B-Zelle ist die GC-Reaktion, in der die Affinität des BCRs zum Antigen erhöht wird. Wenn eine B-Zelle ein entsprechendes Antigen mit seinem BCR bindet, wandert sie in das nächste sekundäre lymphatische Organ, wie z.B. einen Lymphknoten oder die Milz. Erhält sie dort an der Grenze der T-Zell-reichen Zone durch die Interaktion mit antigenspezifischen T-Helferzellen und antigenpräsentierenden Zellen weitere Co-stimulierende Signale beginnt die aktivierte B-Zelle stark zu proliferieren und bildet das sogenannte GC aus (De Silva & Klein, 2015). Im GC lassen sich histologisch und funktionell zwei Strukturen unterscheiden, die helle Zone und die dunkle Zone (De Silva & Klein, 2015). In der dunklen Zone finden sich vor allem stark proliferierende, dichtgedrängte B-Zellen, die sogenannten Zentroblasten. Die Zentroblasten sind umgeben von einem verbundenen Netzwerk CXCL12-positiver retikulärer Zellen, die eine hohe Ähnlichkeit zu folliculären dendritischen Zellen (FDC) der hellen Zone haben (De Silva & Klein, 2015). Die helle Zone besteht aus einem Gemisch aus B-Zellen, den sogenannten Zentrozyten, T-Helferzellen, FDCs und Makrophagen. Neben der Lokalisierung innerhalb des GCs unterscheiden sich Zentroblasten und Zentrozyten auch in der Expression von Oberflächenmarkern. Zentroblasten werden durch die starke Ausprägung von CXCR4 und der schwächeren Expression von CD83 und CD86 charakterisiert, wohingegen Zentrozyten ein gegenteiliges Expressionsmuster aufweisen, also CXCR4 schwach ausprägen und stark-positiv für CD83 und CD86 sind (Victoria *et al.*, 2010; Victoria & Nussenzweig, 2012). Parallel zur starken Expansion der Zentrozyten, die sich alle sechs bis 12 Stunden teilen, findet der

Prozess der Somatischen Hypermutation (SHM) in diesen Zellen statt (Victoria & Nussenzweig, 2012). Die SHM wird durch das Enzym AID vermittelt (Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000) und fügt Punktmutationen und seltener Deletionen sowie Insertion in den variablen Regionen der umgelagerten Ig-Genen der schweren und leichten Kette ein (Goossens *et al.*, 1998). Dabei liegt die Mutationsrate bei ca. 10^{-3} bis 10^{-4} pro Basenpaar und Zellteilung (Kocks & Rajewsky, 1989). Der Prozess der SHM ist aber nicht auf die Ig-Gene beschränkt, sondern kann mit geringer Frequenz auch andere stark transkribierte Gene betreffen, wie z.B. *BCL6* (Pasqualucci *et al.*, 1998). Durch die normale SHM entstehen Varianten des BCRs mit unterschiedlichen Affinitäten zum Antigen. Allerdings werden auch unproduktive BCRs durch Generierung von vorzeitigen Stopcodons oder Verschiebungen des Leserasters erzeugt. B-Zellen, die solche unproduktiven BCRs tragen, sterben durch Apoptose (De Silva & Klein, 2015). Die übrigen B-Zellen werden in der hellen Zone auf eine verbesserte Affinität ihres BCRs zum Antigen hin selektioniert, indem sie um Überlebenssignale von T-Helferzellen und FDCs konkurrieren. B-Zellen, deren BCRs eine geringe Affinität besitzen, sterben durch Apoptose. Zusätzlich werden die BCRs auch auf Autoreaktivität überprüft und die Zellen ggf. eliminiert. Ein Teil der positiv selektionierten B-Zellen zirkuliert zurück in die dunkle Zone und durchläuft eine weitere Runde von Proliferation mit SHM und Diversifizierung des BCRs und anschließender Affinitätsselektion des BCRs in der hellen Zone (De Silva & Klein, 2015). Diese sich wiederholende Abfolge der Proliferation, SHM und Selektion führt zur Entwicklung von B-Zellen mit hochaffinen BCRs zum entsprechenden Antigen (Rajewsky, 1996). Der andere Teil der in der hellen Zone positiv selektionierten B-Zellen differenziert zu Gedächtnis-B-Zellen oder Antikörpersezernierenden Plasmazellen, die das GC verlassen (Rajewsky, 1996).

Im Verlauf der GC-Reaktion führen einige Zentrozyten in der hellen Zone des GCs auch den sogenannten Klassenwechsel durch. Dabei wird der Isotyp und damit auch die Effektorfunktion des ausgeprägten BCRs geändert (Manis *et al.*, 2002). Vermittelt wird der Klassenwechsel durch das Enzym AID, welches in Kombination mit anderen Faktoren DNA-Doppelstrangbrüche in den sogenannten „Switch“-Regionen, die jeweils 5' vor den verschiedenen C-Regionen der schweren Kette des Ig-Gens liegen, einfügt (Muramatsu *et al.*, 2000; Revy *et al.*, 2000). Durch die nicht homologe Verknüpfung der beiden beteiligten „Switch“-Regionen und der Deletion des dazwischenliegenden DNA-Fragmentes wird eine neue C-Region irreversibel hinter dem 3'-Ende der rekombinierten VDJ-Gensegmenten der schweren Kette angefügt. Dadurch wird die C-Region der schweren Kette des ausgeprägten BCRs von IgM zu IgA, IgG oder IgE geändert. Im Allgemeinen findet der Klassenwechsel im GC statt, er kann aber in seltenen Fällen auch T-Zell-unabhängig außerhalb des GCs erfolgen.

Jeder Schritt der Keimzentrumsreaktion, wie z.B. die Formierung, die Aufrechterhaltung und das Verlassen des GCs, wird durch eine Kombination verschiedenster Faktoren reguliert. So

sind die Transkriptionsfaktoren BCL6, MYC und IRF4 essentiell bei der Formierung des GCs und ein Verlust dieser Gene verhindert die Bildung dieser Strukturen (Basso & Dalla-Favera, 2015). BCL6 und MYC, nicht aber IRF4, sind auch Beispiele für essentielle Faktoren der Aufrechterhaltung der Keimzentrumsreaktion (Basso & Dalla-Favera, 2015). MYC in Kombination mit REL ist z.B. für die Initiierung der Rezirkulation von positiv selektionierten Zentrozyten in die dunkle Zone zu einer neuen Runde von Proliferation mit SHM und anschließender Affinitätsselektion verantwortlich. Das Verlassen des GCs wird durch eine erneute Hochregulierung von IRF4 und einer daraus resultierenden globalen Änderung des Genausprägungsmusters, wie z.B. der Herabregulierung des GC-Phänotyp-bestimmenden Faktors BCL6, bewirkt (Victoria & Nussenzweig, 2012; Basso & Dalla-Favera, 2015). IRF4 ist auch essentiell an der Initiierung des Klassenwechsels beteiligt (De Silva & Klein, 2015). Die starke Proliferation der Zentrozyten und die im GC absichtlich stattfindende Generierung von genotoxischen DNA-Schäden durch die Prozesse der SHM und des Klassenwechsels begünstigen die Entstehung von B-Zell-Lymphomen. So stammen verschiedene Lymphome von unterschiedlichen Zellen des GCs oder von GC-erfahrenden Zellen, wie Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen, ab (Küppers *et al.*, 1999; Basso & Dalla-Favera, 2015).

1.3.3 Abstammung und Klonalität der HRS-Zellen

Die HRS-Zellen des cHLs zeichnen sich im immunhistologischen Bild durch die Ausprägung verschiedenster Marker unterschiedlicher hämatopoetischer Zellarten aus, wobei viele dieser Marker nur von einem Teil der Fälle und/oder innerhalb eines Falles nur von einem Teil der HRS-Zellen ausgeprägt wird. So können HRS-Zellen unter anderem Marker von T-Zellen, wie CD3, NOTCH1 und GATA3, zytotoxischen T-Zellen, wie Granzym B und Perforin, B-Zellen, wie PAX5 und CD20, dendritischen Zellen, wie FSCN1, CCL17, Natürlichen Killerzellen, wie ID2, myeloiden Zellen, wie CSFR1, und Granulozyten, wie CD15, ausprägen (Küppers *et al.*, 2012). Die HRS-Zellen sind immer positiv für den Aktivierungsmarker CD30. Dieser ungewöhnliche Phänotyp der HRS-Zellen und die Seltenheit der HRS-Zellen im Tumorgewebe, wodurch sie mit Standardmethoden wie Southern Blot oder PCR aus Ganzschnittgewebe nicht analysierbar waren, erschwerten die Identifikation des zellulären Ursprungs der HRS-Zellen. Durch den Nachweis klonaler somatisch-mutierter umgelagerter IgV-Gene in einzelnen mikrodisssektierten HRS-Zellen konnte die Abstammung von GC- oder Post-GC-B-Zellen und die klonale Verwandtschaft der HRS-Zellen innerhalb eines Falles gezeigt werden (Küppers *et al.*, 1994; Kanzler *et al.*, 1996b; Irsch *et al.*, 1998; Vockerodt *et al.*, 1998; Bräuninger *et al.*, 1999; Marafioti *et al.*, 2000; Bräuninger *et al.*, 2003). In diesen Studien wurden in 25% der cHL-Fälle inaktivierende Mutationen, wie z.B. „Nonsense“-Mutationen, Insertionen und Deletion mit Verschiebung des Leserasters, in den IgV-Genen der HRS-Zellen gefunden. Diese sogenannten verkrüppelnden Mutationen treten im GC auf und führen normalerweise zur Apoptose der Zellen. In diesen Fällen scheinen die

HRS-Zellen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abzustammen, die durch vor oder während der GC-Reaktion auftretende transformierende Ereignisse gerettet werden. Es ist denkbar, dass alle HRS-Zellen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abstammen, da ein Großteil der Mutationen, die nicht zu einer positiven Selektion im GC und folglich zur Apoptose der GC-B-Zellen führen, schwierig zu identifizieren sind (Kanzler *et al.*, 1996b). Interessanterweise wurde das EBV in fast allen cHL-Fällen mit inaktivierenden Mutationen der IgV-Gene gefunden (Bräuninger *et al.*, 2006). In diesen Fällen könnte das von EBV-codierte LMP2A-Protein, das in fast allen EBV-positiven HL ausgeprägt wird und die Aktivität eines funktionierenden BCRs imitiert, eine Erklärung für das Überleben der HRS-Vorläuferzelle ohne funktionellen BCR im GC sein (Caldwell *et al.*, 1998; Bechtel *et al.*, 2005; Chaganti *et al.*, 2005; Mancao *et al.*, 2005; Mancao & Hammerschmidt, 2007).

Ein weiterer Hinweis auf die Herkunft der HRS-Zellen von GC- oder Post-GC-B-Zellen ist, dass manche cHL-Zelllinien Anzeichen eines durchgeführten Klassenwechsels zeigen, der überwiegend im GC stattfindet (Irsch *et al.*, 2001). Auch in manchen primären Fällen konnten Hinweise einer Klassenwechsel-Rekombination in den HRS-Zellen gefunden werden (Martin-Subero *et al.*, 2006a).

Weiter zeigten Untersuchungen von Kombinationslymphomen, die aus cHLs und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) bestanden, dass die Tumorzellen beider Lymphome klonal verwandte und somatisch mutierte IgV-Gene mit gemeinsamen und separaten Mutationen besaßen. Dies bedeutet, dass sich in diesen Fällen die Tumorzellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle im GC entwickelt haben (Küppers *et al.*, 2014).

Für einzelne Fälle wurden T-Zell-Rezeptor-Umlagerungen bei gleichzeitiger Abwesenheit von IgV-Umlagerungen gefunden, die in seltenen Fällen auf eine Abstammung der HRS-Zellen von T-Zellen hindeutet (Muschen *et al.*, 2000; Seitz *et al.*, 2000). Allerdings wird diskutiert, ob solche Fälle wirklich nach dem derzeitigen Klassifikationsschema zu den cHLs gezählt werden sollten (Mani & Jaffe, 2009; Engert, 2015).

1.3.4 Abstammung und Klonalität der LP-Zellen

Die Ausprägung verschiedenster B-Zellmarker und das Wachstum in follikulären Strukturen, die GCs ähneln, deuteten eine Abstammung der LP-Zellen von GC-B-Zellen an. Der Nachweis von umgelagerten somatisch mutierten klonalen IgV-Genen, die einen funktionierenden BCR codieren, bestätigten diese Vermutungen (Bräuninger *et al.*, 1997; Marafioti *et al.*, 1997; Ohno *et al.*, 1997). Dabei zeigte ein Teil der Fälle intraklonale IgV-Gen Diversität, die auf eine andauernde SHM hinweist. Zusammenfassend scheinen die LP-Zellen vermutlich von positiv selektionierten GC-B-Zellen abzustammen. Diese Vermutung wird durch Genausprägungsprofilen (GEP) von isolierten LP-Zellen unterstützt, da die LP-Zellen ein Zwischenstadium zwischen GC und Gedächtnis-B-Zellen in ihrer Genausprägung zeigen (Brune *et al.*, 2008).

1.4 Verlust des B-Zell-Phänotyps der HRS-Zellen

Obwohl HRS-Zellen von B-Zellen abstammen, zeigten bereits immunhistochemische Analysen, dass HRS-Zellen verschiedene B-Zellmarker wie CD20, CD79b oder den BCR nicht ausprägen (Kuzu *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 2000; Re *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2001). In Studien mit GEPs von HRS-Zellen und normalen Zellen wurde ein weitreichender Verlust des B-Zell-Phänotyps der HRS-Zellen, der in diesem Ausmaß einzigartig unter den B-Zell-Lymphomen ist, dargestellt (Schwering *et al.*, 2003). Dass dieser Verlust des B-Zell-Phänotyps nicht mit der normalen Herabregulierung einiger B-Zellmarker im Zuge der Plasmazell-Differenzierung assoziiert ist, was auf einen Plasmazell-Phänotyp der HRS-Zellen hindeuten würde, konnte in späteren Genexpressionsstudien (GES) mit mikrodisektierten HRS-Zellen geklärt werden (Tiacchi *et al.*, 2012). Es ist auffällig, dass die HRS-Zellen nur B-Zell-Eigenschaften behalten haben, die in der Antigenpräsentation und vor allem in der Interaktion mit T-Helfer-Zellen involviert sind, wie z.B. CD40, CD80, CD86 und oft von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II (Poppema, 1996; Schwering *et al.*, 2003). Dies unterstreicht die wichtige Rolle der Interaktionen mit umgebenen Zellen in der Pathogenese des cHLs (siehe 1.7).

Bisher sind einige Mechanismen, die zu dem Verlust des B-Zell-Phänotyps der HRS-Zellen beitragen, aufgeklärt worden (siehe Abbildung 1). So werden viele B-Zell-Transkriptionsfaktoren, wie OCT2, BOB1, PU.1, ETS1 und EBF1, in den HRS-Zellen schwächer oder gar nicht ausgeprägt, was zur Herabregulierung ihrer Zielgene führt (Re *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 2001; Torlakovic *et al.*, 2001; Overbeck *et al.*, 2012; Bohle *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass epigenetische Faktoren, wie DNA-Methylierung, an der Herabregulierung einiger B-Zell-Gene beteiligt sind (Doerr *et al.*, 2005; Ushmorov *et al.*, 2006; Ammerpohl *et al.*, 2012). Weiterhin weisen HRS-Zellen eine aberrante Ausprägung verschiedener negativer Regulatoren des B-Zell-Programms von anderen hämatopoetischen Zellen auf. Zum Beispiel wird der wichtige B-Zell-Transkriptionsfaktor TCF3, der auch E2A genannt wird, in den HRS-Zellen durch ABF1 und ID2 gehemmt (Küppers *et al.*, 2003; Mathas *et al.*, 2006; Renne *et al.*, 2006). Dabei wird ID2 normalerweise in dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen ausgeprägt, um in diesen B-Zellgene zu unterdrücken (Yokota *et al.*, 1999; Hacker *et al.*, 2003). Ein weiterer fälschlicherweise in HRS-Zellen stark ausgeprägter Faktor, der zum Verlust des B-Zell-Phänotyps beiträgt, ist der T-Zell-Transkriptionsfaktor NOTCH1 (Jundt *et al.*, 2002). Die Aktivierung von NOTCH1 erfolgt vermutlich zum einen durch Zellen des Mikromilieus, die den NOTCH1-Liganden JAG1 auf ihrer Oberfläche tragen (Jundt *et al.*, 2002) und zum anderen durch eine erhöhte Ausprägung von *Notch coactivator mastermind-like 2* (MAML2) in den HRS-Zellen (Kochert *et al.*, 2011). Zusätzlich ist in den HRS-Zellen DTX1, ein Inhibitor von NOTCH1, herabreguliert (Jundt *et al.*, 2008). Generell fördert NOTCH1 die T-Zell-Differenzierung und blockiert die B-Zell-Differenzierung. NOTCH1 schwächt die Ausprägung von *TCF3* und *EBF1*

und induziert die Transkription von *ABF1* und *GATA3*, einem weiteren T-Zell-Transkriptionsfaktor (Jundt *et al.*, 2008; Stanelle *et al.*, 2010). Zusätzlich bindet NOTCH1 an PAX5 und inhibiert dieses vermutlich (Jundt *et al.*, 2008). Allgemein wird PAX5 in den HRS-Zellen ausgeprägt, wobei die Expression von PAX5 in einem Teil der Fälle vermindert ist. Generell weisen typische Zielgene aber eine schwächere Ausprägung auf (Foss *et al.*, 1999). So wurde gezeigt, dass PAX5 in der cHL-Zelllinie L-428 nicht an den für B-Zellen typischen Genom-Regionen, sondern stattdessen an anderen Stellen des Genoms bindet und dass es insgesamt eine gehemmte Aktivität aufweist (Dimitrova *et al.*, 2014). Wodurch die Hemmung von PAX5 im Detail verursacht wird oder ob z.B. wichtige Co-Faktoren zur Transaktivierung von Genen in den HRS-Zellen fehlen ist nicht genau bekannt. Mutationen in PAX5 konnten in den cHL-Zelllinien nicht gefunden werden (Schwering *et al.*, 2003). Des Weiteren sind STAT5A und STAT5B in HRS-Zellen aktiv und vermutlich an der Umprogrammierung dieser Zellen beteiligt. So wurde gezeigt, dass aktiviertes STAT5A und STAT5B in normalen B-Zellen einen HRS-ähnlichen Phänotyp induziert, einschließlich der Ausprägung von CD30 und *GATA3* und der Herabregulierung der BCR-Ausprägung (Scheeren *et al.*, 2008). Kürzlich wurde die starke Expression von IRF5 in den HRS-Zellen als ein treibender Faktor der Umprogrammierung der HRS-Zellen beschrieben (Kreher *et al.*, 2014). So führt die Ausprägung von aktiviertem IRF5 alleine oder im Besonderen in Kombination mit NF- κ B zu einem HRS-ähnlichem Phänotyp in humanen Zelllinien anderer B-Zell-Lymphome oder primären B-Zellen von Mäusen (Kreher *et al.*, 2014). Ein vermutlich weiterer wichtiger Mechanismus, der zum Verlust des B-Zell-Phänotyps der HRS-Zellen und zur Ausprägung von Faktoren unterschiedlichster hämatopoetischer Zelllinien in den HRS-Zellen beiträgt, ist die Expression verschiedenster Transkriptionsfaktoren von hämatopoetischen Stammzellen und frühen lymphoiden Vorläuferzellen, wie *GATA2*, *BMI1*, *EZH2*, *RING1* und *RYBP* (Raaphorst *et al.*, 2000; Dukers *et al.*, 2004; Sanchez-Beato *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2004). So prägen normale B-Zellen zwar einige dieser Faktoren aus, aber die gleichzeitige Ausprägung von Mitgliedern der *Polycomb Repressive Complex 1* und *2* ist ungewöhnlich (Raaphorst *et al.*, 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass Proteine der *Polycomp* Gruppe B-Zellgene herabregulieren und dass hämatopoetische Stammzellen und die lymphoiden Vorläuferzellen verschiedenste Marker unterschiedlicher hämatopoetischer Zellen ausprägen (Hu *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 2002; Dutton *et al.*, 2007). Dies unterstützt die Annahme einer Beteiligung der Ausprägung dieser Faktoren an den besonderen Phänotyp der HRS-Zellen.

Es wird vermutet, dass der Verlust des B-Zell-Phänotyps mit der Abstammung der HRS-Zellen von negativ selektionierten prä-apoptischen GC-B-Zellen zusammenhängt. Die HRS-Vorläuferzelle könnte durch eine solche Umprogrammierung der bevorstehenden Apoptose entgehen (Schwering *et al.*, 2003).

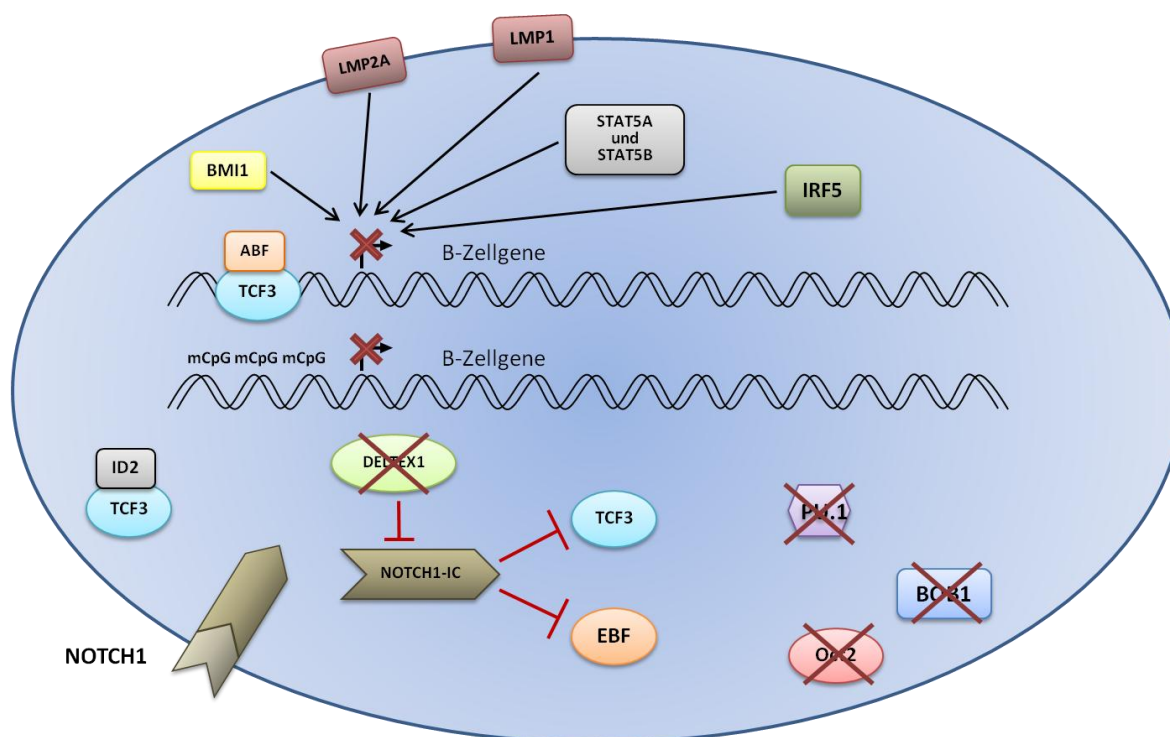


Abbildung 1: Umprogrammierung der HRS-Zellen (Küppers, 2009)

HRS-Zellen weisen einen starken Verlust des B-Zell-Phänotyps auf. Einige Mechanismen dieser Umprogrammierung konnten identifiziert werden. So tragen z.B. die aberrante Ausprägung von B-Zell-Transkriptionsfaktor-Inhibitoren, wie ID2, ABF1 und NOTCH1, der Verlust der Ausprägung von B-Zell-Transkriptionfaktoren, wie OCT2, PU.1 und BOB1, sowie die epigenetische Stilllegung von B-Zellgenen zur Umprogrammierung bei. ID2 bindet den B-Zell-Transkriptionsfaktor TCF3 und hemmt dessen Bindung an die DNA. ABF1 bindet TCF3 und hemmt es. NOTCH1-Aktivierung erfolgt Liganden-vermittelt durch Zellen des Mikromilieus des cHLs und zusätzlich ist der NOTCH1-Inhibitor DTX1 herunterreguliert. NOTCH1 hemmt TCF3 und EBF. Weitere am Verlust des B-Zell-Phänotyps beteiligte Faktoren sind die EBV-kodierten Proteine LMP1 und LMP2A, die BMI1-Ausprägung, aktiviertes STAT5A und STAT5B, sowie die IRF5-Ausprägung.

1.5 Genetische Läsionen in HRS-Zellen

Im Allgemeinen wird die Suche nach genetischen Läsionen in den HRS-Zellen des cHLs durch die Seltenheit der HRS-Zellen im Tumorgewebe behindert. Dennoch konnten einige an der Pathogenese dieser Zellen beteiligten Faktoren z.B. durch Anwendung molekular zytogenetischer Techniken, wie z.B. Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungen (FISH), Analyse von mikrodisssektierten Zellen oder kürzlich auch durch Anreicherung der HRS-Zellen mittels durchflusszytometrischer Zell-Sortierung und anschließender Massiv-Parallel-Sequenzierung identifiziert werden.

Die HRS-Zellen zeigen ein hohes Maß an numerischen und strukturellen chromosomalen Aberrationen, das für viele andere Lymphome untypisch ist (Weber-Matthiesen *et al.*, 1995). Viele zusätzlich subklonal auftretende Aberrationen weisen auf eine generelle genetische Instabilität in den HRS-Zellen hin (Weber-Matthiesen *et al.*, 1995). Wodurch diese Instabilität verursacht wird ist unbekannt. Allerdings wurde in cHL-Zelllinien gezeigt, dass ein Teil der chromosomalen Aberrationen wahrscheinlich durch den Prozess der Chromotripsis verursacht wurde (Nagel *et al.*, 2013). Chromotripsis ist ein Phänomen bei dem eine Vielzahl

von Umlagerungen von Chromosomenabschnitten, die begrenzt auf einen Arm oder kleinere Region eines Chromosoms sind, in Folge eines einzelnen katastrophalen Ereignisses entstanden sind (Stephens *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden in cHL-Zelllinien Fehler der Schwesterchromatid-Kohäsion gezeigt, die auch zur genomischen Instabilität beitragen können (Sajesh *et al.*, 2013). Aufgrund der Abstammung der HRS-Zellen von B-Zellen wurde nach Translokationen des Ig-Locus, die häufig in anderen B-Zell-Lymphomen auftreten, in den HRS-Zellen gesucht. FISH-Analysen zeigten, dass in etwa 20% der cHL-Fälle die HRS-Zellen solche Translokationen tragen (Martin-Subero *et al.*, 2006a; Szymanowska *et al.*, 2008). In manchen Fällen wurden bekannte Onkogene, wie *BCL1*, *BCL2*, *BCL3*, *BCL6*, *REL* und *MYC*, als Translokationspartner identifiziert. Jedoch konnten in den meisten Fällen die betroffenen Gene nicht identifiziert werden (Martin-Subero *et al.*, 2006a; Szymanowska *et al.*, 2008). Die Auswirkung dieser Translokationen auf die Expression der translozierten Gene in den HRS-Zellen ist nicht eindeutig, da der Ig-Locus in vielen HRS-Zellen stillgelegt ist. Daher wird vermutet, dass diese Translokationen vor allem in den HRS-Vorläuferzellen, die den B-Zell-Phänotyp noch besitzen, eine wichtige Bedeutung haben (Küppers, 2012). Ein weiterer oft von Translokationen betroffener Locus in den HRS-Zellen betrifft den MHC Klasse II Transaktivator (MHC2TA). So treten in 15% der cHL-Fälle solche Translokationen auf, die zu einer verminderten Ausprägung von MHC Klasse II auf den HRS-Zellen führt und somit zur Immunevasion der HRS-Zellen beiträgt (Steidl *et al.*, 2011b). In einer aktuellen Studie wurden in 70% der cHL-Fälle inaktivierende Mutationen im B2M-Gen gefunden, die zur verminderten Ausprägung von MHC Klasse I-Molekülen in den HRS-Zellen führen und so auch zur Immunevasion beitragen (Reichel *et al.*, 2015).

HRS-Zellen zeigen grundsätzlich eine konstitutive Aktivität des NF- κ B-Signalweges (Bargou *et al.*, 1997). Einige an dieser aberranten Aktivierung beteiligte Faktoren konnten bereits aufgeklärt werden. So zeigen ca. 50% der cHL-Fälle genomische Zugewinne von *REL*, einer Untereinheit des NF- κ B-Komplexes (Joos *et al.*, 2002; Martin-Subero *et al.*, 2002; Joos *et al.*, 2003). Weiter wurde auch der Zusammenhang zwischen diesen Zugewinnen und der starken Ausprägung des REL-Proteins gezeigt (Barth *et al.*, 2003). In seltenen Fällen treten Amplifikationen und Translokationen des positiven NF- κ B-Regulators *BCL3* in HRS-Zellen auf, die zur starken NF- κ B Aktivität beitragen (Mathas *et al.*, 2005; Martin-Subero *et al.*, 2006b). Zugewinne von *MAP3K14* wurden in 15% der cHL-Fälle gezeigt (Steidl *et al.*, 2010; Otto *et al.*, 2012). *MAP3K14* kodiert NIK, einen positiven Regulator des alternativen NF- κ B-Signalweges. Zusätzlich wurden in 10-20% der primären cHL-Fälle inaktivierende Mutationen im NFKBIA- und NFKBIE-Gen gefunden, die Inhibitoren von NF- κ B codieren (Cabannes *et al.*, 1999; Emmerich *et al.*, 1999; Jungnickel *et al.*, 2000; Emmerich *et al.*, 2003; Lake *et al.*, 2009). In 40% der cHL-Fälle wurden inaktivierende Mutationen in *TNFAIP3* gefunden (Kato *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2009). *TNFAIP3* codiert das A20-Protein, einen negativen Regulator des NF- κ B-Signalweges. Hierbei ist interessant, dass sich Mutationen in

TNFAIP3 und die EBV-Infektion gegenseitig auszuschließen scheinen und somit vermutlich zwei alternative pathogenetische Mechanismen zur aberranten Aktivierung von NF- κ B darstellen. So wurde gezeigt, dass in EBV-positiven HRS-Zellen die Ausprägung von LMP1 zur Aktivierung von NF- κ B führt (Kilger *et al.*, 1998). Weitere negative Regulatoren des NF- κ B-Signalweges, wie *CYLD* und *TRAF3*, sind nur selten in HRS-Zellen mutiert (Schmidt *et al.*, 2010; Otto *et al.*, 2012). Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen außerdem, dass in einigen cHL-Zelllinien verschiedene Faktoren zusammenarbeiten, um die starke NF- κ B Aktivität in den HRS-Zellen zu erreichen.

Ein weiterer konstitutiv aktivierter Signalweg in den HRS-Zellen ist der JAK/STAT-Signalweg. Ähnlich zum NF- κ B-Signalweg wurden auch hier verschiedene Mechanismen aufgedeckt, die zu dieser aberranten Aktivität führen. In 40% der cHL-Fälle ist der negative Regulator der STAT-Aktivität *SOCS1* mutiert (Weniger *et al.*, 2006). Zusätzlich wurden in 20% der cHL-Fälle Mutationen in *PTPN1* gefunden (Gunawardana *et al.*, 2014). Diese Mutationen reduzieren die Phosphatase-Aktivität von *PTPN1* und führen so zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit Aktivität von Faktoren des JAK/STAT-Signalweges. Desweiteren wurden in 20% der cHL-Fälle Zugewinne und in seltenen Fällen auch Translokationen von *JAK2*, das für eine aktivierenden Kinase der STAT-Faktoren codiert, gefunden (Joos *et al.*, 2000; Van Roosbroeck *et al.*, 2011). Dabei beeinflusst der Zugewinn von 9p24 nicht nur den *JAK2*-Locus, sondern schließt auch noch die Gene *PD-L1*, *PD-L2* und *JMJD2C* ein, die jeweils an anderen Aspekten der Pathogenese des cHLs beteiligt sind (Rui *et al.*, 2010). *PD-L1* und *PD-L2* hemmen PD1-positive T-Zellen und unterstützen somit die Immunevasion der HRS-Zellen. *JMJD2C* codiert für eine Histon Demethylase und es wurde gezeigt, dass der Verlust von *JMJD2* tödlich für HRS-Zellen ist (Rui *et al.*, 2010). Weiter wurde gezeigt, dass *JAK2* in HRS-Zellen einen Einfluss auf die epigenetische Regulation hat, indem es Histon H3 phosphoryliert (Rui *et al.*, 2010).

In Bezug auf die Apoptose-Resistenz der HRS-Zellen wurden verschiedene Gene, wie *FAS*, *FADD*, *Caspase 8* und *10*, *BAD*, *ATM* und *TP53* analysiert. Generell fand man Mutationen nur in seltenen Fällen (Engert, 2015). *MDM2*, das einen negativen Regulator von *TP53* codiert, zeigte hingegen in einigen Fällen genomische Zugewinne (Kupper *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die hohe Expression von cFLIP in den HRS-Zellen zur Vermeidung der Apoptose durch den FAS-Signalweg beiträgt und dass der intrinsische Apoptose-Signalweg zum Teil durch die starke Ausprägung von *BCL2L1* (früher *Bcl-xl* genannt) und *XIAP* bzw. durch die verminderte Ausprägung des pro-apoptotischen Faktors *BIK* gehemmt wird (Engert, 2015). Wodurch diese Veränderungen in der Ausprägung der Proteine verursacht werden ist nicht genau bekannt.

1.6 Deregulierte Signalwege in HRS-Zellen

Die HRS-Zellen des cHLs zeigen eine Vielzahl verschiedener Signalwege die konstitutiv aktiv sind. Neben genetischen Faktoren spielen die parakrinen und autokrinen Stimulationen unterschiedlicher Signalwege eine wichtige Rolle. HRS-Zellen weisen eine konstitutive NF- κ B Aktivität auf und es wurde gezeigt, dass diese Aktivität für das Überleben der HRS-Zellen essentiell ist (Bargou *et al.*, 1997). Neben den beschriebenen genetische Läsionen (siehe 1.5) ist die Expression von Mitgliedern der Tumornekrosefaktor (TNF)- α Rezeptor (TNF)-Familie und deren Stimulation von großer Bedeutung für die aberrante Aktivität von NF- κ B. So prägen die HRS-Zellen CD30, CD40, RANK, TACI und BCMA aus (Engert, 2015). Diese Rezeptoren werden alle durch Zellen des Mikromilieus der HRS-Zellen, die die entsprechenden Liganden ausprägen, aktiviert, was zur Aktivierung von NF- κ B beiträgt (Zheng *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2007; Küppers *et al.*, 2012). In EBV-positiven Fällen führt die Ausprägung von LMP1 zur Aktivierung von NF- κ B (Kilger *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Notch-Signalweg an der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in den HRS-Zellen beteiligt ist (Schwarzer *et al.*, 2012).

Ein weiterer konstitutiv aktivierter Signalweg in HRS-Zellen ist JAK/STAT. Auch hier sind neben den genetischen Läsionen parakrine und autokrine Stimulationen von Rezeptoren wichtig. HRS-Zellen prägen STAT3, STAT5 und STAT6 aus (Kube *et al.*, 2001; Skinnider *et al.*, 2002; Baus & Pfitzner, 2006; Scheeren *et al.*, 2008). Die Aktivierung von STAT6 erfolgt durch autokrine Stimulation des IL13-Rezeptors der HRS-Zellen, wohingegen STAT3 und STAT5 durch Stimulation des IL21-Rezeptors erfolgt (Kapp *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 2001; Hinz *et al.*, 2002; Lamprecht *et al.*, 2008; Scheeren *et al.*, 2008). Zusätzlich verstärkt das aktivierte NF- κ B die Aktivität von STAT5 in den HRS-Zellen (Hinz *et al.*, 2002).

Die HRS-Zellen zeigen unterschiedliche Kombinationen einer aberranten Ausprägung und Aktivierung verschiedenster Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), wie z.B. PDGFRA, DDR2, EPHB1, RON, TRKA, TRKB, CSF1R und MET (Engert, 2015). Dabei erfolgt die Aktivierung meist nicht durch genetische Läsionen sondern durch Liganden-vermittelte Stimulation (Renne *et al.*, 2005). Da besonders EBV-negative cHL-Fälle verschiedene RTKs ausprägen, wird vermutet, dass EBV RTK-ähnliche Signalwege aktiviert (Renne *et al.*, 2007). Für PDGFRA, TRKA und CSFR1 wurden wachstumsfördernden Eigenschaften für die HRS-Zellen gezeigt (Renne *et al.*, 2005; Renne *et al.*, 2008; Lamprecht *et al.*, 2010).

Viele weitere Signalwege zeigen eine aberrante Aktivität in den HRS-Zellen. Dazu gehören der PI3K/AKT-Signalweg und der MAPK/ERK-Signalweg (Zheng *et al.*, 2003; Dutton *et al.*, 2005; Georgakis *et al.*, 2006). Die Aktivierung erfolgt vermutlich zum Teil durch CD40, CD30, RANK und verschiedener RTKs. Die Hemmung von AKT und verschiedener ERKs in cHL-Zelllinien zeigt antiproliferative und/oder apoptotische Effekte, was deren Bedeutung für die Proliferation und das Überleben der HRS-Zellen unterstreicht (Zheng *et al.*, 2003; Dutton *et al.*, 2005; Georgakis *et al.*, 2006). Desweiteren sind mit c-Jun und Jun-B Transkriptions-

faktoren der AP-1 Familie in HRS-Zellen stark ausgeprägt und konstitutiv aktiviert. AP-1 stimuliert die Proliferation der HRS-Zellen und reguliert zusammen mit NF- κ B eine Reihe von Zielgenen (Mathas *et al.*, 2002). Zusätzlich ist der Transkriptionsfaktor IRF4 in HRS-Zellen aktiv und es wurde gezeigt, dass er die Proliferation von HRS-Zellen fördert (Aldinucci *et al.*, 2010; Aldinucci *et al.*, 2011).

1.7 Interaktionen der HRS-Zellen mit dem Mikromilieu

Das die HRS-Zellen umgebene Mikromilieu spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des cHLs. Durch direkte Interaktion mit den HRS-Zellen oder durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen wirkt das Mikromilieu anti-apoptotisch und proliferationsfördernd auf die HRS-Zellen ein. Zusätzlich trägt es auch zur Immunevasion der HRS-Zellen bei. Die HRS-Zellen stellen ungefähr nur 1% der Tumormasse dar, während das Mikromilieu die restlichen 99% des Tumors bilden. Das Mikromilieu besteht aus nicht-malignen reaktiven Zellen, wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Eosinophile, Neutrophile, Mastzellen Fibroblasten und Plasmazellen, und Kollagen (Pileri *et al.*, 2002). Die zentrale Bedeutung des Mikromilieus für das Überleben der HRS-Zellen wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass HRS-Zellen normalerweise nicht im peripheren Blut zu finden sind, dass es sehr schwierig ist Zelllinien aus den HRS-Zellen zu generieren und dass es bis heute nicht gelungen ist primäre HRS-Zellen in immundefizienten Mäusen wachsen zu lassen (Kapp *et al.*, 1993; Meggetto *et al.*, 1996).

Viele Zelltypen des Mikromilieus werden aktiv von den HRS-Zellen durch die Sekretion von Chemokinen angelockt. So sekretieren HRS-Zellen z.B. RANTES, TARC, CCL20 und CCL22, um CD4-positive T-Zellen anzulocken, die einen Th2- oder T-regulatorischen Phänotyp besitzen (van den Berg *et al.*, 1999; Skinnider & Mak, 2002; Fischer *et al.*, 2003; Marshall *et al.*, 2004; Aldinucci *et al.*, 2008; Baumforth *et al.*, 2008). Weiter prägen HRS-Zellen RANTES, IL-5, IL-9, CCL28, GM-CSF und CCL11 aus, um Eosinophile anzulocken (Skinnider & Mak, 2002; Hanamoto *et al.*, 2004; Glimelius *et al.*, 2006; Aldinucci *et al.*, 2008). Zusätzlich lockt RANTES auch Mastzellen an und es wird IL-8 von den HRS-Zellen sekretiert, um Neutrophile anzuziehen (Skinnider & Mak, 2002). Die Interaktion der HRS-Zellen mit den angelockten Zellen ist vielfältig. So prägen z.B. die CD4-positiven Zellen CD40L und CD28 aus, die Liganden der von den HRS-Zellen ausgeprägten Rezeptoren CD40 und CD80 (Carbone *et al.*, 1995; Nozawa *et al.*, 1998). Diese Stimulation von CD40 trägt zur Aktivierung von NF- κ B bei und das CD80-Signal stellt ein wichtiges co-stimulierendes Signal in der Interaktion zwischen B- und T-Zellen dar. Weiter werden z.B. TACI und BCMA auf den HRS-Zellen durch APRIL auf den angelockten Neutrophilen aktiviert, was zum Überleben und der Proliferation der HRS-Zellen beiträgt (Chiu *et al.*, 2007).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Interaktion der HRS-Zellen mit dem Mikromilieu ist die Immunevasion. So hemmen die angelockten T-regulatorischen Zellen zytotoxische T-Zellen. Dabei induzieren HRS-Zellen die Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Zellen in FOXP3-positive T-regulatorische Zellen und zusätzlich wird die Proliferation der FOXP3-positiven T-regulatorischen Zellen durch die Sekretion von IL-7 von den HRS-Zellen verstärkt (Tanijiri *et al.*, 2007; Cattaruzza *et al.*, 2009). T-regulatorische Zellen und HRS-Zellen exprimieren IL-10 und TGF- β , die hemmend auf zytotoxische T-Zellen wirken (Kadin *et al.*, 1990; Herbst *et al.*, 1996; Skinnider & Mak, 2002). Zusätzlich exprimieren HRS-Zellen Galectin 1, Prostaglandin E2, FASL, PDL1 und PDL2, um zytotoxische T-Zellen zu hemmen (Verbeke *et al.*, 2001; Chemnitz *et al.*, 2006; Gandhi *et al.*, 2007; Juszczynski *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2008). Des Weiteren scheint die reduzierte Ausprägung der MHC Klasse I und II in einem Teil der cHL-Fälle an der Immunevasion beteiligt zu sein (Diepstra *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010; Steidl *et al.*, 2011b; Reichel *et al.*, 2015). In wenigen cHL-Fällen trägt vermutlich auch der Verlust von CD58 als Mechanismus zur Immunevasion bei, so wie es für einige Fälle des diffus großzelligen B-Zell Lymphoms gezeigt worden ist (Challa-Malladi *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2015).

1.8 Epstein-Barr-Virus in der cHL-Pathogenese

EBV ist ein γ -Herpesvirus, mit dem weltweit über 90% aller Menschen latent infiziert sind. Normalerweise erfolgt die primäre Infektion im Kindesalter und ist asymptomatisch. Erfolgt die Infektion allerdings erst in jungen Erwachsenen kann es zur Ausbildung einer Mononukleose kommen. Das Reservoir der latenten Infektion sind Gedächtnis-B-Zellen, wobei die Frequenz infizierter Zellen relativ gering ist (Chaganti *et al.*, 2009). Das drei- bis vierfach erhöhte Risiko nach überstandener Mononukleose ein HL zu entwickeln gibt Hinweise auf eine Assoziation der Virusinfektion mit HL (Rosdahl *et al.*, 1974; Munoz *et al.*, 1978). Des Weiteren sind in ca. 40% der cHL-Fälle in den Industriestaaten die HRS-Zellen klonal mit EBV infiziert. Dies lässt vermuten, dass bereits eine frühe Vorläuferzelle der HRS-Zellen mit EBV infiziert war und die EBV-Infektion von pathogenetischer Bedeutung ist. In diesem Sinne wurde gezeigt, dass EBV in den HRS-Zellen im Latenzprogramm II vorliegt. Dies bedeutet, dass die viralen Proteine LMP1, LMP2 und EBNA1 und zusätzlich EBER und einige weitere nicht-codierende RNAs des EBV-Genoms, die teilweise als miRNAs fungieren, in den HRS-Zellen ausgeprägt werden (Küppers, 2003). EBNA1 wird hauptsächlich für die Replikation des Virus-Epigenoms benötigt. Zusätzlich ist EBNA1 direkt an der Pathogenese des cHL beteiligt, indem es in den HRS-Zellen zur Herabregulierung des Tumorsuppressorgens Protein-Tyrosin-Phosphatase κ und zur erhöhten Ausprägung von CCL20, das regulatorische T-Zellen anlockt und somit zur Gestaltung des Mikromilieu des cHLs beiträgt, führt (Baumforth *et al.*, 2008; Flavell *et al.*, 2008). LMP1 ist ein Onkogen und führt zu Entwicklung von B-Zell-Lymphomen in LMP1-transgenen Mäusen (Kulwichit *et*

al., 1998). Es imitiert einen aktivierten CD40-Rezeptor und führt so zur konstitutiven Aktivierung verschiedener Signalwege, einschließlich NF- κ B, JAK/STAT und PI3K/AKT (Kilger *et al.*, 1998; Young & Murray, 2003), die auch in HRS-Zellen aberrant aktiviert sind (Bargou *et al.*, 1997; Kube *et al.*, 2001; Dutton *et al.*, 2005). LMP2A imitiert die Aktivität eines funktionellen BCRs und es wurde gezeigt, dass es das Überleben von B-Zell-Vorläufern unabhängig vom BCR-Signal ermöglicht (Caldwell *et al.*, 1998). Daher könnte LMP2A zusammen mit LMP1 in der cHL-Pathogenese an der Rettung der prä-apoptischen GC-B-Zelle, die Vorläuferzelle der HRS-Zellen, vor der Apoptose beteiligt sein, da die BCR- und CD40-Signale zwei wichtige Überlebenssignale von GC-B-Zellen darstellen (Victoria & Nussenzweig, 2012). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass eine EBV-Infektion GC-B-Zellen mit verkrüppeltem BCR vor der Apoptose retten kann (Bechtel *et al.*, 2005; Chaganti *et al.*, 2005; Mancao *et al.*, 2005; Mancao & Hammerschmidt, 2007). Des Weiteren sind fast alle Fälle des cHLs, die verkrüppelnde Mutationen in den HRS-Zellen aufweisen, mit EBV infiziert (Bräuninger *et al.*, 2006). Die Funktion von LMP2A im etablierten HRS-Zell-Klon ist allerdings unsicher, da ein Großteil der Komponenten des BCR-Signalweges herab reguliert sind. Dabei wird vermutet, dass dies wiederum vorteilhaft für die HRS-Zelle ist, da LMP2A durch die fehlende Ausprägung von Komponenten des BCR-Signalweges in den HRS-Zellen den lytischen EBV-Zyklus nicht induzieren kann (Vockerodt *et al.*, 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass LMP1 und LMP2A an der veränderten Genausprägung der HRS-Zellen beteiligt sein können (Portis *et al.*, 2003; Vockerodt *et al.*, 2008).

1.9 Therapie des cHLs

Das cHL ist eines der am besten heilbaren Tumorerkrankungen des Menschen. Durch die Kombination von Chemotherapie und Strahlentherapie können heutzutage 80% der Patienten mit cHL geheilt werden (Stathis & Younes, 2015). Dabei stellt aber das Auftreten von akuter Toxizität und Langzeittoxizität der Behandlung, wie z.B. die Entwicklung von Zweitneoplasien oder Erkrankungen des Herzkreislaufsystems, ein großes Problem dar (Armitage, 2010). Daher ist das derzeitige Ziel in der Behandlung des cHLs die Toxizität der Therapie zu reduzieren und gleichzeitig die hohe Effektivität der Behandlung zu erhalten. Zusätzlich ist es wichtig, die 10-20% der Patienten, die nicht auf die Standardtherapie ansprechen, frühzeitig zu erkennen, um die Therapie anpassen zu können (Küppers *et al.*, 2012).

Für die Auswahl des Therapieansatzes erfolgt die Einteilung der Patienten in 3 Gruppen: limitierte Stadien, intermediäre Stadien und fortgeschrittene Stadien (Küppers *et al.*, 2012). Die Einteilung in diese Gruppen erfolgt anhand des Krankheitsstadium nach der Cotswolds Modifizierung der Ann-Arbor-Klassifizierung und zusätzlich vorhandener Risikofaktoren, wie z.B. eine hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit (Engert, 2015). Die Standardbehandlung für Patienten mit cHL in limitierten Stadien umfasst zwei Zyklen mit der Kombination der

Chemotherapeutika Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin, abgekürzt ABVD, und anschließender Bestrahlung des betroffenen Gewebes (*involved field radiotherapy* (IFRT)) mit 20 Gy (Küppers *et al.*, 2012). Patienten mit cHL im intermediären Stadien erhalten 4 Zyklen ABVD mit anschließender IFRT mit 30 Gy (Küppers *et al.*, 2012). Für die Behandlung von cHL in fortgeschrittenen Stadien gibt es derzeit zwei verschiedene Protokolle. So werden sechs bis acht Zyklen mit ABVD oder sechs Zyklen mit BEACOPP eskaliert, das eine Kombination der Chemotherapeutika Cyclophosphamid, Etoposid(phosphat), Adriamycin, Procarbazin, Vincristin, Predniso(lo)n, und Bleomycin ist, durchgeführt (Küppers *et al.*, 2012). Neuere Studien zeigen ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit dem BEACOPP-Protokoll (Stathis & Younes, 2015). Bei Patienten die Rezidive oder therapierefraktäre cHL aufweisen wurden bisher oft eine Hoch-Dosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzell-Transplantation (ASCT) durchgeführt, die in ca. 50% der Patienten erfolgreich war (Stathis & Younes, 2015).

Neuerdings werden auch monoklonale Antikörper in der Therapie des cHLs eingesetzt. Sehr erfolgreich wird Brentuximab Vedotin, ein mit Zytostatikum-gekoppelter anti-CD30-Antikörper, angewendet (Katz *et al.*, 2011; Stathis & Younes, 2015). Brentuximab Vedotin ist als Einzelmedikament zur Behandlung von rezidivierenden und therapierefraktären cHL nach erfolgloser ASCT oder nicht durchführbarer ASCT zugelassen und zeigt in 94% der behandelten Patienten eine Tumorreduktion, wobei in 75% der Patienten eine partielle oder komplette Remission erreicht wurde (Younes *et al.*, 2012a). In neueren Studien wurde Brentuximab Vedotin auch in der Erstbehandlung von cHL in fortgeschrittenen Stadien in Kombination mit AVD erfolgreich getestet und zeigte in 96% der Fälle eine komplette Remission (Younes *et al.*, 2013).

Zwei weitere vielversprechende monoklonale Antikörper zur Behandlung von cHL sind Pembrolizumab und Nivolumab. Beide Antikörper sind gegen PD-1 gerichtet und zeigen in ersten Studien an austherapierten cHL-Patienten sehr hohe Ansprechraten von 87% und 53% (Moskowitz, 2014; Ansell *et al.*, 2015). Weitere neue Therapieansätze verwenden Histone-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren, die in einem Teil der Patienten zur Tumorreduktion führten (Younes *et al.*, 2012b).

1.10 MYC

Das Protoonkogen *MYC* gehört zur Familie der *basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper* (bHLHZip)-Transkriptionsfaktoren. Diese namensgebenden Domänen befinden sich am C-terminalen Ende, wobei zunächst die basische Region, die zur Interaktion mit der DNA dient, dann der Helix-Loop-Helix und zuletzt der Leucin Zipper codiert werden. Die beiden letzteren Domänen dienen zur Interaktion mit verschiedenen Co-Faktoren und Bildung von Heterodimeren. N-Terminal befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (TAD), vier hoch konservierte Regionen, die sogenannten *MYC homology box I-IV*, und ein

Kernlokalisierungssignal (Meyer & Penn, 2008). Die MYC-mRNA wird durch Verwendung alternativer Startcodons in drei Isoformen translatiert, MYC1, MYC2 und S-MYC (Hann *et al.*, 1992; Blackwood *et al.*, 1994; Spotts *et al.*, 1997). MYC2 stellt die Hauptisoform, initiiert an einem AUG, dar und produziert ein 64 kDa großes Protein. Die Translation von MYC1 wird von einem 15 Codon weiter 5'-gelegenen CUG gestartet und produziert ein 67 kDa Protein. MYC-S hingegen fehlen die ersten 100 Aminosäuren von MYC2. Zwar wurden funktionelle Unterschiede der drei Isoformen gezeigt, deren genaue Funktion und Vorkommen ist bisher aber nicht eindeutig geklärt (Hann *et al.*, 1992; Blackwood *et al.*, 1994; Hann *et al.*, 1994; Spotts *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 1999; Benassayag *et al.*, 2005). Wie die mRNA haben auch die MYC-Proteine eine kurze Halbwertszeit von nur 20 bis 30 Minuten, was eine schnelle Regulation von MYC ermöglicht (Dani *et al.*, 1984; Hann & Eisenman, 1984). So wird die Ausprägung von MYC nicht nur von vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren sowohl positiv als auch negativ reguliert, sondern zusätzlich erfolgt eine Regulation der MYC-Ausprägung außerdem durch die Kontrolle der mRNA-Stabilität und der Translation, sowie durch Beeinflussung der Protein-Stabilität (Meyer & Penn, 2008; Dang, 2012). Für eine transaktivierende Aktivität von MYC ist die Bildung eines Heterodimers mit MAX notwendig (Blackwood & Eisenman, 1991). Die Dimerisierung erfolgt dabei über die bHLHZip-Domäne. Das MYC-MAX-Heterodimer bindet mit hoher Affinität an 5'-CACGTG-3' DNA-Abschnitte, den sogenannten E-Box Motiven, wobei auch verwandte nicht-kanonische Stellen schwächer gebunden werden, und aktiviert die Transkription naher Gene (Amati *et al.*, 1992; Kretzner *et al.*, 1992). Die transkriptionelle Aktivierung erfolgt dabei z.B. durch die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Komplexen, die unter anderem Histon-Acetyltransferasen enthalten, und durch Aufhebung der pausierten Transkriptionselongation durch weitere Phosphorylierung der RNA-Polymerase II (Cole & Cowling, 2008). MYC kann aber auch die Transkription von Genen hemmen, indem es andere Transkriptionsfaktoren, wie MIZ1, bindet und damit deren Aktivität unterdrückt oder indem es die Ausprägung von miRNAs verstärkt (Schneider *et al.*, 1997; O'Donnell *et al.*, 2005). Für MYC wurde gezeigt, dass es an viele tausende Stellen des Genoms bindet, die auch RNA-Polymerase III und I Gene beinhalten, und die Transkription von ungefähr 15% aller menschlichen Gene beeinflusst (Patel *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2006; Seitz *et al.*, 2011). Diese Gene sind involviert in der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. Proliferation, Zell-Zyklus-Kontrolle, Differenzierung, Metabolismus, Zelladhäsion und Apoptose.

Zwei neuere Studien zeigten für MYC, dass es vermutlich keine spezifischen Zielgene besitzt, sondern dass MYC eher die Ausprägung aller aktiven Gene einer Zelle verstärkt und somit als genereller Verstärker der Transkription fungiert (Lin *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2012). Dies wurde von zwei später erschienen Studien relativiert, die zeigten, dass MYC zwar die Ausprägung aller aktiven Gene verstärkt, dies aber zum einen von der Menge an MYC und

der Anzahl zu besetzenden E-Boxen abhängig ist, wobei zunächst die kanonischen und erst später die nicht-kanonischen besetzt werden, und zum anderen ein Teil der verstärkten transkriptionellen Aktivität auch indirekt durch MYC-induzierte Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Sabo *et al.*, 2014; Walz *et al.*, 2014). Zusätzlich zeigten diese beiden Studien, dass MYC doch bestimmte Zielgene hat, die präferentiell reguliert werden. So trägt zum einen das Zusammenspiel der in der Zelle vorhanden Menge an MYC und die unterschiedliche Affinität von MYC zu seinen Bindestellen zur selektiven Ausprägung einiger Gene bei. Zum anderen wird eine negative Regulation bestimmter Zielgene durch Bindung und Hemmung von MIZ1 durch MYC erzielt. Weiter wird auch zwischen direkten und indirekten Zielgenen von MYC unterschieden.

MYC wird in der frühen Entwicklung der B-Zelle benötigt (Habib *et al.*, 2007). In reifen B-Zellen wird MYC in einer kleinen Population von extrafollikulären B-Zellen und in einem kleinem Teil der GC-B-Zellen ausgeprägt (Cattoretti, 2013). Es wurde in der Maus gezeigt, dass MYC für die Bildung des GCs und Aufrechterhaltung der GC-Reaktion benötigt wird (Calado *et al.*, 2012; Dominguez-Sola *et al.*, 2012). So scheinen die MYC-positiven GC-B-Zellen positiv selektionierte Zentrozyten zu sein, die in die dunkle Zone des GCs rezirkulieren, um eine erneute Runde von Proliferation mit SHM mit anschließender Selektion in der hellen Zone des GCs durchzuführen (Calado *et al.*, 2012; Dominguez-Sola *et al.*, 2012; Cattoretti, 2013).

MYC ist in vielen humanen Krebsarten ein starkes Onkogen und trägt abhängig vom jeweiligen Kontext auf unterschiedliche Weise zur Tumorentwicklung bei (Nesbit *et al.*, 1999; Dang, 2012). Es kann durch chromosomale Translokationen der Promotorregion, Gen-Amplifikation, Virus-vermittelte Insertionsmutagenese oder Punktmutation im kodierenden Bereich von *MYC* dereguliert werden (Rohban & Campaner, 2015). Allerdings kann MYC alleine die Tumorgenese nicht induzieren, sondern arbeitet mit anderen genetischen Läsionen zusammen, um die Tumorentwicklung zu ermöglichen (Land *et al.*, 1983; Meyer & Penn, 2008).

MYC scheint auch zu der Pathogenese einiger Fälle des cHLs beizutragen. So sind in ca. 70% der cHL-Fälle ein Teil der HRS-Zellen positiv für MYC (Chisholm *et al.*, 2015). Zusätzlich zeigten die HRS-Zellen von einem Teil der primären Fällen des cHLs im Vergleich zu normalen GC-B-Zellen in GES eine erhöhte Expression von *MYC* (Tiacchi *et al.*, 2012). Dabei konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sich die untersuchten Fälle anhand der Ausprägung von *MYC* und deren Zielgene in zwei Gruppen einteilen lassen, was die Annahme unterstützt, dass *MYC* eine bedeutendere Rolle in diesen cHL-Fällen besitzt. Des Weiteren wurde für einige cHL-Zelllinien gezeigt, dass Zellen mit herabreguliertem MYC im Vergleich zu Zellen mit normaler MYC-Ausprägung schlechter wachsen (Rui *et al.*, 2010).

1.11 CEBPB

CCAAT/enhancer-binding protein beta (CEBPB) gehört zur Gruppe der *basic Leucine Zipper* (bZIP)-Transkriptionsfaktoren und ist an der Regulation verschiedenster Prozesse beteiligt, wie z.B. zelluläre Proliferation und Differenzierung, Akute-Phase-Reaktion, Entzündungsreaktion, Zellüberleben, Tumorgenese, Seneszenz und Hämatopoese (Lekstrom-Himes & Xanthopoulos, 1998; Ramji & Foka, 2002; Nerlov, 2007; Zahnow, 2009; Huber *et al.*, 2012). *CEBPB* ist ein Gen ohne Intron und die mRNA wird durch Verwendung unterschiedlicher Translationsinitiationsstellen in drei Isoformen translatiert, die LAP1 (*liver activating protein 1*), LAP2 und LIP (*liver inhibitory protein*) genannt werden (Zahnow, 2009). C-Terminal besitzen alle Isoformen eine bZIP-Domäne, die der Dimerbildung und der DNA-Bindung dient. LAP1 und LAP2 haben N-Terminal eine TAD und fungieren somit als Transaktivatoren, wobei LAP2 generell eine starke Aktivität aufweist (Zahnow, 2009). Allerdings ist die 21 Aminosäuren-längere N-terminale Region von LAP1 kritisch für die Bindung des Chromatin-modifizierenden SWI-SNF-Komplexes und ermöglicht so z.B. auch die Aktivierung von stillgelegten Genen (Kowenz-Leutz & Leutz, 1999). LIP hingegen fehlt die TAD und wirkt als dominanter Inhibitor von LAP1 und LAP2 (Descombes & Schibler, 1991). Daher ist das LAP/LIP-Verhältnis ein wichtiger Regulator der Aktivität von CEBPB. Es wurde gezeigt, dass die Translation von CEBPB und damit die Ausprägung der drei Isoformen durch *mammalian target of rapamycin* (mTOR), Signalwege der Stress-Antwort und durch RNA-Bindeproteine reguliert wird (Calkhoven *et al.*, 2000; Timchenko *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Zahnow, 2009). Auch posttranslationale Modifizierungen, wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen und Sumoylierungen spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation von CEBPB. So beeinflussen diese Modifizierungen die DNA-Bindung, die transkriptionelle Aktivität, die Protein-Protein-Interaktionen sowie die Lokalisierung von CEBPB innerhalb der Zelle (Zahnow, 2009).

Eine erhöhte Ausprägung von CEBPB wurde in verschiedenen menschlichen Tumorarten nachgewiesen, wie z.B. Brustkrebs, anaplastisch großzelliges Lymphom (ALCL), Multiples Myelom, Hautkrebs und viele mehr (Oh & Smart, 1998; Jundt *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2009; Zahnow, 2009). Dabei scheint in vielen Fällen die erhöhte Expression von LIP und somit ein geringeres LAP/LIP-Verhältnis für die Tumorentwicklung von Bedeutung zu sein (Gomis *et al.*, 2006; Begay *et al.*, 2015). Allerdings können auch LAP1 und LAP2 an der Pathogenese von Tumoren beteiligt sein. So wurde in folliculären Lymphomen, die eine t(14;18)-Translokation aufweisen, gezeigt, dass LAP1 und LAP2 die Ausprägung des antiapoptotischen Proteins BCL2 verstärken. Für das cHL wurde gezeigt, dass die LIP-Isoform von CEBPB zur Proliferation der HRS-Zellen beiträgt (Jundt *et al.*, 2005).

Wichtige Funktionen erfüllt CEBPB auch in der Entwicklung des hämatopoetischen Systems. So führt der Verlust von *CEBPB* in Mäusen zu einer gestörten B-Zell-Entwicklung im Knochenmark (Chen *et al.*, 1997). Zusätzlich ist CEBPB an verschiedenen Prozessen

myeloischer Zellen beteiligt, wie z.B. der sogenannten "*Emergency Granulopoese*", der Entwicklung von dendritischen Zellen, der Differenzierung von eosinophilen Zellen und der Entwicklung und Regulation von Monozyten (Nerlov *et al.*, 1998; Hirai *et al.*, 2006; Garber *et al.*, 2012; Huber *et al.*, 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine verstärkte Ausprägung von CEBPB zur Transdifferenzierung oder Umprogrammierung von B-Zellen in Makrophagen führen kann (Xie *et al.*, 2004).

1.12 Zielsetzung

Obwohl in den letzten Jahren bereits einige beteiligte Faktoren und Mechanismen der Pathogenese des cHLs aufgeklärt wurden, ist sie bis heute größtenteils noch unbekannt. In dieser Arbeit sollten weitere molekulare Mechanismen in der Pathogenese des cHLs genauer analysiert werden, um ein besseres Verständnis über die Lymphomentstehung des cHLs zu erlangen.

MYC ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Zelle und als starkes Onkogen an der Pathogenese verschiedenster humaner Tumorerkrankungen beteiligt (Nesbit *et al.*, 1999; Dang, 2012). Auch in HRS-Zellen einiger Fälle des cHLs konnte eine erhöhte MYC-Ausprägung auf mRNA und Proteinebene nachgewiesen werden (Tiacci *et al.*, 2012; Chisholm *et al.*, 2015). Daher sollte die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHLs genauer untersucht werden. Dazu sollte MYC in mehreren cHL-Zelllinien mittels eines lentiviralen Systems zur shRNA-Expression herabreguliert und anschließend die Konsequenzen dieser MYC-Herabregulation auf den Phänotyp der Zellen, insbesondere die Proliferation und das Überleben der Zellen, analysiert werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte die Rolle von CEBPB in der Pathogenese des cHLs untersucht werden. CEBPB ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor und an der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse beteiligt (Zahnow, 2009; Huber *et al.*, 2012). Für das Multiple Myelom und ALCL konnte eine Beteiligung von CEBPB an der Proliferation und dem Überleben der Tumorzellen gezeigt werden (Pal *et al.*, 2009; Anastasov *et al.*, 2010). Eine aberrant erhöhte Expression von *CEBPB* in HRS-Zellen primärer Fälle des cHLs im Vergleich zu normalen B-Zellpopulationen wurde mit Hilfe von GEP nachgewiesen (Tiacci *et al.*, 2012). Daher sollte CEBPB mittels eines lentiviralen Systems zur shRNA-Expression in cHL-Zelllinien herabreguliert werden und die Bedeutung von CEBPB für die Proliferation und das Überleben der HRS-Zellen untersucht werden. Da eine verstärkte Ausprägung von CEBPB zur Transdifferenzierung oder Umprogrammierung von B-Zellen in Makrophagen führen kann (Xie *et al.*, 2004), sollte auch eine mögliche Beteiligung von CEBPB an der Umprogrammierung der HRS-Zellen untersucht werden.

Zusätzlich sollte im Rahmen dieser Arbeit mit der umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen der HRS-Zellen des cHLs begonnen werden. Aufgrund der Seltenheit der HRS-Zellen im Lymphomgewebe sollte eine Methode zur Exom-Sequenzierung

ausgehend von mikrodisektierten Zellen etabliert werden. Anschließend sollten die Exome von ersten cHL-Fällen sequenziert und zunächst die Qualität der Sequenzierung überprüft werden, indem z.B. gefundene Mutationen validiert werden. Des Weiteren sollten erste Auswertungen bzgl. der genetischen Heterogenität des cHLs und zur Identifizierung rekurrent in den HRS-Zellen mutierten Gene durchgeführt werden. So sollten neue an der Pathogenese des cHLs beteiligte Faktoren identifiziert werden, deren pathogenetische Bedeutungen für die HRS-Zellen in Zukunft durch funktionelle Studien in Zelllinien weiter untersucht werden können.

2 Material & Methoden

2.1 Zellkultur

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien und Wachstumsbedingungen

Zelllinie	Zelltyp	Optimale Zelldichte [$\times 10^5$ Zellen/ml]	Medium*	Literatur
HDLM-2	cHL (T-Zell-Ursprung)	5 – 10	RPMI + 10% FCS	(Drexler et al., 1986)
KM-H2	cHL	3 – 10	RPMI + 10% FCS	(Kamesaki et al., 1986)
L-1236	cHL	3 – 6	RPMI + 10% FCS	(Kanzler et al., 1996a; Wolf et al., 1996)
L-428	cHL	2 – 4	RPMI + 10% FCS	(Schaadt et al., 1979)
SUP-HD1	cHL	3 – 6	RPMI + 20% FCS	(Naumovski et al., 1989)
U-HO1	cHL	10 – 20	60%IMDM + 20% RPMI + 20% FCS	(Mader et al., 2007)
DAUDI	Burkitt Lymphom	5 – 10	RPMI + 10% FCS	(Klein et al., 1968)
Raji	Burkitt Lymphom	5 – 20	RPMI + 10% FCS	(Pulvertaft, 1964)
U-266	Multiples Myelom	2 – 10	RPMI + 10% FCS	(Nilsson et al., 1970)
293T	Embryonale Nierenzelle	–	DMEM + 10% FCS	(Graham et al., 1977)

*Die verwendeten Medien wurden von PAN Biotech bezogen und mit 100 i.E. /ml Medium Penicillin und 100 μ g/ml Medium Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) versetzt.

2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Alle drei bis vier Tage wurden die Suspensionszellen durch Zugabe von frischem Medium oder bei Bedarf durch Zentrifugation bei 150 x g für 5 min, Abnahme des verbrauchten Mediums und anschließender Zugabe von frischem Medium auf ihre optimale Zelldichte eingestellt (siehe Tabelle 1). Dabei wurde ein Verhältnis von 50% konditioniertem und 50% frischem Medium zur weiteren Kultivierung der Zellen verwendet. Bei der adhärennten Zelllinie 293T wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen, indem 5 ml 1x PBS auf die Zellen gegeben, die Zellen bei 150 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (PAN Biotech) abgelöst und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in geringerer Konzentration auf neuen Zellkulturschalen weiterkultiviert.

2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung von Zellsuspensionen erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen bei der Zellzahlbestimmung wurden zuvor gleiche Teile der Zellsuspensionslösung mit 0,5%iger Trypanblau-Lösung gemischt. Die toten Zellen färben sich blau, da ihr Membranintägrität gestört ist und somit der Farbstoff in die Zellen eindringen kann.

2.1.3 Sortierung von Zellen mittels FACS

Die durchflusszytometrische Sortierung von Zellen (FACS) erfolgte an der BD FACSDiva™ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Hierfür wurden die für die Sortierung verwendeten Zellen 3x mit 1x PBS/0,5% BSA gewaschen, indem sie für 5 min bei 150 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml PBS/0,5% BSA resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Zellen abhängig von der Zellmenge in 0,5 – 3 ml PBS/0,5% BSA aufgenommen. Kurz vor der Sortierung an der FACSDiva™ wurde DAPI (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 3 µg/ml zu den Zellen zugegeben, um tote von lebendigen Zellen unterscheiden zu können. Nach der Sortierung wurden die Zellen, die wieder in Kultur genommen wurden, bei 150 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Weiter wurden die Zellen in ihrer optimalen Dichte entsprechenden Menge Medium aufgenommen und im Inkubator kultiviert. Für RNA- und Protein-Analysen-sortierte Zellen wurden bei 2500 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.1.4 Retrovirale Arbeitstechniken

Arbeiten mit retroviralen Partikeln unterliegen den besonderen Sicherheitsbestimmungen der Stufe S2. Diese Arbeiten umfassen die Herstellung und die Titrierung der Viruspartikel, sowie die Infektion von Zelllinien mit den hergestellten Viruspartikeln.

2.1.4.1 Produktion von Viruspartikeln

Die Produktion der Viruspartikel erfolgte durch die Co-Transfektion der Plasmide pViG, pHIT/g und ΔSP2 in 293T-Zellen zur Produktion von pViG-Viren oder durch die Co-Transfektion der Plasmide pGIPZ oder LeGO.G, psPAX2 und pMD2.G in 293T-Zellen für die Produktion von pGIPZ- bzw. LeGO.G-Viren. Die pViG-, pGIPZ- und LeGO.G-Plasmide kodieren für das Virusgenom. Die Plasmide pHIT/g und psPAX2 kodieren die viralen *gag* und *pol* Proteine und die Plasmide ΔSP2 und pMD2.G codieren das Hüllprotein des Vesikular Stomatitis Virus (VSV). Für die Virusproduktion wurden zunächst $3,5 \times 10^6$ 293T-Zellen in 10 ml Medium in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion durch Verwendung des Transfektionsreagenz GeneJuice® (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Dafür wurden zunächst 30 µl GeneJuice® Reagenz mit 500 µl DMEM,

ohne weitere Zusätze, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 10,5 µl Plasmid-Gemisch, bestehend aus 3,5 µg pHIT/g oder psPAX2, 2 µg ΔSP2 oder pMD2.G und 5 µg pViG, pGIPZ oder LeGO.G, zugegeben und dieser Mix durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu dem Medium der 293T-Zellen gegeben. Nach 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium abgesaugt und durch 6 ml RPMI mit 20% FCS ausgetauscht. Nach drei Tagen Kultivierung wurden die Viruspartikel geerntet. Dafür wurde der Überstand gesammelt, bei 150 x g für 5 min zentrifugiert, mit einem 0,45 µm Filter steril filtriert und anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.1.4.2 Virustitration

Um die genaue Anzahl infektiöser Partikel der Virusüberstände zu bestimmen wurde eine definierte Anzahl an 293T-Zellen mit bekannten Volumina der Virusüberstände infiziert. Durch das in den Vektoren-enthaltene GFP und der Annahme dass jede GFP-positive Zelle von einem Viruspartikel infiziert worden ist, ließ sich der Virustiter der Viruslösung bestimmen.

Hierfür wurden am Vortag 1 x 10⁵ 293T-Zellen pro Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am Tag der Transduktion wurden die Zellen zweier Löcher gezählt, um die genaue Zellzahl der zu infizierenden Zellen zu bestimmen. Die Virusüberstände wurden zunächst mit der vierfachen Menge Medium verdünnt. Dann wurden 12,5 µl, 5 µl oder 2,5 µl der verdünnten Virusüberstände zu den 500 µl Medium eines Lochs pipettiert, so dass sich finale Verdünnungen von 1:200, 1:500 und 1:1000 der Viruslösungen ergaben. Es wurden Duplikate und Negativkontrollen angesetzt. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen im Medium gelöst, bei 150 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 500 µl 1x PBS aufgenommen. Propidiumiodid (PI) (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde hinzugeben und die Zellen im FACSCanto™ (BD Biosciences) gemessen. Anhand des Anteils GFP-positiver Zellen und folgender Formel konnte der Virustiter der Virusüberstände ermittelt werden:

$$\text{Virustiter} \left[\frac{\text{Viruspartikel}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Anzahl 293T-Zellen} \times \frac{\text{Anteil GFP-positiver Zellen}}{100}}{\text{verwendetes Volumen der Viruslösung (ml)}}$$

2.1.4.3 Infektion mit Viruspartikeln

Die für die Infektion benötigten Zellen wurden am Vortag auf eine optimale Dichte eingestellt, so dass die Zellen am Tag der Infektion in der logarithmischen Wachstumsphase und generell in einem guten Zustand waren. Für die Transduktion wurde die benötigte Anzahl an Zellen bei 150 x g für 5 min zentrifugiert, die Hälfte des konditionierten Mediums abgenommen und die Zellen in der anderen Hälfte des Mediums resuspendiert. Das abgenommene Medium wurde für den nachfolgenden Tag bei 4°C gelagert. Zu den Zellen

wurde eine entsprechende Menge an Virus zugeben, dass eine MOI (*Multiplicity of infection*) von 5-15 erreicht wurde. Dies bedeutet, dass die Zellen mit der fünf bis 15-fachen Menge an infektiösen Viruspartikeln infiziert werden. Zusätzlich wurde Polybrene in einer Konzentration von 10 µg/ml zu den Zellen geben. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von frischem Medium auf ihre optimale Zelldichte eingestellt und für 24 Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem die Zellen für 5 min bei 150 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend das gleiche Volumen bestehend zur Hälfte aus dem konditionierten Medium des Vortages und zur anderen Hälfte aus frischem Medium zu den Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden bis zur Verwendung in den weiteren Experimenten in Kultur gehalten.

2.1.4.4 Sortierung von infizierten Zellen mittels FACS

Durch das im den Vektor enthaltene GFP-Gen war es möglich erfolgreich infizierte Zellen anhand der Expression von GFP zu identifizieren. Dies wurde ausgenutzt, um diese Zellen mit Hilfe der FACSDiva™ zu sortieren (siehe 2.1.3) und somit Proben aus 100% infizierten Zellen für die späteren Analysen zur Verfügung zu haben oder wieder in Kultur zu nehmen.

2.1.4.5 Durchflusszytometrische Analyse des Wachstumsverhaltens infizierter Zellen

Erfolgreich infizierte Zellen konnten ab dem 3. Tag nach der Infektion durch die Detektion von GFP identifiziert werden. Mittels Durchflusszytometrie wurde so der prozentuelle Anteil GFP-positiver Zellen in den Infektionsansätzen gemessen. Diese Messung erfolgte anschließend in regelmäßigen Abständen und ermöglichte so den Rückschluss auf das Wachstumsverhalten der infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Es wurden mindestens 1×10^5 Zellen aus den Infektionsansätzen entnommen und bei 150 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 500 µl 1x PBS/0,5% BSA resuspendiert. Vor der Messung am FACSCanto™ wurde 1 µl PI-Lösung (500 µg/ml) zu den Zellen gegeben. Für die Auswertung wurden die gemessenen GFP-Prozentwerte der unterschiedlichen Tage auf den Wert an Tag 3, Tag 5 oder 6 normalisiert, je nachdem an welchem Tag der höchste Anteil an GFP-positiven Zellen ermittelt wurde.

2.1.4.6 Annexin V-Färbung

Um Zellen zu identifizieren, die sich in einer frühen Phase des Zelltods befinden, wurde eine Färbung mit Annexin V unter Verwendung des *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences) in Kombination mit APC-konjugiertem Annexin V (BD Biosciences) durchgeführt. Hierbei bindet APC-konjugiertes Annexin V an Phosphatidylserin auf der Oberfläche von Zellen, welches sich normalerweise im Inneren der Zelle befindet, allerdings

in einem frühen Stadium des Zelltods externalisiert wird. Für die Färbung wurden 5×10^5 Zellen der rekultivierten sortierten Zellen aus der Kultur entnommen und bei $150 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen in $500 \mu\text{l}$ $1 \times$ PBS/0,5% BSA resuspendiert und wieder bei $150 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ $1 \times$ Annexin V Bindepuffer resuspendiert. Es wurde $1 \mu\text{l}$ APC-konjugiertes Annexin V zugegeben und der Ansatz im Dunkeln für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden $200 \mu\text{l}$ $1 \times$ Annexin V Bindepuffer hinzugefügt. Kurz vor der Messung wurden die Zellen mit $1 \mu\text{l}$ der PI-Lösung des Kits gefärbt. Die Messung erfolgte im FACSCanto™ und die Daten wurden mit Hilfe der Software BD FACSDiva™ Version 5.0.3 (BD Biosciences) ausgewertet.

2.1.4.7 Proliferationsassay

Um die Proliferationsgeschwindigkeit der infizierten Zellen zu bestimmen wurde der Vybrant® DiD Farbstoff verwendet. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff interkaliert in die Zellmembran und färbt Zellen in durchflusszytometrischen Analysen gleichmäßig an. Bei der Zellteilung wird der Farbstoff in gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt, wodurch die Abnahme der Fluoreszenz-Intensität proportional zur Zellteilungsrate ist. Für die Messung wurden 2×10^5 Zellen verwendet. Nach Zentrifugation bei $150 \times g$ für 5 min und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml serumfreiem Medium aufgenommen. Es wurden $5 \mu\text{l}$ Vybrant® DiD Cell-Labeling Solution (Life Technologies) zu den Zellen gegeben und der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei $150 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend 3-mal mit 1 ml warmen RPMI-Medium mit 10% FCS gewaschen, indem die Zellen darin resuspendiert, bei $150 \times g$ für 5 min zentrifugiert wurden und der Überstand abgenommen wurde. Danach wurden die Zellen in ihrer optimalen Zelldichte und ihren bevorzugtem Medium resuspendiert und kultiviert. Nach 10 min wurde ein Aliquot ($100 \mu\text{l}$) abgenommen und im FACSCanto™ gemessen, um den Startpunkt der Färbung mit der maximalen Intensität zu bestimmen. Dabei wurde zusätzlich das GFP-Signal gemessen, um erfolgreich infizierte Zellen zu identifizieren. In den nachfolgenden Tagen wurden die gefärbten Zellen kultiviert und in regelmäßigen Abständen erneut im FACSCanto™ gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software Version 7.6.5 (FlowJo Enterprise). Für die Auswertung wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des DiD-Signals an den verschiedenen Tagen ermittelt und zum MFI-Wert an Tag 0 der jeweiligen Zellpopulation normalisiert. Somit korreliert die Abnahme der Fluoreszenz mit dem Ausmaß der Proliferation der Zellen.

Zur Ermittlung der Signifikanzen der Abnahme des DiD-Signals zwischen den shMYC1- oder shMYC2-exprimierenden Zellen und der ScrMYC-Kontrolle wurden pro Population die Werte der MFI-Änderungen an einem gleichen Tag nach den Infektionen und ein zweiseitiger

gepaarter T-Test verwendet. Die gepaarte Version des T-Tests wurde ausgewählt, weil in einer Infektion die gleichen Zellen, d.h. gleiches Alter und Zustand der Zellen, für die verschiedenen Bedingungen benutzt wurden und die Infektionen und anschließenden Messungen parallel erfolgten. Daher wurden durch Verwendung des gepaarten T-Tests eventuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Infektionen besser ausgeglichen.

2.2 Arbeiten mit Primärgewebe

2.2.1 Primäre Lymphknotenbiopsate

Die in dieser Arbeit verwendeten Lymphknotenbiopsate von Patienten mit cHL wurden von Prof. Hansmann, Leiter des Senckenbergischen Instituts für Pathologie an der Universitätsklinik Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt. Die Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke und im Besonderen zu genomweiten Analysen erfolgte mit Abstimmung der lokalen Ethikkommission. Jeder Patient wurde aufgeklärt und willigte in die Verwendung des Gewebes ein.

2.2.2 Färbung von Gewebeschnitten

Es wurden Gefrierschnitte von Lymphknotenbiopsaten mit Dicken von 5 – 7 µm von Mitarbeitern des Senckenbergischen Instituts für Pathologie an der Universitätsklinik Frankfurt am Main angefertigt und auf Membran-bespannte Objektträger aufgebracht. Abhängig von der späteren Verwendung wurden die Gewebeschnitte entweder immunhistochemisch oder mit einer Hämalaun- und Eosin-Färbung gefärbt. Für die Verwendung zur Mikrodisektion von Zellen, die später in der Gesamtgenomamplifizierung (WGA) eingesetzt wurden, erfolgte eine schnelle Färbung der Schnitte mit Hämalaun und Eosin. Dafür wurden die Schnitte zunächst für 10 min in 100% EtOH, welches zuvor auf 4°C abgekühlt worden war, fixiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden getrocknet und dann mit einer sauren Hämalaun-Lösung nach Mayer, die mit 40 U/ml Rnase Inhibitor, dem *Protector RNase Inhibitor* (Roche, Mannheim, Deutschland), komplementiert wurde, überschichtet. Nach einer Inkubation von 5 min wurden die Schnitte 3-mal mit DEPC-behandeltem Wasser gewaschen. Es folgte die Färbung mit 2% Eosin-Lösung für 45 s und eine dreimalige Waschung mit DEPC-behandeltem Wasser. Die Schnitte wurden anschließend kurz in 100% EtOH getaucht, getrocknet und in der Mikrodisektion verwendet.

Für die Mikrodisektion der Zellen zur Validierung der in den Exom-Sequenzierungen gefundenen Mutationen wurden die Gefrierschnitte mit dem *Super Sensitive Link-Label IHC Detection System* (BioGenex, Fremont, CA, USA) gefärbt. Dafür wurden die Schnitte zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder für 30 min bei 37°C auf einer Heizplatte getrocknet. Anschließend wurden die Schnitten für 10 min in Aceton fixiert und anschließend

für 10 min bei 37°C getrocknet. Der Primärantikörper wurde 1:100 mit 1x TBS/5% BSA verdünnt und die Schnitte mit dieser Lösung bedeckt. Nach einer Inkubation von 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit 1x TBS abgespült, um die Primärantikörper-Lösung zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit der sogenannten *Link-Lösung* des *Super Sensitive Link-Label IHC Detection System*, die 30 min vor Gebrauch nach Herstellerangaben angesetzt wurde, überschichtet und die Schnitte in einer feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der *Link-Lösung* handelt es sich um einen biotinylierten Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut mit 1x TBS gewaschen und die *Label-Lösung*, die auch 30 min vor Gebrauch nach Herstellerangaben angesetzt wurde, auf die Schnitte gegeben. Die *Label-Lösung* enthält Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase, die an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur und erneutem Waschen mit 1x TBS erfolgte die Detektion des Antikörper-Enzym-Komplexes durch Zugabe des *Permanent Red Substrate-Chromogen, Liquid* (Dako, Hamburg, Deutschland), welches zuvor nach Anleitung vorbereitet worden war. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und bei ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Waschen der Schnitte mit destilliertem Wasser gestoppt. Anschließend wurden die Zellkerne mit einer Hämalaun-Färbung nach Mayer gegengefärbt, indem die Schnitte mit der sauren Hämalaun-Lösung nach Mayer für 2 min überschichtet wurden, dann für 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und schließlich die Reaktion mit destilliertem Wasser gestoppt wurde. Die Schnitte wurden für 2 Stunden auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet, bevor sie in der Mikrodissektion verwendet wurden.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper zur immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten

Name (Klon)	Spezies	Hersteller (Katalognummer)
Anti-CD30 (BerH2)	Maus	Dako
Anti-CD3 (polyclonal)	Maus	Dako (#20011828)

2.2.3 Lasermikrodissektion zur Isolierung von Zellen aus Gewebeschnitten

Die Lasermikrodissektion wurde am Senckenbergischen Institut am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt. Es wurde das *PALM MicroBeam System* von Zeiss (Jena, Deutschland) verwendet. Generell erfolgte die Mikrodissektion bei einer 40-fachen Vergrößerung und der Software-Einstellung RoboLPC. Die Isolierung der HRS- und der NT-Zellen, die später in der WGA eingesetzt werden sollten, erfolgte an HE-gefärbten Gewebeschnitten. Hierbei erfolgte die Identifizierung der HRS-Zellen durch ihre charakteristische Morphologie, wie z.B. ihrer enormen Größe und Mehrkernigkeit, unter Anleitung eines erfahrenen Pathologen. Die NT-Zellen wurden dementsprechend als nicht HRS-Zellen identifiziert und gesammelt. Für die Mikrodissektion wurden sogenannte

AdhesiveCap 200 opaque PCR-Gefäße (Zeiss) verwendet. Die Deckel dieser 200 µl Reaktionsgefäße sind mit opakem Haftmittel gefüllt und erlauben eine Puffer-freie Dissektataufnahme. Für die WGA wurden je 2000 bis 3000 HRS- und NT-Zellen in Reaktionsgefäße gesammelt. Dabei wurden die HRS-Zellen einzeln mikrodisektiert, wohingegen die NT-Zellen meist in Gruppen von 5-20 Zellen isoliert werden konnten. Für die Mikrodisektion der Zellen, die zur Validierung der in den Exom-Sequenzierungen-gefunden Mutationen verwendet wurden, wurde das sogenannte „Naß“-Verfahren zur Dissektataufnahme gewählt. Dafür wurde zunächst der *Expand High Fidelity Puffer (10x) ohne MgCl₂* des *Expand High Fidelity PCR Systems* von Roche 1:10 mit Wasser verdünnt und diesem 0,1% Triton-X zugefügt, um die Oberflächenspannung des Puffers zu verringern. Es wurden 20 µl des Puffers in die Deckel von 500 µl Reaktionsgefäßen vorgelegt und diese dann in der Mikrodisektion zum Sammeln der mikrodisektierten Zellen verwendet. Um die HRS-Zellen spezifischer identifizieren zu können, wurden CD30-gefärbte Gewebeschnitte verwendet. Zusätzlich diente die Morphologie der HRS-Zellen als zusätzliches Auswahlkriterium. Für die NT-Zellen wurden CD3-gefärbte Gewebeschnitte verwendet. Es wurden 10 Zellen pro Reaktionsgefäß gesammelt. Hierbei wurden die HRS-Zellen wiederum einzeln und die NT-Zellen in Gruppen von je 5-10 Zellen mikrodisektiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit 12000 x g zentrifugiert. Zusätzlich zu den Zellproben wurden bei jeder Mikrodisektion Stücke der leeren Membran in separaten Reaktionsgefäßen gesammelt. Diese dienten in späteren Analysen als Negativkontrollen. Die Lagerung aller mikrodisektierten Proben erfolgte bei -20°C.

2.3 RNA-Arbeitstechniken

2.3.1 RNA-Isolierung

Zur Isolation der RNA aus sortierten Zellen wurde das *RNeasy Micro Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland), einschließlich des optionalen Schritts des DNA-Verdau, nach Herstellerangaben verwendet. Für die Elution der RNA wurden 20 µl RNase-freies Wasser verwendet. Die Isolation aus größeren Zellmengen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zur Homogenisierung wurden die *QIAshredder* (Qiagen) verwendet und der optionale Schritt des DNA-Verdau wurde durchgeführt. Zur Elution wurden 40 µl RNase-freies Wasser verwendet.

2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration einer Probe wurde der *NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer* (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Messung der optischen Dichte (OD) bei Wellenlänge 260 nm. Eine OD von 1 bei Wellenlänge 260 nm entspricht 40 µg/ml RNA. Mit

Hilfe folgender Formel wird die RNA-Konzentration automatisch durch den *NanoDrop*® ermittelt:

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $\text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

Zusätzlich wird im *NanoDrop*® die OD bei 280 nm bestimmt, da der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} ein Maß für Verunreinigung mit Proteinen, genomischer DNA oder aromatischen Substanzen ist. Ein Verhältnis von ungefähr 2,0 zeigt reine RNA an, während Werte unter 2 Verunreinigungen induzieren.

2.3.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Life Technologies mit zufälligen Hexamer-Oligonukleotiden nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich zu den Proben wurden sogenannte Minus-RT-Kontrollen, bei der dem Ansatz keine Reverse Transkriptase zugefügt wird, und eine Wasser-Negativkontrolle, die anstatt RNA nur Wasser enthielt, angesetzt. Die cDNA wurde 1:200 mit Wasser verdünnt.

2.4 DNA-Arbeitstechniken

2.4.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Zellkultur-Zellen wurde das *Gentra Puregene Cell Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.2 Klonierungsarbeiten

Die Klonierung beschreibt die Herstellung und Vervielfältigung identischer Moleküle der DNA. Sie wurde in dieser Arbeit verwendet um pViG- und LeGO.G-Vektoren mit spezifischen shRNA-Expressionskassetten herzustellen, die shRNA gegen die mRNA von Interesse codieren und die Expression dieser durch den H1-Promotor kontrolliert. Dazu wurden die gekauften und zueinander-komplementären Oligonukleotide zunächst hybridisiert, durch Phosphorylierung der 3' Enden vorbereitet und anschließend in den pSUPER-Vektor kloniert. Nach Transformation in Bakterienzellen und Amplifizierung des entstandenen pSUPER-Vektors, wurde das DNA-Fragment (*Insert*), welches den H1-Promotor des pSuper-Vektors und die shRNA enthielt, mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten und in den pViG- oder LeGO.G-Vektor umklont. Dieser Vektor wurde mittels Transformation wiederum in Bakterienzellen gebracht, amplifiziert und für die Herstellung der lentiviralen Partikel verwendet.

Tabelle 3: Für die Klonierung verwendete Plasmide

Name	Quelle
LeGO.G	Boris Fehse (Addgene plasmid # 27347) (Weber et al., 2008)
pHIT/g	(Fouchier <i>et al.</i> , 1997)
pMD2.G	Didier Trono (Addgene plasmid # 12259) (Dull et al., 1998)
psPAX2	Didier Trono (Addgene Plasmid # 12260)
pSUPER	(Brummelkamp et al., 2002)
pViG	(Schnell <i>et al.</i> , 2000)
Δ SP2	(Schnell <i>et al.</i> , 2000)

2.4.2.1 Oligonukleotid-Hybridisierung

Zur Herstellung eines passenden *Insert* für den pSUPER Vektor, wurden die zueinanderkomplementären Oligonukleotide hybridisiert. Dafür wurden je 5 μ l Oligonukleotide (200 μ M) mit 30 μ l Hybridisierungs-Puffer, der aus 100 mM Kaliumacetat, 2 mM Magnesiumacetat und 30 mM Hepes/KOH pH 7,6 bestand, gemischt. Der Ansatz wurde in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm inkubiert: (95°C 4 min, 70°C 10 min, Gradient: T= -0,01°C/Sekunde, 4°C Pause). Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Es entstanden doppelstränge DNA-Fragmente mit HindIII- und BglII-Überhängen, die für die jeweiligen shRNAs kodierten.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung shRNA-kodierender pViG- und LeGO.G-Vektoren

Konstrukt	Sequenz (5' \rightarrow 3')*	Quelle der Zielsequenz
shCEBPB1	GATC ATCCATGGAAGTGGCCA ACTT <u>TCAAGAG</u> AAGTTGGCCACTTCCATGGAT TTTT AGCT AAAAA ATCCATGGAAGTGGCCA <u>CTCTTGA</u> AAGTTGGCCACTTCCATGGAT	Mit siRNA Wizard v3.1 (InvivoGen, Toulouse, Frankreich) entworfen
shCEBPB2	GATC GAAGACCGTGGACAAGCACAG <u>TCAAGAG</u> CTGTGCTTGTCCACGGTCTTC TTTT AGCT AAAAA GAAGACCGTGGACAAGCACAG <u>CTCTTGA</u> CTGTGCTTGTCCACGGTCTTC	Mit siRNA Wizard v3.1 (InvivoGen) entworfen
shCEBPB3	GATC AACCAACCGCACATGCAGATG <u>TCAAGAG</u> CATCTGCATGTGCGGTTGGTT TTTT AGCT AAAAA AACCAACCGCACATGCAGATG <u>CTCTTGA</u> CATCTGCATGTGCGGTTGGTT	Mit siRNA Wizard v3.1 (InvivoGen) entworfen
ScrCEBPB	GATC GAGAGACCGGACACGAAGACT <u>TCAAGAG</u> AGTCTTCGTGTCCGGTCTCTC TTTT AGCT AAAAA GAGAGACCGGACACGAAGACT <u>CTCTTGA</u> AGTCTTCGTGTCCGGTCTCTC	Durchmischte Zielsequenz der shCEBPB2 mit siRNA Wizard v3.1 (InvivoGen) entworfen
shMYC1	GATC CCTATGAACTTGTTTCAAATG <u>TCAAGAG</u> CATTGAAACAAGTTCATAGG TTTT AGCT AAAAA CCTATGAACTTGTTTCAAATG <u>CTCTTGA</u> CATTGAAACAAGTTCATAGG	(Shaffer <i>et al.</i> , 2008)

shMYC2	GATC CGATTCCTTCTAACAGAAATG <u>TCAAGAG</u> CATTCTGTTAGAAGGAATCG TTTT AGCT AAAAA CGATTCCTTCTAACAGAAATG <u>CTCTTGA</u> CATTCTGTTAGAAGGAATCG	(Shaffer <i>et al.</i> , 2008)
shMYC3	GATC CCTGAGACAGATCAGCAACAA <u>TCAAGAG</u> TTGTTGCTGATCTGTCTCAGG TTTT AGCT AAAACCTGAGACAGATCAGCAACAA <u>CTCTTGA</u> TTGTTGCTGATCTGTCTCAGG	Mit siRNA Wizard v3.1 (InvivoGen) entworfen
ScrMYC	GATC GATCTCGATATCTAAGCTATT <u>TCAAGAG</u> AATAGCTTAGATATCGAGATC TTTT AGCT AAAAA GATCTCGATATCTAAGCTATT <u>CTCTTGA</u> AATAGCTTAGATATCGAGATC	Durchmischte Zielsequenz der shMYC1 mit siRNA Wizard v3.1 (InvivoGen) entworfen

*Die Zielsequenz der shRNA ist fett und die Sequenz der Schleife der shRNA ist unterstrichen dargestellt.

2.4.2.2 DNA-Phosphorylierung

Um die bei der Hybridisierung der Oligonukleotide-entstandenen DNA-Fragmente erfolgreich ligieren zu können, mussten deren 5'-Enden phosphoryliert werden. Dafür wurde die T4-Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.2.3 Dephosphorylierung von DNA

Die für die Ligation verwendeten Vektoren wurden zuvor einer Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden unterzogen, um so die sogenannte Religation der Vektoren zu verhindern. Es wurde die *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)* (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.2.4 Restriktionsverdau

In dieser Arbeit wurden die *FastDigestTM*-Restriktionsenzyme von Life Technologies verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach der Reaktion wurden die Ansätze durch Gelelektrophorese untersucht und ggf. die gewünschten Fragmente ausgeschnitten und aufgereinigt. Folgende Restriktionsenzyme wurden in den verschiedenen Verdauungen verwendet: BamH1, BglII, EcoRI, HindIII, NotI, Sall, SpeI, XbaI, XhoI.

2.4.2.5 Ligation

Die Ligation beschreibt die Verknüpfung zweier DNA-Moleküle durch eine Enzymreaktion. Hier wurde sie verwendet, um die Inserts in die zuvor geschnittenen Plasmide einzubringen. Es wurde die T4 Ligase mit dem „*Rapid Ligation*“-Protokoll von Life Technologies benutzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert in der Ligation war 1:3. Für die Berechnung der einzusetzenden Mengen der Inserts wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Menge des Insert in ng} = 3 \times \left[\frac{\text{Länge des Inserts in bp}}{\text{Länge des Plasmids in bp}} \right] \times \text{Menge des Plasmids in ng}$$

2.4.2.6 Hitzeschock-Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen

Für die Transformation wurden die chemisch-kompetenten *XL1-Blue* Bakterienzellen (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Die Durchführung erfolgte größtenteils nach Herstellerangaben. Abweichend wurden 30 µl Bakterienzellen mit 2 µl Ligationsansatz gemischt, nach dem Hitzeschock 5 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend in 300 µl SOC-Medium aufgenommen. Es wurden 100 µl auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien aufgenommen und in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Die Ansätze wurden für mind. 12 Stunden bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert. Diese sogenannten Vorkulturen wurden für die Plasmid-Präparationen verwendet.

2.4.2.7 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab wurde mit Hilfe des Puffersystems des *NucleoBond® PC 500 Kits* (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt: Es wurden 1,5 ml der am Vortag angesetzten Vorkulturen, die mit einzelnen Kolonien inokuliert wurden, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl Resuspensionspuffer (S1-Lösung) aufgenommen. Durch Zugabe von 300 µl Lysepuffer (S2-Lösung), der zuvor mit 100 µg/ml RNase versetzt wurde, und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zellyse. Anschließend wurden 300 µl Neutralisationspuffer (S3-Lösung) zugegeben und das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 14000 x g für 15 min wurden die ausgefällten Proteine von der wässrigen Phase, die die gewünschten Plasmide enthielt, getrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation bei 14000 x g für 30 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 14000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 40 µl Wasser aufgenommen.

Die Isolation größerer Plasmidmengen wurde mit dem *NucleoBond® PC 500 Kit* (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Produktion von Endotoxin-freien Plasmiden für die Virusproduktion wurde das *NucleoBond® Xtra Maxi EF Kit* (Macherey und Nagel) nach Anleitung verwendet.

Die Plasmide wurden anschließend durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Analyse mittels Gelelektrophorese oder Sequenzierung auf ihre Richtigkeit und ggf. dem korrektem Insert überprüft.

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstocks mit pGIPZ.Plasmiden von GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)

Name	Herstellerbezeichnung	Sequenz der reifen antisense RNA (5' → 3')
pGIPZ.non_silencing	RHS4346	
pGIPZ.shCEBPB1	V2LHS_48323	TTATCATTTCATCTGTACAC
pGIPZ.shCEBPB2	V2LHS_245072	TCCATGGATTTAAAGGCAG
pGIPZ.shCEBPB3	V3LHS_371451	TCCGCAGGGTGCTGAGCTC
pGIPZ.shCEBPB4	V3LHS_371448	TGAACAAGTTCCGCAGGGT
pGIPZ.shCEBPB5	V3LHS_371449	GCTTGAACAAGTTCCGCAG
pGIPZ.shMYC1	V2LHS_152050	TTGCTCCTCTGCTTGGACG
pGIPZ.shMYC2	V2LHS_152051	TTGTGTTTCAACTGTTCTC
pGIPZ.shMYC3	V2LHS_152053	TCCTTACGCACAAGAGTTC
pGIPZ.shMYC4	V3LHS_365622	TCATTGTTTTCCAACCTCCG
pGIPZ.shMYC5	V3LHS_365618	TTTTTAAGGATAACTACCT
pGIPZ.shMYC6	V3LHS_365620	AGTCGAGGTCATAGTTCCT
pGIPZ.shMYC7	V3LHS_365619	TAAGGATAACTACCTTGGG
pGIPZ.shMYC8	V3LHS_365617	TCCACAGAAACAACATCGA

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.4.3.1 Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA

Um die erfolgreiche und gleichmäßige Amplifikation des Genoms in der WGA zu überprüfen, wurde in Anlehnung an Hou et al. 2012 eine Multiplex-PCR für mehrerer Produkte verschiedener Chromosomen durchgeführt (Hou *et al.*, 2012). In diesem modifizierten Protokoll wurden stellvertretend acht Produkte mit unterschiedlichen Längen von verschiedenen Chromosomen amplifiziert, um den Erfolg der WGA zu bemessen. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet. Zunächst wurde ein Oligonukleotid-Mix hergestellt, indem die in Tabelle 6 angegebenen Volumina von 10 µM-Lösungen der verwendeten Oligonukleotide gemischt wurden. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit Ausnahme der *Taq*-DNA-Polymerase, wie in Tabelle 7 angegeben, angesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit der sogenannten „Hot-Start“-Methode gestartet. Dies bedeutete, dass der Reaktionsansatz zunächst für 4 min bei 95°C inkubiert wurde, um die DNA und Oligonukleotide zu denaturieren. Anschließend wurde bei einer Temperatur von 85°C 0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase (Thermo Scientific) dem Reaktionsgemisch zugegeben. Es folgten 35 Wiederholungen der Temperaturschritte 95°C für 30 s, 56°C für 50 s und 72°C für 1 min und anschließend eine Inkubation von 10 min bei 72°C. Die Proben wurden bis zur Analyse mittels Gelelektrophorese mit einem 2%igen Agarosegel (2.4.4) bei 4°C gelagert. Damit die WGA-Proben in der Exom-Sequenzierung verwendet werden konnten, mussten mindestens sechs der acht Produkte positiv sein. Zusätzlich zu den WGA-Proben wurden Reaktionsansätze mit 50 ng DNA der Zelllinie L-1236 als Positivkontrolle und mit Wasser anstatt DNA als Negativkontrollen angesetzt.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide in der Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA

Chromosom	Gen	Sequenz (5' → 3')	Länge des Produktes [in bp]	Volumina von 10 µM-Lösungen im Oligonukleotid-Mix [in µl]
18	CYB5A	CTGCCCTTGGCCTAACTAACCT	998	40
		GGCAACGCTTAGACTCTGTGTG		40
12	PRPH	G TTCCTCAAGAAGCTGCACGAG	744	24
		C GTTAGACTCTGGATCTGGCGT		24
16	GABARAPL2	CCAGCCAATTCATGAGTCGGTG	595	20
		CCTGACAACCTCGCAAGTAGCAC		20
17	ACTG1	GTGGACGTTACGTAAAAGGCC	485	36
		GCTCAATGGGGTACTTCAGGGT		36
19	NDUFA7	TTCCAGGTAAATCCAGCCCAGG	405	12
		TGCTCTGGATGTGAAGATGCCA		12
3	UQCRC1	GAAAGCCGGATTGCGGTAACAT	315	16
		CAGCCAGTCAGCATCATCCAAC		16
8	MYC	GGATAGCTCTGCAAGGGGAGAG	214	16
		TCGTCGCAGTAGAAATACGGCT		16
22	MIF	AGAAGTCAGGCACGTAGCTCAG	113	16
		GGCACGTTGGTGTTCACGATGA		16

Tabelle 7: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA

Volumen [in µl]	Reagenz	Hersteller
0,8	dNTPs (10 mM)	Thermo Scientific
3	10x PCR-Puffer mit KCl	Thermo Scientific
3	Oligonukleotid-Mix	
2,5	<i>Purified</i> BSA 100x	NEB
2,4	25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific
17	Wasser	Roth
1	50 ng WGA-Produkt	
0,3	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Thermo Scientific

2.4.3.2 PCR zur Validierung gefundener Mutationen in der Exom-Sequenzierung

Für die Validierung repräsentativer Mutationen der Exom-Sequenzierung dreier verschiedener Fälle wurden sogenannte „*semi-nested*“-Multiplex-PCRs mit 10-Zellproben mikrodissektierter HRS- und NT-Zellen verwendet. Bei einer „*semi-nested*“-PCR handelt es sich um eine Zwei-Runden-PCR, bei der das Produkt einer ersten PCR als Startmaterial (*Template*) für eine weitere Amplifikation verwendet wird, bei der aber ein Oligonukleotid der vorherigen PCR mit einem weiter innen liegendem Oligonukleotid ausgetauscht wird. So wird die Spezifität der PCR für das richtige Produkt erhöht. Um Probenmaterial zu sparen, wurden in den ersten Runden mehrere Produkte in einem Ansatz amplifiziert, die in den 2. Runden in einzelnen Reaktionsansätzen aufgeteilt wurden. Zur Auswahl der Oligonukleotide wurde das

„Primer-Blast“-Programm von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 dargestellt. Für Fall 2921 wurde ein Oligonukleotid-Mix für die Erste Runde mit einer Endkonzentration von 0,8 μM pro Oligonukleotid angefertigt. Für die Fälle 3049 und 3306 wurden die sieben bzw. acht Produkte auf zwei Erstrunden-Ansätze mit einer Oligonukleotid-Konzentration von 0,125 μM für jedes Oligonukleotid aufgeteilt (siehe Tabelle 8). Vor der PCR wurden die 10-Zellproben zunächst mit 0,25 mg/ml Proteinase K (Roche) für 3 Stunden bei 55°C inkubiert, gefolgt von 5 min bei 95°C, um die Proteinase K zu inaktivieren. In der ersten Runde der PCR wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) verwendet. Für Fall 2921 und 3306 wurde eine MgCl_2 -Konzentration von 2,5 mM und für Fall 3049 eine von 3,5 mM in der ersten Runde der PCR verwendet. Die genauen Reaktionsansätze sind in Tabelle 9 angegeben. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Ansätze mit ein bis zwei Tropfen Mineralöl überschichtet. Die PCRs wurden mit der „Hot-Start“-Methode gestartet, indem die Reaktionsansätze zunächst für 5 min bei 95°C inkubiert wurden, bevor der *Expand High Fidelity Enzym-Mix* (Roche) bei einer Temperatur von 85°C dem Reaktionsgemisch zugegeben wurde. Für die PCR des Falles 2921 folgten 35 Wiederholungen der Temperaturschritte 95°C für 30 s, 62°C für 30 s und 72°C für 1 min, wohingegen für die PCRs der Fälle 3049 und 3306 35 Wiederholungen der Temperaturschritte 95°C für 30 s, 60°C für 30 s und 72°C für 1 min durchgeführt wurden. Anschließend folgten eine Inkubation von 10 min bei 72°C und die Lagerung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung. In der zweiten Runde wurde die *Taq*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific mit passendem Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze wurden wie in Tabelle 10 angegeben angesetzt. Somit wurde eine MgCl_2 -Konzentration von 2,5 mM und 3,5 mM für die zweiten Runden der Fälle 2921 und 3306 bzw. des Falls 3049 verwendet. Es wurde folgendes PCR-Programm für alle drei Fälle verwendet: 95°C für 5 min, 40x (95°C für 30 s, 60°C für 30 s und 72°C für 1 min), und 72°C für 10 min. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, aus diesem aufgereinigt und anschließend sequenziert. Zusätzlich zu den 10-Zellproben der HRS- und NT-Zellen wurden diverse Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Gepickte Membrankontrollen und Ansätze mit Wasser anstatt DNA dienten als Negativkontrollen. Zur Verfügung gestellte 10- und 50-Zellproben einer lymphoblastoiden Zelllinie (CB-6-3) in 20 μl 1x *Expand High Fidelity* Puffer (10x) ohne MgCl_2 wurden als Positivkontrollen verwendet. Zusätzlich wurde der Mutationsstatus der WGA-Produkte mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Dafür wurden 50 ng des WGA-Produktes mit den Protokollen der 2. Runden verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur Validierung ausgewählter Mutationen der Fälle 2921, 3049 und 3306

Name des Oligonukleotids	Sequenz (5'→3')	Oligonukleotid-Mix	Verwendung
CTSB_For1	GTGAGCCCTCGACCCACATAAC	2921_I	1. Runde
CTSB_For2	TCCTGATGCCCTCTGTCTCTCTC		2. Runde + Sequenzierung
CTSB_Rev	CATACATAGGACGCAGCCCCAC	2921_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
IL17RB_For1	TGACGTCAACAGTGTGTGCGAT	2921_I	1. Runde
IL17RB_For2	ACAATGCTCTCAGTGTCTGCCC		2. Runde + Sequenzierung
IL17RB_Rev	AGGTCTCTTGCTTCTCATGGGT	2921_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
MSN_For1	AGCCATTGACCTCTGTGTTCCC	2921_I	1. Runde
MSN_For2	CATCCTCACAGGCCCTCACTTC		2. Runde + Sequenzierung
MSN_Rev	CAGGGCTGCTCTAGTTAGTGGC	2921_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
RFX7_For	TAGTATTTCTGCTGCGGGAGGC	2921_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
RFX7_Rev1	AGCGATATCAGGTTGTCTTCTGAGC	2921_I	1. Runde
RFX7_Rev2	TTTGATCCAGGTCGTCAGCAGG		2. Runde + Sequenzierung
SCAPER_For1	TCTATCCTTGCTTTCTCTGCTGGA	2921_I	1. Runde
SCAPER_For2	ACTTGTAAGGAGGTGTACCAGC		2. Runde + Sequenzierung
SCAPER_Rev	TCTGTCATCCAGTCAAGTACCTCT	2921_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
SLC4A3_For1	GGCACACCAGGAGAAAGAGGAAG	2921_I	1. Runde
SLC4A3_For2	GAAAACCTCTGCTCCTCCCTCC		2. Runde + Sequenzierung
SLC4A3_Rev	ACCATACAGCCCCCAACCCTAC	2921_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
DOX5_For	ACTAACCTTTTGTCTTCTCCCAGAG	3049_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
DOX5_Rev1	TCATTAAACTCACCTCCCTGCCTC	3049_I	1. Runde
DOX5_Rev2	TGAACCACGTAGTATCACGTCC		2. Runde + Sequenzierung
DROSHA_For	AATTTACAATCAGGGGCACTCATCCAG	3049_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
DROSHA_Rev1	ATGTCTTCAGTCTCATCTGGCTCTC	3049_I	1. Runde
DROSHA_Rev2	CTCTCTCTTGATGCTCTCTTTCCCAC		2. Runde + Sequenzierung
IL17RB_For1	AACCATTGCAGAAGTGAGGTCATCC	3049_I	1. Runde
IL17RB_For2	AAAATAGCAGAGATGGGTCCAGTGC		2. Runde + Sequenzierung
IL17RB_Rev	AGGTTAAAGGCAAGGGGAAGAGG	3049_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
IRAK2_For1	TCAGCACCTCCATTCCCTAAGCAG	3049_II	1. Runde
IRAK2_For2	CCTTTTCTGGAGTGAGGCAGACG		2. Runde + Sequenzierung
IRAK2_Rev	AGAACATGAAGATCCCGCCCCAC	3049_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung

MAP4K3_For	CTTTAAGTATTTCTAGGTCTAAGGCTG	3049_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung
MAP4K3_Rev1	GACAGCATGGCAACGAGATTTCC	3049_II	1. Runde
MAP4K3_Rev2	CGTCTTAGGAGAGGGAAAACCTG		2. Runde + Sequenzierung
MAP4K4_For	CCTCACCTCATTAGTGTCCACCTG	3049_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung
MAP4K4_Rev1	TCCCCAGCTCTGCAAAGTAAC	3049_II	1. Runde
MAP4K4_Rev2	GCCTGCTATGTTATCTGTGAACTAACC		2. Runde + Sequenzierung
NFKBID_For	GACTCCTGGATTCTGTGGGAGG	3049_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung
NFKBID_Rev1	CACACAATCTGCACTTCCCAGCC	3049_II	1. Runde
NFKBID_Rev2	TTGACAAAGGTCCGCAGGTCTC		2. Runde + Sequenzierung
IL6_For1	AGCAGAGGGAAAAGATGTGCGAACTG	3306_I	1. Runde
IL6_For2	CCTCTTAGGAGACTTGCCCTGGTG		2. Runde + Sequenzierung
IL6_Rev	TGAGGACACACCCACCTTTTTCTG	3306_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
ITPKB_For	AGCGAGGAACGGAGGACAAAGTC	3306_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
ITPKB_Rev1	ATTTCCATAGCTGTGGGTGAGCC	3306_I	1. Runde
ITPKB_Rev2	ACAAAAGCGGATGGACCCTGAG		2. Runde + Sequenzierung
PTGER4_For1	CTCCGCATGCACCGCCAGTTC	3306_I	1. Runde
PTGER4_For2	CGCGCCTCAGCGACTTTCGG		2. Runde + Sequenzierung
PTGER4_Rev	TGCGAGAAAAGGCCGAGTAGGG	3306_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
RANBP2_For1	CATTGCGTGTGAGAATACAAAATCTGC	3306_I	1. Runde
RANBP2_For2	AAAAGTGGATCTTCATTTGTTTCATCAAGC		2. Runde + Sequenzierung
RANBP2_Rev	ATCCACTTTTTAGAGTTTTACTTGTCTCTG	3306_I	1. + 2. Runde + Sequenzierung
TP53BP1_For1	GGCTTTTGCTGAGGCAATGGTG	3306_II	1. Runde
TP53BP1_For2	GAGAGTTTGTGAGCCCCTGTGAG		2. Runde + Sequenzierung
TP53BP1_Rev	AGGCCTTACCCTCCTCTTCTTAC	3306_II	
TXNRD1_For1	CAAGGGAGTCAACAGAGGGCAC	3306_II	1. Runde
TXNRD1_For2	CGGGGGAGAAGCACCTTACAC		2. Runde + Sequenzierung
TXNRD1_Rev	TTAAAAGGCAGGCTGTGACCACG	3306_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung
B2M_For	TATAAGTGGAGGCGTCGCGCTG	3306_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung
B2M_Rev1	CGGGCCACCAAGGAGAACTTG	3306_II	1. Runde
B2M_Rev2	AAGTCACGGAGCGAGAGAGCAC		2. Runde + Sequenzierung
SOCS1_For	ATTCCGTTGCGACGCCGATTAC	3306_II	1. + 2. Runde + Sequenzierung
SOCS1_Rev1	CGGCTGCCATCCAGGTGAAAG	3306_II	1. Runde
SOCS1_Rev2	GCCTGAAAGTGCACGCGGATG		2. Runde + Sequenzierung

Tabelle 9: Reaktionsansätze der 1. Runde der „semi-nested“-Multiplex-PCR zur Validierung ausgewählter Mutationen der Fälle 2921, 3049 und 3306

Reagenz	Hersteller	Volumen für Fall 2921 [in µl]	Volumen für Fall 3049 [in µl]	Volumen für Fall 3306 [in µl]
dNTPs (2 mM)	Thermo Scientific	5	5	5
<i>Expand High Fidelity</i> Puffer (10x) ohne MgCl ₂	Roche	3	-	3
<i>Expand High Fidelity</i> Puffer (10x) mit MgCl ₂	Roche	-	3	-
Oligonukleotid-Mix		3	5	5
25 mM MgCl ₂	Roche	5	5,2	5
Betaine (5 M)		10	10	10
Wasser	Roth	3,5	1,3	1,5
<i>Expand High Fidelity</i> Enzym-Mix	Roche	0,5	0,5	0,5
Proteinase K-verdaute Zellen in 1x PCR-Puffer		20	20	20

Tabelle 10: Reaktionsansätze der 2. Runde der „semi-nested“-Multiplex-PCR zur Validierung ausgewählter Mutationen des Falls 2921, 3049 und 3306

Reagenz	Hersteller	Volumen für Fall 2921 und 3306 [in µl]	Volumen für Fall 3049 [in µl]
dNTPs (2 mM)	Thermo Scientific	3	3
10x PCR-Puffer mit KCl	Thermo Scientific	3	3
Oligonukleotid For + Rev (10 µM)		Je 0,6	Je 0,6
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific	3	4,2
Betaine (5 M)		6	6
Wasser	Roth	12,5	10,3
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Thermo Scientific	0,3	0,3
Produkt der 1. Runde		1	2

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um DNA- oder PCR-Fragmente anhand ihrer Größe zu trennen, anschließend zu analysieren und ggf. gewünschte Produkte isolieren zu können. Es wurden zunächst 1 – 2% TAE-Agarosegele, die mit 10 µl GelRed™ 10000X Stock-Lösung (Biotium, Hayward, CA, USA) pro 100 ml Gel versetzt wurden, vorbereitet. Die Proben wurden ihrem Volumen entsprechend mit 6x *Orange Loading Dye* (Thermo Scientific) gemischt und in die Taschen der fertigen Gele, die zuvor in mit 1x TAE Laufpuffer-gefüllten Gelelektrophoresekammern gelegt wurden, pipettiert. Um die Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurden entsprechende Längenstandards (*O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder ready-to-use*, *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use* (Thermo Scientific), *Lambda DNA/HindIII Marker* (Thermo Scientific)) gemäß Herstellerangaben aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 10-15 V/cm Abstand

der Elektroden für ca. eine Stunde angelegt bis die Banden von Interesse gut aufgetrennt waren. Die Analyse der Banden erfolgte mit Hilfe von UV-Licht.

50 x TAE Puffer: 2 M Tris-Acetat
50 mM EDTA, pH 8,0
Auf 1 L mit ddH₂O auffüllen

2.4.5 Gelextraktion von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten wurde in der Regel mit dem *innuPREP Gel Extraktions Kit* von Analytik Jena nach Herstellerangaben durchgeführt. Da die DNA-Fragmente, die als *Insert* in der Ligation verwendet wurden besonders klein waren, wurde für die Gelextraktion das *MinElute Gelextraktions Kit* von Qiagen, das speziell für kleine Größen geeignet ist, nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die direkte Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das *innuPREP PCRpure Kit* von Analytik Jena (Jena, Deutschland) oder für kleine DNA-Fragmente das *MinElute Gelextraktions Kit* (Qiagen) verwendet.

2.4.7 Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden

PCR-Produkte und Plasmide wurden nach der Sanger-Methode auf dem *3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies) sequenziert. Es wurde das *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies) nach leicht modifizierten Herstellerangaben verwendet. In der Regel wurde die der Anleitung entnommenen Menge der zu sequenzierenden Plasmid-DNA oder PCR-Produkte mit 0,5 µl *Ready Reaction Premix*, 2 µl *BigDye Sequencing Buffer* und 3.2 pmol des entsprechenden Oligonukleotids gemischt und die Reaktion auf 20 µl aufgefüllt. Für die Sequenzierung der shRNA-kodierenden Plasmide wurden die zu sequenzierende Plasmid-DNA zunächst durch eine Inkubation bei 95°C für 5 min denaturiert. Dem Sequenzieransatz wurde zusätzlich Betain in einer Endkonzentration von 1 M zugesetzt und es wurde 1 µl des *Ready Reaction Premix* verwendet. Die weitere Durchführung der Sequenzierung erfolgte nach Herstellerangaben. Nach einer Ethanol-Fällung erfolgte die Messung auf dem *3130 Genetic Analyzer*.

Die Sequenzen und Elektropherogramme wurden zunächst manuell begutachtet und bei ausreichender Qualität der Sequenzen wurde ein Vergleich mit der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt, um die Sequenzen zu identifizieren. Für weitere Analysen wurde außerdem die SeqScope v2.5 Software (Applied Biosystems) verwendet.

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung der Plasmide

Name	Sequenz (5' → 3')	Plasmid
LeGO.Seq.For	ACAGTGCAGGGGAAAGAATAG	LeGO.G
LeGO.Seq.Rev2	ATGTACCCGCCCTTGATCTG	
M13_rev	AACAGCTATGACCATG	pSUPER
pSUPER_US	CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGG	
pSUPER_US3	GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG	pViG
pSUPER_LS	ATCACTCTCGGCATGGACGAGC	
CMV_For	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	pGIPZ
pGIPZ_Seq	GATTAAAGCAGCGTATC	

2.4.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe wurden drei Verfahren verwendet. Aufgereinigte DNA-Proben wurden im *NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer* vermessen. Dieser misst die OD bei 260 nm und berechnet die DNA-Konzentration automatisch nach folgender Formel:

Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $\text{OD}_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

Zusätzlich wird im *NanoDrop®* die OD bei 280 nm bestimmt, da der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} ein Maß für die Reinheit der DNA ist. Ein Wert von 1,8 zeigt reine DNA an. Für eine genauere Messung der DNA-Konzentration oder wenn nicht aufgereinigte Proben gemessen werden sollten, wurde der *Qubit Fluorometer* (Life Technologies) zusammen mit dem *Qubit dsDNA HS Kit* (Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung basiert auf der starken Steigerung der Fluoreszenz eines speziellen Farbstoffs bei spezifischer Bindung an doppelsträngiger DNA. Da dieses Fluoreszenzsignal direkt proportional zur DNA-Konzentration ist, kann durch einen Abgleich von Proben mit bekannter DNA-Konzentration die Konzentration der DNA in der analysierten Probe bestimmt werden. Dabei wird die Messung durch Kontaminationen, wie Salze, freie Nukleotide, Lösungsmittel oder Detergenzien generell nicht beeinflusst.

In einigen Fällen wurde die DNA-Konzentration mittels Gelelektrophorese (siehe 2.4.4) und dem Vergleich mit Massenstandards durchgeführt. Hierbei wird ein definiertes Volumen der zu messenden Probe neben einem Massenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Intensitäten der Banden einer Probe wird mit den verschiedenen Intensitäten der Banden des Massenstandards, die verschiedene DNA-Konzentrationen darstellen, verglichen und so die DNA-Konzentration der Probe bestimmt. Es wurde der *Low Mass Ladder* (Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet.

2.4.9 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (quantitative Real-Time PCR, qPCR) ist eine Variante der normalen PCR und ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Menge innerhalb einer Probe. In dieser Arbeit wurden die TaqMan[®]-qPCR- und SYBR Green-qPCR-Methoden verwendet. Bei der TaqMan[®]-qPCR erfolgt die Amplifizierung der zu messenden DNA durch Verwendung

zweier zum Ziel-DNA-Strang komplementärer Oligonukleotide und deren Verlängerung durch die *AmpliTaq Gold*[®]-DNA-Polymerase. Das Besondere ist, dass das Gemisch zusätzlich eine Sonde enthält, die komplementär zu einem Bereich innerhalb der zu amplifizierenden DNA bindet. Diese Sonde trägt an ihrem 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff, den Reporter, dessen Signal aber durch einen am 3'-gebundenen sogenannten „*Quencher*“ unterdrückt wird. Aufgrund der 5'-Exonuklease-Aktivität der verwendeten DNA-Polymerase wird die Sonde in der Elongationsphase der PCR abgebaut, wodurch sich der „*Quencher*“ und Reporter räumlich voneinander trennen und ein Fluoreszenzsignal entsteht. In der *SYBR Green*-qPCR erfolgt die Detektion der amplifizierten DNA durch den namensgebenden Cyanin-Farbstoff *SYBR Green*. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA, wodurch ein Fluoreszenzsignal entsteht. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte an. Gemessen wird der sogenannte Ct-Wert, der angibt, ab welchem PCR-Zyklus die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert, der von der Hintergrund-Fluoreszenz abhängt, übersteigt.

In dieser Arbeit wurde für die TaqMan[®]-qPCR der *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix, No Amp Erase*[®] *UNG* (Life Technologies) und die in Tabelle 12 angegebenen TaqMan[®]-Assays (Life Technologies) verwendet. Für jede Reaktion wurden jeweils 5 µl *Master Mix*, 0,5 µl TaqMan[®]-Assay und 4,5 µl der verdünnten cDNA zusammenpipettiert.

Für die *SYBR Green*-qPCR wurde der *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Life Technologies) verwendet. Dafür wurden 5 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix*, je 0,25 µl 5 µM Oligonukleotid-Verdünnungen und 4,5 µl der verdünnten cDNA gemischt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Die qPCR wurde im *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Life Technologies) mit folgendem Programm durchgeführt: (2 min 50°C, 10 min 95°C; (15 s 95°C, 1 min 60°C) x 45 Wiederholungen). Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software SDS 2.1 (Applied Biosystems). Von jeder Probe wurden Triplikate angesetzt und die Mittelwerte bestimmt. Anschließend wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewendet, um die relative Expression der Zielgene zu den Referenzgenen *GAPDH* oder *ACTB* und anschließend zur jeweiligen Referenzbedingung der Analyse darzustellen.

Zur Ermittlung der Signifikanzen der differentiellen Genausprägung zwischen den shMYC1- oder shMYC2-exprimierenden Zellen und der ScrMYC-Kontrolle wurden die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Infektionen und ein gepaarter zweiseitiger T-Test verwendet.

Tabelle 12: Verwendete TaqMan®-Assays

Zielgen	Reporter	Bezeichnung
<i>ACTB</i>	FAM	Hs01060665_g1
<i>BLK</i>	FAM	Hs01017452_m1
<i>BMI1</i>	FAM	Hs00180411_m1
<i>CEBPB</i>	FAM	Hs00270923_s1
<i>EBF1</i>	FAM	Hs01092694_m1
<i>GAPDH</i>	FAM	Hs02758991_g1
<i>ID2</i>	FAM	Hs00 747379_m1
<i>IRF5</i>	FAM	Hs00158114_m1
<i>MS4A1</i>	FAM	Hs00544819_m1
<i>MYC</i>	FAM	Hs00153408_m1
<i>PAX5</i>	FAM	Hs00277134_m1
<i>PRDM1</i>	FAM	HS00153357_m1
<i>TCF3</i>	FAM	Hs00413032_m1

Tabelle 13: Verwendete Primer in SYBR Green-qPCR

Zielgen	Sequenz (5' → 3')
<i>ACTB</i>	GACGACATGGAGAAAATCTG ATGATCTGGGTCATCTTCTC
<i>IRF4</i>	CAATGACTTTGAGGAACTGG CATCATGTAGTTGTGAACCTG
<i>IL6</i>	GCAGAAAAAGGCAAAGAATC CTACATTTGCCGAAGAGC
<i>BCL2A1</i>	AAGAACTTCTACGACAGC AAGCCATTTTCCTCTTCTTC
<i>PTGS2</i>	AAGCAGGCTAATACTGATAGG TGTTGAAAAGTAGTTCTGGG
<i>BCL2</i>	GATTGTGGCCTTCTTTGAG GTTCCACAAAGGCATCC

2.4.10 Gesamtgenomamplifizierung

Die WGA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll mit dem *Single Cell Repli-g Kit* (Qiagen). Das *Single Cell Repli-g Kit* verwendet zufällige Hexamer-Oligonukleotide zusammen mit der ϕ 29-DNA-Polymerase, um das Genom in einer isothermalen Reaktion zu vervielfältigen. Zu Beginn wird die DNA durch einen alkalischen Denaturierungsschritt vorbereitet. In der nachfolgenden isothermalen Reaktion verlängert die ϕ 29-DNA-Polymerase die an die einzelsträngige DNA-gebunden Oligonukleotide, indem es die komplementären Basen anfügt. Bei Erreichen eines weiter 3'-gebunden Oligonukleotids, verdrängt die ϕ 29-DNA-Polymerase den komplementären Strang, wodurch die Synthese fortgesetzt werden kann. Der verdrängte Strang dient als Ausgangsprodukt weiterer Replikationen. Es entsteht eine stark verzweigte Struktur (*hyper-branched structure*), die in einer massiven Amplifikation des Ausgangsproduktes resultiert. Diese Methode der Genomamplifizierung weist eine sehr geringe Fehlerrate und zusätzlich einen niedrigen Amplifikationsfehler in Bezug auf Über- oder Unterrepräsentation von Genloci auf.

Als Ausgangsprodukt für die WGA wurden 2000 bis 3000 HRS- und NT-Zellen, die in mit Haftmittel-gefüllten Deckeln von 200 µl Reaktionsgefäßen mikrodisssektiert wurden (siehe 2.2.3), verwendet. Da sich die Zellen in den Deckeln der Reaktionsgefäße befanden, wurden die Reaktionsgefäße in den ersten Schritten des WGA-Protokolls auf den Kopf stehend verwendet. Nach Auftauen der Proben wurden 10 µl AE-Puffer (Qiagen) in die Deckel der Reaktionsgefäße pipettiert und die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu Beginn und in der Mitte der Inkubation wurden die Proben unter Verwendung eines Vortexmischers gemischt. Nach Ablauf der Inkubation wurden 10 µl des Puffer D2, der nach Herstellerangaben angesetzt wurde, in die Deckel der Reaktionsgefäße gegeben, die Ansätze gut gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. In 10-minütigen Abständen wurden die Proben unter Verwendung eines Vortexmischers gemischt. Nach Ablauf der 30 min wurde die Lyse- und Denaturierungsreaktion durch Zugabe von 10 µl *Stop Solution* des *Single Cell Repli-g Kits* gestoppt. Die Ansätze wurden gemischt und bei 12000 x g kurz zentrifugiert. Anschließend wurden für die eigentliche WGA-Reaktion 10 µl der Ansätze mit 9 µl H₂O, 29 µl *Repli-g sc Reaction Buffer* und 2 µl *Repli-g sc DNA Polymerase* in separaten 200 µl Reaktionsgefäßen gemischt. Somit wurden pro Probe drei separate WGA-Reaktionen mit einem Zelläquivalent von ca. 667 bis 1000 Zellen angesetzt. Zwei dieser drei Reaktionsansätze wurden für 5 Stunden und ein Ansatz wurde für 8 Stunden bei 30°C inkubiert. Es folgte die Inaktivierung der DNA-Polymerase, durch Inkubation der Ansätze bei 65°C für 3 min. Die WGA-Produkte wurden kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Parallel zu den Proben der HRS- und NT-Zellen wurde für jeden Fall eine Membrankontrolle, ein Reaktionsgefäß, das nur Membran und keine Zellen enthielt, prozessiert. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde ein leeres Reaktionsgefäß von Beginn des Protokolls mitgeführt. Außerdem wurden für die eigentlichen WGA-Reaktionen Ansätze angesetzt, die anstatt DNA Wasser enthielten. Als Positivkontrolle dienten Proben mit 200 und 10000 sortierten L-428 Zellen.

2.4.11 Exom-Sequenzierung

Die Exom-Sequenzierung des Falles 2921 wurde im BioChip Labor von PD Dr. Klein-Hitpass am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Für die „Library“-Präparation wurde das *TruSeq DNA Sample Prep Kit v1* (Illumina, San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die Anreicherung der Exon-Regionen erfolgte mit dem *NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 Kit* (Roche). Die Sequenzierung wurde auf dem *Illumina HiSeq 2500 Sequenzierer* (Illumina) mit einem sogenannten „Paired-End“-Lauf mit einer Leseweite von 2x 100 bp durchgeführt. Die übrigen Fälle wurden zwecks Sequenzierung an die Hochdurchsatz-Sequenzierungs-Serviceeinheit der Zentralen Einheit für Genom und Proteom des DKFZ in Heidelberg geschickt. Hier erfolgten die „Library“-Präparation und die Anreicherung der Exom-Regionen mit dem *SureSelectXT Human v5+UTRs Kit* (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA). Die nachfolgende Sequenzierung erfolgte auf dem Illumina *HiSeq 2000 Sequenzierer* (Illumina) mit einem „*Paired-End*“-Lauf mit einer Leseweite von 2x 100 bp. Die Auswertung der Daten wurde von Johanna Christina Czeschik aus der Arbeitsgruppe von Prof. Sven Rahmann durchgeführt. Die initiale Begutachtung der Sequenz-Daten erfolgte mit Hilfe der FastQC-Software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Das „*Alignment*“ der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA) (Li & Durbin, 2009) zum humanen Referenzgenom GRCH37. Duplikate, d.h. identische Sequenzen, wurden mit der *Picard-Software* (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) entfernt. Anschließend wurde das *Genome Analysis Toolkit* (GATK) für die weitere Analyse einschließlich Realignment von Insertionen und Deletionen, Qualitäts-Rekalibrierung und der Identifikation von Varianten mittels *UnifiedGenotyper* verwendet (McKenna *et al.*, 2010). Die grafische Präsentation der Ergebnisse erfolgte mittels eines in der Rahmann-Gruppe entwickelten Software-Pakets, genannt Exomate. In diesem wurden zusätzlich die Filterparameter und Suchkriterien für Varianten eingestellt. Um somatische Mutation in den HRS-Proben zu identifizieren, wurden die in der *dbSNP*-Datenbank (Sherry *et al.*, 2001) -annotierten nicht-Krankheitsassoziierten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) herausgefiltert. Außerdem folgte die Filterung von bekannten Varianten, die in einer selbst erstellten Datenbank aus Gesamtgenom-Sequenzierungen von gesunden Patienten der Essener Humangenetik zu finden sind. Zusätzlich wurden die gefundenen Varianten in den NT-Zellen herausgefiltert. Der *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (Thorvaldsdottir *et al.*, 2013) wurde verwendet, um sich die einzelnen Sequenzen an einer interessanten Stelle des Genoms genauer anschauen zu können.

2.5 Protein-Arbeitstechniken

2.5.1 Proteinisolation

Die Proteinisolierung erfolgte durch Verwendung des *RIPA Lysis Buffer System* (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland). Der RIPA-Puffer wurde mit je 10 µl des Protease-Inhibitor-Gemisches, PMSF und Natrium Orthovandant pro ml RIPA-Puffer gemischt. Für die Proteinextraktion wurden die Zellpellets in 250 µl vorbereiteten RIPA-Puffern pro 5×10^6 Zellen resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 x g bei 4°C für 15 min. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Messung der Proteinkonzentration wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) und anschließendem Western Blot gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Protein-Konzentration einer Lösung wurde mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) bestimmt. Dieser Test basiert auf der bekannten Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine im alkalischen Medium, auch Biuretreaktion genannt, und dem quantitativen Nachweis des sich bildenden violetten Farbstoff aus den einwertigen Kupferionen und Bicinchoninsäure durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm mittels eines Photometers. Es wurde das im Handbuch beschriebene Mikrotiterplatten-Protokoll angewendet, mit der Ausnahme, dass von den zu messenden Proben nur 1 μl eingesetzt wurde.

2.5.3 SDS-Page

Die SDS-Page ermöglicht die Auftrennung von denaturierten Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. Dafür wurden 20-30 μg Protein mit 3 μl 1 M DTT, 6 μl 5x *Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer* (Thermo Scientific) vermischt und mit Wasser auf 30 μl aufgefüllt. Parallel wurden Längenstandards angesetzt, indem 1 μl *MagicMark™ XP Western Protein Standard* (Life Technologies), 5 μl *PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 170 kDa* (Thermo Scientific), 3 μl 1 M DTT, 6 μl 5x *Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer* und 15 μl Wasser gemischt wurden. Die Ansätze wurden für 5 min bei 99°C und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit wurde ein 10% oder 12% *Mini PROTEAN® TGX Stain-free™ Gel* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) nach Herstellerangaben vorbereiten und in die mit 1x-Tris/Glycine/SDS-Puffer (Bio-Rad Laboratories GmbH)-gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 12 V/cm Elektrodenabstand für ca. 1 Stunde angelegt bis die Banden von Interesse gut aufgetrennt waren. Die Gele wurden sofort im Western Blot weiter verwendet.

2.5.4 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren umfasst die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran und den anschließenden immunologischen Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper-Färbungen. Für das sogenannte „*Blotting*“, die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran, wurde der *iBlot* von Life Technologies mit den *iBlot Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini* (Life Technologies) und das Programm 0 (20 V 1 min, 23 V 4 min und 25 V 2 min) verwendet. Alle folgenden Inkubationen wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Membran wurde zunächst 2 Stunden in 5% Milchpulver (0,1% Tween-20 in 1x TBS (TBST)) geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die entsprechenden Verdünnungen der Primärantikörper mit 5% Milchpulver (0,1% TBST) hergestellt (siehe Tabelle 14). Die optimalen Bedingungen waren in Vorversuchen ermittelt worden. Die Membran wurde mit

ausreichender Menge der Antikörperlösung überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen, indem sie 3x in ausreichender Menge 0,1% TBST für 10 min inkubiert wurde. Der sekundäre Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper wurde gemäß Tabelle 14 in 5% Milchpulver verdünnt und die Membran mit diesem für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Waschung der Membran durch dreimalige Inkubation für 10 min in 0,1% TBST. Die Detektion erfolgte mit dem *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) nach Herstellerangaben auf dem *Fusion Solo S Chemilumineszenzsystem* (PeqLab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland). Nach erfolgreicher Messung des Signals für das Protein von Interesse folgte die Detektion der Ladekontrolle, die ein um mindestens 10 kDa anderes Molekulargewicht als das Protein von Interesse haben sollte. Dafür wurde die Membran mit den entsprechenden Antikörperlösungen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und ggf. die Inkubation mit dem sekundären Antikörper durchgeführt. Die Detektion erfolgte wiederum mit dem *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* nach Herstellerangaben auf dem *Fusion Solo S Chemilumineszenzsystem*. Da in der Regel die benötigte Belichtungszeit für die Detektion der Ladekontrolle wesentlich kürzer war als für die Proteine von Interesse stellten die bereits gebundenen Antikörper der vorherigen Inkubationen kein Problem bei der Messung der Ladekontrollen dar. War dies nicht der Fall wurde die Membran zunächst von den gebundenen Antikörpern befreit, indem sie 10 Min in einem milden „*Stripping*“-Puffer (siehe unten) inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit 1x PBS und einmal für 5 min mit 0,1% TBST gewaschen. Es folgte ein erneutes Blocken der Membran für eine Stunde in 5% Milchpulver (0,1% TBST). Danach wurde die Detektion der Ladekontrolle durchgeführt.

Die quantitative Auswertung der Western Blots erfolgte durch Verwendung der Phoretix 1D-Software (PaqLab Biotechnologies). Dabei erfolgte die Normalisierung entweder nach der Δ Ct-Methode, indem die ermittelten Intensitäten der Banden des Proteins von Interesse zu der Intensität der Bande der entsprechenden Ladekontrolle normalisiert wurden, oder nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode, indem die Intensitäten der Banden des Protein von Interesse zunächst zu der Intensität der Bande der Referenzbedingung normalisiert wurden und danach eine weitere Normalisierung zu den Intensitäten der Banden der Ladekontrolle erfolgte. Zur Ermittlung der Signifikanzen der MYC-Herabregulation zwischen den shMYC1- oder shMYC2-exprimierenden Zellen und der ScrMYC-Kontrolle wurden die normalisierten Expressionswerte der einzelnen Infektionen und ein gepaarter zweiseitiger T-Test verwendet

Milder „*Stripping*“ Puffer: 15 g Glycerin
 1 g SDS
 10 ml Tween-20
 Mit HCl auf pH 2,2 einstellen
 Auf 1 L mit ddH₂O auffüllen

Tabelle 14: Verwendete Antikörper im Western Blot

Antikörper (Klon)	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Katalognummer)
Anti- α -Tubulin (DM1A)	Maus	1:500	MP Biomedicals (08691251)
Anti-CEBPB (E299)	Kaninchen	1:1000	Abcam (ab32358)
Anti-CEBPB (H-7)	Maus	1:200	Santa Cruz (sc-7962)
Anti-MYC (Y69)	Kaninchen	1:1000	Abcam (32072)
Anti- β -Aktin- Peroxidase-gekoppelt (AC-15)	Maus	1:250000	Sigma Aldrich (A3854)
Anti-Kaninchen-HRP- gekoppelt	Esel	1:10000	Jackson ImmunoResearch (711-036-152)
Anti-Maus-HRP- gekoppelt	Ziege	1:2000	Dianova (115-036-062)

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines lentiviralen Systems zur shRNA-vermittelten Herabregulation von Genen in cHL-Zelllinien

In den Projekten zur Rolle von *MYC* und *CEBPB* in der Pathogenese des cHLs sollten beide Faktoren in cHL-Zelllinien durch die Ausprägung von shRNAs herunterreguliert werden. Da das lentivirale pViG-System schon erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe zur Herabregulation von *GATA3* in den cHL-Zelllinien verwendet worden war (Stanelle *et al.*, 2010), sollte dieses System auch für die Herabregulation von *MYC* und *CEBPB* angewendet werden. Der pViG-Vektor basiert auf dem Simian Immunodefizienz Virus (SIV) und die Ausprägung der shRNA wird ursprünglich von einem U6-Promotor kontrolliert. Frühere Erfahrungen zeigten aber, dass der H1-Promotor in den cHL-Zelllinien besser funktioniert als der U6-Promotor (persönliche Kommunikation mit Dr. Jens Stanelle und Dr. Roland Schmitz). Daher sollten die shRNAs zunächst in den pSUPER-Vektor kloniert werden, um dann die shRNAs zusammen mit dem H1-Promotor des pSUPER-Vektors in den pViG-Vektor zu klonieren und dabei den U6-Promotor des pViG-Vektors zu ersetzen. Zusätzlich trägt der pViG-Vektor ein GFP-Gen, das durch einen separaten Promotor des *spleen focus forming virus* (SFFV) kontrolliert wird. Die Expression von GFP ermöglicht somit die Identifizierung von infizierten Zellen. Im ersten Schritt wurden komplementäre Oligonukleotide entworfen, die jeweils drei verschiedene shRNAs gegen *MYC* und *CEBPB* kodierten. Zusätzlich wurden je eine durchmischte Zielsequenz einer shRNA gegen *MYC* und *CEBPB* (ScrCEBPB und ScrMYC) entworfen, die zu keiner mRNA in menschlichen Zellen komplementär waren. Diese *scrambled*-shRNAs dienten in späteren Experimenten als wichtige Kontrollen und sollten die unspezifischen Einflüsse einer Infektion und die Auswirkungen der Expression einer unspezifischen shRNA in den Zellen einschließen. Außerdem wiesen die komplementären Oligonukleotide jeweils ein Überhang einer HindIII- oder BglII-Schnittstelle am 5' Ende auf (siehe Tabelle 4). Die komplementären Oligonukleotide wurden in einem ersten Schritt hybridisiert, um doppelstränge DNA-Fragmente für die Klonierung zu erhalten, und anschließend deren 5'-Enden phosphoryliert, um die Ligation zu ermöglichen. Parallel wurde der pSUPER-Vektor mit den Restriktionsenzymen HindIII und BglII geschnitten und die 5'-Enden wurden dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors ohne Einfügen des gewünschten *Inserts* zu verhindern. Nach Aufreinigung der phosphorylierten DNA-Fragmente und des dephosphorylierten Vektors erfolgten die Ligation und anschließend die Transformation in XL1-Blue Zellen. Für jede shRNA wurden einzelne Bakterienkolonien auf das Vorhandensein des richtigen Plasmids und unmutierter shRNA-Kassette mittels Restriktionsverdau mit NotI und Sall und Sequenzierung überprüft. Anschließend wurden große Mengen des korrekten Plasmids mittels Maxi-Präparationen

isoliert und die shRNA-Kassetten wurden wiederum mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Im nächsten Schritt sollten die shRNA-Kassetten zusammen mit dem H1-Promotor des pSUPER-Vektors in den zur Virusproduktion verwendeten pViG-Vektor kloniert werden. Dafür wurden die Restriktionsschnittstellen SpeI und Sall verwendet. Nach erfolgreicher Ligation und Transformation der Plasmide in XL1-Blue Zellen wurden einzelne Kolonien mittels Restriktionsverdau mit EcoRI auf das Vorhandensein des richtigen Plasmids und anschließend die shRNA-Sequenzen mittels Sequenzierung überprüft. Danach wurden von ausgewählten Kolonien größere Mengen Endotoxin-freier Plasmide durch Maxi-Präparation gewonnen und anschließend wurde die shRNA-Sequenz erneut mittels Sequenzierung überprüft. Für die Virusproduktion wurden die gewonnenen pViG-Plasmide zusammen mit den Verpackungsplasmiden Δ SP2, welches die viralen *gag*- und *pol*-Gene codiert, und pHIT/g, welches das Hüllprotein des VSV-G codiert, in 293T-Zellen transfiziert. Die anschließende Virustitration zeigte allerdings, dass nur Virustiter von ungefähr 1×10^6 Viruspartikeln pro ml Viruslösung erreicht wurden (Daten nicht gezeigt). Auch in wiederholten Virusproduktionen mit neuen Plasmidpräparationen und leichten Modifizierungen des Protokolls zur Virusproduktion (nicht beschrieben) konnte kein höherer Titer erzielt werden. Aus den Experimenten mit GATA3 war bereits bekannt, dass sich die cHL-Zelllinien nur schlecht transduzieren lassen. So wurde in diesen Experimenten ein MOI von 15 verwendet und nur eine Transduktionseffizienz von ca. 5-15% erreicht, wodurch die erfolgreich transduzierten Zellen mittels FACS sortiert werden mussten. Unter diesen Voraussetzungen wurde kalkuliert, dass die hier erreichten Virustiter es nicht ermöglichten eine sinnvolle Anzahl an infizierten Zellen für spätere Analysen kosten- und arbeitszeiteffizient zu erhalten. Daher wurde entschieden ein anderes lentivirales System zur Expression von shRNAs zu etablieren.

Das pGIPZ-Vektorsystem der Firma GE Healthcare Life Sciences wurde zu dieser Zeit erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe verwendet um *EBF1* in cHL-Zelllinien verstärkt zu exprimieren (Bohle *et al.*, 2013). Da es von diesem System auch fertige Vektoren zur Herabregulation von *MYC* und *CEBPB* gab, wurde entschieden dieses System zu testen. Im Vergleich zum pViG-System, das das Gerüst des SIV verwendet, basiert das pGIPZ-System auf dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Des Weiteren wird die shRNA als miRNA-Vorläufer unter Kontrolle des CMV-Promotors, und nicht direkt als shRNA unter Kontrolle des H1-Promotors, ausgeprägt. Daher erfolgt eine Prozessierung der miRNA-Vorläufer durch die miRNA-Maschinerie, um die shRNAs zu erhalten. Der gleiche CMV-Promotor kontrolliert auch die Ausprägung eines TurboGFP-Gens, mit dessen Hilfe infizierte Zellen identifiziert werden können. Insgesamt wurden 14 Bakterien-Stocks mit unterschiedlichen shRNA-Vektoren bestellt. Fünf Plasmide codierten für shRNAs gegen *CEBPB*, acht Plasmide codierten für shRNAs gegen *MYC* und ein Plasmid stellte eine „non-silencing“-Negativkontrolle dar, die eine shRNA ohne Ziel codierte. Die erhaltenen Bakterien-Stocks

wurden zunächst kultiviert und die Plasmide mittels Maxi-Präparationen isoliert. Anschließend wurde mittels Sequenzierung überprüft, dass die shRNA-Sequenzen nicht mutiert waren. Danach wurden die pGIPZ-Plasmide mit den Verpackungsplasmiden psPAX2, welches die gag- und pol-Gene codiert, und pMD2.G, welches das Hüllprotein des VSV codiert, zur Virusproduktion in 293T-Zellen verwendet. Die nachfolgende Virustitration zeigte deutlich höhere Viruskonzentrationen der pGIPZ-Viren als der pViG-Viren. So wurden Virustiter von $4,2 - 10 \times 10^6$ Viruspartikeln pro ml Viruslösung ermittelt. Die Virustiter des pGIPZ-Systems waren somit ca. 5-10-fach höher als die des pViG-Systems und in einem Bereich mit dem cHL-Zelllinien infiziert werden konnten ohne die jeweils empfohlene optimale Wachstumsdichte zu unterschreiten. Nachfolgend wurden Infektionen mit einer MOI von 15 mit verschiedenen Kombinationen von Zelllinien und pGIPZ-Viren durchgeführt und die Effektivität der Herabregulation der Zielgene mittels TaqMan[®]-qPCR und teilweise mit Western Blot-Analysen überprüft. Bei jeder dieser Infektionen wurden parallel Zellen der jeweiligen Zelllinie mit dem pGIPZ.*non_silencing*-Virus infiziert. Diese Kontrolle diente in den Analysen als Referenz und sollte unspezifische Auswirkungen der Infektion, wie z.B. eine Immun- oder Stressreaktion, auf die Ausprägung der Zielgene kompensieren. Zusätzlich wurde eine sogenannte *mock*-Bedingung durchgeführt. Hierbei werden die Zellen gleich behandelt wie bei den anderen Bedingungen, aber nicht mit einem Virus infiziert. Diese Kontrolle dient somit der Anzeige des Einflusses der Infektion auf den Phänotyp der Zellen. Damit eine mögliche Herabregulation nicht durch nicht-infizierte Zellen überdeckt wurde, wurden die infizierten Zellen anhand des im pGIPZ-enthaltenem GFP durchflußzytometrisch sortiert. Bei der Sortierung wurde zusätzlich eine DAPI-Färbung durchgeführt, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Die infizierten Zellen wurden somit als DAPI-negativ und GFP-positiv an unterschiedlichen Tagen nach der Infektion sortiert. Die Zellen der *mock*-Bedingung wurden aufgrund des fehlenden GFP-Signals als DAPI-negative Zellen sortiert. In Abbildung 5 ist die Sortierstrategie der Infektionen mit LeGO.G-Vektoren dargestellt, die der der pGIPZ-Infektionen entsprach. Abhängig von der verwendeten Zelllinie lag bei den Sortierungen der Anteil der transduzierten Zellen bei ca. 5-25%, was mit den Erwartungen aus den EBF1-Experimenten übereinstimmte. In den Abbildungen 2-4 sind die Ergebnisse der TaqMan[®]-qPCR und Western Blot-Analysen der sortierten Zellen dargestellt. In keiner der getesteten Kombinationen konnte eine deutliche Herabregulation von *CEBPB* oder *MYC* in den cHL-Zelllinien erreicht werden. Nur in der cHL-Zelllinie L-1236 führte die Ausprägung der pGIPZ.shMYC4 zu einer minimalen Herabregulation der MYC-mRNA um ca. 30%. Auffällig ist, dass pGIPZ.shCEBPB4 und im besonderen pGIPZ.shMYC5 zu einer verstärkten Ausprägung von *CEBPB* führten. Wodurch dies ausgelöst wurde oder ob es sich um einen technischen Fehler handelte, wurde nicht geklärt. Auch auf Proteinebene zeigte sich eine nahezu gleiche Ausprägung von *CEBPB* in den mit pGIPZ.CEBPB1, pGIPZ.shCEBPB2 und pGIPZ.*non_silencing* infizierten Zellen. Dagegen wurde in 293T-

Zellen, die mit pGIPZ.shMYC2 und pGIPZ.shMYC3 infiziert worden waren, die *CEBPB*-Ausprägung im Vergleich zu pGIPZ.non-silencing infizierten Zellen um ca. die Hälfte gesenkt. Diese erfolgreiche Herabregulation in den 293T-Zellen zeigt, dass das pGIPZ-System prinzipiell funktioniert. Allerdings scheint es mit den cHL-Zelllinien nicht kompatibel zu sein. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Infektionen nur einmalig, wenn auch an unterschiedlichen Tagen, durchgeführt wurden. Daher wäre es denkbar, dass in den Versuchen mit den cHL-Zelllinien ein unbekannter Fehler zu den negativen Ergebnissen führte. Zusätzlich wurden nicht alle shRNAs in allen Zelllinien getestet und es wäre möglich, dass eine shRNA eine andere Effektivität in einer anderen Zelllinie besitzt. Trotzdem wurde beschlossen, dass das pGIPZ-System ungeeignet für die Herabregulation von Zielgenen in den cHL-Zelllinien ist.

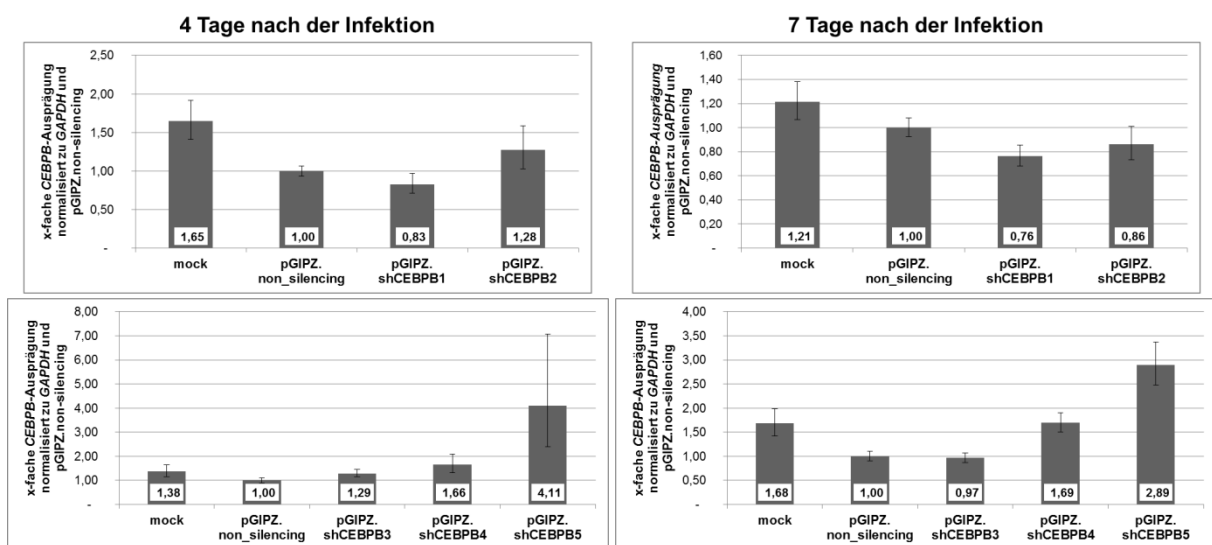


Abbildung 2: *CEBPB*-Ausprägung in sortierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428 nach Infektion mit pGIPZ-Viren

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den angegebenen pGIPZ-Viren infiziert und an Tag 4 und 7 nach der Infektion durchflusszytometrisch sortiert. Anschließend wurde die Menge an *CEBPB* in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan[®]-qPCR bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert in den mit pGIPZ.non_silencing infizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten. Keine der getesteten shRNAs gegen *CEBPB* führte zu einer Herabregulation von *CEBPB*.

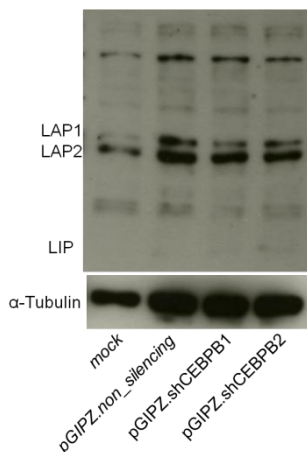


Abbildung 3: *CEBPB*-Ausprägung in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 an Tag 4 nach der Infektion mit pGIPZ-Viren

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den angegebenen pGIPZ-Viren infiziert und an Tag 4 nach der Infektion sortiert. Anschließend wurde die Menge an *CEBPB* in den verschiedenen Zellen mittels Western Blot bestimmt. Zur Kontrolle der gleichen Proteinladung auf das Gel wurde α -Tubulin nachgewiesen. Im Vergleich zur non_silencing-Kontrolle war keine Herabregulation von *CEBPB* in den infizierten Zellen, die shRNAs gegen *CEBPB* ausprägen sollen, festzustellen.

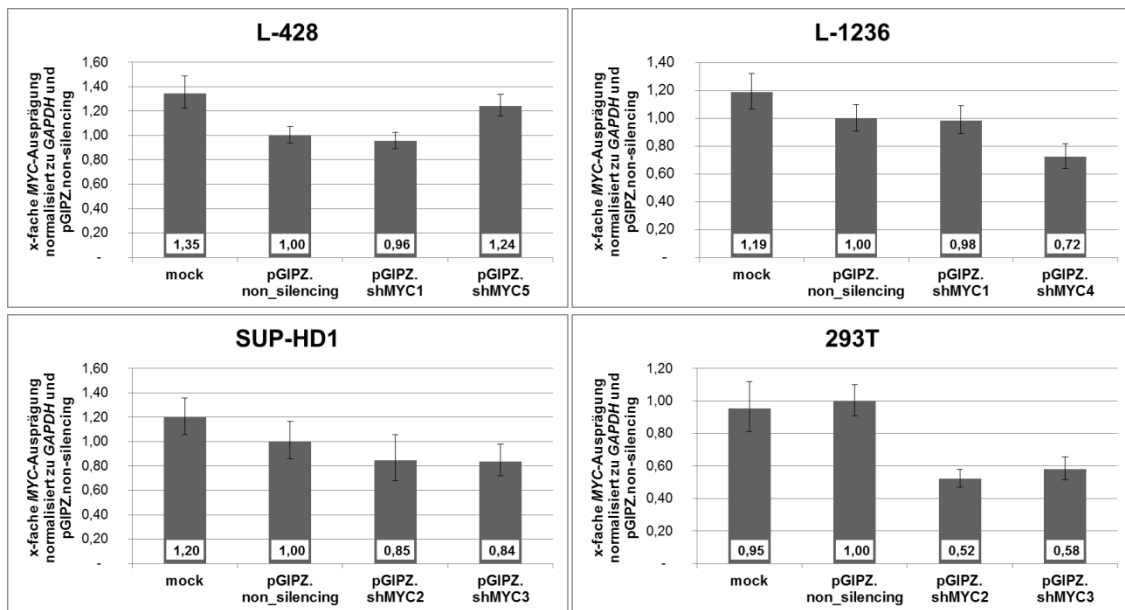


Abbildung 4: MYC-Ausprägung in mit pGIPZ-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428, L-1236 und SUP-HD1, sowie der Zelllinie 293T nach Infektion mit pGIPZ-Viren

Die Zellen wurden mit den angegebenen pGIPZ-Viren infiziert und an Tag 4 nach der Infektion durchflusszytometrisch sortiert. Anschließend wurde die Menge an MYC in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan®-qPCR bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zunächst zum jeweiligen GAPDH-Wert und anschließend zum Wert in den mit pGIPZ.non_silencing infizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten. In den cHL-Zelllinien konnte keine Herabregulation von MYC nachgewiesen werden. In Zellen der Zelllinie 293T hingegen führte die Ausprägung von pGIPZ.shMYC2 oder pGIPZ.shMYC3 zu einer um die Hälfte reduzierten Ausprägung von MYC im Vergleich zur non_silencing-Kontrolle.

Als nächstes wurde der LeGO.G-Vektor zur Herabregulation von Zielgenen getestet, der gut in cHL-Zelllinien funktionieren soll (persönliche Kommunikation Dr. Sebastian Newrzela). Der LeGO.G-Vektor basiert auf HIV und prägt die shRNA ursprünglich unter Kontrolle eines U6-Promotors aus. Zusätzlich enthält der LeGO.G-Vektor ein „enhanced“ GFP-Gen, welches von einem SFFV-Promotor kontrolliert wird. Dies ermöglicht die Identifizierung der infizierten Zellen als GFP-positive Zellen. Generell ähnelt der LeGO.G-Vektor damit sehr stark dem pViG-Vektor, außer dass der eine HIV-basiert und der andere SIV-basiert ist. Ähnlich zu den gemachten Erfahrungen bzgl. des pViG-Vektors in cHL-Zelllinien wurde für die Verwendung des LeGO.G-Vektors in cHL-Zelllinien empfohlen den U6-Promotor durch einen H1-Promotor zu ersetzen (persönliche Kommunikation Dr. Sebastian Newrzela). Daher konnte bei den Klonierungsarbeiten auf die zur pViG-Produktion hergestellten pSUPER-Plasmide zurückgegriffen werden, so dass jeweils 3 Plasmide mit shRNAs gegen CEBPB und MYC sowie die ScrCEBPB- und ScrMYC-Kontrollen zur Verfügung standen. Die Umklonierung des H1-Promotors mit der shRNA-Kassette aus dem pSUPER-Vektor in den LeGO.G-Vektor erfolgte über die Restriktionsschnittstellen von XhoI und XbaI. Nach der Ligation erfolgte die Transformation in XL1-Blue-Zellen. Einzelne Kolonien wurden mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des richtigen Plasmids überprüft und anschließend wurde die shRNA-Sequenz sequenziert, um Mutationen auszuschließen. Es folgte die Maxi-Präparation und

erneute Überprüfung der shRNA-Sequenzen mittels Sequenzierung. Da der LeGO.G-Vektor wie der pGIPZ-Vektor auf HIV basiert, wurden die gleichen Verpackungsplasmide, sprich psPAX2 und pMD2.g, zur Virusproduktion verwendet. Die ermittelten Virustiter der LeGO.G-Vektoren lagen alle in einem Bereich von ungefähr 2 bis 6×10^7 Viruspartikeln pro ml Viruslösung und waren damit doppelt bis 10-fach höher als die Virustiter der pGIPZ-Vektoren. Somit stellte das LeGO-System das potenteste System zur Virusproduktion dar. Anschließend wurden verschiedene Infektionen durchgeführt und die Herabregulation von *CEBPB* und *MYC* mittels TaqMan[®]-qPCR und Western Blot-Analysen auf mRNA- und Proteinebene überprüft. Um in diesen Analysen auszuschließen, dass nicht-transduzierte Zellen die erfolgreiche Herabregulation überdecken, war es notwendig die transduzierten Zellen von den nicht-transduzierten Zellen mittels FACS zu trennen. So konnten reine Populationen von transduzierten Zellen in den TaqMan[®]-qPCR-Analysen und Western Blots analysiert werden. Die allgemeine Sortierungsstrategie zur Anreicherung infizierter Zellen ist in Abbildung 5 am Beispiel einer Sortierung der cHL-Zelllinie L-428 an Tag 6 nach der Infektion mit dem shMYC3-codierenden LeGO.G-Virus dargestellt. Die Sortierung der Zellen an den unterschiedlichen Tagen nach der Infektion erfolgte immer an der FACSDiva[™]. Dabei wurden zunächst Zelltrümmer und größere Zellaggregate im FSC-A und SSC-A ausgeschlossen (Abbildung 5A). Weiter wurden Dubletten mit Hilfe des FSC-A und FSC-W ausgeschlossen (Abbildung 5B). Durch eine vor der Sortierung durchgeführte DAPI-Färbung konnten im UV-Kanal lebende Zellen als DAPI-negativ von den toten Zellen, die DAPI-positiv waren, getrennt und ausgewählt werden (Abbildung 5C). Durch Detektion des GFP-Signals im FITC-Kanal konnten die transduzierten Zellen identifiziert werden (Abbildung 5D). Dabei wurden die Auswahlfenster recht stringent gewählt, um möglichst reine Populationen von transduzierten Zellen zu sortieren. Da die *mock*-Probe kein GFP ausprägte, wurden hier lebende, also DAPI-negative, Zellen sortiert (Abbildung 5D). Zur Erfolgskontrolle und Abschätzung der Reinheit des Sortiervorganges erfolgte von einem Teil der sortierten Zellen nach erneuter DAPI-Färbung eine Reanalyse mit den gleichen Auswahlfenstern. So wurde bei allen Sortierungen eine Reinheit von mindestens 90% meist aber von 95% oder höher erreicht. Die wenigen GFP-negativen Zellen in der Reanalyse stellen entweder Kontaminationen mit nicht-infizierten Zellen dar, die durch Sortierfehler entstanden sind, oder sind beschädigte Zellen, hervorgerufen durch den mechanischen Stress des Sortiervorganges, die ihr GFP-Signal aufgrund von Schäden in der Plasmamembran bereits verloren hatten, aber noch nicht positiv für DAPI waren, weil deren Kernmembran noch intakt war. Für die TaqMan[®]-qPCR-Analysen wurden 40000 Zellen je Population sortiert. Für die Proteinisolierungen und anschließenden Western Blots wurden mindestens 150000 Zellen je Population, optimaler Weise aber bis zu 700000 Zellen, sortiert.

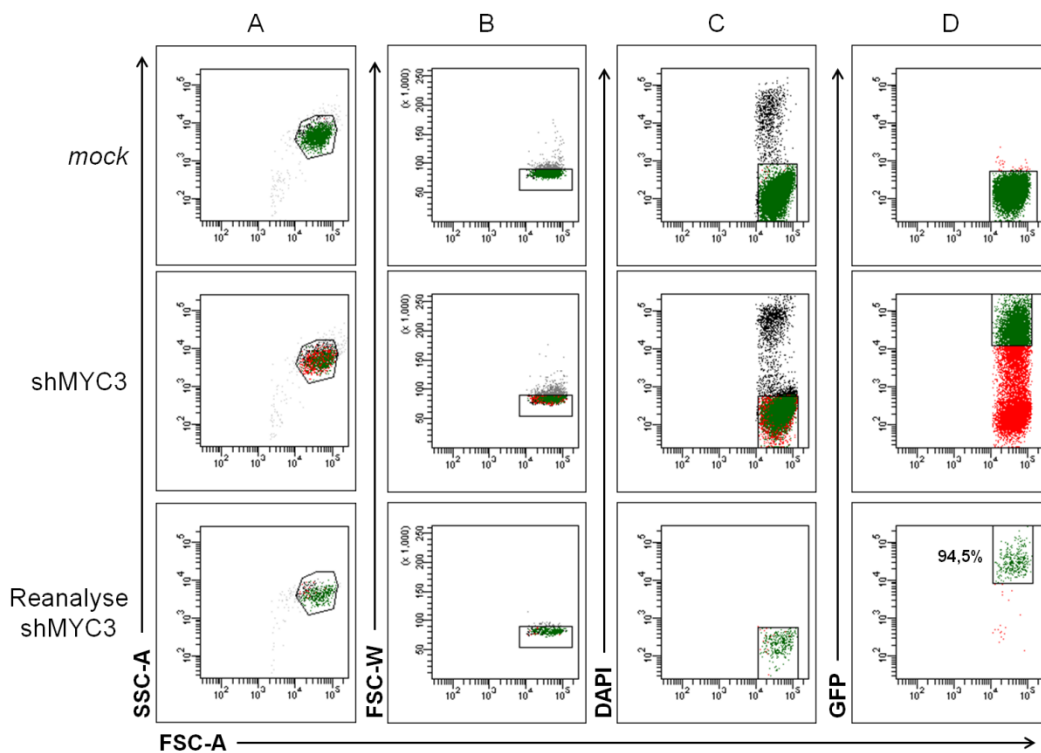


Abbildung 5: Sortierungsstrategie infizierter Zellen am Beispiel der Infektion der cHL-Zelllinie L-428 mit einem LeGO.G-Vektor

Dargestellt sind die Auswahlfenster zur Sortierung infizierter Zellen und nicht infizierter Zellen der *mock*-Bedingung. L-428 Zellen wurden mit LeGO.G-Vektor, der für shMYC3 codiert, infiziert. Parallel wurde die *mock*-Bedingung durchgeführt. Die Sortierung erfolgte an Tag 6 nach der Infektion. (A) Zunächst wurden Zelltrümmer und größere Zellaggregate mittels FSC-A und SSC-A ausgeschlossen. (B) Dubletten wurden mittels FSC-A und FSC-W entfernt. (C) Eine zuvor durchgeführte DAPI-Färbung ermöglichte die Auswahl lebender Zellen als DAPI-negativ. (D) Für die *mock*-Bedingung wurden GFP-negative Zellen sortiert. Infizierte Zellen wurden als GFP-positive Zellen sortiert. Die Reanalyse der GFP-sortierten Zellen zeigte eine Anreicherung der Zellen auf 94,5%. Die wenigen nicht GFP-positiven Ereignisse waren entweder Kontaminationen oder durch den Sortiervorgang beschädigte Zellen.

Die Sortierungsstrategie wurde im Folgenden auch verwendet, um transduzierte Zellen zu sortieren, die wieder in Kultur genommen wurden. Nach der Sortierung wurden diese Zellen in einer ihrer optimalen Zelldichte entsprechenden Menge Medium aufgenommen und kultiviert. In den Sortierungen wiesen die LeGO.G-Vektoren viel höhere Transduktionseffizienzen als die pGIPZ-Vektoren auf. So wurden die ersten Infektionen im CEBPB-Projekt in Anlehnung an den Erfahrungen mit den pGIPZ-Vektoren mit einer MOI von 15 durchgeführt. Hierbei waren abhängig von der Zelllinie bis zu 90% der Zellen GFP-positiv, was einer Verdreifachung der Effizienz gegenüber den pGIPZ-Vektoren entspricht. Eine mögliche Erklärung dieser viel höheren Transduktionseffizienz bei gleichem Hüllprotein könnte sein, dass durch die erzielten höheren Virustiter der LeGO.G-Vektoren, die Zellen zunächst in viel kleineren Volumina infiziert werden konnten. Dadurch stieg die Wahrscheinlichkeit, dass ein Virus auf eine zu infizierende Zelle traf und somit die Transduktionseffizienz. Aufgrund dieser guten Transduktionseffizienz und um die Gefahr multipler Integrationen des Provirus durch Mehrfachinfektion und dadurch ausgelöste

unspezifische Effekte zu minimieren, wurden die späteren Infektionen mit einer MOI von 5 durchgeführt. Selbst hier wurden Transduktionseffizienzen von ungefähr 30% in der SUP-HD1, der HDLM-2 und der KM-H2, von ca. 60% in der L-428 und U-HO1 und von ca. 80% in der L-1236 erreicht (Daten nicht gezeigt). Damit waren die Transduktionseffizienzen trotz niedriger MOI teilweise noch immer besser als bei den Infektionen mit pGIPZ, was die Anwendbarkeit des LeGO.G-Vektors zur Infektion der cHL-Zelllinien unterstreicht. Des Weiteren zeigten die TaqMan[®]-qPCRs und Western Blots der sortierten Zellen, dass die LeGO.G-Vektoren auch zu einer deutlichen Herabregulation der Zielgene führten. Die detaillierte Beschreibung der Ergebnisse erfolgt in den jeweiligen Abschnitten (siehe unten). Zusammenfassend wurde somit mit dem LeGO.G-Vektor eine sehr gute Methode zur shRNA-vermittelten Herabregulation von Zielgenen in cHL-Zelllinien etabliert, die auch in weiteren Projekten unserer Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet wird.

3.2 Die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHL

MYC ist ein starkes Onkogen und an der Pathogenese vieler verschiedener Tumore beteiligt (Nesbit *et al.*, 1999; Dang, 2012). Auch in 70% der primären cHL-Fälle konnte MYC in einem Teil der HRS-Zellen nachgewiesen werden (Chisholm *et al.*, 2015). Genauso zeigten GEPs von HRS-Zellen primärer cHL-Fälle und normaler B-Zellpopulationen, dass die HRS-Zellen von einem Teil der cHL-Fälle eine erhöhte *MYC*-Ausprägung im Vergleich zu den normalen B-Zellpopulationen aufweisen (Tiacchi *et al.*, 2012) (Abbildung 6). Zusätzlich ließen sich in dieser Studie die untersuchten cHL-Fälle gemäß der Ausprägung von *MYC* und dessen Zielgenen in zwei Untergruppen aufteilen. Dies deutet darauf hin, dass *MYC* in einem Teil der cHL-Fälle eine wichtige Rolle in der Pathogenese hat. Daher sollte der Einfluss der erhöhten *MYC*-Expression in den HRS-Zellen genauer untersucht werden. Dazu wurde *MYC* in einem Teil der cHL-Zelllinien mittels eines lentiviralen Systems zur shRNA-Expression herabreguliert und anschließend der Phänotyp der infizierten Zellen insbesondere die Proliferation und das Überleben der Zellen analysiert. Ein Teil dieses Projektes wurde dabei von B.Sc. Annika Weiß im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Dabei erfolgte eine enge Betreuung und Hilfestellung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Ihre Arbeit umfasste die Validierung der erhöhten Ausprägung von *MYC* in den cHL-Zelllinien, die ersten drei bzw. zwei Infektionen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1, sowie die Infektion der Linie KM-H2. Zusätzlich führte sie die weiteren Analysen, mit Ausnahme der Analysen zur Ausprägung der *MYC*-Zielgene, dieser Infektionen durch.

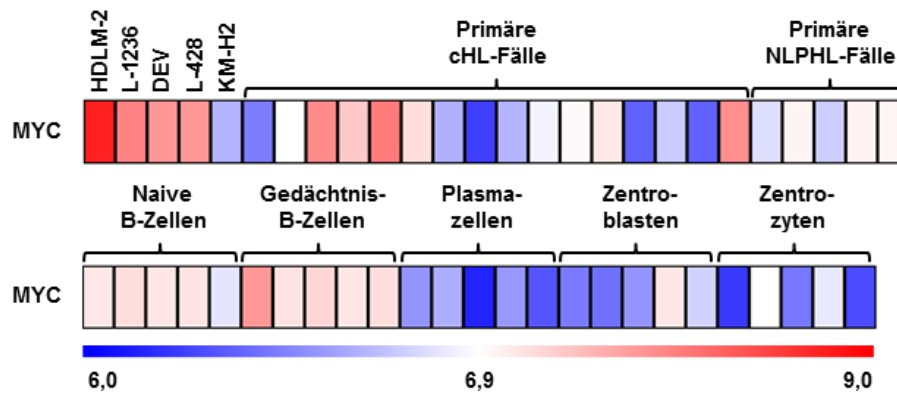


Abbildung 6: „Heat Map“ der MYC-Expression von cHL-Zelllinien, HRS-Zellen primärer cHL-Fälle, LP-Zellen primärer NLPHL-Fälle und normalen B-Zellpopulationen (Daten entnommen aus (Tiacci *et al.*, 2012))

In der Studie von Tiacci *et al.*, 2012 wurden GEPs von cHL-Zelllinien, HRS-Zellen primärer cHL-Fälle, LP-Zellen primärer NLPHL-Fälle, naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen, Plasmazellen, Zentroblasten und Zentrozyten erstellt. Dargestellt ist die differentielle Expression von *MYC* in einer logarithmischen Skala. Im Vergleich zu den Zentroblasten und Zentrozyten, die die putativen Ursprungszellen der HRS-Zellen des cHLs sind, zeigten die cHL-Zelllinien und die HRS-Zellen eines Teils der primären cHL-Fälle eine erhöhte Ausprägung von *MYC*.

3.2.1 Validierung der erhöhten Ausprägung von *MYC* in cHL-Zelllinien

In einem ersten Schritt sollte die in den GEPs gezeigte erhöhte Ausprägung von *MYC* in den cHL-Zelllinien validiert werden. Hierfür sollte die Expression der *MYC*-mRNA in den cHL-Zelllinien L-1236, L-428, KM-H2, HDLM-2, SUP-HD1 und U-HO1 zu der von GC-B-Zellen verglichen werden, da die GC-B-Zellen die putativen Ursprungszellen der HRS-Zellen darstellen. Die GC-B-Zellen waren zuvor von einem Kollegen als $CD20^{++}/IgD^{-}/IgM^{-}/CD38^{+}$ -Zellen mittels FACS aus Tonsillen-Präparaten sortiert worden und stellten Gesamt-GC-B-Zellen dar. Die $CD20^{++}/IgD^{+}/IgM^{+}/CD38^{+}$ -Zellen wurden ausgeschlossen, da diese Zellen GC-Gründungs-B-Zellen darstellen (Kolar *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde die *MYC*-Ausprägung in der Multiplen Myelom-Zelllinie U-266 ermittelt, da von dieser Zelllinie bekannt ist, dass sie wenig *MYC* und stattdessen verstärkt *MYCL* ausprägt. Nach erfolgreicher RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden die TaqMan[®]-qPCRs für *MYC* und das Referenzgene *ACTB* durchgeführt. Hierbei wies die Zelllinie U-266, wie erwartet, eine ähnliche Expression von *MYC* wie die GC-B-Zellen auf. Die cHL-Zelllinien hingegen zeigten eine deutlich erhöhte *MYC*-Expression im Vergleich zu den GC-B-Zellen (Abbildung 7). Dabei wies das Ausmaß der verstärkten *MYC*-Ausprägung eine große Variation auf und reichte von einer ca. 2,5-fachen Menge der *MYC*-Ausprägung in den GC-B-Zellen in der Zelllinie KM-H2 bis zu einer ca. 43,4-fachen Menge in der Zelllinie HDLM-2. Diese Unterschiede waren auch in den GEPs gesehen worden, wobei von den untersuchten Zelllinien auch die Linie KM-H2 die niedrigste und die Linie HDLM-2 die höchste *MYC*-Ausprägung zeigte (Abbildung 6). Somit wurden die GEPs erfolgreich validiert.

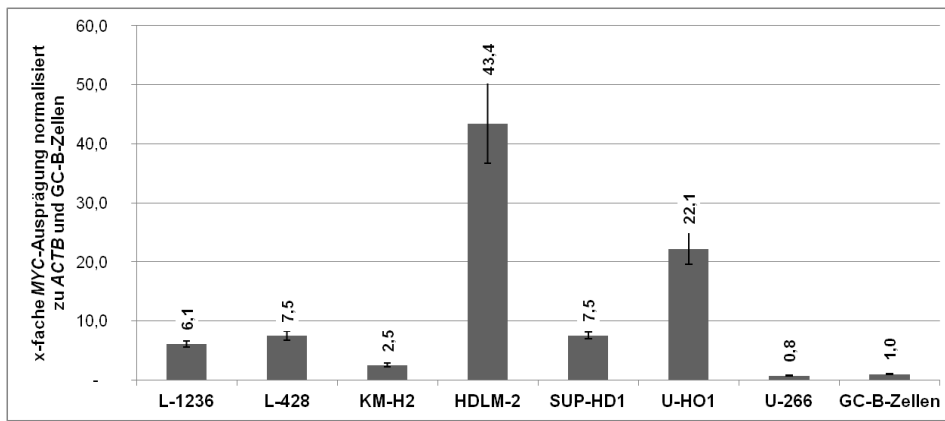


Abbildung 7: MYC-Ausprägung in cHL-Zelllinien

Die Menge an *MYC* wurde in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan[®]-qPCR bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert der GC-B-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten. Alle cHL-Zelllinien zeigten in verschiedenem Ausmaß eine vielfach erhöhte Ausprägung von *MYC* im Vergleich zu den GC-B-Zellen. Die Zelllinie U-266 hingegen prägte, wie erwartet, ähnlich viel *MYC* wie GC-B-Zellen aus.

Für die Untersuchung der *MYC*-Ausprägung auf Proteinebene wurden Western Blots für *MYC* und das Referenzgen *ACTB* zweier biologischer Replikate der cHL-Zelllinien L-1236, L-428, KM-H2, HDLM-2, SUP-HD1 und U-HO1, GC-B-Zellen und der U-266 durchgeführt (Abbildung 8). Dabei konnte für die Zelllinien L-428, U-HO1 und HDLM-2 sowohl *MYC1* und *MYC2* nachgewiesen werden, wohingegen in den restlichen Proben nur eine Bande für *MYC2* detektiert werden konnte. Da bisher nicht genau geklärt ist, welche unterschiedlichen Funktionen die verschiedenen Isoformen besitzen und *MYC2* die dominantere Isoform darstellt, beschränkten sich die weiteren Analysen in dieser Arbeit auf die *MYC2*-Isoform. Die anschließende quantitative Auswertung der Intensitäten der entsprechenden Banden erfolgte mit Hilfe der Phoretix 1D-Software. Dabei erfolgte eine Normalisierung der Intensitäten der *MYC*-Banden auf den jeweiligen *ACTB*-Wert, um etwaige Unterschiede der Proteinmenge auf den Membranen auszugleichen. Eine zusätzliche Normalisierung auf die GC-B-Zellen konnte nicht durchgeführt werden, da im zweiten biologischen Replikat keine *MYC*-Bande für die GC-B-Zellen detektiert werden konnte. Genauso konnte für die Linien L-1236 und U-266 im zweiten biologischen Replikat keine Bande für *MYC* nachgewiesen werden. Dies lag vermutlich an dem allgemein schwächeren *MYC*-Signal im zweiten Replikat, wodurch die schwachen Banden für *MYC* in diesen beiden Linien und auch der GC-B-Zellen unter der Nachweisgrenze lagen. Generell zeigte der Western Blot, dass bis auf die Linie L-1236 alle cHL-Zelllinien *MYC* im Vergleich zu den GC-B-Zellen auch auf Proteinebene verstärkt ausprägten (Abbildung 8). So wies die cHL-Zelllinie SUP-HD1 zumindest in dem ersten biologischen Replikat eine ca. 5-fach stärkere *MYC*-Expression im Vergleich zu den GC-B-Zellen auf, wohingegen im zweiten Replikat im Gegensatz zu den GC-B-Zellen zumindest eine schwache *MYC*-Bande detektiert werden konnte. Die Zelllinien L-428, KM-H2 U-HO1 und HDLM-2 wiesen eine 13- bis 25-fach erhöhte *MYC*-Expression auf. Somit korrelierte die

Proteinexpression nur bedingt mit der ermittelten mRNA-Ausprägung, da z.B. die Linie KM-H2 mit am stärksten MYC-Protein exprimierte, obwohl sie die niedrigste mRNA-Ausprägung von MYC aufwies. Dies zeigt, dass MYC in HRS-Zellen posttranskriptionell reguliert sein muss. Dazu passt auch, dass die L-1236 zwar mehr MYC-mRNA ausprägt als GC-B-Zellen, allerdings auf Proteinebene keine verstärkte MYC-Ausprägung nachgewiesen werden konnte. Die U-266 zeigte wie erwartet keine erhöhte Ausprägung von MYC auf Proteinebene.

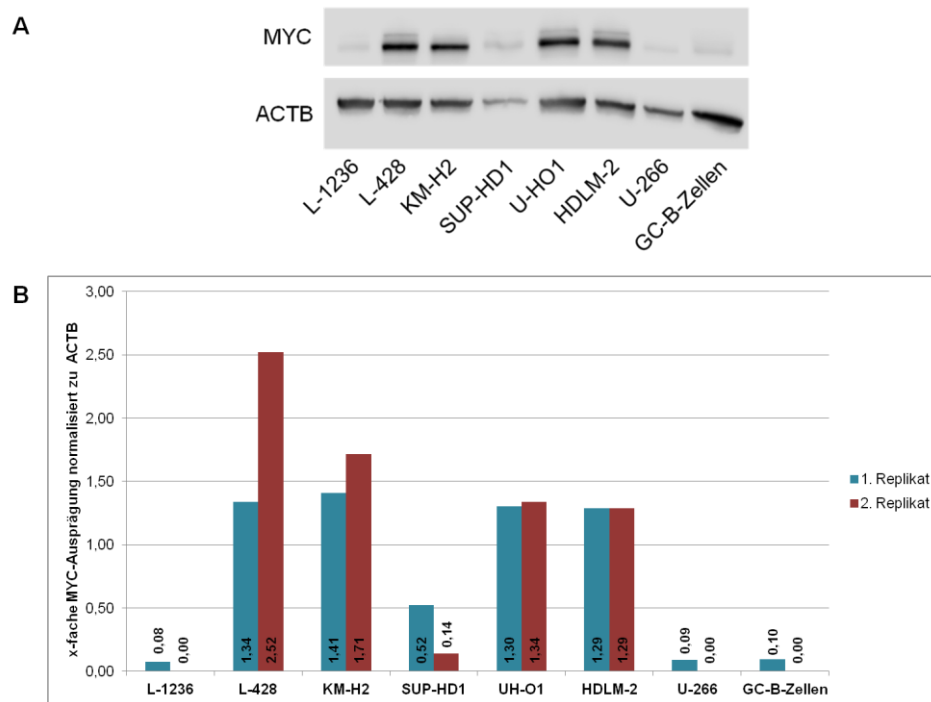


Abbildung 8: MYC-Ausprägung in cHL-Zelllinien

(A) MYC- und ACTB-Western Blot des 1. Replikates der untersuchten Zelllinien (B) Quantitative Auswertung der Western Blots mittels der Phoretix 1D-Software. Dabei erfolgte die Normalisierung der MYC-Ausprägung zur jeweiligen ACTB-Ausprägung. Zwei biologische Replikate sind dargestellt. Bis auf die cHL-Zelllinie L-1236 wiesen alle cHL-Zelllinien eine vielfach erhöhte MYC-Ausprägung im Vergleich zu den GC-B-Zellen auf. Die Zelllinie U-266 zeigte, wie erwartet, eine ähnlich starke MYC-Expression wie die GC-B-Zellen. Im zweiten Replikate konnte keine Bande für MYC in Proben von L-1236, U-266 und GC-B-Zellen detektiert werden.

Für eine bessere Einschätzung des Ausmaßes der erhöhten MYC-Expression in den cHL-Zelllinien wurden bei dem Western Blot mit den zweiten Replikaten die Burkitt-Lymphom Zelllinien Raji und DAUDI parallel untersucht. Diese Burkitt-Lymphom-Zelllinien weisen eine t(8;14)-Translokation auf, wodurch MYC unter Kontrolle des Ig-Enhancer gelangt und folglich sehr stark ausgeprägt wird. Der Vergleich der am stärksten MYC-ausprägenden cHL-Zelllinie L-428 mit den Burkitt-Zelllinien zeigt, dass MYC in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien nochmals ca. 2,5-fach stärker ausgeprägt wird.

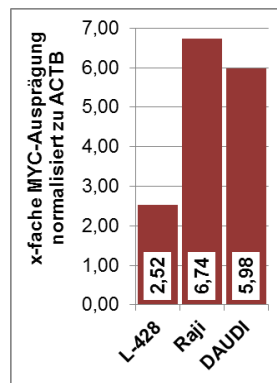


Abbildung 9: MYC-Ausprägung in der cHL-Zelllinie L-428 im Vergleich zu den Burkitt-Lymphom- Zelllinien Raji und DAUDI

Die MYC-Ausprägung der angegebenen Zelllinien wurde mittels Western Blot bestimmt und quantitativ mit der Phoretix 1D-Software ausgewertet. Dabei erfolgte die Normalisierung der MYC-Ausprägung zur jeweiligen ACTB-Ausprägung. Im Vergleich zu der cHL-Zelllinie L-428 zeigten die Burkitt-Lymphom-Zelllinien, die eine t(8;14)-Translokation und dadurch verursachte Deregelung von MYC aufweisen, eine ca. 2,5-fach stärkere MYC-Ausprägung.

Zusammenfassend konnte eine erhöhte MYC-Ausprägung im Vergleich zu den GC-B-Zellen in den cHL-Zelllinien mit Ausnahme der L-1236 auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. In weiterführenden Experimenten sollte eine Herabregulation von MYC durch eine lentiviral-vermittelte shRNA-Ausprägung in den cHL-Zelllinien erreicht werden, um somit Erkenntnisse zum Einfluss der erhöhten MYC-Expression auf den Phänotyp der HRS-Zellen zu gewinnen. Die cHL-Zelllinien dienten dabei als bewährtes Model der HRS-Zellen von primären Fällen. Für die nachfolgenden Infektionen mit den LeGO.G-Vektoren wurden die Zelllinien L-428, U-HO1 und KM-H2 ausgewählt, da diese neben der Linie HDLM-2 MYC am stärksten auf Proteinebene ausprägten und somit stärkere Phänotypen aufgrund des MYC-Verlustes in diesen Zellen erhofft wurden.

3.2.2 Erfolgreiche Herabregulation von MYC durch die lentiviral-vermittelte Ausprägung von shRNAs

Bevor die Untersuchungen zur Charakterisierung des Phänotyps der infizierten Zellen der verschiedenen Infektionen durchgeführt wurden, wurde zunächst die Funktionalität und auch die Stärke der Herabregulation von MYC in den infizierten Zellen, die shRNAs gegen MYC ausprägten, mittels TaqMan[®]-qPCR und Western Blot überprüft. Allgemein wurden die cHL-Zelllinien L-428, U-HO1 und KM-H2 in diesen Experimenten verwendet. Die Infektion mit den LeGO.G-Vektoren erfolgte hierbei mit einer MOI von 5. Damit nicht-transduzierte Zellen die erfolgreiche Herabregulation nicht überdeckten, erfolgte zuvor die Sortierung der transduzierten Zellen anhand des im LeGO.G-Vektor enthaltenem GFP. Die angewandte Sortierungsstrategie wurde bereits erklärt und ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Sortierung der Zellen erfolgte dabei an den Tagen 3 und 6 nach Infektion. In den TaqMan[®]-qPCRs und Western Blots diente generell die ScrMYC-Kontrolle zur Normalisierung der MYC-Ausprägung, da in dieser Kontrolle mögliche Einflüsse der Infektion und der

Ausprägung einer unspezifischen shRNA auf die MYC-Ausprägung eingeschlossen waren. Zusätzlich wurde bei jeder Infektion die *mock*-Kontrolle durchgeführt.

Für die TaqMan[®]-qPCRs wurden von den Zelllinien L-428 und U-HO1 je Population 40000 Zellen sortiert. Es wurden TaqMan[®]-qPCRs für *MYC* und die Referenzgene *ACTB* und *GAPDH* durchgeführt. Die Ergebnisse der TaqMan[®]-qPCRs der verschiedenen Infektionen mit Normalisierung zu *ACTB* ist in Abbildung 10 dargestellt. Insgesamt wurden in dieser Arbeit für die Linie L-428 vier und für die Linie U-HO1 fünf unabhängige Infektionen durchgeführt. Dabei erfolgte für die 4. und 5. Infektion der Linie U-HO1 der Nachweis der Herunterregulation von MYC nur noch an Tag 3, da die vorherigen Ergebnisse sehr konsistent waren. Allgemein wurde eine signifikante Herabregulation von *MYC* in den Zellen, die shMYC1- oder shMYC2-ausprägten, im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle nachgewiesen. Dabei konnte in der Zelllinie L-428 die *MYC*-Ausprägung auf das ca. 0,4-fache der *MYC*-Ausprägung in der ScrMYC-Kontrolle durch shMYC1 oder shMYC2 an Tag 3 und auf das ca. 0,3-fache an Tag 6 reduziert werden. In der Linie U-HO1 konnte durch shMYC1- oder shMYC2-Ausprägung eine Reduktion der *MYC*-Menge auf das ca. 0,5- und 0,35-fache der *MYC*-Expression in der ScrMYC-Kontrolle an Tag 3 bzw. 6 nach Infektion erzielt werden. Die shMYC3 wies, besonders in der L-428, genauso wie in den späteren Western Blot-Analysen (Abbildung 12), in den ersten beiden Infektionen eine schwächere Regulation auf und wurde daher in den späteren Infektionen weggelassen. In beiden Zelllinien prägten die nicht-infizierten Zellen der *mock*-Bedingung in etwa gleich viel *MYC* wie die ScrMYC-ausprägenden Zellen aus. Die Auswertung der TaqMan[®]-qPCR Ergebnisse mit Normalisierung zu *GAPDH* ergab das gleiche Ergebnis und zeigte eine erfolgreiche Herabregulation von *MYC*, insbesondere für shMYC1 und shMYC2 (Daten nicht gezeigt). Allerdings war hier die Herabregulation weniger stark. Bei weiteren Analysen fiel auf, dass bei einer Normalisierung zu *ACTB* die mRNA von *GAPDH* in den shMYC1- und shMYC2-ausprägenden Zellen um ca. 50% schwächer ausgeprägt war als in der ScrMYC-Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert eine Regulation der Referenzgene durch die Herabregulation von MYC, die sehr gut mit der Rolle von MYC als allgemeiner Verstärker der transkriptionellen Aktivität der Zelle vereinbar ist. Dabei scheint *ACTB* weniger stark von der Herabregulation von MYC betroffen zu sein als *GAPDH*.

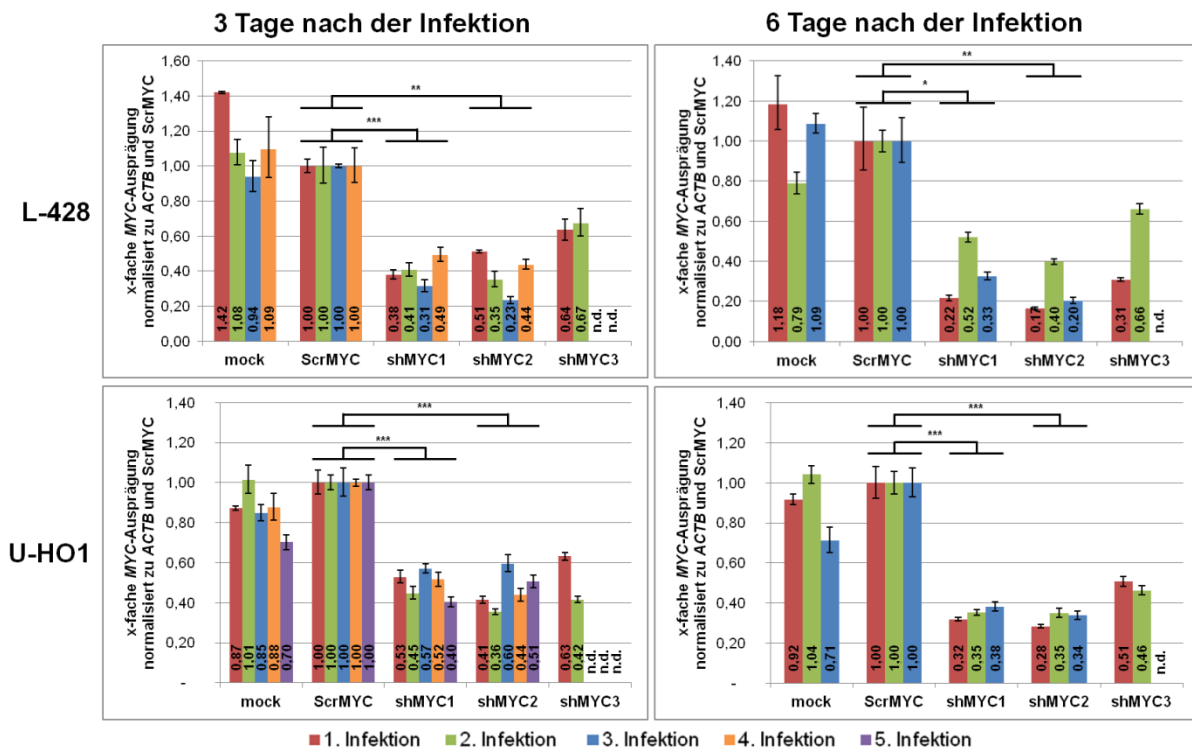


Abbildung 10: MYC-Ausprägung in sortierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428, und U-HO1 an Tag 3 und 6 nach den Infektionen mit LeGO.G-Viren

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 bzw. 6 nach der Infektion sortiert. Anschließend wurde die Menge an MYC in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan®-qPCRs bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta Ct$ -Methode zunächst zum jeweiligen ACTB-Wert und anschließend zum Wert der ScrMYC-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten von bis zu fünf unabhängigen Infektionen. Alle drei shRNAs gegen MYC führen an den getesteten Tagen zu einer deutlichen Herabregulation von MYC in beiden Zelllinien. Für die statistische Analyse der MYC-Herabregulation zwischen zwei Populationen wurden die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Infektionen und ein gepaarter zweiseitiger T-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen sind dargestellt durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. n.d. : nicht durchgeführt

Für die Western Blots zur Überprüfung der erfolgreichen Herabregulation von MYC in den cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 wurden mindestens 150000 Zellen sortiert. Ein Beispiel der Western Blots für MYC und das Referenzgen ACTB mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertungen der Infektionen der L-428 und U-HO1 ist in Abbildung 12 gezeigt. Insgesamt wurden Western Blots von vier und fünf unabhängigen Infektionen der Zelllinien L-428 bzw. U-HO1 durchgeführt. Leider war der Western Blot der 4. Infektion der Zelllinie L-428 nicht erfolgreich und konnte nicht ausgewertet werden. Da die übrigen Infektionen allerdings eine hohe Konsistenz der MYC-Herabregulation zwischen mRNA- und Proteinebene zeigten, wurde die 4. Infektion auch in weiterführenden Experimenten verwendet. Für die 4. und 5. Infektion der Linie U-HO1 wurde der Western Blot nur mit an Tag 3 nach der Infektion sortierten Zellen durchgeführt, da hier die vorherigen Ergebnisse eine Konsistenz der MYC-Herabregulation zwischen Tag 3 und Tag 6 zeigten. Zusammenfassend führte die Ausprägung der shMYC1 oder shMYC2 in beiden Zelllinien zu einer starken Herabregulation von MYC, die signifikant

waren. So konnte in der cHL-Zelllinie L-428 durch die Expression von shMYC1 oder shMYC2 die MYC-Ausprägung an Tag 3 und Tag 6 nach der Infektion auf ca. 30% bzw. ca. 23% der MYC-Ausprägung in der ScrMYC-Kontrolle herabreguliert werden. In der Linie U-HO1 reduzierte sich die MYC-Ausprägung durch shMYC1- oder shMYC2-Expression auf ca. 16% und 10% des Referenzwertes an Tag 3 bzw. 6 nach der Infektion. Die shMYC3 hingegen zeigte nur eine moderate Herabregulation und wurde daher nach zwei Infektionen nicht weiter verwendet. Bei Betrachtung der MYC-Ausprägung in den nicht-infizierten Zellen der *mock*-Bedingung und der ScrMYC-Kontrolle fiel eine moderate Herabregulation von MYC an Tag 3 nach der Infektion in der Linie L-428 und zusätzlich in einer der drei Infektionen an Tag 6 nach der Infektion auf. Zusätzlich konnte eine moderate Reduzierung von MYC in 3 der 5 Infektionen an Tag 3 in der Linie U-HO1 nachgewiesen werden. In allen Fällen wurde nicht weiter untersucht, wodurch diese Regulationen verursacht wurden. Bei dem einzelnen Ausreißer in der Zelllinie L-428 an Tag 6 nach der Infektion könnte es sich um einen technischen Fehler handeln. Eine mögliche Erklärung für die vermeintlich schwächere Expression in der *mock*-Bedingung an Tag 3 nach der Infektion in beiden Zelllinien wäre, dass die Infektion mit einem Virus z.B. zu einer Stimulation eines MYC-aktivierenden Signalweges führt oder dass die Expression einer shRNA die endogene miRNA-Maschinerie überlädt, wodurch eine MYC-hemmende miRNA nicht ihre vollständige Aktivität entfalten kann. Dies ist aber rein spekulativ.

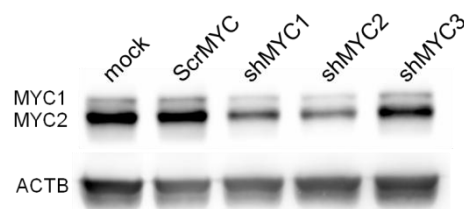


Abbildung 11: MYC-Ausprägung in der cHL-Zelllinie L-428 an Tag 3 nach Infektion mit LeGO.G-Viren

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 nach der Infektion sortiert. Anschließend wurde die Menge an MYC in den verschiedenen Zellpopulationen mittels Western Blot bestimmt. Zur Kontrolle der gleichen Proteinladung auf dem Gel ist ACTB nachgewiesen worden. Im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle zeigten die Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 ausprägten, eine deutliche Herabregulation von MYC. Die Ausprägung von shMYC3 führte hingegen nicht zu einer Reduktion der MYC-Menge. Die *mock*-Bedingung wies gleich viel MYC auf wie die ScrMYC-Kontrolle.

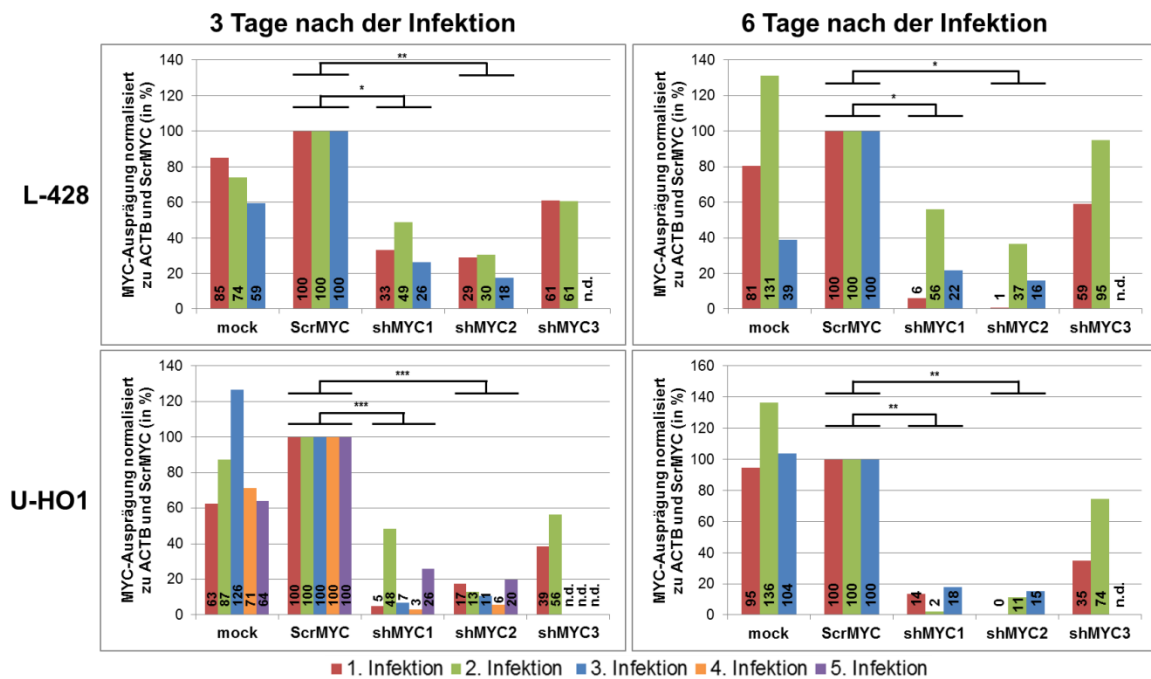


Abbildung 12: MYC-Ausprägung in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 an Tag 3 und 6 nach den Infektionen

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 bzw. 6 nach den Infektionen sortiert. Anschließend wurden Western Blots für MYC und ACTB durchgeführt und diese quantitativ mit der Phoretix-1D Software ausgewertet. Dabei erfolgte die Normalisierung der MYC-Ausprägung zur MYC-Ausprägung in der jeweiligen ScrMYC-Kontrolle und zur ACTB-Ausprägung. Dargestellt sind die ermittelten Werte von bis zu fünf unabhängigen Infektionen. In beiden Zelllinien führte die Ausprägung von shRNA gegen MYC zu einer Herabregulation von MYC, wobei die shMYC3 insgesamt einen schwächeren Effekt zeigte. Für die statistische Analyse der MYC-Herabregulation zwischen zwei Populationen wurden die normalisierten Expressionswerte der einzelnen Infektionen und ein gepaarter zweiseitiger T-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen sind dargestellt durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. n.d.: nicht durchgeführt

Zusätzlich wurde mittels Western Blot auch die Herabregulation von MYC einer Infektion der cHL-Zelllinie KM-H2 überprüft. Hierbei wurde neben der *mock*- und ScrMYC-Kontrolle nur die shMYC1 und shMYC2 verwendet, da aus den vorherigen Versuchen mit den Zelllinien L-428 und U-HO1 bekannt war, dass diese beiden shRNAs eine stärkere Herunterregulation von MYC bewirken. Im Ergebnis zeigte sich in der KM-H2 nur eine moderate Herabregulation von MYC in den shMYC1 und shMYC2 ausprägenden Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle (Abbildung 13). Aufgrund dieser schwächeren Herabregulation von MYC in der KM-H2 im Vergleich zu den Resultaten in den Linien L-428 und U-HO1 wurden keine weiterführenden Experimente in Bezug auf die Funktion von MYC mit der Zelllinie KM-H2 durchgeführt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die lentiviral-vermittelte Ausprägung von shRNAs gegen MYC mittels des LeGO.G-Vektors in den beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 MYC erfolgreich in allen durchgeführten Infektionen auf mRNA- und Proteinebene herunter reguliert wurde. Dies ermöglichte die phänotypische Charakterisierung der infizierten Zellen. Da MYC ein wichtiger Regulator der Proliferation

und Überleben der Zellen ist sollte dieser Aspekt in den infizierten Zellen als erstes untersucht werden.

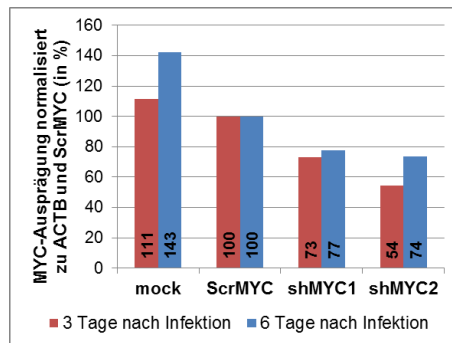


Abbildung 13: MYC-Ausprägung in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie KM-H2 an Tag 3 und Tag 6 nach der Infektion

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und 3 bzw. 6 Tage nach Infektion sortiert. Anschließend wurde ein Western Blot für MYC und ACTB durchgeführt und quantitativ mit der Phoretix-1D Software ausgewertet. Dabei erfolgte die Normalisierung der MYC-Ausprägung zur MYC-Ausprägung in der ScrMYC-Kontrolle und zur jeweiligen ACTB-Ausprägung. Die Ausprägung von shRNAs gegen *MYC* führte nur zu einer moderaten Herabregulation von MYC in der Zelllinie KM-H2, so dass entschieden wurde keine weiterführenden Experimente mit dieser Zelllinie durchzuführen.

3.2.3 Verringerte Proliferation von Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 mit MYC-Herabregulation

MYC nimmt als Transkriptionsfaktor direkten Einfluss auf die Proliferation, die Zell-Zyklus-Kontrolle und die Apoptose der Zelle. Daher wurde in einem ersten Schritt zur Charakterisierung des Phänotyps der MYC-Herabregulation in den cHL-Zelllinien, die Auswirkung der MYC-Herabregulation auf die Proliferation und das Überleben der Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit den LeGO.G-Viren infiziert und für mehrere Tage in Kultur gehalten. Dabei erfolgte keine Trennung der infizierten von den nicht-infizierten Zellen, so dass eine Mischkultur vorlag. Nach der Infektion wurde in regelmäßigen Abständen der Anteil der GFP-positiven und damit infizierten Zellen in diesen Mischkulturen mittels FACS gemessen. Dabei wurde zusätzlich eine PI-Färbung durchgeführt, damit nur lebende Zellen untersucht wurden. Durch Messung des zeitlichen Verlaufs des Anteils der GFP-positiven Zellen in der Mischkultur sollte ein evtl. Vor- oder Nachteil im kompetitiven Wachstum der Zellen mit herabreguliertem MYC gegenüber nicht infizierten Zellen untersucht werden. Parallel wurden auch ScrMYC-infizierte Zellen und *mock*-behandelte Zellen analysiert, um die Spezifität des Effektes der Herabregulation von MYC zu zeigen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen der unterschiedlichen Populationen immer in gleichen optimalen Zelldichten gehalten wurden und auch sonst gleich behandelt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Transduktionseffizienzen der verschiedenen Viren und Infektionen wurden die ermittelten Anteile der GFP-positiven Zellen auf den Wert an Tag 6 normalisiert, da zu diesem Zeitpunkt in der Regel der maximale Anteil an GFP-positiven Zellen gemessen wurde. Des Weiteren erlaubt diese Normalisierung eine optisch bessere Darstellung und

einen einfacheren Vergleich der verschiedenen Bedingungen. Generell konnte in den Tagen bis Tag 6 nach Infektion kein spezifischer Effekt der shMYC1- oder shMYC2-Ausprägung nachgewiesen werden, da der Anteil der GFP-positiven Zellen in allen mit Virus infizierten Bedingungen in diesem Zeitraum zunahm. Dies lag vermutlich an unterschiedlichen Übergangszeiten von Integration des Provirus bis zur Expression des GFPs in den infizierten Zellen. Die Messungen vor Tag 6 sind daher nicht in Abbildung 14 dargestellt. Zusätzlich wurde in den Experimenten die absolute Zellzahl mittels Zählung in der Neubauerkammer bestimmt. Insgesamt wurde dieses Experiment für die cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 mit drei unabhängigen Infektionen durchgeführt. Allgemein konnte eine deutliche Abnahme des Anteils GFP-positiver Zellen in den Zellen mit herabregulierten MYC in beiden Zelllinien über den zeitlichen Verlauf beobachtet werden (Abbildung 14). So war nach über 20 Tagen nach der Infektion der Zelllinie L-428 der Anteil der GFP-positiven Zellen in den shMYC1-infizierten Zellen auf ca. 30-35% des ursprünglichen Werts an Tag 6 nach der Infektion gesunken. In den mit shMYC2-infizierten Zellen sank der Anteil auf ca. 20% des Ursprungswerts ab. Auch in den U-HO1 Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 exprimierten, sanken die Anteile jeweils auf ca. 20% und 10% des Wertes an Tag 6 nach der Infektion. Dagegen blieb der Anteil der GFP-positiven Zellen in den ScrMYC-Kontrollen relativ konstant. Nur in der 2. Infektion beider Zelllinien war ein leichter Abfall im GFP-Anteil zusehen, der aber weniger stark als in den shMYC1- und shMYC2-exprimierenden Zellen war. Somit wiesen Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1, die MYC herabreguliert hatten, ein schlechteres kompetitives Wachstum gegenüber Zellen mit normaler MYC-Ausprägung auf. Die Bestimmung der Gesamt-Zellzahlen in diesen Experimenten konnte keinen Unterschied in den mit den verschiedenen Vektoren-infizierten Zellen aufzeigen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass der Anteil der nicht-infizierten Zellen in den shMYC1- und shMYC2-infizierten Mischkulturen das geringe Wachstum der infizierten Zellen kompensieren konnte. Hierbei ist zu bedenken, dass die Passage der Zellen alle 3 bis 4 Tage stattfand und die Zellen jeder Bedingung zu diesen Zeitpunkten oft die obere optimale Zelldichte erreicht hatten. Daher könnte es sein, dass ein möglicher Unterschied in den Zellzahlen nicht ermittelt wurde, weil die besser wachsenden Zellen der *mock*- und ScrMYC-Bedingung die obere Zelldichte früher erreicht hatten, danach aber nicht weiter wachsen konnten, wohingegen in den shMYC1- oder shMYC2-infizierten Mischkulturen die Zellen zwar langsamer wuchsen, dennoch die obere Zelldichte vor der nächsten Passage der Zellen erreicht wurde.

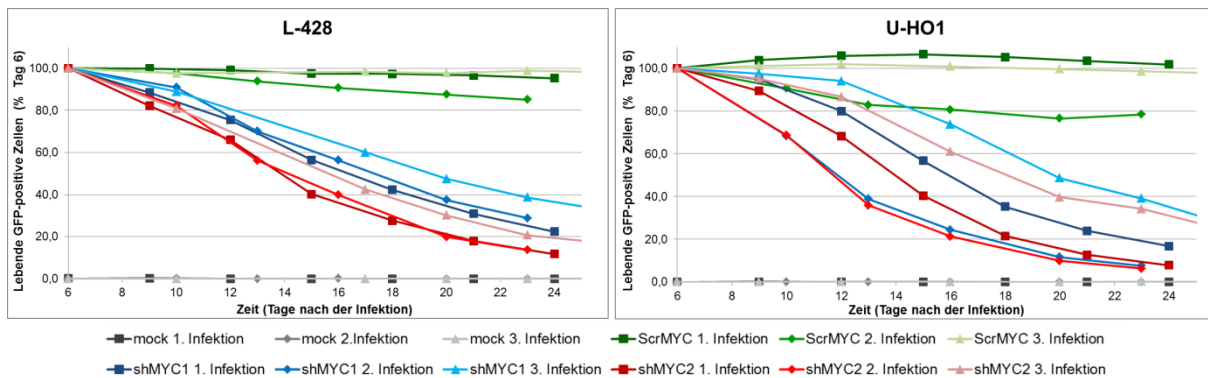


Abbildung 14: Schlechteres kompetitives Wachstum von Zellen, die shRNAs gegen MYC ausprägen, im Vergleich zu nicht infizierten Zellen in den cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1

Die Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und in Kultur gehalten. An Tag 6 nach der Infektion wurde der Anteil der lebenden GFP-positiven und damit infizierten Zellen mittels FACS-Analyse nach vorheriger PI-Färbung in der Kultur bestimmt. In den folgenden Tagen wurde diese Messung wiederholt und der Anteil der infizierten Zellen auf den Wert an Tag 6 normalisiert. In beiden Zelllinien führte der Verlust von MYC zu einer Abnahme des Anteils infizierter Zellen. Somit besitzen Zellen, die weniger MYC ausprägen, einen Wachstumsnachteil gegenüber Zellen, die MYC normal exprimieren. Zellen der ScrMYC-Kontrolle hingegen zeigten keinen Wachstumsnachteil gegenüber den nicht infizierten Zellen. Da die Zellen der *mock*-Bedingung nicht infiziert wurden, konnte hier kein GFP nachgewiesen werden.

Um den Einfluss von MYC auf die Proliferation der infizierten Zellen genauer zu untersuchen und um auszuschließen, dass die Interaktion mit nicht-infizierten Zellen oder parakrine Faktoren von nicht-infizierten Zellen die transduzierten Zellen beeinflussten, wurden GFP-sortierte Zellen wieder in Kultur genommen und die Anzahl der Zellen über mehrere Tage verfolgt. Dafür wurden die Zellen mit den LeGO.G-Viren infiziert, an Tag 3 nach der Infektion sortiert und wieder in Kultur genommen. An den folgenden Tagen wurde die Anzahl an Zellen mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Insgesamt wurden je drei unabhängige Infektionen für die beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 untersucht. Bei einer Infektion der Zelllinie L428 wurden die Zellen nicht an Tag 3 sondern an Tag 6 nach der Infektion sortiert. In Abbildung 15 sind die ermittelten Zellzahlen der unterschiedlichen Zellpopulationen und Infektionen dargestellt. Für die Zelllinie L-428 konnte in den drei Infektionen eine verminderte Zunahme der Anzahl an Zellen in den mit shMYC1- und shMYC2-ausprägenden Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte shMYC1 in zwei der drei Infektionen nur einen schwachen Effekt. Die Ausprägung von shMYC2 hingegen wies in allen drei Infektionen der L-428 einen stärkeren Effekt auf. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen der vorherigen Versuche, in denen die shMYC2 auch einen stärkeren Effekt in dieser Zelllinie aufgewiesen hatte. In allen Infektionen mit der Zelllinie U-HO1 stagnierte die Anzahl der Zellen in den shMYC1- oder shMYC2-exprimierenden Zellen, wohingegen die Anzahl der Zellen der *mock*-Bedingung und die der Zellen, die ScrMYC ausprägten, anstieg. Dies zeigt, dass MYC in der U-HO1 ein entscheidender Proliferationsfaktor ist.

Zusammenfassend konnte die wichtige Rolle von MYC für die Proliferation der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 gezeigt werden. Allerdings lassen sich die gezeigten Ergebnisse durch

eine verminderte Zellteilung oder durch ein vermindertes Überleben der Zellen erklären. Denkbar wäre auch eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten. Da MYC sowohl die Proliferation als auch das Überleben von Zellen regulieren kann, sollten im Folgenden nähere Untersuchungen zur Beteiligung von MYC zu diesen beiden Prozess in den untersuchten cHL-Zelllinien durchgeführt werden.

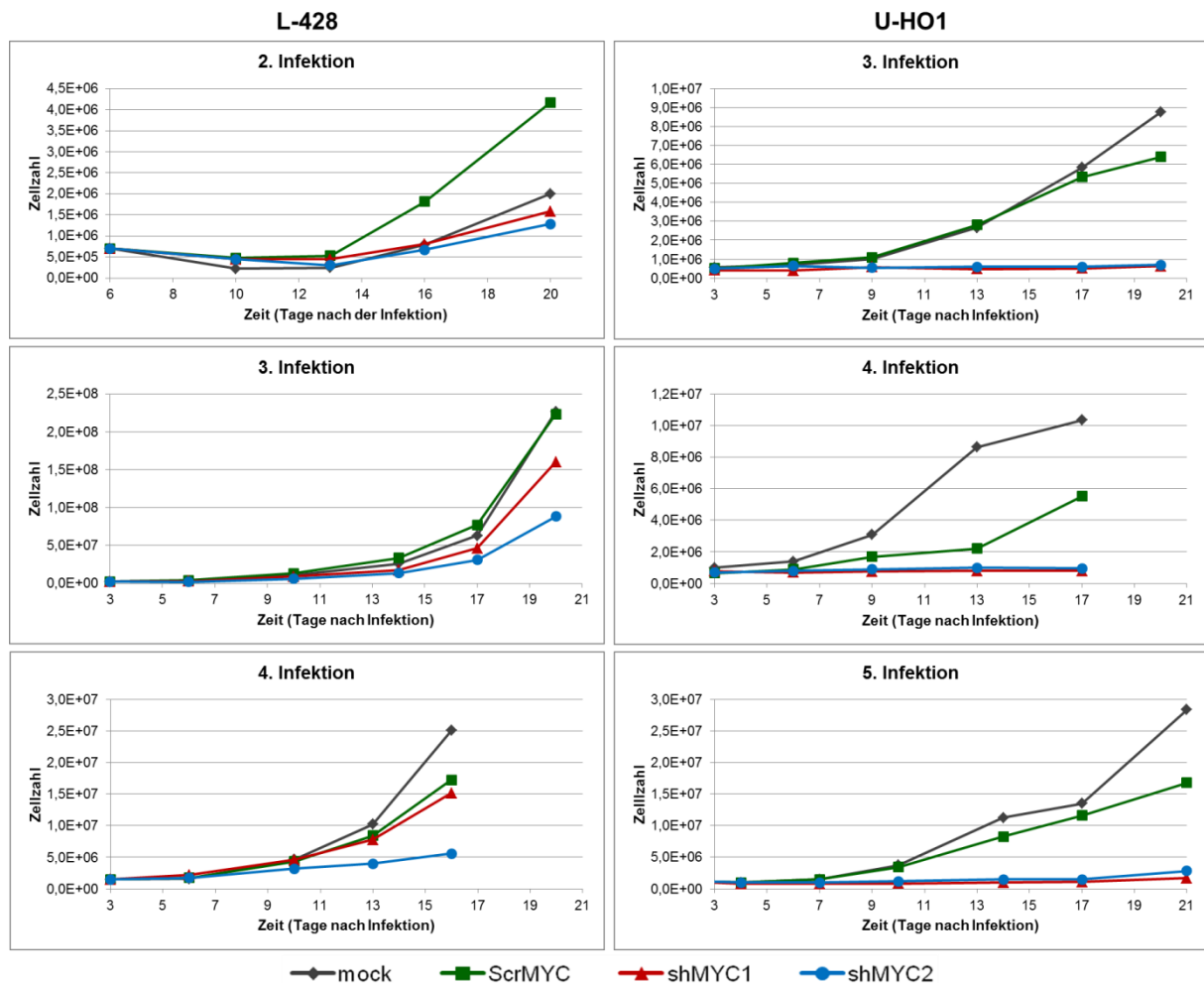


Abbildung 15: Verminderte Proliferation von Zellen mit MYC-Herabregulation der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1

Die Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 wurden mit den entsprechenden LeGO.G-Viren infiziert. An Tag 3 bzw. Tag 6 wurden die infizierten Zellen als GFP-positive Zellen sortiert und in Kultur genommen. Die Zellen der *mock*-Bedingung wurden als GFP-negative Zellen sortiert. An den folgenden Tagen wurden die Zellzahlen ermittelt und die Zellen ihrer optimalen Zelldichte entsprechend mit frischem Medium weiter kultiviert. Für jede Zelllinie sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Infektionen dargestellt. Bei der Zelllinie L-428 führte die verminderte MYC-Ausprägung zu einer verlangsamten Proliferation der Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle. In der U-HO1 hingegen kam es in den Zellen, die MYC herunterreguliert hatten, zu einem Proliferationsstopp.

3.2.4 Auswirkung der MYC-Herabregulation auf das Überleben der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1

Um zu klären, welche Rolle MYC für das Überleben der Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 hat, wurden Annexin V- und PI-Färbungen von zuvor sortierten und wieder in Kultur genommenen infizierten Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit den

entsprechenden LeGO.G-Viren infiziert, an Tag 3 die infizierten Zellen als GFP-positive lebende Zellen sortiert und wieder in Kultur genommen, damit sich die Zellen vor der Annexin V- und PI-Färbung vom Stress des Sortiervorganges erholen konnten. An Tag 6 nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit Annexin V und PI gefärbt und anschließend im FACSCanto™ gemessen. Dabei erfolgte zunächst der Ausschluss von Zelltrümmern mittels eines entsprechenden Auswahlfensters im FSC-A und SSC-A und anschließend die Auswahl dreier Populationen anhand des Annexin V- und PI-Signals (Abbildung 16 und 17). Diese drei Populationen waren: Annexin V/PI⁻, die die lebenden Zellen darstellten, Annexin V⁺/PI⁻, die die sterbenden Zellen in einem frühem Stadium darstellten und Annexin V⁺/PI⁺, die die sterbenden Zellen in einem späten Stadium oder bereits tote Zellen darstellten. Die Population der Annexin V/PI⁺ Zellen, die in manchen Messungen auftraten, wurde bei diesen Messungen nicht berücksichtigt, da deren Herkunft nicht eindeutig geklärt wurde. So stellte diese Population vermutlich nekrotische Zellen dar, die z.B. erst nach der Annexin V-Färbung im Verlauf der vielen Waschschriffe entstanden war. Für die Auswertung wurden die Anteile der Annexin V⁺ Populationen verglichen. Dabei wurden die shMYC1- und shMYC2-infizierten Zellen mit der ScrMYC-Kontrolle verglichen, da diese Kontrolle etwaige Effekte der Virusinfektion und Ausprägung einer shRNA berücksichtigt. Zusätzlich wurde dennoch eine *mock*-Bedingung analysiert, um Einflüsse der Virusinfektion und Ausprägung einer shRNA aufzuzeigen. Insgesamt wurden für die cHL-Zelllinie L-428 je eine Messung zweier unabhängiger Infektionen (die 2. und 4. Infektion in dieser Arbeit) und für die Linie U-HO1 je eine Messung dreier unabhängiger Infektionen (3. bis 5. Infektion in dieser Arbeit) durchgeführt. Generell zeigten sich bei den prozentuellen Anteilen der analysierten Populationen zwischen den Infektionen große Unterschiede, die die Heterogenität der einzelnen Infektionen unterstreicht. Dennoch waren die Tendenzen des Effektes der MYC-Herabregulation auf das Überleben der beiden cHL-Zelllinien zwischen den verschiedenen Infektionen konsistent. Ein bei der Auswertung zu beachtender Nachteil dieser Methode ist, dass durch Analyse der Zellen an Tag 6 nach der Infektion nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich bereits einige Zellen in einem sehr späten Stadium des Zelltods befanden, in dem die Zellen nur noch als Zelltrümmer vorlagen, wodurch sie von der Analyse ausgeschlossen wurden. Daher kann es sein, dass das Ausmaß des Zelltods in den Bedingungen unterschätzt wurde.

Die Ergebnisse der Annexin V- und PI-Färbungen mit infizierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428 ist in Abbildung 16 dargestellt. In den Zellen, die aufgrund der Ausprägung von shMYC1 oder shMYC2 weniger MYC exprimierten, zeigte sich ein höherer Anteil sterbender Zellen, d.h. Annexin V⁺ Zellen, im Vergleich zu den Zellen, die ScrMYC ausprägten. Im Detail stieg der prozentuelle Anteil sterbender Zellen in der 2. Infektion der L-428 dieser Arbeit in shMYC1- oder shMYC2-produzierender Zellen im Vergleich zu ScrMYC-produzierenden Zellen von 19,2% auf 23,3% oder 34,8%. In der 4. Infektion der L-428 stiegen die Anteile von

20,3% auf 22,9% und 27,4%. In Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten wiesen die shMYC2-ausprägenden Zellen wieder einen stärkeren Phänotyp auf als die Zellen, die shMYC1 exprimierten. Leider konnten aufgrund der geringen Anzahl der Wiederholungen dieses Experimentes keine statistischen Methoden zur Signifikanzberechnung durchgeführt werden. Dennoch lassen diese Daten stark vermuten, dass MYC in der cHL-Zelllinie L-428 einen positiven Effekt auf das Überleben der Zellen ausübt. Beim Vergleich der Anteile der sterbenden Zellen in der *mock*-Bedingung zur ScrMYC-Kontrolle fiel auf, dass die Virusinfektion für die cHL-Zelllinien L-428 auch einen positiven Effekt auf das Überleben der Zellen hat. So waren die prozentuellen Anteile der sterbenden Zellen in den *mock*-Bedingungen beider Infektionen höher als die der ScrMYC-Kontrolle. Hier wäre denkbar, dass die Virusinfektion eine Stressantwort in den Zellen auslöst, die zu einer besseren Kompensation des Stresses des Sortiervorganges führt.

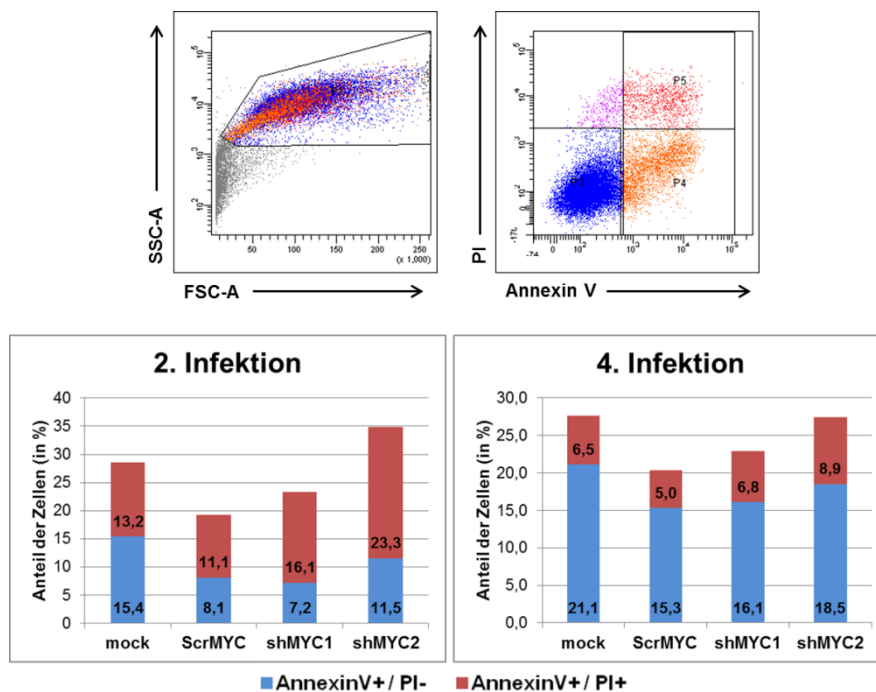


Abbildung 16: Verringerteres Überleben der Zellen der cHL-Zelllinie L-428 mit MYC-Herabregulation

Die Zellen wurden mit den entsprechenden LeGO.G-Viren infiziert. An Tag 3 nach der Infektion wurden die infizierten Zellen sortiert und wieder in Kultur genommen. An Tag 6 nach der Infektion erfolgten die Annexin V- und PI-Färbung der Zellen und die Messung mittels FACS. Dabei wurde zunächst ein Auswahlfenster im FSC-A und SSC-A gewählt, welches Zelltrümmer ausschließt. Danach wurden Auswahlfenster für folgende Populationen gewählt: AnnexinV⁻/PI⁻, die lebende Zellen darstellten, AnnexinV⁺/PI⁻, die sterbende Zellen in einem frühem Stadium darstellen und AnnexinV⁺/PI⁺, welche die sterbenden Zellen in einem späten Stadium bzw. tote Zellen darstellen. Die Ergebnisse zweier unabhängiger Infektionen der cHL-Zelllinie L-428 sind dargestellt. Im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle wiesen Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 ausprägten, mehr sterbende und tote Zellen auf. Somit trägt MYC zum Überleben der Zellen der L-428 bei. Der erhöhte Anteil an sterbenden und toten Zellen in der *mock*-Bedingung lässt einen positiven Effekt der Virusinfektion auf das Zellüberleben vermuten. Evtl. wurde durch die Infektion eine Stressreaktion ausgelöst, die die Zellen vor dem Stress beim Sortieren schützte.

Die Ergebnisse der Annexin V- und PI-Färbungen der cHL-Zelllinie U-HO1 sind in Abbildung 17 dargestellt. Hier zeigte die Herabregulation von MYC einen zur Linie L-428 gegenteiligen Effekt. So führte die verminderte MYC-Ausprägung in den U-HO1-Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 exprimierten, zu einem besseren Überleben der Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle. So sank der Anteil der sterbenden Zellen in der 3. Infektion der cHL-Zelllinie U-HO1 in dieser Arbeit in den Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 ausprägten, im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle von 29,1% auf 22% bzw. 24,2%. In der 4. Infektion sank der Anteil von 25,8% in ScrMYC-ausprägenden Zellen auf 18,6% in den shMYC1-exprimierenden Zellen bzw. auf 17,1% in den shMYC2-exprimierenden Zellen. Genauso verminderte sich der Anteil der sterbenden Zellen in der 5. Infektion der Zelllinie U-HO1 von 16,1% auf 12% bzw. 10,8% in den ScrMYC-, shMYC1- und shMYC2-ausprägenden Zellen. Aufgrund der geringen Wiederholungen und der starken Heterogenität der einzelnen Infektionen konnten keine Signifikanzen dieser Unterschiede ermittelt werden. Da die Tendenzen aber in den drei Infektionen gleich waren, wurde dennoch gefolgert, dass die verminderte

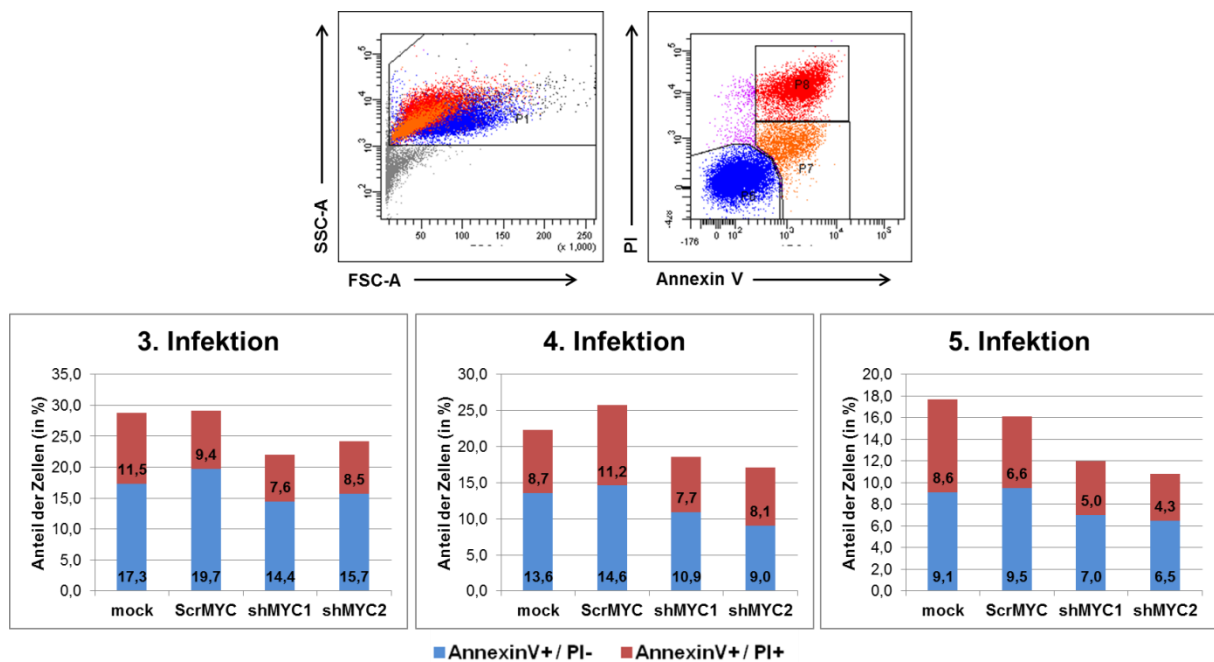


Abbildung 17: Verbessertes Überleben der Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 mit MYC-Herabregulation

Die Zellen wurden mit den entsprechenden LeGO.G-Viren infiziert. An Tag 3 nach der Infektion wurden die infizierten Zellen sortiert und wieder in Kultur genommen. An Tag 6 nach der Infektion erfolgten die Annexin V- und PI-Färbungen der Zellen und die Messung mittels FACS. Dabei wurde zunächst ein Auswahlfenster im FSC-A und SSC-A gewählt, welches Zelltrümmer ausschließt. Danach wurden Auswahlfenster für folgende Populationen gewählt: AnnexinV⁻/PI⁻, die lebende Zellen darstellten, AnnexinV⁺/PI⁻, die sterbende Zellen in einem frühen Stadium darstellten und AnnexinV⁺/PI⁺, welche die sterbenden Zellen in einem späten Stadium bzw. tote Zellen darstellten. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Infektionen der cHL-Zelllinie U-HO1 sind dargestellt. Im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle wiesen Zellen, die mit shMYC1 oder shMYC2 infiziert wurden, weniger sterbende und tote Zellen auf. Die verminderte Ausprägung von MYC führte also zu einem verbesserten Überleben der Zellen. Die Zellen der *mock*-Bedingung hingegen wiesen ähnlich viele tote Zellen wie die ScrMYC-Kontrolle auf.

MYC-Expression in der Zelllinie U-HO1 zu einem besseren Überleben der infizierten Zellen führt. Somit ist in der Linie U-HO1 keine erhöhte Sterberate an dem beobachteten Wachstumsnachteil und Stagnation der Anzahl an sortierten Zellen nach MYC-Herabregulation beteiligt. Die Zellen der *mock*-Bedingung wiesen im Gegensatz zu der Situation in der Zelllinie L-428 in allen analysierten Infektionen einen ähnlichen Anteil an sterbenden Zellen als die ScrMYC-Kontrolle auf. Der gleiche Effekt des besseren Überlebens der Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 mit herabreguliertem MYC wurden auch bei Annexin V- und PI-Messungen an Tag 9 nach der Infektion mit an Tag 3 sortierten Zellen in drei unabhängigen Infektionen gesehen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigte sich in den beiden cHL-Zelllinien eine gegensätzliche Rolle von MYC für das Überleben der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1. In der Linie L-428 fördert MYC das Überleben der Zellen, während in der Zelllinie U-HO1 die Ausprägung von MYC eher zu einer gesteigerten Sterberate führt. Da beides bekannte Effekte von MYC sind, scheint die Rolle von MYC für das Überleben der Zellen der cHL-Zelllinien nicht eindeutig zu sein und vom jeweiligen Kontext, d.h. vorliegende genetische Läsionen und aberrant aktivierten Signalwegen abzuhängen.

3.2.5 Auswirkung der MYC-Herabregulation auf die Proliferation der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1

Der Einfluss der MYC-Ausprägung auf die Proliferation der beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 wurde mit Hilfe des Membran-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Vybrant® DiD überprüft. Die Zellen werden zu Beginn einer Messung gleichmäßig angefärbt und die Fluoreszenz mittels FACS gemessen. Durch Kultivierung der Zellen und dabei einhergehender Zellteilung wird der Farbstoff in gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt. Durch erneute Messung im FACS kann die Abnahme der Fluoreszenzintensität, die proportional zur Zellteilungsrate ist, gemessen werden. Durch Vergleich der Zellen, die shRNAs gegen MYC ausprägen, mit Zellen der ScrMYC-Kontrolle konnte eine Aussage über den Einfluss von MYC auf die Zellproliferation der Zellen getroffen werden. Für die Versuche wurden die Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 zunächst mit den entsprechenden Viren infiziert und zusätzlich die *mock*-Bedingung durchgeführt. An Tag 3 erfolgte die Färbung der Zellen mit dem Vybrant® DiD-Farbstoff. Eine Sortierung der infizierten Zellen, um reine Zellpopulationen zu gewinnen, war hierbei nicht notwendig, da die spätere Analyse im FACSCanto™ es ermöglichte, die Auswertung auf die infizierten Zellen zu begrenzen. Zusätzlich hatten Etablierungsarbeiten gezeigt, dass die Zellen nach einer Sortierung zunächst schlechter proliferierten, wodurch keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten. Für die Analyse im FACSCanto™ wurde an den folgenden Tagen ein Aliquot der gefärbten Zellen entnommen und der Rest wurde weiter kultiviert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen im unteren Bereich ihrer optimalen Zelldichte gehalten wurden, um

eine gute Proliferation zu ermöglichen. Bei der Analyse im FACS erfolgte zunächst der Ausschluss von Zelltrümmern und großen Zellaggregaten mittels eines Auswahlfensters im FSC-A und SSC-A. Dann wurden die infizierten Zellen als GFP-positive Zellen ausgewählt und anschließend die Intensität des DiD-Signals im APC-Kanal bestimmt. Für die *mock*-Bedingung wurden GFP-negative Zellen analysiert. Für jede Infektion erfolgte die Messung an mehreren Tagen und die Abnahme der Intensitäten der DiD-Signale zeigte die Proliferation der Zellen an. Für die weitere Auswertung und grafische Präsentation der Daten wurden die ermittelte Intensität des DiD-Signals einer Population einer Infektion auf den jeweiligen Wert an Tag 0 normalisiert. Insgesamt wurden Zellen der cHL-Zelllinie L-428 von zwei unabhängigen Infektionen, d.h. die 4. und 5. Infektion dieser Zelllinie in dieser Arbeit, und Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 von drei unabhängigen Infektionen, d.h. die 3.-5. Infektion dieser Zelllinie, mittels Vybrant® DiD untersucht.

Die Ergebnisse der Vybrant® DiD-Färbungen der cHL-Zelllinie L-428 sind in Abbildung 18 dargestellt. In beiden Infektionen wiesen die Zellen, die MYC herunterreguliert haben, eine leicht verminderte Proliferation auf. Dies erkennt man an der langsameren Abnahme der Intensität des DiD-Signals in den Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 ausprägten, im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle. Während sich dieser Unterschied im zeitlichen Verlauf der 5. Infektion recht deutlich darstellte, war der Unterschied in der 4. Infektion schwächer, aber dennoch vorhanden. Zusätzlich zeigte sich, dass Zellen mit herabreguliertem MYC überhaupt proliferieren, da die Intensität des DNA-Signals abnimmt. Zwischen den Zellen der *mock*-Bedingung und denen der ScrMYC-Kontrolle war hingegen kein deutlicher Unterschied in der Proliferationsrate zu sehen. Folglich scheint die Ausprägung von MYC einen schwachen proliferationsfördernden Effekt in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 zu haben.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der Vybrant® DiD-Färbungen infizierter Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 dargestellt. In den untersuchten Infektionen zeigten die Zellen der *mock*-Bedingung und ScrMYC-Kontrolle eine ähnlich starke Proliferation über den analysierten Zeitraum. Die Zellen, die shMYC1 oder shMYC2 ausprägten und somit MYC herabregulierten, wiesen hingegen in den drei unabhängigen Infektionen eine deutlich verminderte Proliferation auf, wie es durch die reduzierte Abnahme der Intensität des DiD-Signals im Vergleich zum Wert der ScrMYC-Kontrolle angezeigt wurde. Dabei war der Effekt in den U-HO1 Zellen viel ausgeprägter als in den Zellen der cHL-Zelllinie L-428. Um statistische Signifikanzen dieser Unterschiede zwischen den Populationen der ScrMYC-Kontrolle und der shMYC1- oder shMYC2-exprimierenden Zellen zu berechnen, wurden pro Population die Werte der MFI-Änderungen an einem gleichen Tag nach den Infektionen und ein zweiseitiger gepaarter T-Test verwendet. Hierbei war das Problem, dass bei der 5. Infektion im Gegensatz zur 3. und 4. Infektion nicht an Tag 6 und Tag 13, sondern an Tag 7 und Tag 14 die DiD-Intensität gemessen wurde. Um die Berechnung dennoch durchführen

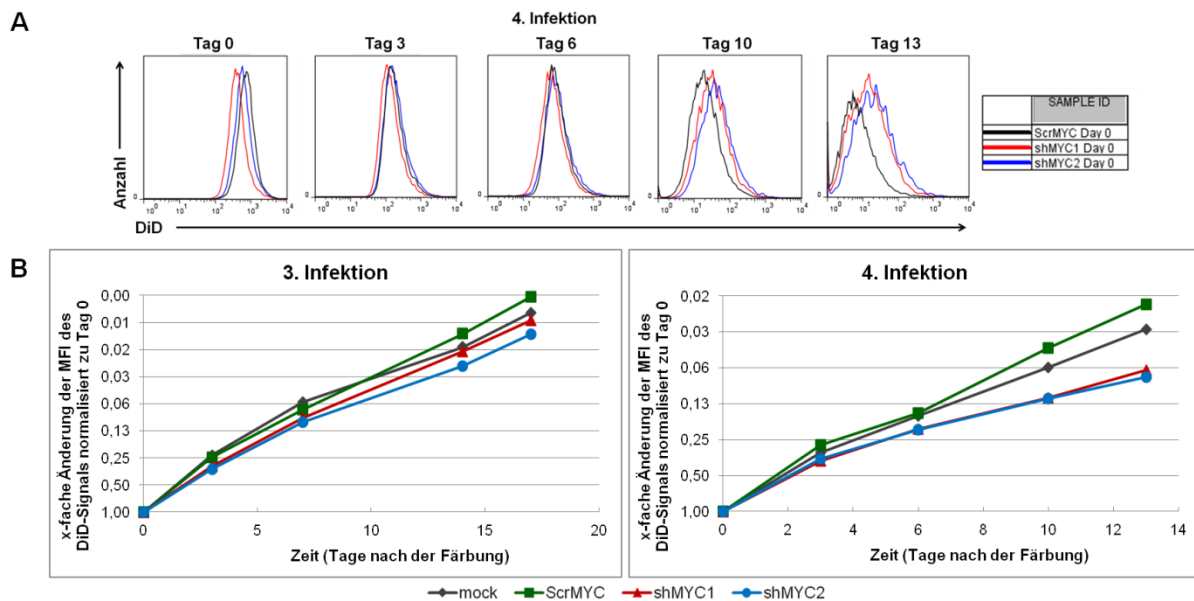


Abbildung 18: Leicht verminderte Proliferation in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 durch MYC-Herabregulation

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den entsprechenden LeGO.G-Viren infiziert. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Färbung mit dem DiD-Farbstoff und Messung im FACS. Dabei wurden zunächst Zelltrümmer und größere Zellaggregate durch ein Auswahlfenster im FSC-A und SSC-A entfernt. Anschließend wurden die infizierten Zellen anhand der GFP-Ausprägung identifiziert und das DiD-Signal dieser Zellen gemessen. Diese Messung wurde in den folgenden Tagen wiederholt. (A) Zeitlicher Verlauf des DiD-Signals der verschiedenen Zellpopulationen der 4. Infektion der cHL-Zelllinie L-428. (B) Dargestellt sind die Änderungen der MFIs der DiD-Signale, welches zu den MFIs an Tag 0 der jeweiligen Bedingung normalisiert wurden. Zwei unabhängige Infektionen wurden untersucht. Die Herabregulation von MYC führte in der L-428 zu einer leicht verminderten Proliferation der Zellen.

zu können, wurden die Werte der Tage 6 und 7 sowie der Tage 13 und 14 zusammen verwendet. So konnte mit den Werten von den Tagen 6 und 7 sowie den Tagen 13 und 14 die Signifikanz des Proliferationsunterschieds gezeigt werden. Im Detail wurde für den Vergleich der ScrMYC-Kontrolle und der shMYC1-exprimierenden Zellen an Tag 6 bzw. 7 ein p-Wert von 0,001 und an Tag 13 bzw. 14 ein p-Wert von 0,0496 ermittelt. Für den Vergleich der ScrMYC-Kontrolle und den shMYC2-exprimierenden Zellen wurde an Tag 6 bzw. 7 ein p-Wert von 0,007 und an Tag 13 bzw. 14 ein p-Wert von ca. 0,03 ermittelt. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass die U-HO1-Zellen mit verminderter MYC-Ausprägung keinen generellen Proliferationsstopp aufwiesen, da die Intensität des DiD-Signals über den zeitlichen Verlauf abnahm. Dennoch spielt die MYC-Ausprägung eine wichtige proliferationsfördernde Rolle in den Zellen der Zelllinie U-HO1.

Zusammenfassend konnte in beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 eine proliferationsfördernde Wirkung von MYC gezeigt werden. Dabei ist der positive Effekt von MYC auf die Proliferation der Zellen in der cHL-Zelllinie U-HO1 größer als in der Linie L-428, was in gewissen Grenzen die ungleiche Rolle von MYC in den beiden cHL-Zelllinien unterstreicht.

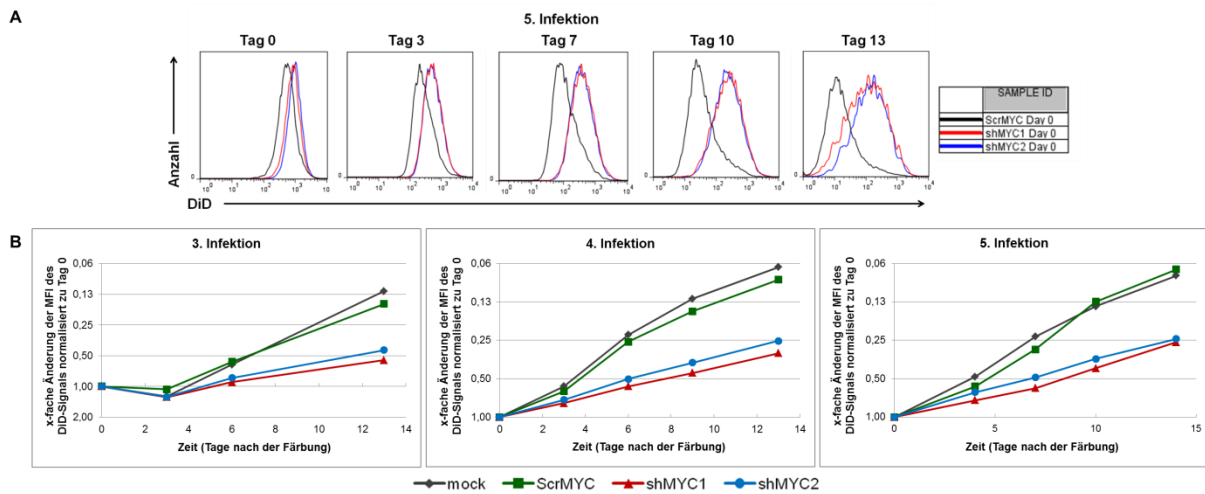


Abbildung 19: Deutlich verminderte Proliferation in Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 durch MYC-Herabregulation

Die Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 wurden mit den entsprechenden LeGO.G-Viren infiziert. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Färbung mit dem DiD-Farbstoff und Messung im FACS. Dabei wurden zunächst Zelltrümmer und größere Zellaggregate durch ein Auswahlfenster im FSC-A und SSC-A entfernt. Anschließend wurden die infizierten Zellen anhand der GFP-Ausprägung identifiziert und das DiD-Signal dieser Zellen gemessen. Diese Messung wurde in den folgenden Tagen wiederholt. (A) Zeitlicher Verlauf des DiD-Signals der verschiedenen Zellpopulationen der 5. Infektion der cHL-Zelllinie U-HO1. (B) Dargestellt sind die Änderungen der MFIs der DiD-Signale, welches zu den MFIs an Tag 0 der jeweiligen Bedingung normalisiert wurden. Drei unabhängige Infektionen wurden untersucht. Die Herabregulation von MYC führte zu einer deutlich verminderten Proliferation der Zellen.

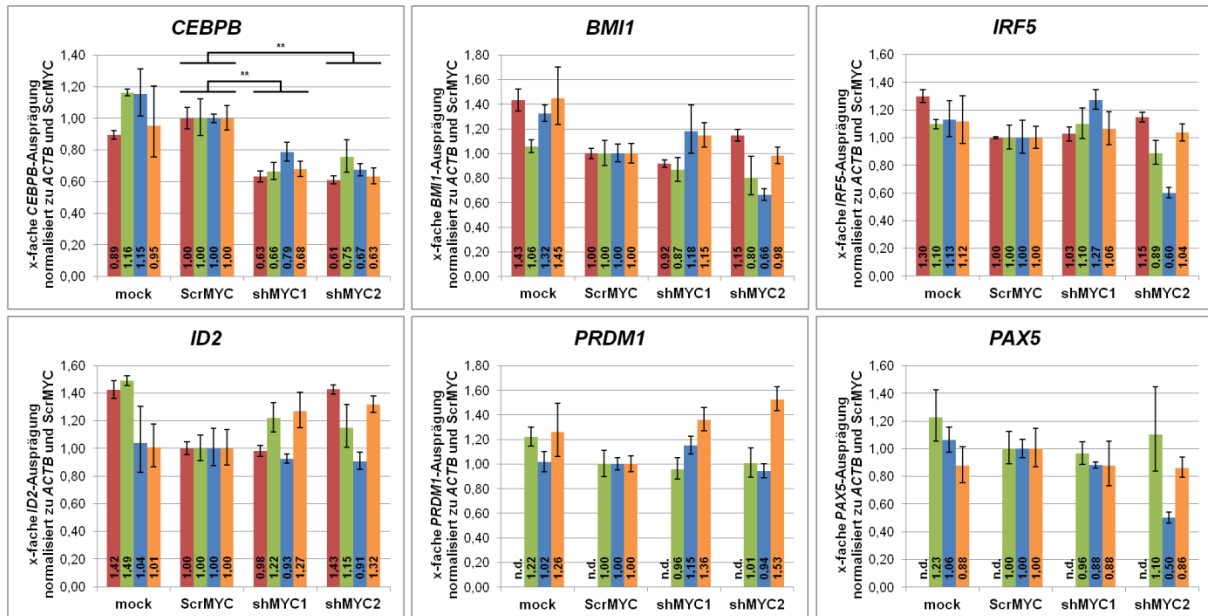
3.2.6 Auswirkung der MYC-Herabregulation auf die Ausprägung von MYC-Zielgenen, die zum Phänotyp der HRS-Zellen beitragen

Die HRS-Zellen des cHL weisen einen sehr ungewöhnlichen Phänotyp aus, der geprägt wird von dem Verlust des B-Zell-Phänotyps und der aberranten Ausprägung verschiedenster Faktoren anderer hämatopoetischer Zellen. Einige entscheidende Mechanismen dieser Umprogrammierung sind bereits aufgeklärt worden und für manche an der Umprogrammierung der HRS-Zellen beteiligten Gene konnte in Studien mit verschiedenen Zellen eine direkte Regulation durch MYC gezeigt werden. Zusätzlich wurde für MYC vor kurzem auch gezeigt, dass es die Ausprägung aller aktiv transkribierten Gene einer Zelle steigern kann (Lin *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2012). Daher sollte im folgenden Abschnitt der Beitrag von MYC zur Ausprägung von Genen, die typischer Weise in HRS-Zellen ausgeprägt werden, Zielgene von MYC darstellen und an dem Verlust des B-Zellphänotyps beteiligt sind, aufgeklärt werden. Zu diesen Faktoren gehörte CEBPB, ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Entwicklung myeloischer Zellen (Huber *et al.*, 2012), dessen Rolle in der Pathogenese des cHLs in einem weiteren Teil dieser Arbeit näher untersucht wurde. Es wurde gezeigt, dass die Herabregulation von MYC in Burkitt-Lymphom-Zelllinien zu einer verminderten Ausprägung von CEBPB führt und dass es eine MYC-Bindestelle im Promotor von CEBPB gibt (Seitz *et al.*, 2011). BMI1 ist ein Protein der Polycomb Gruppe und kann die Expression von B-Zellgenen regulieren (Dutton *et al.*, 2007). Für das BMI1-Gen wurde gezeigt, dass es

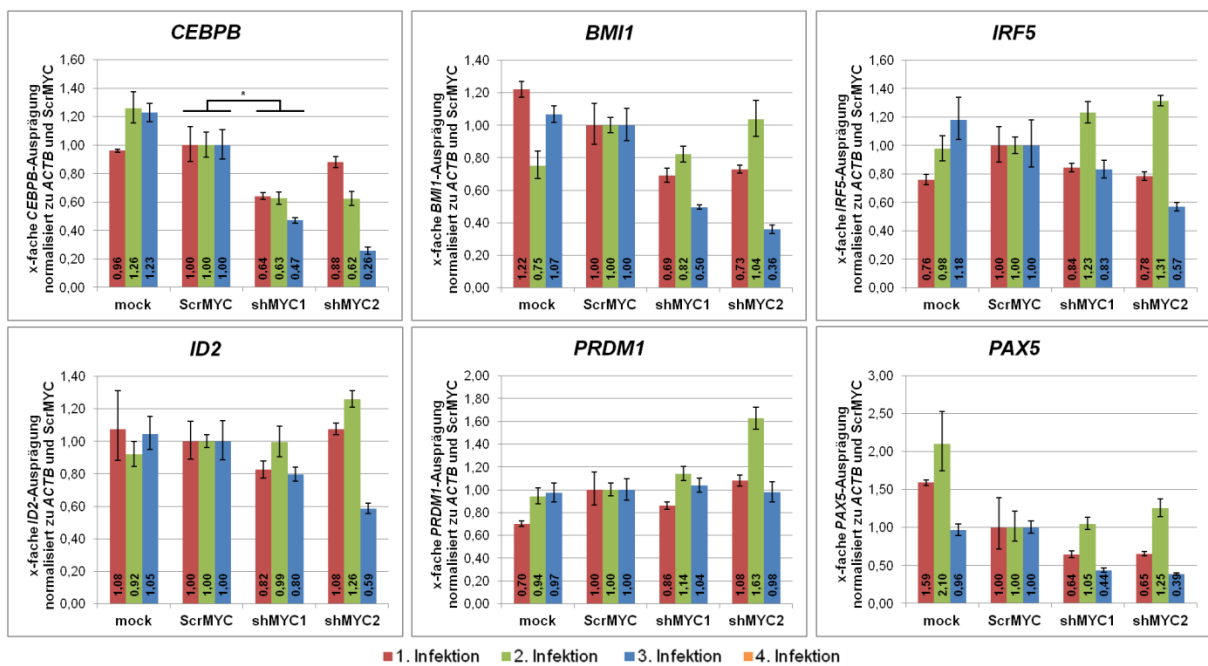
eine MYC-Bindestelle besitzt und von MYC reguliert werden kann (Ji *et al.*, 2011; Seitz *et al.*, 2011). *IRF5* wurde als ein treibender Faktor der Umprogrammierung der HRS-Zellen beschrieben (Kreher *et al.*, 2014) und *IRF5* weist eine MYC-Bindestelle im Promotor auf (Seitz *et al.*, 2011). Zusätzlich scheint die erhöhte Expression von MYC zu einer verminderten *IRF5*-Ausprägung zu führen, wie es in einer Burkitt-Lymphom-Zelllinie gezeigt wurde (Ji *et al.*, 2011). Dies ist in HRS-Zellen zwar kontraintuitiv, sollte daher aber genauer untersucht werden. *ID2* bindet den B-Zell-Transkriptionsfaktor TCF3 und hemmt dessen Bindung an die DNA (Mathas *et al.*, 2006). Für *ID2* wurde eine direkte positive Regulation durch MYC gezeigt (Lasorella *et al.*, 2000). *PRDM1* ist ein entscheidender Faktor für die Differenzierung in Plasmazellen (Shaffer *et al.*, 2002). Obwohl eine negative Regulation von *PRDM1* durch MYC in der Zelllinie L-428 bereits dargestellt wurde (Vogel *et al.*, 2014), sollte diese Regulation in den beiden Zelllinien überprüft werden. Als letzter Faktor wurde *PAX5* als wichtiger Transkriptionsfaktor von B-Zellgenen untersucht. So wurde für *PAX5* gezeigt, dass eine erhöhte MYC-Ausprägung zu einer verminderten Ausprägung von *PAX5* führt und dass *PAX5* mehrere MYC-Bindestellen aufweist (Seitz *et al.*, 2011). Die Untersuchungen zur Ausprägung dieser Faktoren beschränkte sich dabei auf die mRNA-Ebene und wurde mittels TaqMan[®]-qPCR durchgeführt. Dafür wurden die vorhandenen cDNAs der unabhängigen Infektionen der beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 verwendet. Zusätzlich wurde die *ACTB*-Menge für die Normalisierung bestimmt.

Die Ergebnisse der cHL-Zelllinie L-428 sind in Abbildung 20 dargestellt. Insgesamt konnte nur für *CEBPB* eine signifikante Herabregulation in Folge der MYC-Herabregulation nachgewiesen werden. Dabei war die Menge an *CEBPB* an Tag 3 nach der Infektion in den shMYC1- oder shMYC2-ausprägenden Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle signifikant vermindert. An Tag 6 hingegen war die *CEBPB*-Herabregulation nur in den shMYC1-ausprägenden Zellen signifikant, wobei in den shMYC2-exprimierenden Zellen in zwei der drei Infektionen die *CEBPB*-Menge im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle auch vermindert war. Somit scheint MYC in der cHL-Zelllinie L-428 an der erhöhten *CEBPB*-Ausprägung beteiligt zu sein. Die anderen untersuchten Gene zeigten keine einheitliche Regulation.

3 Tage nach der Infektion



6 Tage nach der Infektion



■ 1. Infektion ■ 2. Infektion ■ 3. Infektion ■ 4. Infektion

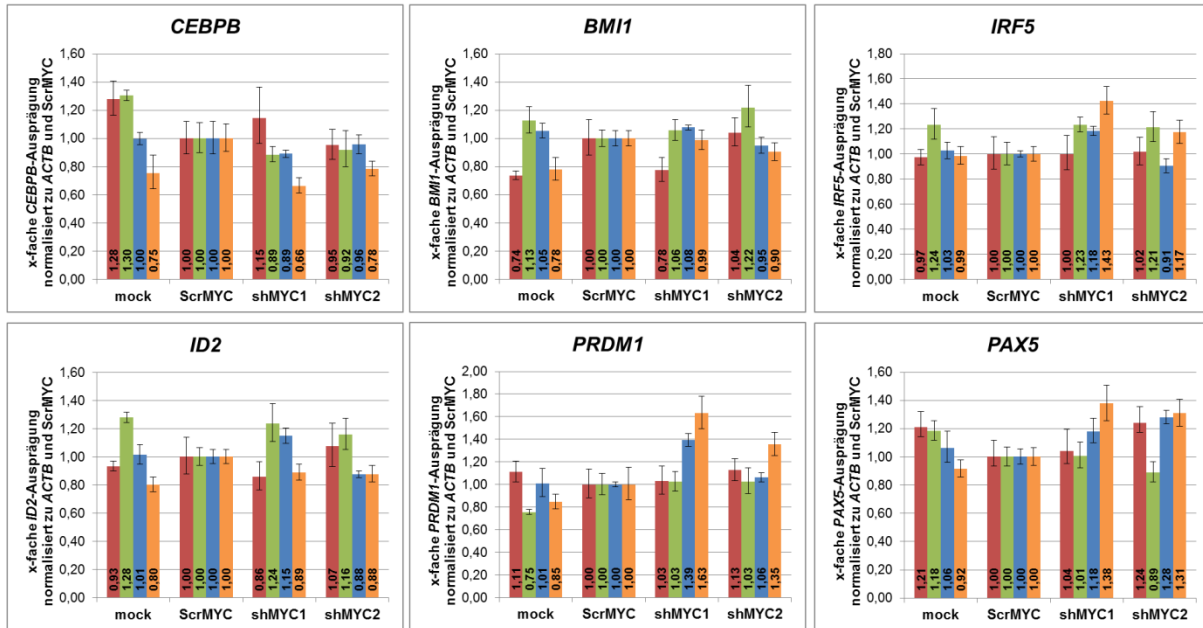
Abbildung 20: Ausprägung von MYC-Zielgenen nach MYC-Herabregulation in Zellen der cHL-Zelllinie L-428

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 6 nach den Infektionen sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener MYC-Zielgene und *ACTB* mittels TaqMan®-qPCRs bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zunächst zum jeweiligen *ACTB*-Wert und anschließend zum Wert der ScrMYC-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten von bis zu vier unabhängigen Infektionen. An Tag 3 nach der Infektion konnte für *CEBPB* eine signifikante Herabregulation durch verminderte Menge an MYC nachgewiesen werden. An Tag 6 hingegen war die Herabregulation von *CEBPB* nur in den shMYC1-exprimierenden Zellen signifikant, wobei in zwei der drei Infektionen die shMYC2-exprimierenden Zellen auch eine *CEBPB*-Herabregulation zeigten. Somit scheint MYC in der cHL-Zelllinie zur erhöhten *CEBPB*-Ausprägung beizutragen. Die anderen untersuchten Gene zeigten keine einheitliche Regulation nach MYC-Herabregulation. Für die statistische Analyse zwischen zwei Populationen wurden die normalisierten Expressionswerte der einzelnen Infektionen und ein gepaarter zweiseitiger T-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen sind dargestellt durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. n.d.: nicht durchgeführt

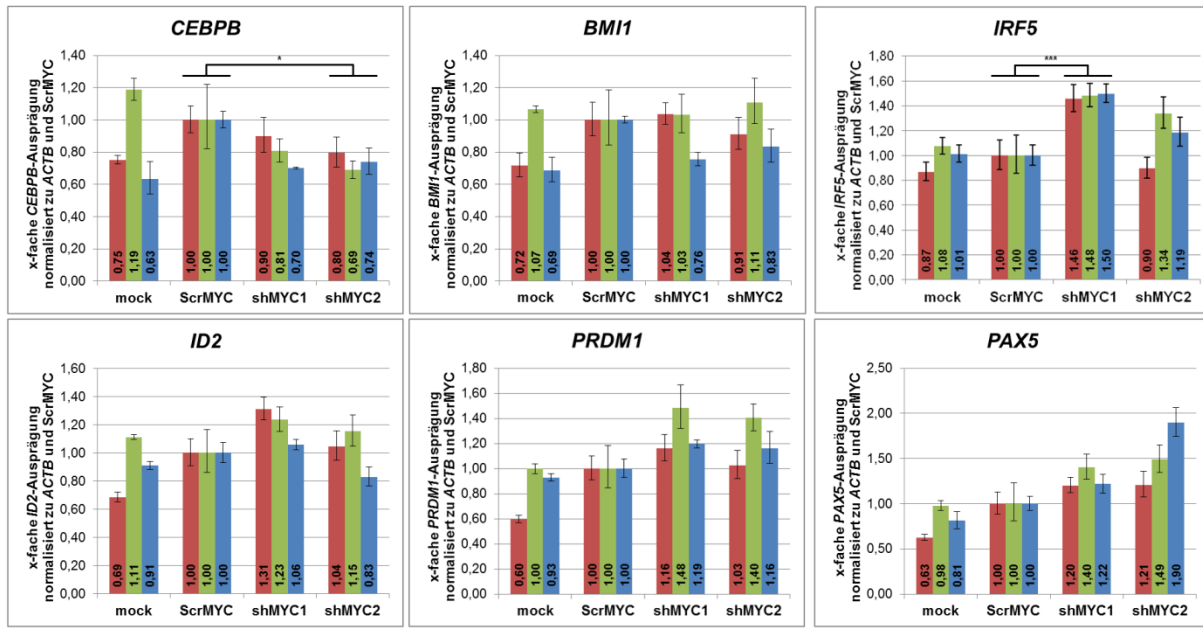
In der cHL-Zelllinie U-HO1 konnte für keines der untersuchten Gene eine signifikante Regulation in beiden Zellpopulationen, die shRNAs gegen MYC ausprägten, nachgewiesen werden. Dennoch deutete sich zumindest an Tag 6 nach der Infektion eine Regulation durch MYC-Herabregulation für die Gene *IRF5* und *PAX5* an. So konnte an Tag 6 nach der Infektion eine signifikant erhöhte *IRF5*-Expression in den shMYC1-ausprägenden Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle nachgewiesen werden. Auch in den shMYC2-ausprägenden Zellen konnte zumindest in zwei der drei Infektionen eine leicht erhöhte *IRF5*-Ausprägung gezeigt werden. Somit könnte MYC in der cHL-Zelllinie U-HO1 die Ausprägung von *IRF5* hemmen. Für *PAX5* konnte an Tag 6 nach der Infektion in allen untersuchten Infektionen eine erhöhte Ausprägung im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle in den Zellen, die shMYC1- oder shMYC2-ausprägten, gezeigt werden. Diese Erhöhung war zwar nicht signifikant, deutete allerdings eine negative Regulation von *PAX5* durch MYC an. Bereits an Tag 3 nach der Infektionen zeigten die shMYC1-ausprägenden Zellen in zwei von vier Infektionen und die shMYC2-ausprägenden Zellen in drei von vier Infektionen eine moderat erhöhte *PAX5*-Ausprägung im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle, was die Annahme einer negativen Regulation von *PAX5* durch MYC in der Linie U-HO1 unterstützt.

Zusammenfassend scheint die Beteiligung von MYC an der Ausprägung der untersuchten Gene unterschiedlich in den beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 zu sein. So wird vermutlich in der Linie L-428 einzig *CEBPB* positiv durch MYC beeinflusst, wohingegen sich eine negative Regulation von *IRF5* und *PAX5* durch MYC in der Linie U-HO1 andeutete. Somit scheint MYC in den verschiedenen Zelllinien an der Regulation der Ausprägung von unterschiedlichen Genen, die typischerweise in HRS-Zellen exprimiert werden, beteiligt zu sein.

3 Tage nach der Infektion



6 Tage nach der Infektion



■ 1. Infektion ■ 2. Infektion ■ 3. Infektion ■ 4. Infektion

Abbildung 21: Ausprägung von MYC-Zielgenen nach MYC-Herabregulation in Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1

Die Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 6 nach den Infektionen sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener MYC-Zielgene und *ACTB* mittels TaqMan®-qPCRs bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta ct$ -Methode zunächst zum jeweiligen *ACTB*-Wert und anschließend zum Wert der ScrMYC-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten von bis zu vier unabhängigen Infektionen. Insgesamt konnte keine einheitliche und signifikante Regulation eines der untersuchten Gene in beiden Zellpopulationen, die shRNAs gegen MYC ausprägten, nachgewiesen werden. Allerdings deutete sich für *IRF5* und *PAX5* eine positive Regulation durch eine verringerte MYC-Menge zumindest an Tag 6 nach der Infektion an. So war die erhöhte *IRF5*-Ausprägung in den shMYC1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu ScrMYC-Kontrolle an Tag 6 nach der Infektion signifikant und in den shMYC2-ausprägenden Zellen war die *IRF5*-Ausprägung in zwei der drei Infektionen auch leicht erhöht. Für *PAX5* konnte in den drei untersuchten Infektionen eine erhöhte Ausprägung im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle sowohl in den shMYC1 als auch in den shMYC2-ausprägenden Zellen nachgewiesen werden, die aber keine Signifikanz erreichten. Dies deutet an, dass MYC in der Zelllinie U-HO1 die *IRF5*- und

PAX5-Ausprägung negativ beeinflusst. Für die statistische Analyse zwischen zwei Populationen wurden die normalisierten Expressionswerte der einzelnen Infektionen und ein gepaarter zweiseitiger T-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen sind dargestellt durch * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.
n.d.: nicht durchgeführt

3.3 Die Rolle von CEBPB in der Pathogenese des cHLs

GEPs von HRS-Zellen primärer cHL-Fälle und verschiedener normaler B-Zellpopulationen zeigten eine erhöhte Ausprägung von *CEBPB* in den HRS-Zellen im Vergleich zu den GC-B-Zellen, den putativen Ursprungszellen der HRS-Zellen (Abbildung 22) (Tiacci *et al.*, 2012). Für das Multiple Myelom und ALCL konnte eine Beteiligung von *CEBPB* an der Proliferation und dem Überleben der Tumorzellen gezeigt werden (Pal *et al.*, 2009; Anastasov *et al.*, 2010) Weiter wurde für *CEBPB* gezeigt, dass es ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Entwicklung und Funktion von myeloischen Zellen ist (Huber *et al.*, 2012). Außerdem führt eine verstärkte Ausprägung von *CEBPB* zur Transdifferenzierung von B-Zellen in Makrophagen (Xie *et al.*, 2004). Daher sollte in diesem Projekt die Beteiligung von *CEBPB* an der Pathogenese des cHLs und insbesondere an der Umprogrammierung der HRS-Zellen untersucht werden. Zwar wurde bereits in einer früheren Studie die wichtige Bedeutung der LIP-Isoform für die Proliferation einiger cHL-Zelllinien gezeigt, dabei beschränkte sich die Untersuchung aber auf die phänotypische Charakterisierung der Zellen nach Regulation des LAP/LIP-Verhältnis durch Hemmung des mTOR-Signalweges (Jundt *et al.*, 2005). In der aktuellen Studie wurden alle *CEBPB*-Isoformen durch die Ausprägung von shRNAs in den cHL-Zelllinien herabreguliert und die Auswirkung dieser Herabregulation auf den Phänotyp der Zellen der cHL-Zelllinien untersucht.

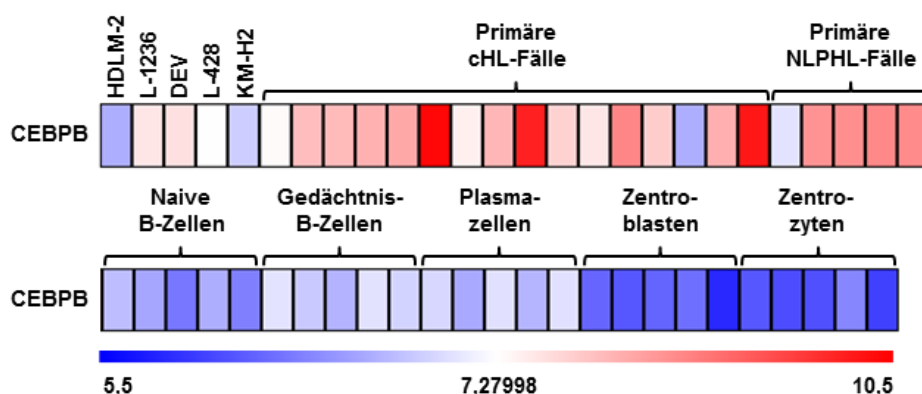


Abbildung 22: „Heat Map“ der CEBPB-Expression von cHL-Zelllinien, HRS-Zellen primärer cHL-Fällen, LP-Zellen primärer NLPHL-Fällen und normalen B-Zellpopulationen (Daten entnommen aus (Tiacci *et al.*, 2012))

In der Studie von Tiacci *et al.*, 2012 wurden GEPs von cHL-Zelllinien, HRS-Zellen primärer cHL-Fälle, LP-Zellen primärer NLPHL-Fälle, naiven B-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen, Plasmazellen, Zentroblasten und Zentrozyten erstellt. Dargestellt ist die differentielle Expression von *CEBPB* in einer logarithmischen Skala. Im Vergleich zu den Zentroblasten und Zentrozyten, die die putativen Ursprungszellen der HRS-Zellen des cHLs sind, zeigen die cHL-Zelllinien und die HRS-Zellen der primären Fälle eine erhöhte Ausprägung von *CEBPB*.

3.3.1 Validierung der erhöhten Ausprägung von *CEBPB* in den cHL-Zelllinien

Zunächst sollte die erhöhte Ausprägung von *CEBPB* in den cHL-Zelllinien im Vergleich zur den GC-B-Zellen auf mRNA- und Proteinebene bestätigt werden. Die GC-B-Zellen wurden für die Analysen von einem Kollegen zur Verfügung gestellt und waren als CD20⁺/IgD⁻/IgM⁻/CD38⁺-Zellen mittels FACS aus Tonsillen-Präparaten sortiert worden. Von den cHL-Zelllinien wurden L-1236, L-428, KM-H2, SUP-HD1, U-HO1 und HDLM-2 untersucht. Zusätzlich wurde die Multiple Myelom-Zelllinie U-266 untersucht. Diese diente als Positivkontrolle, da bekannt ist, dass die U-266 *CEBPB* stark ausprägt (Pal *et al.*, 2009). Von den Proben erfolgte die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Anschließend wurden TaqMan[®]-qPCRs für *CEBPB* und das Referenzgen *ACTB* durchgeführt. Wie erwartet zeigte die U-266 eine sehr starke Ausprägung von *CEBPB* im Vergleich zu den GC-B-Zellen (Abbildung 23). Mit Ausnahme der cHL-Zelllinie U-HO1 konnte auch für alle cHL-Zelllinien eine vielfach erhöhte Expression von *CEBPB* im Vergleich zu den GC-B-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 23). Die Stärke der erhöhten Expression schwankte dabei stark zwischen den verschiedenen Zelllinien. So zeigte die L-428 die schwächste Erhöhung mit einer 5,5-fach erhöhten *CEBPB*-Expression während die L-1236 die stärkste *CEBPB*-Ausprägung aufwies mit einer 17,25-fachen Erhöhung. Im Vergleich zu den GEPs fällt auf, dass die Ergebnisse nicht 100%ig zusammenpassen. So wies z.B. die L-428 in den GEPs eine höhere *CEBPB*-Ausprägung als die HDLM2, was in den TaqMan[®]-qPCRs nicht der Fall war. Die schwächere *CEBPB*-Expression in der KM-H2 in den GEPs findet sich hingegen auch in den Ergebnissen der TaqMan[®]-qPCRs wieder. Insgesamt konnte aber die erhöhte mRNA-Ausprägung von *CEBPB* in den cHL-Zelllinien im Vergleich zu den GC-B-Zellen bestätigt werden.

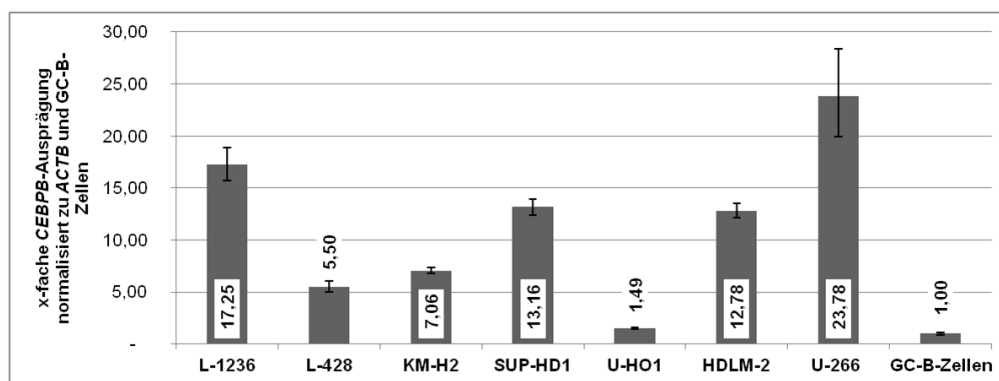


Abbildung 23: *CEBPB*-Ausprägung in cHL-Zelllinien

Die Menge an *CEBPB* wurde in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan[®]-qPCR bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zunächst zum jeweiligen *ACTB*-Wert und anschließend zum Wert der GC-B-Zellen. Alle cHL-Zelllinien, bis auf die Linie U-HO1, zeigten eine vielfach erhöhte Ausprägung von *CEBPB* im Vergleich zu den GC-B-Zellen. Die Linie U-266 prägte wie erwartet besonders stark *CEBPB* aus. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten.

Für die Überprüfung der Proteinmenge an CEBPB in den cHL-Zelllinien, der U-266 und der GC-B-Zellen wurden Western Blots für CEBPB und α -Tubulin als Ladekontrolle durchgeführt. Für alle untersuchten cHL-Zelllinien und die Linie U-266 konnten die drei Isoformen von CEBPB mit den Molekulargewichten von 44, 42 und 20 kDa detektiert werden (Abbildung 24A). Für die GC-B-Zellen hingegen wurde keine Bande für CEBPB nachgewiesen. Generell wies der Western Blot für CEBPB ein relativ hohes Hintergrund-Signal und sehr viele unspezifische Banden auf. Dies konnte durch diverse Anpassungen am Protokoll des Western Blots, wie z.B. der Verringerung der Antikörper-Konzentration oder Änderung des Waschpuffers, nicht verbessert werden. Im Gegenteil führten diese Veränderungen entweder zu mehr Hintergrund oder dem Verlust der CEBPB-Banden. Für die quantitative Auswertung erfolgte eine Normalisierung der Intensitäten der Banden der CEBPB-Isoformen der verschiedenen Proben zu der Intensität der LAP1-Bande der Linie L-1236, da in den GC-B-Zellen keine CEBPB-Bande detektiert werden konnte. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung zu α -Tubulin, um etwaige Ungleichheiten bei der Beladung des Gels oder dem Transfer vom Gel auf die Membran auszugleichen. Die so ermittelten Expressionswerte der einzelnen Isoformen von CEBPB in den verschiedenen Zelllinien ist in Abbildung 24B dargestellt. Die stärkste Expression von CEBPB zeigte die cHL-Zelllinie SUP-HD1, gefolgt von der Linie L-428. Die anderen cHL-Zelllinien, d.h. L-1236, KM-H2, U-HO1 und HDLM-2, prägten ähnlich viel CEBPB aus. Im Gegensatz zur mRNA-Expression zeigte die Linie U-266 auf Proteinebene eine eher schwache Ausprägung von CEBPB und liegt auf einem Niveau der cHL-Zelllinien L-1236, KM-H2, U-HO1 und HDLM-2. Für die GC-B-Zellen konnte, wie vorher erwähnt, hingegen keine CEBPB-Expression nachgewiesen werden. Da es Hinweise gibt, dass das Verhältnis der CEBPB-Isoformen wichtig für die funktionelle Konsequenz der CEBPB-Expression ist, wurde das Verhältnis in den untersuchten Zelllinien bestimmt. Hierbei zeigten alle cHL-Zelllinien eine starke Expression der aktivierenden Isoformen LAP1 und LAP2 im Vergleich zur eher hemmend-wirkenden LIP-Isoform. Allerdings schwankte das LAP/LIP-Verhältnis in den cHL-Zelllinie stark und war z.B. in der L-1236 mit 1,6 am niedrigsten und mit 6,0 in der SUP-HD1 am höchsten. Zusätzlich scheint die Linie U-HO1 nur die LAP-Isoformen zu exprimieren, da LIP nicht detektiert werden konnte. Die Zelllinie U-266 hingegen wies eine starke Expression der LIP-Isoform und damit ein LAP/LIP-Verhältnis von kleiner eins auf.

Insgesamt konnte mit Ausnahme der cHL-Zelllinie U-HO1 eine erhöhte Ausprägung von CEBPB in allen cHL-Zelllinien auf mRNA-Ebene und in allen cHL-Zelllinien auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten alle cHL-Zelllinien eine starke Expression der LAP-Isoformen, die für die Transdifferenzierung von B-Zellen zu Makrophagen verantwortlich ist. Daher wurde in einem nächsten Schritt CEBPB mittels des LeGO.G-Systems in den cHL-Zelllinien herabreguliert und die Konsequenzen auf den Phänotyp untersucht.

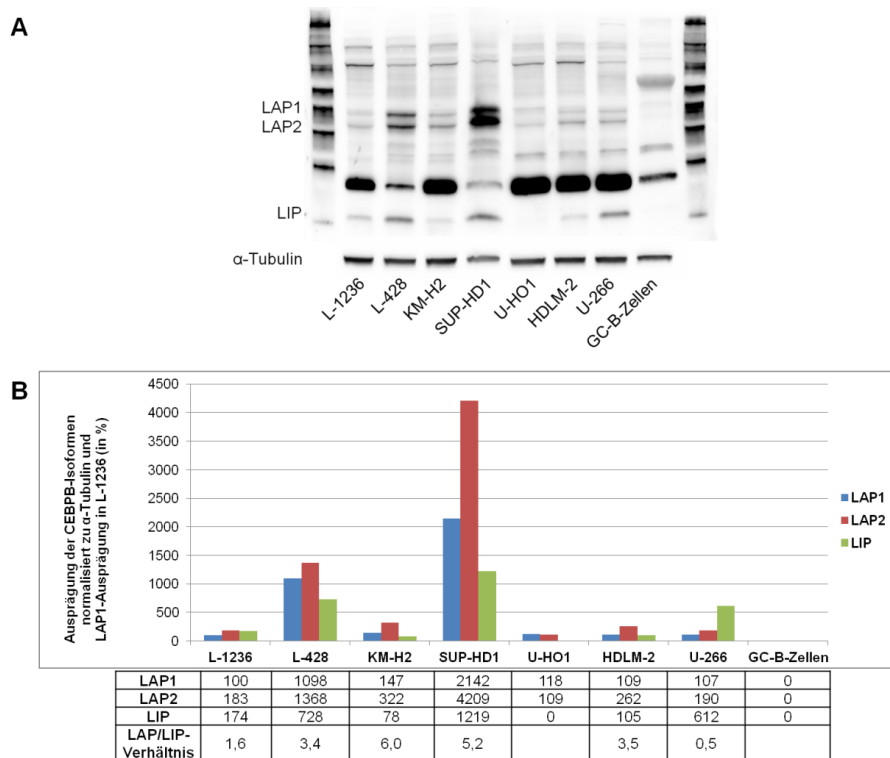


Abbildung 24: CEBPB-Ausprägung in cHL-Zelllinien

(A) CEBPB- und α -Tubulin-Western Blot der untersuchten Zelllinien. (B) Quantitative Auswertung der Western Blot mittels der Phoretix 1D-Software. Dabei erfolgte die Normalisierung der Ausprägung der CEBPB-Isoformen zur Ausprägung der LAP1-Isoform in der L-1236 und zur jeweiligen ACTB-Ausprägung. Zusätzlich ist eine Tabelle mit den Prozentwerten der Isoform-Ausprägungen und den LAP/LIP-Verhältnissen in den Zellen dargestellt. Alle cHL-Zelllinien prägen CEBPB in verschiedener Stärke aus und weisen eine stärkere Expression der LAP-Isoformen auf. Besonders stark wird CEBPB in den cHL-Zelllinien L-428 und SUP-HD1 ausgeprägt. Die Multiple Myelom-Zelllinie U-266 prägt auch CEBPB aus, weist aber ein LAP/LIP-Verhältnis von 0,5 auf. Für die GC-B-Zellen konnte keine CEBPB-Ausprägung detektiert werden

3.3.2 Erfolgreiche Herabregulation von CEBPB in den cHL-Zelllinien

Vor der Charakterisierung des Phänotyps wurde der Erfolg der Herabregulation von CEBPB in den verschiedenen Infektionen der cHL-Zelllinien mittels TaqMan[®]-qPCRs und Western Blots untersucht. Dafür wurden die Zellen der cHL-Zelllinien L-1236, L-428, SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2 mit den LeGO.G-Vektoren, die für ScrCEBPB, shCEBPB1, shCEBPB2 oder shCEBPB3 codieren, infiziert. Insgesamt wurden je zwei Infektionen für die cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 und je eine Infektion mit Zellen der anderen Zelllinien durchgeführt. Dabei wurde für die Infektionen im Allgemeinen eine MOI von 15 eingesetzt. Nur in der 2. Infektion der L-1236 und in der Infektion der SUP-HD1 wurde eine MOI von 10 eingesetzt. Für die Untersuchung des Erfolgs der Herabregulation wurden die infizierten Zellen als GFP-positive Zellen mittels FACS sortiert, um reine Populationen infizierter Zellen zu erhalten. Die Sortierungsstrategie ist in Abbildung 5 dargestellt. Sortiert wurde in allen Infektionen am 3. Tag nach der Infektion. Zusätzlich wurde in den ersten Infektionen der L-1236 und L-428 an Tag 5 nach der Infektion und in allen übrigen Infektionen an Tag 6 nach der Infektion sortiert. Die ScrCEBPB-Kontrolle diente in den TaqMan[®]-qPCRs und Western

Blots als Referenz, da diese Kontrolle etwaige Einflüsse der Infektion und Ausprägung einer unspezifischen shRNA auf die Ausprägung von Genen miteinschließt. Zusätzlich wurde bei jeder Infektion eine *mock*-Bedingung mitgeführt, um den eventuellen Einfluss der Infektion aufzuzeigen. Die *mock*-Bedingungen wiesen allerdings teilweise sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene extreme Unterschiede in der Expression von CEBPB im Vergleich zu der ScrCEBPB-Kontrolle auf, was einen Einfluss der Infektion auf die CEBPB-Ausprägung der Zelle vermuten lässt (siehe unten). Da die Unterschiede aber nicht einheitlich waren, konnte die Ursache dieser Unterschiede nicht aufgeklärt werden. Die Ergebnisse der *mock*-Bedingung werden aber vollständigheitshalber aufgeführt, auch wenn deren Interpretation schwierig war. Generell galt bei der Interpretation der Ergebnisse die ScrCEBPB-Kontrolle als die wichtigere Kontrolle und wurde als Referenzwert zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse verwendet.

Für die TaqMan[®]-qPCRs wurden 40000 GFP-positive lebende Zellen bzw. GFP-negative lebende Zellen für die *mock*-Bedingung sortiert, die RNA isoliert und die cDNA-Synthese durchgeführt. Anschließend wurden TaqMan[®]-qPCRs für *CEBPB* und das Referenzgen *GAPDH* durchgeführt. Die Ergebnisse der TaqMan[®]-qPCRs der beiden Infektionen der cHL-Zelllinie L-1236 und L-428 sind in Abbildung 25 dargestellt. In der cHL-Zelllinie L-1236 führte die Ausprägung von shCEBPB2 und shCEBPB3 in beiden Infektionen an den untersuchten Tagen zu einer deutlichen Reduzierung von *CEBPB* auf das ca. 0,3-fache des Wertes in der ScrCEBPB-Kontrolle. Die Ausprägung von *CEBPB* in shCEBPB1-exprimierenden Zellen wurde nur in der ersten Infektion gemessen und zeigte an Tag 3 nach der Infektion keine Regulation von *CEBPB* und an Tag 6 nur eine moderate Regulation auf das 0,5-fache des Referenzwertes. Die *mock*-Bedingung zeigte eine schwach bis moderat verminderte CEBPB-Expression. In der Zelllinie L-428 wiesen shCEBPB2 und shCEBPB3-ausprägende Zellen eine moderate Reduzierung von *CEBPB* an den untersuchten Tagen nach der Infektion auf. So sank die Expression von *CEBPB* durch shCEBPB3-Ausprägung auf ca. die Hälfte des Wertes der ScrCEBPB-Kontrolle an den untersuchten Tagen in beiden Infektionen, wohingegen die shCEBPB2 an Tag 3 nach der Infektion die CEBPB-Ausprägung auf 75% reduzierte und an Tag 6 eine ca. 50%ige Reduktion erreichte. In der L-428 führte die Expression von shCEBPB1 zu einer minimalen Herabregulation von CEBPB an den untersuchten Tagen. Hier zeigte die *mock*-Bedingung im Gegensatz zur L-1236 eine moderat erhöhte Expression von CEBPB. Leider konnten aufgrund der geringen Wiederholungen keine Signifikanzen ermittelt werden.

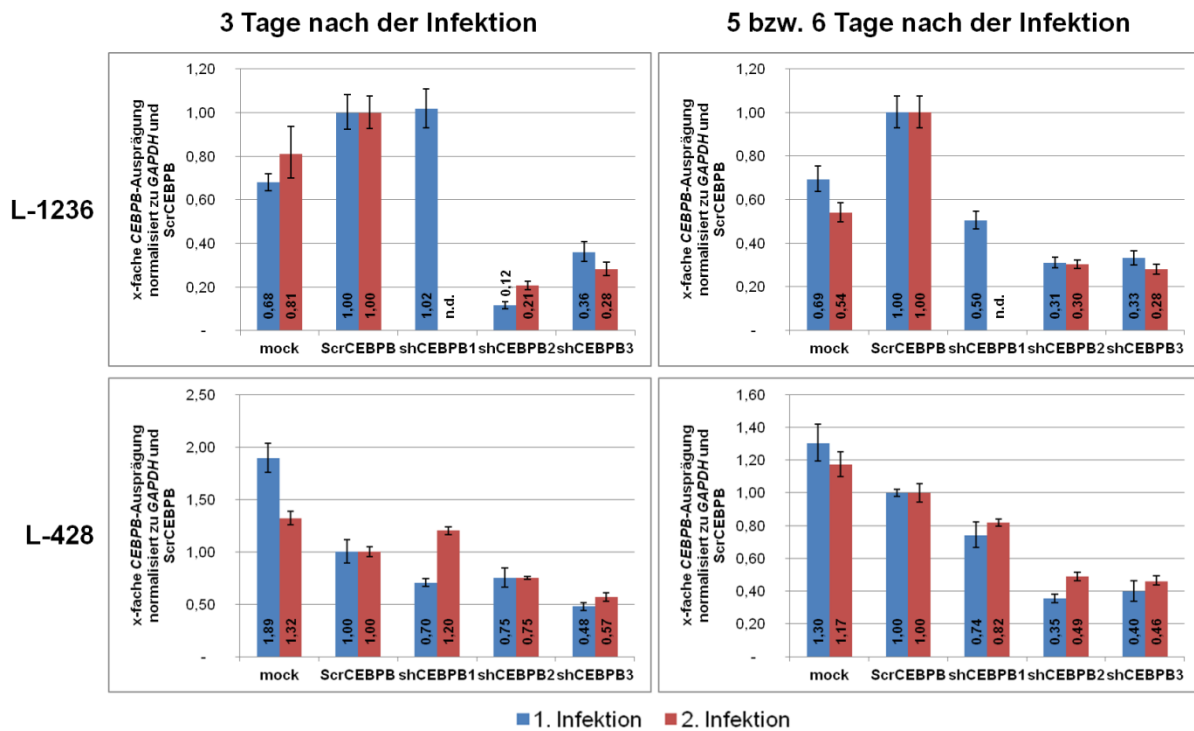


Abbildung 25: CEBPB-Ausprägung in den cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 nach Infektion mit LeGO.G-Viren

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 5 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde die Menge an *CEBPB* und *GAPDH* in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan[®]-qPCR bestimmt. Für die Auswertung erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten von zwei unabhängigen Infektionen. In der cHL-Zelllinie L-1236 führte die Ausprägung von shCEBPB2 und shCEBPB3 zu einer deutlichen Verminderung der *CEBPB*-Ausprägung im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle. In L-428 führten diese beiden shRNAs hingegen nur zu einer Verminderung der *CEBPB*-Ausprägung auf die Hälfte des Werts der ScrCEBPB-Kontrolle. In beiden Zelllinien zeigte die shCEBPB1 nur eine schwache Wirkung.

n.d. : Nicht durchgeführt

Die Ergebnisse der TaqMan[®]-qPCRs der an Tag 3 und 6 nach der Infektion sortierten Zellen der Infektionen der cHL-Zelllinien SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2 sind in Abbildung 26 dargestellt. In der Zelllinie SUP-HD1 führte die Ausprägung von shCEBPB2 und shCEBPB3 zu einer moderaten Herabregulation von *CEBPB* auf das ca. 0,5-fache der Ausprägung in der ScrCEBPB-Kontrolle an beiden untersuchten Tagen. Die *mock*-Bedingung zeigte an Tag 3 nach der Infektion eine normale *CEBPB*-Ausprägung, wohingegen an Tag 6 eine fast 4-fach erhöhte *CEBPB*-Expression festgestellt wurde. Die SUP-HD1 wurde nicht mit shCEBPB1 infiziert. In der HDLM-2 konnte eine schwache Herabregulation von *CEBPB* an Tag 3 nach der Infektion in den shCEBPB2- oder shCEBPB3-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, die an Tag 6 allerdings verschwunden war. Die shCEBPB1-Ausprägung senkte die *CEBPB*-Ausprägung nicht und die *mock*-Bedingung prägte eine mit der ScrCEBPB-Kontrolle vergleichbare *CEBPB*-Mengen aus. Für die KM-H2 wurden nur an Tag 3 sortierte Zellen analysiert. Während die *mock*-Bedingung eine extrem verstärkte

CEBPB-Ausprägung im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle zeigte, führte die Ausprägung der shCEBPB1 oder shCEBPB2 zu keiner Veränderung der *CEBPB*-Menge in den Zellen. Die shCEBPB3-exprimierenden Zellen wiesen das 0,7-fache der *CEBPB*-Menge auf, also auch nur eine minimale Herunterregulation.

Somit zeigen die TaqMan[®]-qPCRs, dass als einzige in der L-1236 eine deutliche Herabregulation von *CEBPB* erreicht wurde. In den Linien L-428 und SUP-HD1 konnte eine moderate Reduzierung von *CEBPB* erzielt werden und in den Linien HDLM-2 und KM-H2 zeigten die shRNAs gegen *CEBPB* nicht die gewünschte Wirkung.

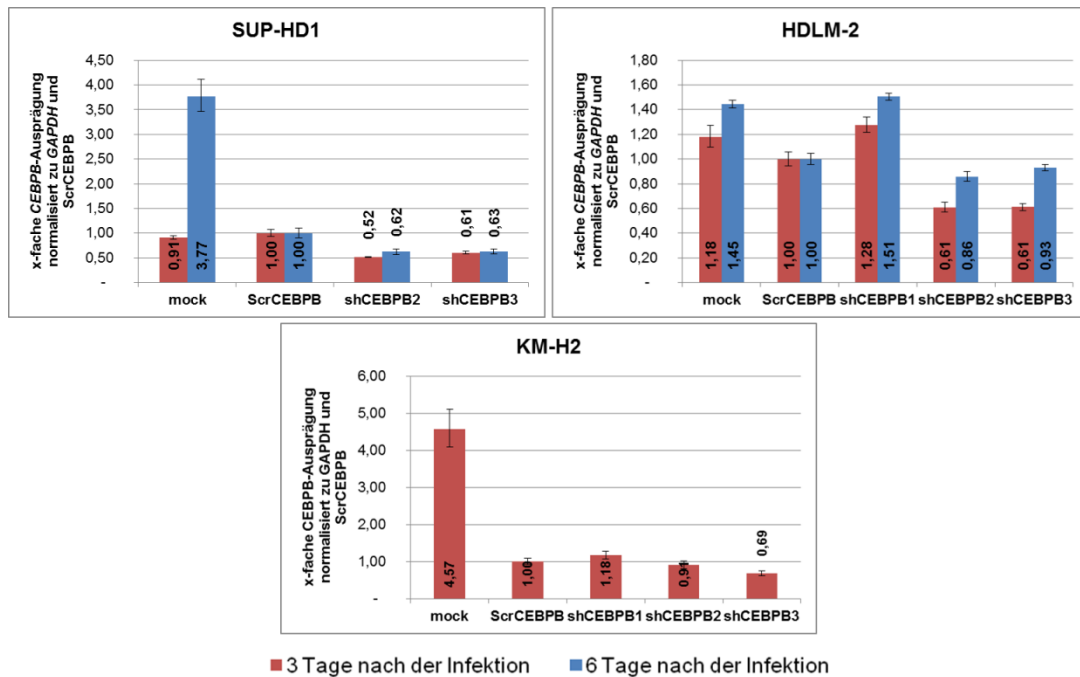


Abbildung 26: *CEBPB*-Ausprägung in den cHL-Zelllinien SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2 nach Infektion mit LeGO.G-Viren

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 6 nach den Infektionen sortiert. Anschließend wurde die Menge an *CEBPB* und *GAPDH* in den verschiedenen Zellen mittels TaqMan[®]-qPCRs bestimmt. Für die Auswertung erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta Ct$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten einer Infektion. In der cHL-Zelllinie SUP-HD1 führte die Ausprägung von shCEBPB2 und shCEBPB3 zu einer moderaten Verminderung der *CEBPB*-Expression im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle. In den beiden Zelllinien HDLM-2 und KM-H2 konnte hingegen keine Herabregulation von *CEBPB* nachgewiesen werden.

Für die Western Blots zur Kontrolle der Herabregulation von *CEBPB* wurden mindestens 150000 Zellen sortiert. Zusätzlich zu *CEBPB* wurde α -Tubulin als Ladekontrolle in den Western Blots nachgewiesen. Für die quantitativen Auswertungen wurden die ermittelten Intensitäten der Banden von den *CEBPB*-Isoformen zunächst auf die LAP1-Isoform der ScrCEBPB-Kontrolle normalisiert. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung anhand der Unterschiede in der Intensität der α -Tubulin Banden zwischen der ScrCEBPB-Kontrolle und der jeweiligen Probe, um Ungleichheiten bei der Beladung der Membran auszugleichen. Insgesamt wurde die *CEBPB*-Ausprägung von je zwei unabhängigen Infektionen der

cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 und je einer Infektion der cHL-Zelllinien SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2 untersucht. Generell war die Qualität der Western Blots allerdings nicht sehr gut. Leider konnte die Qualität der Western Blots auch durch mehrere Anpassungen nicht verbessert werden. Zusätzlich schloss die relativ geringe Menge an Material nach der Sortierung von einigen Infektionen eine Wiederholung der Western Blots, um ein besseres Ergebnis zu bekommen, aus. Ähnlich zu den Ergebnissen der TaqMan[®]-qPCRs zeigte die *mock*-Bedingung auch auf Proteinebene ein heterogenes Bild in der Ausprägung von CEBPB in Bezug auf die ScrCEBPB-Kontrolle. Dadurch werden auch hier die Ergebnisse nur präsentiert und nicht interpretiert. Die ScrCEBPB-Kontrolle stellte auch hier die wichtigere Referenz zur Einschätzung einer erfolgreichen Herabregulation von CEBPB dar. Zur Einschätzung der biologischen Aktivität von CEBPB nach Herabregulation sollte eigentlich auch eine Auswertung des LAP/LIP-Verhältnisses dargestellt werden. Diese Auswertung zeigte allerdings keine konsistenten Ergebnisse in den verschiedenen Infektionen der gleichen Zelllinien und an den verschiedenen untersuchten Tagen. Daher wird die Auswertung der LAP/LIP-Verhältnisse nach der CEBPB-Herabregulation nicht im Detail vorgestellt.

In Abbildung 27 ist exemplarisch ein Western Blot von an Tag 3 nach der 2. Infektion sortierten Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 gezeigt. Die Ausprägung der shCEBPB2 oder shCEBPB3 führte zu einer deutlichen Herabregulation aller CEBPB-Isoformen im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle. Auch in den Western Blots der an Tag 5 bzw. 6 nach der Infektion sortierten Zellen der 1. Infektion und der Zellen der 2. Infektion konnte eine deutliche Herabregulation aller CEBPB-Isoformen den shCEBPB2- oder shCEBPB3-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 28). Der Effekt der shCEBPB1 wurde nur an Tag 3 nach der 1. Infektion kontrolliert und zeigte hier eine schwächere Herabregulation als die shCEBPB2 oder shCEBPB3. Die *mock*-Bedingung wies an den verschiedenen Tagen der beiden Infektionen eine im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle stark variierende Ausprägung der drei CEBPB-Isoformen auf.

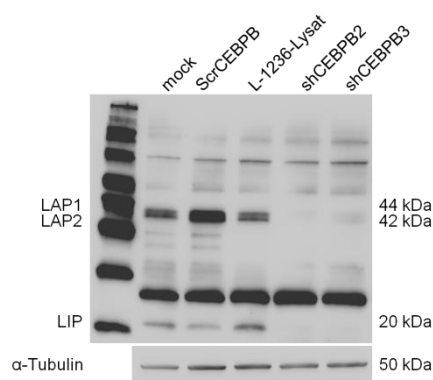


Abbildung 27: CEBPB-Ausprägung in der cHL-Zelllinie L-1236 an Tag 3 nach der 1. Infektion mit LeGO.G-Viren

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde die Menge der CEBPB-Isoformen in den verschiedenen Zellpopulationen mittels Western Blot bestimmt. Zur Kontrolle der gleichen Proteinladung auf der Membran wurde α -Tubulin nachgewiesen. Im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle zeigten die Zellen, die shCEBPB2 oder shCEBPB3 ausprägten, eine deutliche Herabregulation aller CEBPB-Isoformen.

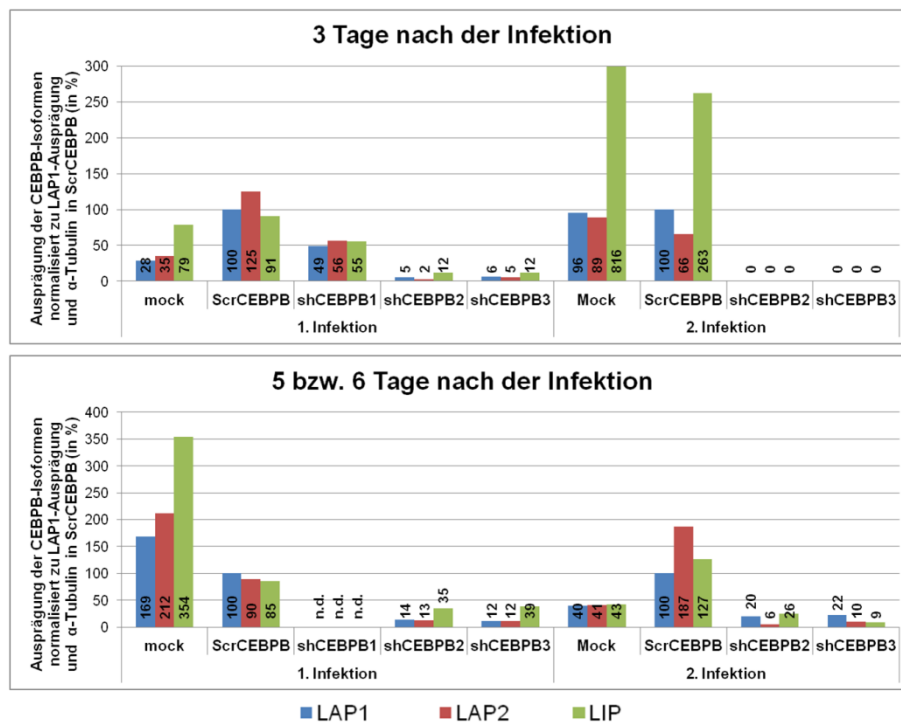


Abbildung 28: Ausprägung der CEBPB-Isoformen in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie L-1236

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 5 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde ein Western Blot für CEBPB und α -Tubulin durchgeführt und quantitativ mit der Phoretix-1D Software ausgewertet. Dabei erfolgte die Normalisierung der Ausprägung der CEBPB-Isoformen zur LAP1-Ausprägung in der ScrCEBPB-Kontrolle und zur jeweiligen Ausprägung von α -Tubulin. Dargestellt sind die ermittelten Werte von zwei unabhängigen Infektionen. In der cHL-Zelllinie L-1236 führte die Ausprägung von shCEBPB2 oder shCEBPB3 zu einer deutlichen Herabregulation aller CEBPB-Isoformen im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle. Die Auswirkung der Expression der shCEPB1 hingegen wurde nur an Tag 3 der 1. Infektion überprüft und zeigte dort eine schwächere Herabregulation der drei CEBPB-Isoformen im Vergleich zu shCEBPB2 oder shCEBPB3.

n.d.: nicht durchgeführt

In der cHL-Zelllinie L-428 führte die Ausprägung der shCEBPB2 oder shCEBPB3 auch zu einer Herabregulation der drei CEBPB-Isoformen im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle, wobei an Tag 3 nach der 1. Infektion diese Herabregulation eher gering war (Abbildung 29). An Tag 5 nach der 1. Infektion und an beiden Tagen der 2. Infektion hingegen zeigte sich eine deutliche Herabregulation aller CEBPB-Isoformen durch shCEBPB2 oder shCEBPB3 auf ca. 1/3 der CEBPB-Expression in der ScrCEBPB-Kontrolle. Die Expression von shCEBPB1 zeigte in der Zelllinie L-428 generell keine Wirkung auf die CEBPB-Expression, nur an Tag 3 der 1. Infektion wiesen die Zellen, die shCEBPB1 ausprägten, eine extrem verstärkte Ausprägung aller drei Isoformen auf, die aber nicht näher untersucht worden ist. Die *mock*-Bedingungen wiesen bis an Tag 3 der 1. Infektion eine ähnliche CEBPB-Expression der drei Isoformen auf wie die ScrCEBPB-Kontrolle.

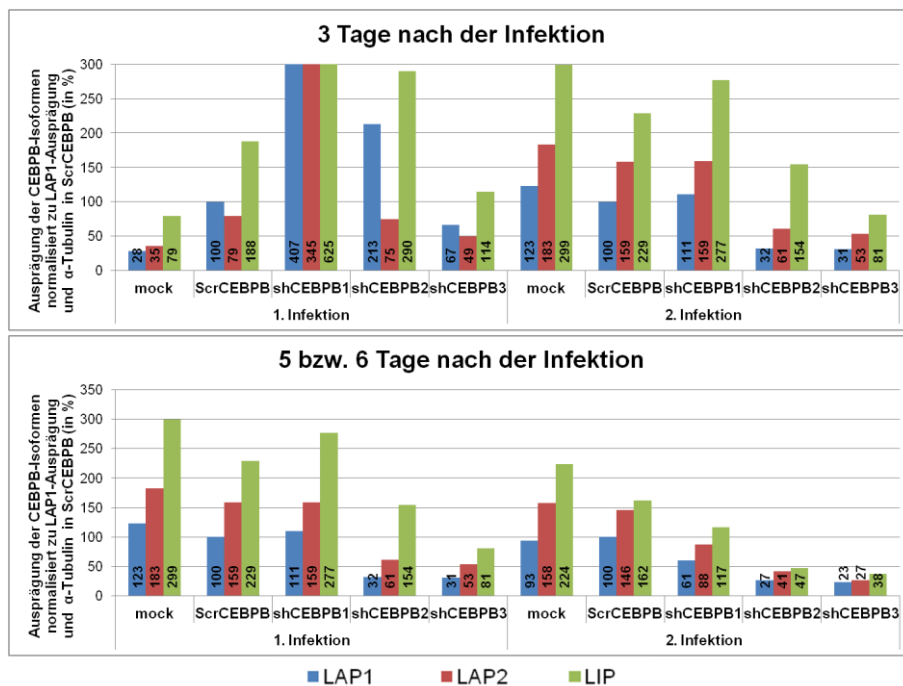


Abbildung 29: Ausprägung der CEBPB-Isoformen in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 6 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurden Western Blots für CEBPB und α -Tubulin durchgeführt und quantitativ mit der Phoretix-1D Software ausgewertet. Dabei erfolgte die Normalisierung der Ausprägung der CEBPB-Isoformen zur LAP1-Ausprägung in der ScrCEBPB-Kontrolle und zur jeweiligen Ausprägung von α -Tubulin. Dargestellt sind die ermittelten Werte von zwei unabhängigen Infektionen. Bis auf Tag 3 nach der 1. Infektion führte die Ausprägung von shCEBPB2 oder shCEBPB3 in der cHL-Zelllinie L-428 zu einer deutlichen Herabregulation aller CEBPB-Isoformen im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle. Zellen, die shCEBPB1 ausprägten, wiesen hingegen keine Herabregulation von CEBPB auf.

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Western Blots der cHL-Zelllinien SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2 dargestellt. In der Linie SUP-HD1 wiesen die Zellen, die shCEBPB2 oder shCEBPB3 exprimierten, an Tag 3 nach der Infektion eine sehr deutliche Herabregulation aller CEBPB-Isoformen auf, die an Tag 6 nach der Infektion in abgeschwächter Form vorhanden war. In der Linie HDLM-2 konnte an Tag 3 nach der Infektion auch eine deutliche Herabregulation aller CEBPB-Isoformen in den shCEBPB2- oder shCEBPB3-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. An Tag 6 nach der Infektion zeigte sich in den shCEBPB3-ausprägenden Zellen allerdings keine Herunterregulation mehr und in den shCEBPB2-ausprägenden Zellen war die Herabregulation schwach. Die Ausprägung von shCEBPB1 wies keinen Effekt in der Zelllinie HDLM-2 auf. Für alle Proben an Tag 6 nach der Infektion konnte keine LIP-Bande detektiert werden, obwohl die Linie HDLM-2 in allen anderen Western Blots positiv für LIP war. Aufgrund mangelnden Materials konnte der Western Blot nicht wiederholt werden und wurde daher dennoch zur Auswertung verwendet. Die Qualitäten der Western Blots der KM-H2-Zellen waren nicht optimal und so konnte z.B. an Tag 3 nach der Infektion keine Bande für LIP detektiert werden. Die Western Blots wurden dennoch ausgewertet, um einen Eindruck der Herabregulation von CEBPB in

dieser Zelllinie zu bekommen. Generell wurde in der Linie KM-H2 nur eine schwache Herabregulation von CEBPB nach Expression der shCEBP2 und CEBPB3 an beiden untersuchten Tagen nach der Infektion nachgewiesen. Die shCEBPB1-Ausprägung hingegen zeigt auch in der Zelllinie KM-H2 keine Wirkung.

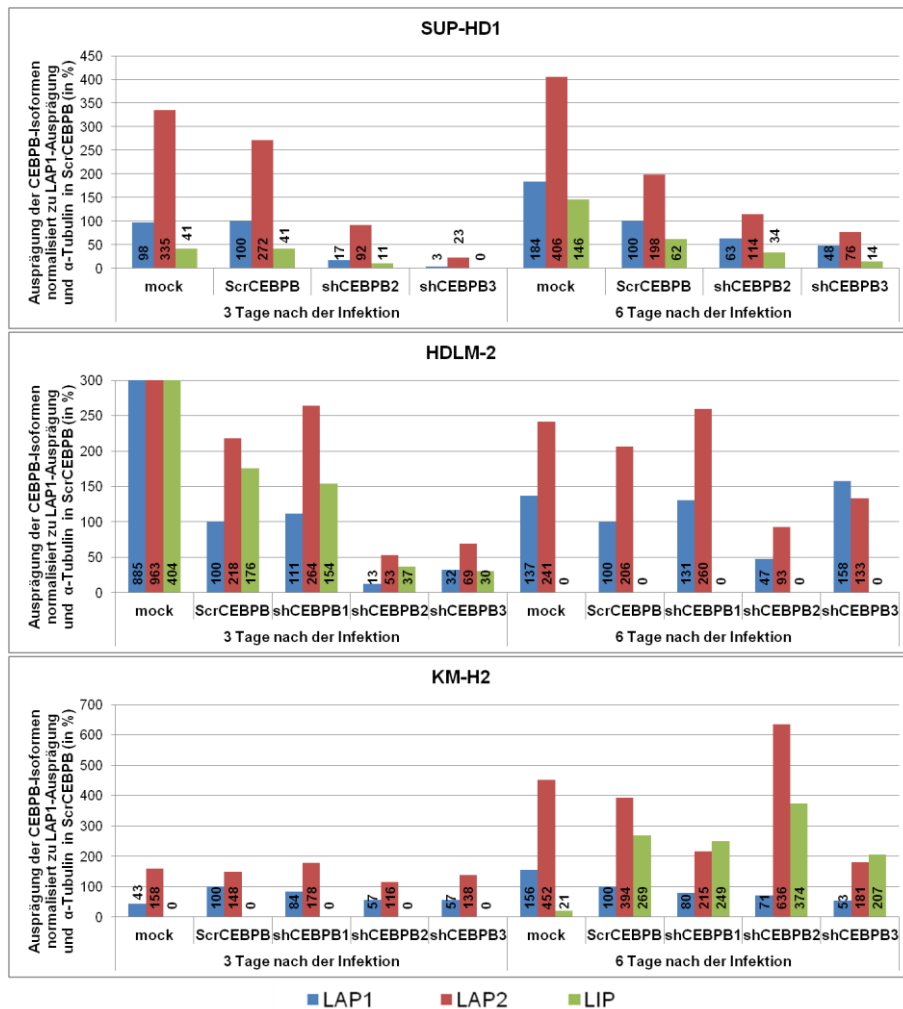


Abbildung 30: Ausprägung der CEBPB-Isoformen in mit LeGO.G-Viren infizierten Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1, HDLM-2 und KM-H2

Die Zellen wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 6 nach den Infektionen sortiert. Anschließend wurde ein Western Blot für CEBPB und α -Tubulin durchgeführt und quantitativ mit der Phoretix-1D Software ausgewertet. Dabei erfolgte die Normalisierung der Ausprägungen der CEBPB-Isoformen zur LAP1-Ausprägung in der ScrCEBPB-Kontrolle und zur jeweiligen Ausprägung von α -Tubulin. Dargestellt sind die ermittelten Werte einer Infektion je Zelllinie. In der cHL-Zelllinie SUP-HD1 führte die Ausprägung der shCEBPB2 oder shCEBPB3 zu einer deutlichen Herabregulation der CEBPB-Isoformen im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle. In HDLM-2 war an Tag 3 nach der Infektion in den shCEBPB2 und shCEBPB3-ausprägenden Zellen eine deutliche Herabregulation zu erkennen, die aber an Tag 6 nach der Infektion nicht nachgewiesen werden konnte. Die shCEBPB1 hingegen zeigte keine Regulation in der HDLM-2. In der KM-H2 konnte eine Herabregulation der CEBPB-Isoformen bei keiner shRNA gegen CEBPB nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde CEBPB erfolgreich in einigen cHL-Zelllinien auf mRNA und Proteinebene herunterreguliert. So konnte eine sehr deutliche Herabregulation in der Zelllinie L-1236 durch die shCEBPB2 oder shCEBPB3 Ausprägung erreicht werden. In der Zelllinie

L-428 zeigte sich besonders am 6. Tag nach der Infektion sowohl in den TaqMan[®]-qPCRs und Western Blots eine deutliche Herabregulation, wobei an Tag 3 nach der Infektion immerhin eine moderate Herabregulation von CEBPB nachgewiesen wurde. In der Zelllinie SUP-HD1 konnte eine deutliche Herabregulation von CEBPB auf Proteinebene an Tag 3 und eine Moderate an Tag 6 nach der Infektion gezeigt werden, die zusammen mit einer moderaten Herabregulation von *MYC* auf mRNA-Ebene auftrat. In den beiden cHL-Zelllinien HDLM-2 und KM-H2 hingegen wurden keine deutlichen Herabregulationen von CEBPB erreicht. Daher wurden diese beiden Zelllinien in den nachfolgenden Versuchen nicht weiter untersucht. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse, dass die shCEBPB1 eine geringe Wirkung auf die CEBPB-Expression aufwies. Daher wurden die Zellen, die shCEBPB1 ausprägten, auch nicht weiter untersucht.

3.3.3 Auswirkung der Herabregulation von CEBPB in den cHL-Zelllinien auf bekannte CEBPB-Zielgene

In einem nächsten Schritt sollte die Funktionalität der Herabregulation von CEBPB in den cHL-Zelllinien überprüft werden. Dafür sollten die Ausprägungen von bekannten CEBPB-Zielgenen in den Zellen mit verminderter CEBPB-Ausprägung mit der Expression dieser Gene in Zellen der ScrCEBPB-Kontrolle mittels *SYBR Green*-qPCRs verglichen werden. Zuvor war eine deutliche Herabregulation von CEBPB in den cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1 durch die Ausprägung von shCEBPB2 oder shCEBPB3 gezeigt worden. Daher beschränkte sich die Analyse auf diese Zelllinien und die shCEBPB1-exprimierenden Zellen wurden nicht analysiert. Getestet wurde die Expression von *BCL2A1*, *IL6*, *IRF4*, *BCL2* und *PTGS2*. *BCL2A1* gehört zur Gruppe der *BCL2*-Proteine. Es reguliert die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und kann Caspasen hemmen. Eine positive Regulation von *BCL2A1* durch CEBPB wurde in ALCL-Zelllinien gezeigt (Bonzheim *et al.*, 2013). *IL6* ist ein wichtiges Zytokin in Entzündungsreaktionen und in der Entwicklung von B-Zellen. CEBPB wurde als transkriptioneller Aktivator des *IL6*-Gens identifiziert (Akira *et al.*, 1990). *IRF4* ist in die Regulation von vielen Genen der Interferonantwort involviert und ist entscheidend an der Entwicklung von GCs beteiligt. Zusätzlich wird es für die Differenzierung in Plasmazellen benötigt. In Multiplen Myelom-Zelllinien wurde eine direkte positive Regulation von *IRF4* durch CEBPB gezeigt (Pal *et al.*, 2009). *BCL2* ist ein bekanntes anti-apoptotisches Protein und eine positive Regulation von *BCL2* durch CEBPB wurde in Multiplen Myelom-Zelllinien gezeigt (Pal *et al.*, 2009). *PTGS2*, auch Cyclooxygenase 2 genannt, ist ein wichtiges Enzym in der Prostaglandin-Biosynthese. Für *PTGS2* konnte eine positive Regulation durch CEBPB in murinen Mastzellen gezeigt werden (Reddy *et al.*, 2000). Zur Normalisierung wurde auch die Ausprägung des Referenzgens *ACTB* bestimmt. Nach erfolgreicher Etablierung der *SYBR Green*-qPCRs für alle Produkte in Vorversuchen wurde die Ausprägung der Gene in den transduzierten Zellen untersucht. *PTGS2* wurde

allerdings nicht in den transduzierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428 untersucht, da in den Vorversuchen keine Expression von PTGS2 in dieser Zelllinie nachgewiesen werden konnte. Für die SYBR Green-qPCRs wurden die für die TaqMan®-qPCRs-hergestellten cDNAs der unterschiedlichen Zellpopulationen der verschiedenen Infektionen der cHL-Zelllinien verwendet. Leider konnten aufgrund der geringen Anzahl an Infektionen keine Signifikanzen berechnet werden. Die Ergebnisse der SYBR Green-qPCR sind in Abbildung 31-33 dargestellt.

In der cHL-Zelllinie L-1236, in der die stärkste Herabregulation gefunden wurde, zeigte sich bereits an Tag 3 nach der Infektion in beiden Infektionen eine gute negative Regulation der CEBPB-Zielgene *BCL2A1* und *IL6* nach Ausprägung der shCEBPB2 oder shCEBPB3. In den shCEBPB2-exprimierenden Zellen war auch eine moderate Herabregulation von *IRF4*, *BCL2* und *PTGS2* zu erkennen. An Tag 5 nach der 1. Infektion wiesen alle untersuchten Gene eine mehr oder weniger starke Herabregulation durch verminderte CEBPB-Ausprägung auf. In

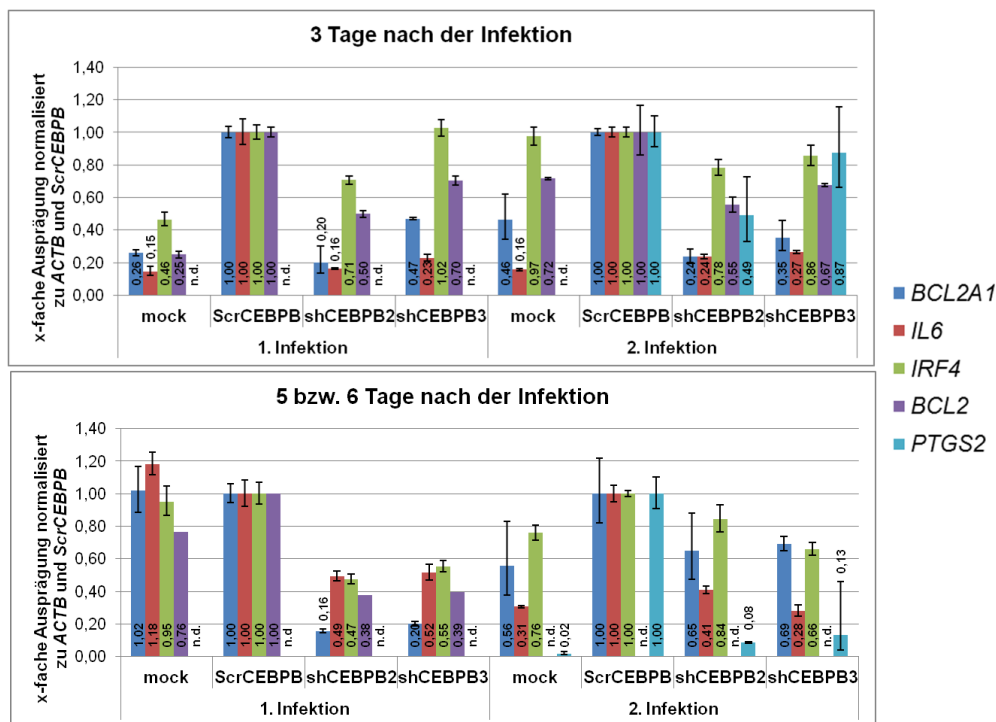


Abbildung 31: Ausprägung von CEBPB-Zielgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 nach Herabregulation von CEBPB

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 5 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener CEBPB-Zielgene und *ACTB* mittels SYBR Green-qPCRs bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gemäß der $\Delta\Delta Ct$ -Methode zunächst zum jeweiligen *ACTB*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten zweier unabhängiger Infektionen. Die Expression von *BCL2A1*, *IL6* und *BCL2* wurde stark positiv durch CEBPB beeinflusst, was durch deren starke Expressionsabnahme nach CEBPB-Herabregulation an den verschiedenen Tagen gezeigt wurde. Die Regulation von *IRF4* und *PTGS2* war nicht konsistent in den verschiedenen Infektionen und an den getesteten Tagen. Teilweise erfolgte eine moderate negative Regulation nach CEBPB-Herabregulation.

n.d.: nicht durchgeführt

der 2. Infektion zeigte *IL6* und *PTGS2* eine deutliche Herabregulation an Tag 6 nach der Infektion in shCEBPB2- oder shCEBPB3-exprimierenden Zellen. Für *BCL2A1* und *IRF4* wurde in der 2. Infektion an Tag 6 nur eine schwache Herabregulation durch die Herabregulation von CEBPB festgestellt.

Nach Herabregulation von CEBPB schien die Ausprägung der untersuchten CEBPB-Zielgene in der cHL-Zelllinie L-428 konstant zu bleiben. So konnte eine schwache Herabregulation von *IL6* in den Zellen mit verminderter CEBPB-Expression im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle in der 2. Infektion an beiden untersuchten Tagen nachgewiesen werden. Diese *IL6*-Herabregulation trat aber nicht in der 1. Infektion auf, sondern im Gegenteil wurde an Tag 3 nach der 1. Infektion in den shCEBPB3-exprimierenden Zellen eine erhöhte Expression von *IL6* nachgewiesen. An Tag 5 nach der 1. Infektion wurde außerdem eine stark erhöhte Expression von *BCL2A1* in den shCEBPB2 oder shCEBPB3-ausprägenden Zellen gefunden, die der erwarteten Regulation von *BCL2A1* durch CEBPB widerspricht. Generell ist zu beachten, dass die TaqMan®-PCR- und Western Blot-Ergebnisse der Infektionen der cHL-Zelllinie L-428 eine bessere Herabregulation von CEBPB

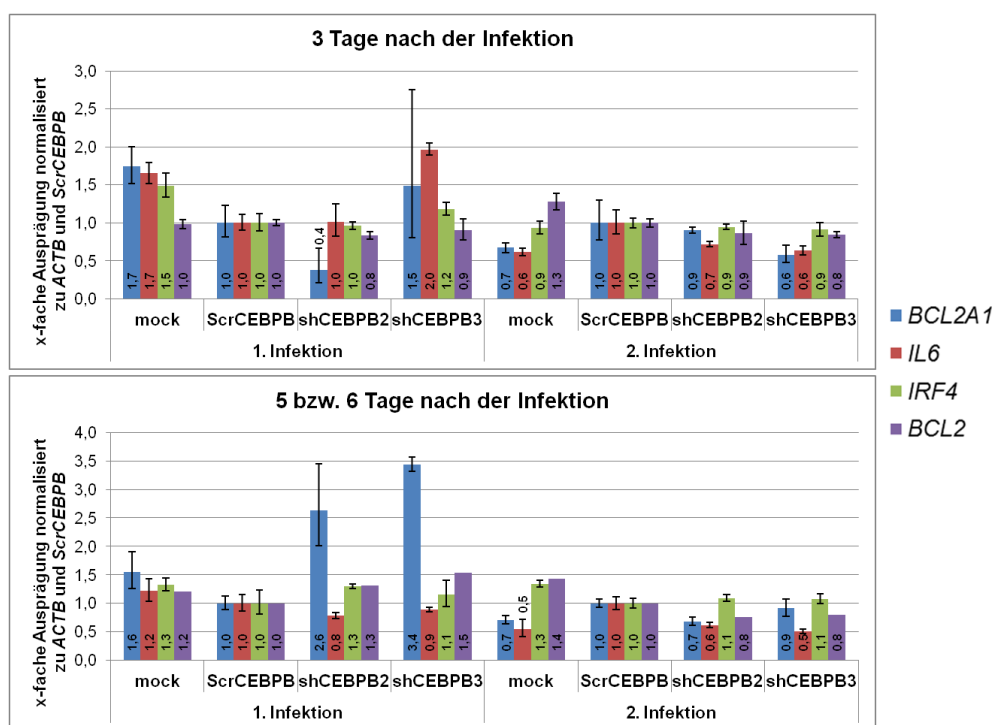


Abbildung 32: Ausprägung von CEBPB-Zielgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 nach Herabregulation von CEBPB

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 5 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener CEBPB-Zielgene und *ACTB* mittels *SYBR Green*-PCRs bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gemäß der $\Delta\Delta C_t$ -Methode zunächst zum jeweiligen *ACTB*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten zweier unabhängiger Infektionen. Nur *IL6* zeigte in der 2. Infektion eine moderate Herabregulation in Folge der verminderten CEBPB-Ausprägung. Alle anderen Gene zeigten keine Regulation.

in der 2. Infektion zeigten, was gut mit der dort gefunden verminderten Expression von *IL6* korreliert. Insgesamt scheint die CEBPB-Herabregulation aber keinen großen Einfluss auf die Expression der untersuchten Zielgene zu haben.

In der Zelllinie SUP-HD1 konnte eine verminderte Expression von *BCL2A1* nach CEBPB-Herabregulation an Tag 3 nach der Infektion sowohl in shCEBPB2- als auch in shCEBPB3-ausprägenden Zellen im Vergleich zu ScrCEBPB-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 33). Diese Herabregulation von *BCL2A1* war allerdings an Tag 6 nach der Infektion nur noch schwach vorhanden. Die anderen untersuchten Gene zeigten hingegen keine einheitliche Regulation an den verschiedenen Tagen oder durch die beiden shRNAs gegen CEBPB.

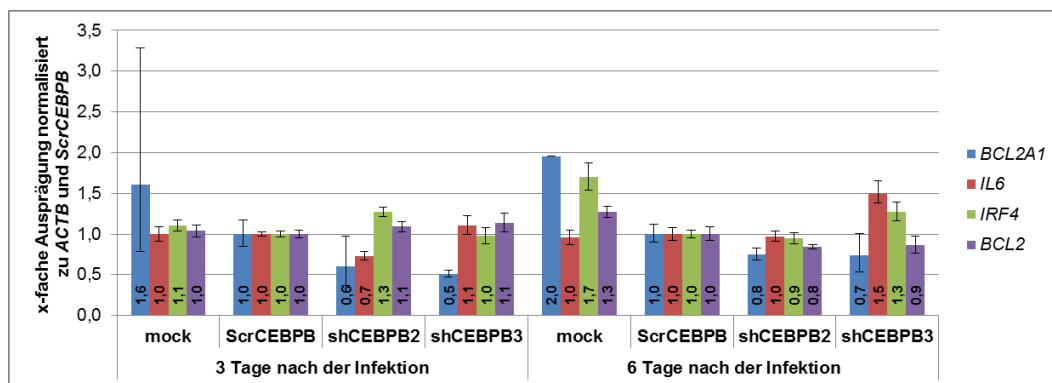


Abbildung 33: Ausprägung von CEBPB-Zielgenen in Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1 nach Herabregulation von CEBPB

Die Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und am 3. und 6. Tag nach der Infektion sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener CEBPB-Zielgene und *ACTB* mittels TaqMan®-PCR bestimmt. Die Normalisierung erfolgte gemäß der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zunächst zum jeweiligen *ACTB*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten einer Infektion. Die Ausprägung von *BCL2A1* war an Tag 3 nach der Infektion in Zellen mit verminderter CEBPB-Expression reduziert. Allerdings war diese Reduktion an Tag 6 nach der Infektion nur noch schwach vorhanden. Die anderen untersuchten Gene zeigten keine Regulation.

Zusammenfassend konnte die Funktionalität der CEBPB-Herabregulation in der cHL-Zelllinie L-1236 bestätigt werden, indem gezeigt wurde, dass CEBPB-Zielgene durch die Herabregulation von CEBPB wie erwartet reguliert wurden. In der Zelllinie L-428 hingegen konnte dies nicht gezeigt werden, wobei bedacht werden muss, dass die Expression der ausgewählten Gene in der L-428 durch andere Mechanismen kontrolliert sein könnten. In der Zelllinie SUP-HD1 zeigte sich durch die CEBPB-Herabregulierung nur eine negative Regulation von *BCL2A1* an Tag 3 nach der Infektion, die an Tag 6 nach der Infektion abgeschwächt war. Die Ausprägung der anderen untersuchten Gene wurde hingegen nicht beeinflusst.

3.3.4 Einfluss der CEBPB-Herabregulation auf die Proliferation und das Überleben der cHL-Zelllinien

Für die LIP-Isoform von CEBPB wurde eine wichtige Bedeutung in der Proliferation und für das Überleben einiger cHL-Zelllinien gezeigt (Jundt *et al.*, 2005). Daher sollte in einem nächsten Schritt der Einfluss der Herabregulation aller Isoformen von CEBPB auf die Proliferation und das Überleben der Zellen untersucht werden. Dies erfolgte durch Beobachtung des kompetitiven Wachstums der mit den LeGO.G.-Viren infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen durch Messung des zeitlichen Verlaufs des Anteils GFP-positiver Zellen einer Mischkultur, analog wie es auch bei den MYC-Experimenten durchgeführt wurde (siehe 3.2.3). Dafür wurden die Zellen der cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1 mit den entsprechenden LeGO.G.-Viren infiziert und gemischt mit den nicht-infizierten Zellen in Kultur gehalten. Hier erfolgte die Messung des Anteils GFP-positiver Zellen ab Tag 3 nach der Infektion und wurde in regelmäßigen Abständen wiederholt. Zur Auswertung wurden die ermittelten Anteile der GFP-positiven Zellen auf den Wert an Tag 3 normalisiert, um Unterschiede in den Transduktionseffizienzen der verschiedenen Viren und Infektionen zu kompensieren. Die beschriebenen Messungen wurden mit Zellen der Infektionen durchgeführt von denen auch die Zellen für die übrigen Experimente sortiert wurden. Daher ist die erfolgreiche Herabregulation von CEBPB in den entsprechenden Zellen gezeigt worden. Insgesamt wurden also zwei Infektionen der Zelllinien L-1236 und L-428 und eine Infektion der SUP-HD1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt, wobei für die Zelllinien L-1236 und die L-428 je nur eine repräsentative Infektion gezeigt ist. Für keine Zelllinie konnte ein Einfluss der CEBPB-Herabregulation auf die Proliferation oder das Überleben der Zellen nachgewiesen werden. In den Zelllinien L-1236 und L-428 bleibt der Anteil der GFP-positiven Zellen über den Beobachtungszeitraum sowohl in den shRNAs gegen CEBPB-exprimierenden als auch in den Zellen der ScrCEBPB-Kontrolle konstant. Dies zeigt, dass die infizierten Zellen unabhängig von der ausgeprägten shRNA keinen Wachstumsnachteil gegenüber nicht infizierten Zellen haben. In der Zelllinie SUP-HD1 hingegen nimmt der Anteil der GFP-positiven Zellen in allen Bedingungen ab. Dies deutet an, dass die Ausprägung einer shRNA das Überleben oder die Proliferation der SUP-HD1-Zellen beeinträchtigt. Da der Anteil der GFP-positiven Zellen bei der ScrCEBPB-Kontrolle allerdings im gleichen Maß abnimmt wie die shCEBPB2 oder shCEBPB3-exprimierenden Zellen handelte es sich hierbei um einen unspezifischen Effekt.

Zusammenfassend scheint die Herabregulation aller drei Isoformen von CEBPB die Proliferation oder das Überleben der Zellen der cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1 nicht zu beeinflussen.

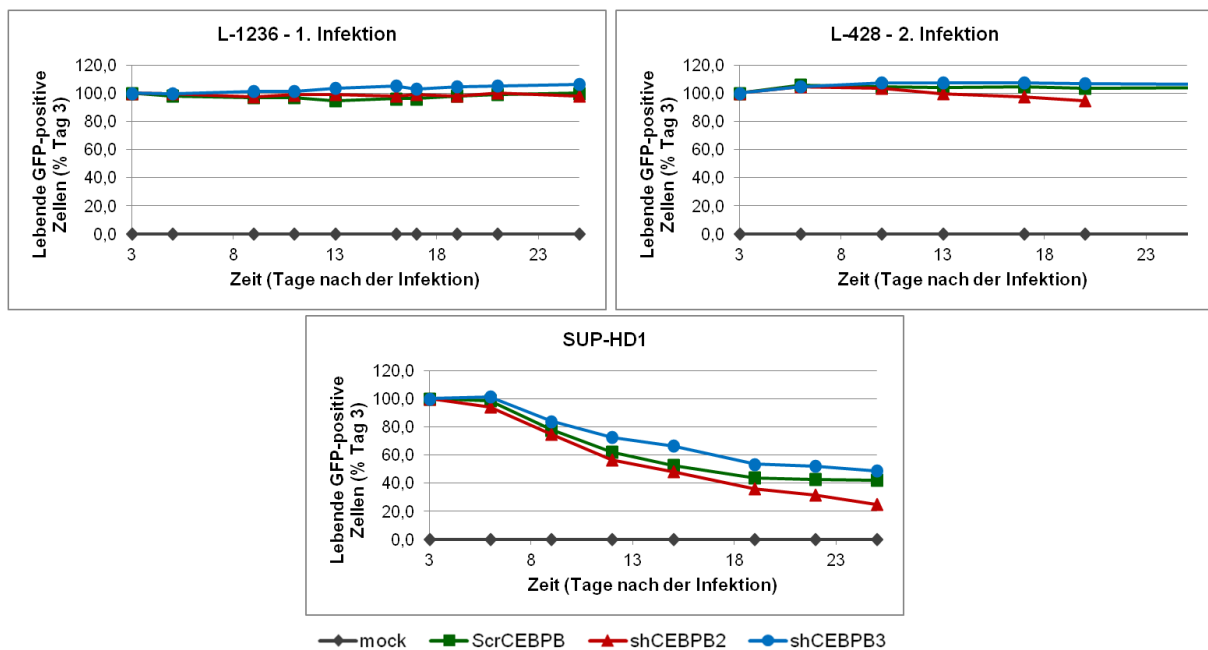


Abbildung 34: Der Einfluss von CEBPB in den cHL-Zelllinien auf das kompetitive Wachstumsverhalten von infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen

Die Zellen der cHL-Zelllinien L-1236, L-428, und SUP-HD1 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und in Kultur gehalten. An Tag 3 nach der Infektion wurde der Anteil der lebenden GFP-positiven und damit infizierten Zellen mittels FACS nach vorheriger PI-Färbung in der Kultur bestimmt. In den folgenden Tagen wurde diese Messung wiederholt und der Anteil der infizierten Zellen auf den Wert an Tag 3 normalisiert. In keiner Zelllinie waren deutliche Unterschiede zwischen den ScrCEBPB-Kontrolle und Zellen, die shRNAs gegen CEBPB ausprägten, festzustellen. In der Zelllinie SUP-HD1 führte die Expression von shRNAs zu einer Abnahme des Anteils GFP-positiver Zellen, was auf einen Wachstumsnachteil durch die Virusinfektion in diesen Zellen hindeutet.

3.3.5 Auswirkung der CEBPB-Herabregulation auf die Expression von B-Zellgenen in den cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1

Für die Untersuchung zur Beteiligung von CEBPB in der Umprogrammierung der cHL-Zelllinien sollte die Expression von typischen B-Zellgenen in Zellen mit reduzierter Menge an CEBPB im Vergleich zu Zellen mit normaler Menge an CEBPB mittels TaqMan®-PCRs analysiert werden. Es wurde die gleiche cDNA der cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1 wie zur Analyse der Herabregulation von *CEBPB* und zur Expression der CEBPB-Zielgene verwendet. Insgesamt wurden also Zellen von je zwei Infektionen der Zelllinien L-1236 und L-428 und einer Infektion der Zelllinie SUP-HD1 untersucht, die an Tag 3 und an Tag 5 bzw. 6 sortiert worden waren. Für die Auswahl der B-Zellgene, die untersucht wurden, wurde darauf geachtet, dass soweit bekannt keines der Gene in den Zelllinien epigenetisch stillgelegt ist und dass diese in den untersuchten cHL-Zelllinien exprimiert werden. So wurde die Expression der B-Zellgene *EBF1*, *BLK*, *PAX5* und *TCF3* bestimmt. *EBF1*, *PAX5* und *TCF3* sind wichtige Transkriptionsfaktoren in der B-Zellentwicklung und an der Expression vieler B-Zellgene beteiligt. *BLK* codiert eine Tyrosin-Kinase und stellt einen wichtigen Bestandteil des BCR-Signalweges dar. Zur Normalisierung wurde parallel die Expression von *GAPDH* gemessen. Wie in den vorherigen Analysen zeigte die *mock*-

Bedingung teilweise deutliche Unterschiede zu der ScrCEBPB-Bedingung. Sie wird vollständigshalber gezeigt, aber die ScrCEBPB-Kontrolle diene wiederum als wichtigere Referenz, da diese den Einfluss der Infektion und Ausprägung einer unspezifischen shRNA auf die Expression der B-Zellgene mit einschließt.

Die Ergebnisse der TaqMan[®]-PCRs für die Zelllinie L-1236 sind in Abbildung 35 dargestellt. Für *BLK* und *TCF3* konnte keine Regulation in den Zellen mit verminderter *CEBPB*-Menge festgestellt werden. Die Ausprägung von *PAX5* hingegen war in den shCEBPB2 oder shCEBPB3-ausprägenden Zellen an allen getesteten Tagen und in beiden Infektionen auf ca. ein Drittel der Expression in der ScrCEBPB-Kontrolle reduziert. Dies deutet auf eine positive Regulation von *PAX5* durch *CEBPB* hin. Für *EBF1* konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. So wurde in den shCEBPB3-ausprägenden Zellen eine gleichstarke Expression von *EBF1* wie in der ScrCEBPB-Kontrolle nachgewiesen. In den shCEBPB2-exprimierenden Zellen konnte hingegen mit Ausnahme an Tag 3 nach der 2. Infektion eine

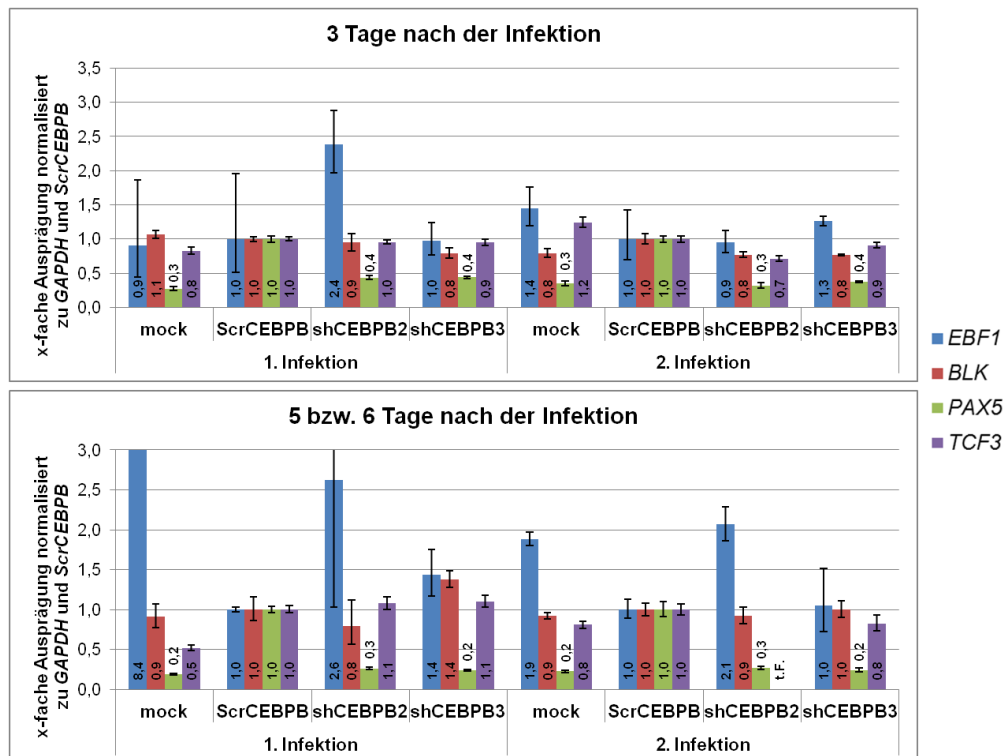


Abbildung 35: Ausprägung von B-Zellgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 nach Herabregulation von CEBPB

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-1236 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 5 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener B-Zellgene und *GAPDH* mittels TaqMan[®]-qPCRs bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten zweier unabhängiger Infektionen. Die Ausprägung von *PAX5* war nach Herabregulation von *CEBPB* reduziert. Die *EBF1*-Expression war in 3 von 4 Messungen zumindest in der shCEBPB2-ausprägenden Zellen erhöht. Alle anderen Gene wiesen keine deutliche Regulation in Folge der Herabregulation von *CEBPB* auf.

t.f.: technischer Fehler

um bis zu 2,6-fach erhöhte *EBF1*-Ausprägung im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle gezeigt werden. Allerdings wiesen die ermittelten *EBF1*-Werte teilweise hohe Standardabweichungen auf, wodurch deren Aussagekraft in Frage gestellt wird. Trotzdem deuten diese Daten eine negative Regulation von *EBF1* durch CEBPB in der cHL-Zelllinie L-1236 an.

Die Ergebnisse der TaqMan®-PCRs für die Zelllinie L-428 sind in Abbildung 36 dargestellt. Für *EBF1* konnte an Tag 3 nach beiden Infektionen eine um 0,5-fach erhöhte Expression im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle in den shCEBPB2- oder shCEBPB3-ausprägenden Zellen nachgewiesen werden. An Tag 5 bzw. 6 nach den Infektionen erhöhte sich die *EBF1*-Expression in der shCEBPB3 auf das 1,9-fache der *EBF1*-Ausprägung in der ScrCEBPB-Kontrolle, wohingegen in den shCEBPB2-ausprägenden Zellen keine erhöhte

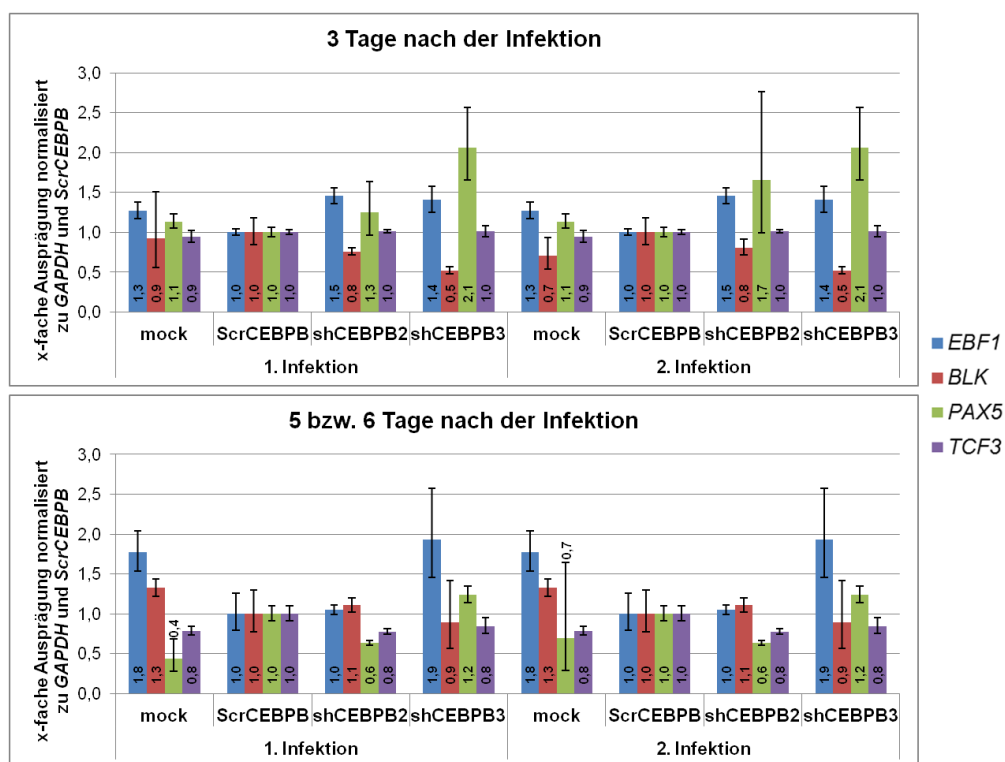


Abbildung 36: Ausprägung von B-Zellgenen in Zellen der cHL-Zelllinie L-428 nach Herabregulation von CEBPB

Die Zellen der cHL-Zelllinie L-428 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 5 nach der 1. Infektion bzw. an Tag 3 und 6 nach der 2. Infektion sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener B-Zellgene und *GAPDH* mittels TaqMan®-qPCRs bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten zweier unabhängiger Infektionen. Die *EBF1*-Expression war an Tag 3 nach der Infektion durch Herabregulation von CEBPB leicht erhöht, wobei nur in den shCEBPB3-ausprägenden Zellen auch an Tag 5 bzw. 6 nach der Infektion eine erhöhte *EBF1*-Expression nachweisbar war. Für *BLK* konnte eine leicht verminderte Expression durch CEBPB-Herabregulation an Tag 3 nach der Infektion festgestellt werden, die an Tag 5 bzw. 6 nach der Infektion aber verschwunden war. *PAX5* zeigte eine erhöhte Expression an Tag 3 nach der Infektion, die aber an Tag 5 bzw. 6 nach den Infektionen in shCEBPB3-ausprägenden Zellen nicht nachgewiesen wurde und die shCEBPB2-ausprägenden Zellen sogar eine leicht verminderte *PAX5*-Expression aufwiesen. *TCF3* zeigte keine Regulation durch CEBPB-Herabregulation.

Ausprägung von *EBF1* mehr nachweisbar war. Für *BLK* konnte eine leicht verminderte Expression an Tag 3 nach den Infektionen durch CEBPB-Herabregulation festgestellt werden, die aber an Tag 5 bzw. 6 nach den Infektionen nicht mehr vorhanden war. An Tag 3 nach beiden Infektionen zeigte sich eine erhöhte *PAX5*-Ausprägung nach CEBPB-Herabregulation. Diese war allerdings an Tag 5 bzw. 6 nach den Infektionen allerdings in den shCEBPB3-ausprägenden Zellen verschwunden und in den shCEBPB2-exprimierenden Zellen konnte sogar eine leicht reduzierte *PAX5*-Ausprägung im Vergleich zur ScrCEBPB-Kontrolle nachgewiesen werden. Für *TCF3* konnte keine Regulation durch die CEBPB-Herabregulation festgestellt werden.

In der Zelllinie SUP-HD1 führte die CEBPB-Herabregulation zu einer stark erhöhten *BLK*-Expression an Tag 3 nach der Infektion (Abbildung 37). Allerdings war an Tag 6 nach der Infektion nur eine schwach erhöhte *BLK*-Expression nachweisbar. Die anderen untersuchten Gene zeigten keine deutliche Regulation durch Herabregulation von CEBPB.

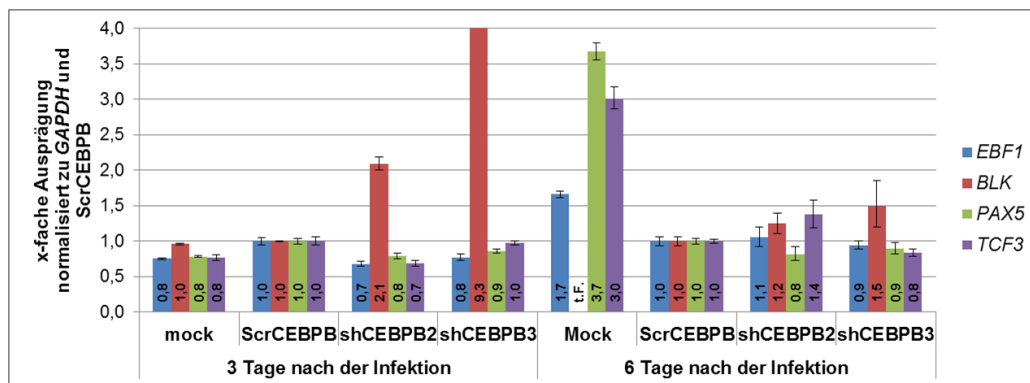


Abbildung 37: Ausprägung von B-Zellgenen in Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1 nach Herabregulation von CEBPB

Die Zellen der cHL-Zelllinie SUP-HD1 wurden mit den angegebenen LeGO.G-Viren infiziert und an Tag 3 und 6 nach der Infektion sortiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge verschiedener B-Zellgene und *GAPDH* mittels TaqMan[®]-qPCRs bestimmt. Dabei erfolgte die Normalisierung gemäß der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zunächst zum jeweiligen *GAPDH*-Wert und anschließend zum Wert der ScrCEBPB. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus drei technischen Replikaten einer Infektion. Die CEBPB-Herabregulation führte in den SUP-HD1 Zellen zu einer stark erhöhten *BLK*-Ausprägung an Tag 3 nach der Infektion. Auch an Tag 6 nach der Infektion konnte eine schwach erhöhte *BLK*-Expression in Zellen mit CEBPB-Herabregulation nachgewiesen werden. Die anderen untersuchten Gene wiesen keine einheitliche Regulation auf.

t.F.: technischer Fehler

Zusammenfassend scheint die Rolle von CEBPB in der Regulation von B-Zellgenen in den cHL-Zelllinien unterschiedlich zu sein und vom jeweiligen Kontext der genetischen Läsionen und aktiven Transkriptionsfaktoren in den verschiedenen Zellen abhängig zu sein. Einzig die negative Regulation der *EBF1*-Expression durch CEBPB konnte in zwei der drei untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

3.4 Arbeiten zur umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen in HRS-Zellen des cHLs

Bisher konnten einige genetische Läsionen, die an der Pathogenese des cHLs beteiligt sind, in den HRS-Zellen identifiziert werden (siehe Einleitung). Allerdings wird die Analyse der HRS-Zellen durch ihrer Seltenheit im Tumorgewebe des cHLs erschwert. So ist es für die Untersuchungen der HRS-Zellen notwendig diese entweder im Gewebe zu markieren, um die Analyse auf die Tumorzellen zu beschränken, oder die HRS-Zellen z.B. durch Lasermikrodissektion anzureichern, um reine Populationen der Tumorzellen zu erhalten. Daher waren die Analysen zu genetischen Läsionen bisher auf wenige Gene beschränkt. In den letzten Jahren ermöglichte die Massiv-Parallel-Sequenzierung die umfassende Untersuchung der genetischen Läsionen vieler verschiedener Lymphomerkrankungen. Allerdings stellt auch hier die Seltenheit der HRS-Zellen im Tumorgewebe des cHLs die größte Einschränkung und Herausforderung zur Anwendung der Massiv-Parallel-Sequenzierung zur Analyse der HRS-Zellen dar. Um genug Ausgangsmaterial für Exom-Sequenzierungen von mikrodissektierten HRS-Zellen zu erhalten, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine WGA für mikrodissektierte Zellen etabliert. Dies ermöglichte die Exom-Sequenzierung der HRS- und NT-Zellen primärer Fälle des cHLs. Dabei war die Sequenzierung der NT-Zellen nötig, um Keimbahnmutationen von somatischen Mutationen in den HRS-Zellen unterscheiden zu können. Anschließend sollten erste Analysen zur umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen in HRS-Zellen des cHLs durchgeführt werden.

3.4.1 Mikrodissektion und WGAs von HRS- und NT-Zellen primärer cHL-Fälle

Für die Mikrodissektion der HRS- und NT-Zellen wurden Hämalaun und Eosin-gefärbte Gewebeschnitte von Lymphknotenbiopsaten von cHL-Patienten verwendet, da Vorversuche andeuteten, dass eine vorherige immunhistochemische Färbung die DNA-Qualität für die anschließende WGA reduziert. Die Identifizierung der HRS-Zellen erfolgte durch ihre charakteristische Morphologie, wie z.B. ihrer enormen Größe und Mehrkernigkeit. Die NT-Zellen hingegen wurden dementsprechend als nicht HRS-Zellen identifiziert und gesammelt. Zu Beginn der Studie wurden pro Fall 2000 Zellen je Zelltyp gesammelt. Später wurde die Anzahl der Zellen auf 3000 Zellen pro Zelltyp pro Fall erhöht, da dadurch die Effizienz der WGA gesteigert werden konnte. Zusätzlich wurden für jeden Fall Membranstücke der Objektträger, auf die die Gewebestücke bespannt wurden, in separaten Reaktionsgefäßen gesammelt. Diese dienten in nachfolgenden Analysen als Negativkontrollen. Insgesamt wurden Zellen von 14 cHL-Fällen erfolgreich mikrodissektiert, wobei vier der Fälle von M.Sc. Anna Lollies mikrodissektiert wurden. Dabei handelte es sich bei drei der 14 cHL-Fälle um MCHL und 11 der 14 cHL-Fälle waren NSHL. Bei zwei der MCHL-Fälle waren die HRS-Zellen mit EBV infiziert und bei einem der NSHL-Fälle handelte

es sich um ein Rezidiv. Tabelle 15 zeigt eine Übersicht der verwendeten Fälle mit weiteren klinischen Daten, wie Alter und Geschlecht, der Patienten und der Anzahl der mikrodisssektierten Zellen pro Zelltyp pro Fall.

Mit Hilfe der Mikrodisssektion wäre es allerdings nicht möglich gewesen genügend Zellen zur Isolation ausreichender DNA-Mengen für die Exom-Sequenzierung zu sammeln. Daher sollte die DNA der mikrodisssektierten Zellen mit Hilfe einer WGA vermehrt werden. Für die WGA wurde das *Repli-g Single Cell Kit* verwendet. Zunächst wurde in Vorversuchen mit sortierten Zellen der cHL-Zelllinien L-428 ein modifiziertes Protokoll zur Amplifizierung der DNA aus mikrodisssektierten Zellen etabliert. Zur Erfolgskontrolle der WGA erfolgte als erstes die Messung der Menge des WGA-Produktes durch Verwendung des *Qubit® Fluorometers*. Dann wurde in Anlehnung an Hou *et al.* eine Multiplex-PCR für acht Produkte verschiedener Genloci mit 50 ng WGA-Produkt durchgeführt (Hou *et al.*, 2012). Diese acht Produkte wiesen eine unterschiedliche Länge auf, wodurch eine Analyse mittels Gelelektrophorese den Erfolg der Amplifizierung der Produkte in der PCR aufzeigen konnte. Generell galt eine WGA als erfolgreich wenn ausreichende Mengen an WGA-Produkt generiert wurden, in der Regel 40 µg, und mindestens 6 der 8 Produkte der Multiplex-PCR detektiert werden konnten, da dies auf eine erfolgreiche und gleichmäßige Amplifizierung des Genoms in der WGA hinwies. So konnte mit nur 50 sortierten Zellen der cHL-Zelllinie L-428 eine erfolgreiche WGA mit dem modifiziertem Protokoll zur Amplifizierung der DNA aus mikrodisssektierten Zellen durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Ein wichtiger Schritt des WGA-Protokolls war, dass nach der DNA-Isolierung der entsprechenden Anzahl an Zellen die isolierte DNA für die eigentliche WGA-Reaktion auf drei Ansätze verteilt wurde. Somit reduzierte sich die eingesetzte DNA-Menge in der eigentlichen WGA-Reaktion auf ein Zelläquivalent von einem Drittel der sortierten oder mikrodisssektierten Zellen. Dieser Schritt war aus Volumen-technischen Gründen nötig. Zusätzlich hatte es aber den Vorteil, dass so technische Replikate der WGA generiert wurden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass durch Mischung verschiedener WGA-Ansätze der gleichen Zellen eine gleichmäßige Abdeckung des Genoms der Zelle erreicht wird, da die Bindung der zufällige Hexamer-Oligonukleotide an die DNA der Zellen zufällig verteilt ist und somit in verschiedenen WGA-Ansätzen der gleichen Zellen andere Genombereiche verstärkt oder vermindert amplifiziert werden können (Rook *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde überlegt, dass durch die unabhängige Analyse der technischen Replikate der WGA falsche Mutationen, die z.B. durch Polymerasefehler eingefügt wurden, erkannt werden können, da diese Mutationen aufgrund der Zufälligkeit der Polymerasefehler nur in einem der Replikate auftreten sollten. Des Weiteren konnten so unterschiedliche Inkubationszeiten von 5 Stunden und 8 Stunden für die WGA durchgeführt werden, da die Dauer der Inkubation die Spezifität aber auch die Quantität der Amplifikation beeinflussen können. Für die WGA der HRS- und NT-Zellen wurden wie beschrieben 2000 bis 3000 Zellen je Zelltyp mikrodisssektiert. Diese drastische Erhöhung der Anzahl der Zellen

diente der Kompensation der vermutlich schlechteren DNA-Qualität der mikrodisssektierten Zellen. So hatte ein Vorversuch mit mikrodisssektierten Zellen von Gewebeschnitten reaktiver Lymphknoten gezeigt, dass von verschiedenen getesteten Zellmengen für die WGA nur die höchste mit 2000 mikrodisssektierten Zellen eine erfolgreiche WGA ermöglichte (Daten nicht gezeigt). Später erfolgte eine weitere Erhöhung der Zellmenge, um die Effizienz der WGA zu erhöhen. Mit den Zellen aller 14 Fälle wurden WGAs durchgeführt. Anschließend erfolgte die Erfolgskontrolle. In Abbildung 38 ist exemplarisch das Ergebnis der erfolgreichen Multiplex-PCR des ersten Falles gezeigt. Alle acht Produkte wurden mit den WGA-Produkten aller technischen Replikate der HRS-Zellen und zwei der drei technischen Replikate der NT-Zellen nachgewiesen. Die Membrankontrollen hingegen waren negativ. In einer Wiederholung der Multiplex-PCR mit dem zuvor negativen technischen Replikat der NT-Zellen konnten auch alle acht Produkte detektiert werden, was darauf hindeutet, dass in der ersten PCR ein technischer Fehler aufgetreten war, wie z.B. dass kein WGA-Produkt in den Ansatz gegeben wurde (Daten nicht gezeigt). Insgesamt waren die WGAs sowohl der HRS- als auch der NT-Zellen von 11 der 14 Fälle erfolgreich (Tabelle 15). Allerdings konnten bei vier der 11 Fälle nur sechs der acht Produkte in der Multiplex-PCR mit den WGA-Produkten der HRS-Zellen nachgewiesen werden, was auf eine etwas schlechtere Effizienz bzw. Qualität der WGA hindeutete. Diese Fälle waren Fall 2, 5, 8 und 10. Bei

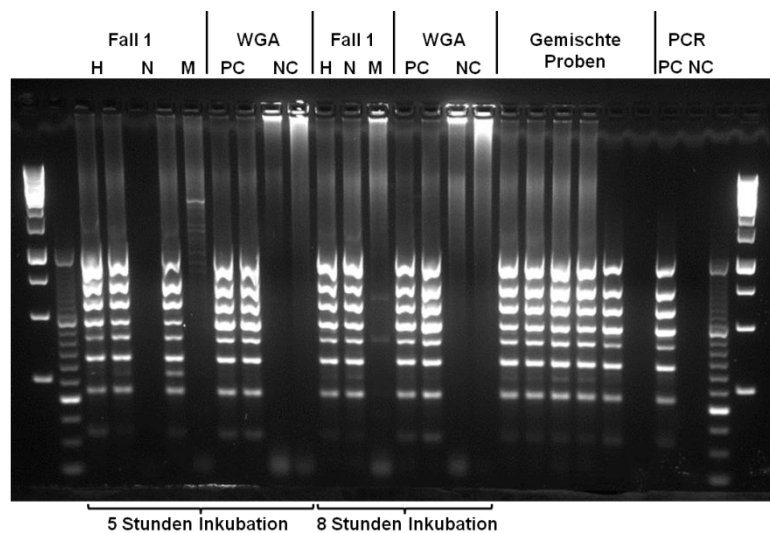


Abbildung 38: Ergebnis der Multiplex-PCR zur Überprüfung der WGA des 1. Falles

2000 HRS- und NT-Zellen des 1. Falles wurden mikrodisssektiert und die WGA durchgeführt. Bei der WGA wurden die HRS- und NT-Zellen in je drei Aliquots für die WGA aufgeteilt und zwei der drei Aliquots für 5 h bei 37°C und ein Aliquot für 8 h inkubiert. Anschließend wurde eine Multiplex-PCR für acht unterschiedliche Produkte verschiedener Genloci mit 50 ng WGA-Produkt durchgeführt und mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Aufgrund der unterschiedlichen Längen der Produkte entsteht ein typisches Bandenmuster. Neben den HRS- und NT-Zellen wurde eine Membrankontrolle mikrodisssektiert und diese zusammen mit weiteren Positiv- und Negativkontrollen parallel prozessiert. Insgesamt konnte sowohl von den HRS-Zellen als auch von den NT-Zellen die DNA erfolgreich vermehrt werden, was durch die erfolgreiche Amplifikation aller Produkte in der Multiplex-PCR mit den WGA-Produkten gezeigt wurde.

H: HRS-Zellen, N: NT-Zellen, M: Membrankontrolle, PC: Positivkontrolle, NC: Negativkontrolle

drei der mikrodisezierten Fälle hingegen konnten nur weniger als sechs Produkte in der Multiplex-PCR mit den WGA-Produkten der HRS-Zellen detektiert werden (Tabelle 15). Insgesamt zeigte sich, dass durch eine Erhöhung der Anzahl der mikrodisezierten Zellen die Effizienz der WGA verbessert wurde. So waren die WGAs mit anfänglich 2000 Zellen in sechs von neun Fällen erfolgreich, wohingegen die WGAs mit 2500 bzw. 3000 Zellen in fünf von fünf Fällen positiv waren. Dies ist nach einem exaktem Test nach Fisher zwar nicht statistisch signifikant, allerdings deutet es eine Steigerung der WGA-Effizienz durch die Erhöhung der Anzahl an Zellen an. Die erfolgreichen WGAs generierten alle ca. 40 µg WGA-Produkt, so dass genug Material für eine Exom-Sequenzierung zur Verfügung stand.

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten cHL-Fälle und Erfolg der WGAs

Fall	Subtyp	Alter	Geschlecht	EBV	Anzahl mikrodisezierte Zellen	Multiplex-PCR nach WGA erfolgreich
1	NSHL	29	F	-	2000	ja
2	NSHL	52	F	-	2000	ja
3	NSHL	26	F	-	2000	ja
4	NSHL	33	M	-	2000	ja
5	NSHL	59	M	-	2000	ja
6	NSHL	13	M	-	2000	ja
7	NSHL	32	F	-	3000	ja
8	NSHL	29	M	-	3000	ja
9	MCHL	45	M	+	3000	ja
10	NSHL	19	M	-	3000	ja
	Rezidiv					
11	MCHL	56	M	-	2500	ja
12	NSHL	18	M	-	2000	nein
13	NSHL	11	F	-	2000	nein
14	MCHL	33	M	+	2000	nein

3.4.2 Exom-Sequenzierung der WGA-Produkte von HRS- und NT-Zellen primärer Fälle des cHLs

Die Produkte der erfolgreichen WGAs wurden im Folgenden für die Exom-Sequenzierung verwendet. Es wurden sowohl die HRS- als auch die NT-Zellen eines Falles sequenziert, um somatische Mutationen in den HRS-Zellen identifizieren zu können. Generell wurden bei den Sequenzierungen der Fälle verschiedene Strategien zum Umgang mit den technischen Replikaten der WGAs der HRS- und NT-Zellen gewählt. Für die Sequenzierung des ersten Falles wurden die technischen Replikate gemischt und je eine Probe für die HRS- und NT-Zellen sequenziert, da hier die Sequenzierung aus WGA-Material zunächst getestet werden sollte. Bei den Fällen 2 und 3 wurden die drei technischen Replikate der HRS- und NT-Zellen jeweils mit separaten „Barcodes“ in der „Library“-Präparation versehen, um diese später getrennt voneinander analysieren zu können. So sollte die Konformität der technischen Replikate der WGAs eines Zelltyps überprüft werden und das Ausmaß an möglichen Artefakten, wie z.B. falsche Mutationen durch Polymerasefehler, in den

verschiedenen WGAs bestimmt werden. Bei den restlichen Fällen wurden jeweils die zwei technischen Replikate der WGAs der HRS- bzw. NT-Zellen eines Falles, die fünf Stunden in der WGA inkubiert worden waren, gemischt und separat von dem technischen Replikat der HRS- oder NT-Zellen, welches acht Stunden in der WGA inkubiert worden war, mit „*Barcodes*“ versehen. Dies stellte einen Kompromiss aus Informationsgewinn durch Analyse separater technischer Replikate der WGAs eines Zelltyps pro Fall und den gesteigerten Kosten zur Anfertigung der verschiedenen „*Library*“-Präparationen dar. Die Sequenzierung des ersten Falles erfolgte im BioChip Labor von PD Dr. Klein-Hitpass am Universitätsklinikum Essen, wohingegen die übrigen Fälle zur Hochdurchsatz-Sequenzierungs-Serviceeinheit der Zentralen Einheit für Genom und Proteom des DKFZ in Heidelberg geschickt wurden. Die Aufarbeitungen der Daten, d.h. das „*Alignment*“ der Sequenzen zum humanen Referenzgenom GRCH37, die Entfernung von Duplikaten und weitere Schritte, wurden von Johanna Christina Czeschik aus der Arbeitsgruppe von Prof. Sven Rahmann durchgeführt. Hierbei erfolgten zum einen unabhängige Auswertungen der mit separaten Barcodes versehenen WGA-Proben (im Folgendem WGA-Einheiten genannt) der HRS- und NT-Zellen eines Falls als auch Auswertungen, in dem die Sequenzen der verschiedenen WGA-Einheiten der HRS- bzw. NT-Zellen eines Falles gemischt und als eine Probe zusammen analysiert wurden.

Die allgemeinen Statistiken der Sequenzierungen und die anschließenden Auswertungen der zusammengefassten WGA-Einheiten der HRS- bzw. NT-Zellen pro Fall sind in Tabelle 16 dargestellt. Im Allgemeinen konnten gute Sequenzierergebnisse von den WGA-Produkten der HRS- und NT-Zellen aller Fälle erzielt werden. Die unterschiedlichen Verhältnisse der Anzahl an Proben pro Spur des Sequenzierers, die im Laufe dieser Arbeit getestet wurden, bedingten eine unterschiedliche Anzahl an Sequenzen und Basen der verschiedenen Proben. Der hohe Prozentsatz an richtig kartierten Sequenzen und die niedrige Duplikatrate aller Proben deutet auf eine gute Qualität der Sequenzierung hin. Des Weiteren konnte in fast allen Proben eine gute Abdeckung der angereicherten Genomregionen, was auch „*Coverage*“ genannt wird, erreicht werden. So wurden im Durchschnitt 77% der angereicherten Genomregionen von mindestens 20 unterschiedlichen Sequenzen abgedeckt. Bei mindestens 10 unterschiedlichen Sequenzen pro angereicherte Genomregion stieg der durchschnittliche Wert auf ca. 87% der angereicherten Region. Einzig der zweite Fall und die HRS-Zell-Proben der Fälle 5 und 8 wiesen etwas schlechtere „*Coverages*“ auf, was vermutlich mit einer schlechteren Qualität der WGA-Produkte der Proben zusammenhängt. So hatten diese Proben in den Multiplex-PCRs bereits schlechtere Ergebnisse erzielt. Dennoch waren hier über 50% der angereicherten Regionen mit mindestens 20 Sequenzen abgedeckt, wodurch die spätere Analyse immer noch einen Großteil des Exoms umfasste.

Die Auswertung der separaten WGA-Einheiten zeigte im Prinzip das gleiche Ergebnis wie die Auswertung der separaten WGA-Einheiten, nur dass pro WGA-Einheit dementsprechend weniger Sequenzen vorhanden waren. Dies resultierte in einer schlechteren Abdeckung der angereicherten Genomregionen der einzelnen WGA-Einheiten (Daten nicht gezeigt). Dennoch wurden selbst in den separaten WGA-Einheiten im Durchschnitt 82% der angereicherten Genomregionen mit mindestens fünf Sequenzen abgedeckt. Dies zeigte, dass in den technischen Replikaten der WGAs der mikrodisektierten HRS- und NT-Zellen das Genom ziemlich gleichmäßig und vollständig amplifiziert worden war.

Zusammenfassend konnten die Exome der HRS- und NT-Zellen aller cHL-Fälle ausgehend von mikrodisektierten Zellen erfolgreich sequenziert werden. Dabei zeigten die Sequenzierstatistiken die gute Qualität und „Coverage“ der Sequenzierung an. Dies ermöglichte weitere Analysen, wie z.B. die Suche nach somatischen Mutationen in den HRS-Zellen.

Tabelle 16: Sequenzierstatistiken der zusammenanalysierten WGA-Einheiten der HRS- und NT-Zellen von jedem untersuchten cHL-Fall

Fall	Probe	Anzahl Sequenzen [Mega]	Anzahl Kartierte Basen [Giga]	Kartierte Sequenzen [%]	Duplikat-rate [%]	Anteil angereicherte Genomregion [%]			
						Cov. ≥ 1	Cov. ≥ 5	Cov. ≥ 10	Cov. ≥ 20
1	HRS	178,6	17,9	99,4	16,2	94,0	90,5	87,6	81,9
	NTZ	185,3	18,5	98,1	16,4	93,8	89,7	85,4	76,7
2	HRS	89,5	8,9	99,7	3,3	89,5	73,0	60,6	45,8
	NTZ	93,1	9,2	93,0	6,1	95,2	83,8	71,6	53,1
3	HRS	101,7	10,2	99,8	2,9	99,5	97,5	93,9	83,2
	NTZ	90,7	9,1	99,8	2,6	99,3	96,7	91,8	78,8
4	HRS	112,8	11,3	99,8	4,1	99,1	96,1	91,5	80,5
	NTZ	97,3	9,8	99,8	3,0	99,3	96,7	92,3	81,2
5	HRS	114,7	11,5	99,8	4,4	98,0	91,4	83,2	68,8
	NTZ	94,9	9,5	99,8	3,9	99,3	96,5	91,9	80,1
6	HRS	127,7	12,8	99,8	4,1	99,5	97,5	94,3	85,8
	NTZ	111,3	11,2	99,8	3,5	99,5	97,7	94,6	85,8
7	HRS	177,9	17,8	99,8	12,2	98,6	95,2	91,5	84,2
	NTZ	182,4	18,3	99,8	12,2	99,2	96,8	94,0	88,3
8	HRS	163,6	16,4	99,7	11,9	94,9	86,1	78,2	66,2
	NTZ	175,7	17,6	99,8	11,8	97,9	93,3	88,6	79,8
9	HRS	155,3	15,5	99,7	12,0	99,0	96,0	92,2	83,8
	NTZ	164,0	16,4	99,8	12,4	99,4	97,3	94,4	87,7
10	HRS	161,0	16,1	99,2	16,3	94,8	85,4	76,9	63,8
	NTZ	182,7	18,3	99,7	12,5	97,2	91,5	85,8	75,6
11	HRS	195,4	19,5	97,8	14,4	97,8	93,0	88,1	78,9
	NTZ	183,6	18,3	99,7	13,0	98,7	95,2	91,2	83,3

3.4.3 Analyse der genetischen Läsionen der HRS-Zellen der einzelnen cHL-Fälle

Die allgemeinen Sequenzierstatistiken zeigten eine gute Qualität der Sequenzierung aus den WGA-Produkten der mikrodisssektierten Zellen und bei fast allen Proben wurde eine gute Abdeckung des Exoms erreicht. Daher sollten im nächsten Schritt die spezifischen Varianten bzw. somatischen Mutationen in den HRS-Zellen bestimmt werden. Dafür wurde zunächst die Identifizierung der Varianten in den einzelnen Proben von Johanna Christina Czeschik mittels des *UnifiedGenotyper* durchgeführt. Die so generierten Listen mit den Varianten konnten mit Hilfe des Exomate-Programms gefiltert und ausgewertet werden. Die Hauptanalyse verwendete dabei die zusammen analysierten Daten der WGA-Einheiten der HRS- bzw. NT-Zellen von jedem Fall, da die höhere „Coverage“ des Exoms eine bessere Identifizierung richtiger Varianten ermöglichte. Zusätzlich wurden aber auch die separaten WGA-Einheiten analysiert. Um die somatischen Mutationen in den HRS-Zellen eines Falles zu identifizieren, wurden die gefundenen Varianten in den NT-Zellen des gleichen Falles von den in den HRS-Zellen gefundenen Varianten abgezogen, da diese die Keimbahnmutationen darstellen. Bei der separaten Analyse der WGA-Einheiten der HRS-Zellen eines Falles wurden dementsprechend alle gefundenen Varianten in den einzelnen WGA-Einheiten der NT-Zellen des gleichen Falles abgezogen. Für die Auswertung wurden nur Varianten berücksichtigt, die direkten Einfluss auf die Proteinfunktion haben könnten, wie Insertionen, Deletionen, „Missense“-Mutationen, Spleißstellenmutationen, vorzeitige Stopcodons, Verluste von Stopcodons und Verluste des Startcodons. Nicht berücksichtigt wurden z.B. synonyme Mutationen oder Mutationen in Introns, die nicht die Spleißstellen betrafen. Genauso wurden Mutationen, die im 5' und 3' untranslatierten Bereich der mRNA lagen, herausgefiltert, da deren Konsequenzen auf die Funktion des Gens bzw. Proteins nicht eindeutig sind. Zusätzlich wurden alle Varianten mit einem Qualitätswert von kleiner 50 herausgefiltert. Der Qualitätswert wird vom verwendeten Programm zur Identifizierung der Varianten berechnet und verwendet dafür z.B. die „Coverage“ an der Stelle der Variante, die Allelfrequenz der Variante (VAF) und weitere Parameter. Der Qualitätswert beschreibt die Wahrscheinlichkeit des Nicht-Vorhandenseins der Variante und ist Phred-skaliert. Das bedeutet je höher der Wert desto wahrscheinlicher ist die Variante wirklich vorhanden. Eine direkte Ausgabe und Filtrierung anhand der „Coverage“ an der Stelle einer Variante oder der VAF war allerdings mit Exomate nicht möglich, sondern erfolgte indirekt über den Qualitätswert. Daher konnte auch keine umfassenden Analysen bzgl. der Subklonalität der Varianten innerhalb des Falles durchgeführt werden, da hierfür die VAF entscheidende Informationen liefert. Für einzelne Varianten wurden die „Coverage“ an der Stelle der Variante und die VAF manuell mit Hilfe des IGV ermittelt.

Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 17 dargestellt. So konnten in den HRS-Zellen der verschiedenen cHL-Fälle eine hohe Anzahl an Varianten detektiert werden. Im Median

wurden 1222 Varianten pro Fall gefunden, wobei die Anzahl zwischen den Fällen enorm schwankte. So konnten in Fall 3 mit 507 Varianten die wenigsten Varianten identifiziert werden und der Fall 10 wies mit 4019 Varianten die meisten Varianten auf. Durch Berechnung der Anzahl der Varianten pro abgedeckte Base der angereicherten Genomregionen konnte die evtl. mangelnde Abdeckung eines Teils des Exoms als Grund für die geringere Anzahl an Varianten mancher Fälle ausgeschlossen werden. Somit deutet diese Analyse auf eine enorme Heterogenität in der Mutationslast der HRS-Zellen in den verschiedenen cHL-Fällen hin.

Die Auswertung der separaten WGA-Einheiten erlaubte es auf Varianten zu filtern, die in mindestens zwei der WGA-Einheiten auftraten. Hierbei musste aufgrund des Mangels separater „Barcodes“ der erste Fall von der Analyse ausgeschlossen werden. Diese Filterung resultierte in einer drastischen Senkung der Anzahl der Varianten pro Fall (Tabelle 17). Dies deutete eine starke Heterogenität der verschiedenen WGA-Einheiten der HRS-Zellen eines Falles an. Allerdings ist zu bedenken, dass für alle Fälle bis auf Fall 2 und 3 nur zwei verschiedene Barcodes für die WGA-Einheiten der meisten Fälle verwendet worden waren, so dass das gewählte Kriterium dieser Analyse bedeutete, dass nur gemeinsame Varianten der WGA-Einheiten angezeigt wurden. Hierbei wird das Ergebnis sicherlich auch von der geringeren „Coverage“ der separaten WGA-Einheiten beeinflusst, da so einige Varianten in den verschiedenen WGAs nicht ausreichend abgedeckt waren, um als Variante erkannt zu werden. Somit sind weitere Analysen notwendig, um die genaue Bedeutung dieser Auswertung aufzuklären.

Tabelle 17: Anzahl der genetischen Läsionen der HRS-Zellen der einzelnen cHL-Fälle

Fall	WGA-Einheiten zusammen analysiert	Anzahl an Varianten	
		Pro Megabase	In mind. 2 WGA-Einheiten
1	1222	20	
2	3682	55	242
3	507	7	248
4	907	12	171
5	3134	43	56
6	520	7	137
7	890	12	92
8	3790	54	126
9	693	9	70
10	4019	57	73
11	2415	33	108

Generell bestand durch die Verwendung der WGA mit wenigen Zellen als Startmaterial und auch durch die Exom-Sequenzierung die Gefahr, dass Artefakte, d.h. falsche Varianten, in der Auswertung der Daten auftreten. Daher sollten in einem nächsten Schritt ausgewählte Varianten der HRS-Zellen von drei der 11 untersuchten cHL-Fälle repräsentativ durch die direkte Analyse von mikrodisssektierten HRS- und NT-Zellen validiert werden. Dafür wurden

Produkte, die die Position der Varianten abdeckten, mittels einer semi-nested Multiplex-PCR aus den mikrodisezierten Zellen amplifiziert, anschließend mit der Methode nach Sanger sequenziert und analysiert. Die Auswahl der zu überprüfenden Varianten erfolgte anhand mehrerer Kriterien. So wurde zum einen darauf geachtet, dass die Varianten unterschiedliche Qualitätswerte aufwiesen und dass sowohl Varianten mit niedrigen, mittleren als auch sehr hohen Qualitätswerten vertreten waren. Das zweite Kriterium war, dass unterschiedliche Mutationstypen validiert werden sollten, wie z.B. Deletionen, Insertionen oder „*Missense*“-Mutationen. Zusätzliche wurden Varianten ausgewählt, die Gene betrafen von denen bereits genetische Läsionen in den HRS-Zellen des cHLs beschrieben worden waren oder von denen zumindest die Funktionen bekannt waren. Als letztes Auswahlkriterium wurde ausgeschlossen, dass sich die Varianten an oder in der Nähe von schwierig zu sequenzierenden Stellen des Genoms befanden, wie z.B. sehr GC-reiche Regionen oder langen Wiederholungen von Adenin. Insgesamt wurden so fünf verschiedene Varianten des Falles 1, sieben Varianten des Falles 2 und acht Varianten des Falles 3 ausgewählt (Tabelle 18). Die Mikrodisektion der HRS- und NT-Zellen für die Multiplex-PCRs erfolgte mit CD30- bzw. CD3-gefärbten Gewebeschnitten der Lymphknotenbiopsate der entsprechenden Fälle, um eine bessere Identifizierung der Zellen zu gewährleisten. Zusätzlich wurden Membrankontrollen gesammelt. Ein Teil der Mikrodisektion wurde dabei von Mitarbeitern des Senckenbergischen Instituts für Pathologie in Frankfurt am Main durchgeführt.

Ein Problem dieser Analysen war, dass es trotz der Mikrodisektion neuer Zellen und auch mehrerer Wiederholungen der PCRs im Endeffekt nicht möglich war die verschiedenen Multiplex-PCRs zur Validierung der Varianten ohne positive Negativkontrollen durchzuführen (Tabelle 18). Die anschließende Sequenzierung dieser Produkte zeigte allerdings, dass die wenigen positiven Negativkontrollen nur unmutierte Sequenzen enthielten. Somit konnte eine Herkunft der mutierten Sequenzen in den HRS-Zellen von den Kontaminationen ausgeschlossen werden. Evtl. Verfälschungen der Ergebnisse der HRS-Zellen durch Kontaminationen von unmutierten Sequenzen konnten allerdings nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem konnte insgesamt ein großer Teil der ausgewählten Varianten validiert werden (Tabelle 18). Für die Fälle 1 und 3 wurden fünf von sechs bzw. acht von acht der ausgewählten Varianten in den mikrodisezierten HRS-Zellen bestätigt. Dabei konnten Varianten unabhängig von der Art der Mutation und auch Varianten mit niedrigerem Qualitätswert bestätigt werden. Einzig die Deletion im MSN-Gen des ersten Falles konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl sie einen relativ hohen Qualitätswert aufwies und keine Besonderheiten in der die Variante umgebenden Sequenz entdeckt werden konnten, die einen Fehler hätten erklären können. Für den Fall 2 hingegen konnten nur drei der sieben ausgewählten Varianten in den mikrodisezierten HRS-Zellen bestätigt werden. Hierbei ist zu bedenken, dass für den Fall 2 eine schlechtere Qualität der WGAs durch fehlende

Produkte in der Multiplex-PCR zur Erfolgskontrolle der WGA angedeutet wurde. Diese schlechtere Qualität der WGAs bedingte möglicherweise die falsch positiven Varianten in der Auswertung der Exom-Sequenzierung. Interessanterweise zeigte die Analyse der separaten WGA-Einheiten, dass alle nicht bestätigten Varianten des zweiten Falles nur in einer der drei WGA-Einheiten gefunden wurde, was evtl. eine stringenter Filterung der Daten implizieren würde. Mit der Variante in *NFKBID* wurde allerdings auch eine Variante, die nur in einer WGA-Einheit gefunden worden war, bestätigt. Leider wurde im Fall 3 keine Variante, die nur in einer WGA-Einheit auftauchte, überprüft. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Verlässlichkeit der Auswertungen weiter zu charakterisieren.

Zusammenfassend konnte eine hohe Anzahl somatischer Mutationen in den HRS-Zellen der verschiedenen Zellen nachgewiesen werden. Die gute Verlässlichkeit der Daten konnte durch die größtenteils erfolgreiche Validierung ausgewählter somatischer Mutationen in den HRS-Zellen von drei verschiedenen cHL-Fällen mittels direkter PCR und Sanger-Sequenzierung mit mikrodisezierten Zellen gezeigt werden.

3.4.4 Analyse rekurrent somatisch mutierter Gene in den HRS-Zellen der cHL-Fälle

Die bisherigen Analysen deuteten die gute Qualität der Daten der Exom-Sequenzierungen an. Daher wurde in einem nächsten Schritt in den HRS-Zellen nach somatischen Mutationen in Genen, die bereits in der Literatur als rekurrent mutiert in den HRS-Zellen beschrieben wurden, gesucht. Dies diente als eine weitere Kontrolle der Exom-Sequenzierung, da erwartet wurde, dass bei einer korrekten Exom-Sequenzierung der mikrodisezierten HRS- und NT-Zellen des cHLs ein Teil der bekannten Mutationen nachgewiesen werden sollte. Für die Auswertung wurden die zuvor generierten Listen der somatischen Mutationen in den HRS-Zellen, die aus den zusammen analysierten WGA-Einheiten erstellt wurden, verwendet. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 19 angegeben. So konnten in den verschiedenen Fällen unterschiedliche Mutationen in manchen der untersuchten Gene nachgewiesen werden. Zwar stimmte die von der Literatur zu erwartende Mutationsfrequenz der Gene nicht mit der beobachteten Mutationsfrequenz der Daten der Exom-Sequenzierung überein, allerdings war die Anzahl der untersuchten Fälle bisher sehr gering, wodurch leicht Abweichungen entstehen können. Zusätzlich zeigte diese detaillierte Analyse einzelner Gene, dass die Suche nach somatischen Mutationen mit den Daten der Exom-Sequenzierung zum Teil auch durch fehlende oder lückenhafte Abdeckung bestimmter Gene behindert wurde. So war z.B. *SOCS1* in 6/11 bzw. 1/11 gar nicht oder nur teilweise abgedeckt. Dabei kann ein solches Ergebnis im Falle eines Tumorsuppressorgens auf eine größere Deletion hinweisen. Dies kann allerdings nur schwierig von einem technischen Fehler, wie z.B. der Nicht-Amplifizierung innerhalb der WGA oder der fehlerhaften

Tabelle 18: Ergebnisse der Validierungen ausgewählter in der Exom-Sequenzierung identifizierter somatischer Mutationen in den HRS-Zellen der cHL-Fälle 1, 2 und 3

Fall	Produkt	Referenzsequenz	Ergebnis der Exom Sequenzierung					Ergebnis der Validierung mittels Multiplex-PCR von 10-Zellproben und Sanger-Sequenzierung		
			Variante	Konsequenz	VAF	Qualitätswert	Anzahl WGA-Einheiten mit Variante / Anzahl separater WGA-Einheiten	Mutierte HRS-Zellproben / analysierte Proben	Mutierte NT-Zellproben / analysierte Proben	Negativkontrollen mutiert / positiv in PCR / angesetzt
1	CTSB	NM_001908.3	c.76C>G	„Missense“	0,91	1460	1/1	2/5 homozygot 3/5 heterozygot	0/2	0/0/5
	IL17RB	NM_018725.3	c.1450C>T	Vorzeitiges Stopcodon	0,43	850	1/1	4/4 heterozygot	0/2	0/2/5
	RFX7	NM_022841.5	c.4354delG	Deletion, Leserasterverschiebung	0,42	1105	1/1	5/5 heterozygot	0/2	0/1/5
	SCAPER	NM_020843.2	c.1096C>T	Vorzeitiges Stopcodon	0,33	282,8	1/1	1/3 heterozygot	0/2	0/1/5
	MSN	NM_002444.2	c.[1688delG;1689G>A]	Deletion, Leserasterverschiebung	0,2	2499	1/1	0/5	0/2	0/2/5
2	DOK5	NM_018431.4	c.495T>A	Vorzeitiges Stopcodon	0,74	2209	3/3	4/5 heterozygot	0/3	0/0/6
	DROSHA	NM_013235.4	c.4013C>T	„Missense“	0,7	9689	1/3	0/5	0/4	0/0/6
	IL17RB	NM_018725.3	c.1207_1208insTC	Insertion, Leserasterverschiebung	0,58	9456	1/3	0/4		0/0/6
	IRAK2	NM_001570.3	c.670G>C	„Missense“	0,93	3051	2/2	3/5 heterozygot	0/5	0/1/6
	MAP4K3	NM_003618.3	c.416G>C	„Missense“	0,19	359	1/3	0/5	0/5	0/1/6
	MAP4K4	NM_145686.3	c.1252dupG	Insertion, Leserasterverschiebung	0,42	816	1/3	0/5	0/5	0/1/6
	NFKBID	NM_139239.1	c.643G>A	„Missense“	0,18	95	1/3	2/5 heterozygot	0/5	0/0/6
3	B2M	NM_004048.2	c.26_46delinsGA	Deletion, Leserasterverschiebung	0,33	1544	2/3	5/5 heterozygot	0/5	0/0/6
	IL6	NM_00600.3	c.400G>C	„Missense“	0,19	95	2/3	1/5 heterozygot	0/5	0/1/6
	ITPKB	NM_002221.3	c.671delG	Deletion, Leserasterverschiebung	0,64	669	3/3	3/5 heterozygot 1/5 homozygot	0/4	0/1/6
	PTGER4	NM_000958.2	c.818T>A	Vorzeitiges Stopcodon	0,82	449	2/3	1/1 heterozygot	0/2	0/0/6
	RANBP2	NM_006267.4	c.4487C>G	„Missense“	0,16	242	2/3	3/5 heterozygot	0/4	0/1/6
	SOCS1	NM_003745.1	c.306_312_delinsT	Deletion	0,33	575	2/3	2/5 heterozygot 1/5 homozygot	0/5	0/1/6
	TP53BP1	NM_001141980.1	c.5225C>T	„Missense“	0,62	2366	3/3	4/5 heterozygot	0/5	0/0/6
	TXNRD1	NM_001093771.2	c.363dupC	Insertion, Leserasterverschiebung	0,42	1353	3/3	5/5 heterozygot	0/4	0/0/6

Anreicherung der entsprechenden Genomregionen vor der Sequenzierung, unterschieden werden. Da *SOCS1* auch in den NT-Zellen keine oder nur eine lückenhafte Abdeckung aufwies, scheint hier eher ein technischer Fehler die Ursache für die schlechte Abdeckung in manchen Fällen zu sein.

Insgesamt zeigte diese Analyse, dass Gene, die in der Literatur als somatisch mutiert beschrieben wurden, auch in den Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Exom-Sequenzierung von HRS-Zellen primärer cHL-Fälle Mutationen aufwiesen. Dies ist ein weiteres Zeichen für die gute Qualität und die Richtigkeit der Daten der Exom-Sequenzierung aus mikrodissektieren HRS- und NT-Zellen primärer cHL-Fälle.

Tabelle 19: Mutationsanalyse der in HRS-Zellen bekannten rekurrent somatisch mutierten Gene mit Daten der Exom-Sequenzierung der HRS-Zellen primärer cHL-Fälle

Gen	Mutationsfrequenz in Literatur	Fall										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B2M	≈ 60%		■	■								
CYLD	<10%		■									
FAS	<6%								■	■		
NFKBIA	≈ 15%		■						■			■
NFKBIB								■				
NFKBID			■									■
NFKBIE	≈ 15%		■		■		■			■		
MYC	≈ 44%	■	■									■
PTPN1	≈ 20%										■	■
TNFAIP3	≈ 40%		■		■	■	■	■				
TRAF3	≈ 10%											
SOCS1	≈ 40%	■	■	■	■	■			■	■	■	■

■	Nur teilweise abgedeckt	■	Nicht abgedeckt	■	„Missense“-Mutation	■	Deletion
■	Vorzeitiges Stopcodon	■	Insertion	■	Spleißstellenmutation		

In einer weiterführenden Analyse sollte nach neuen rekurrent somatisch mutierten Genen in den HRS-Zellen des cHLs gesucht werden. Dafür wurden wieder die zuvor generierten Listen der Varianten in den HRS- und NT-Zellen der zusammen analysierten WGA-Einheiten eines jeden Falles verwendet. Es wurden die gleichen Filterkriterien für die Variantenanalyse wie in den vorherigen Analysen verwendet (siehe oben), außer dass bei dieser Filterung die gefundenen Varianten in den NT-Zellen aller Fälle von den Varianten, die in den HRS-Zellen jedes einzelnen Falles gefunden wurden, herausgefiltert wurden. Dieser Ansatz wurde gewählt, da angenommen wurde, dass wenn eine Variante pathogen ist, diese nicht in gesunden Zellen zu finden sein sollte. Des Weiteren wurde vermutet, dass mögliche Varianten, die sowohl in den HRS-Zellen eines Falles und in den NT-Zellen eines anderen Falles auftreten, höchstwahrscheinlich Artefakte der WGA oder der Exom-Sequenzierung

sein würden. Zusätzlich wurde ausgewählt, dass das gleiche Gen in einer Mindestanzahl von unterschiedlichen Fällen somatisch in den HRS-Zellen mutiert sein musste. Insgesamt konnte eine sehr hohe Anzahl an rekurrent mutierten Genen in den HRS-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 20). So wurden bei der niedrigsten Filterung von einer Mindestanzahl von zwei der 11 Fälle, in denen ein Gen mutiert sein musste, 3821 Gene identifiziert. Dabei entspricht diese Mindestanzahl einer Mutationsfrequenz der Fälle von ca. 20%. Viele in den HRS-Zellen rekurrent mutierten Gene, die bereits in der Literatur beschrieben wurden, weisen dabei eine vergleichbare Mutationsfrequenz der Fälle auf. Somit deuten die Daten eine möglicherweise enorme Anzahl an rekurrent mutierten Gene in den HRS-Zellen des cHLs an. Durch Erhöhung der Mindestanzahl der mutierten Fälle pro Gen konnte die Anzahl der Gene reduziert werden. Allerdings wurden selbst bei einer sehr stringenten Filterung von mindestens 6 der 11 Fälle mit Mutationen im gleichen Gen, was einer sehr hohen Mutationsfrequenz der Fälle von ca. 55% entspricht, noch immer 39 verschiedene Gene identifiziert. Bei der detaillierteren Betrachtung dieser Gene fiel allerdings auf, dass es sich bei vielen der identifizierten Gene, um sehr große Gene handelte. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Teil der identifizierten Gene falsch positiv sind, da die Gene aufgrund ihrer Größe eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzen von technischen Fehlern betroffen zu sein. Dies müsste in nachfolgenden Experimenten geklärt werden. Durch die hohe Anzahl an rekurrent mutierten Genen in den Analysen mit kleineren Mindestanzahlen an mutierten Fällen pro Gen und aufgrund des frühen Stadiums der Auswertung konnten bisher keine genaueren Analysen von einzelnen Gene durchgeführt werden.

Tabelle 20: Anzahl rekurrent somatisch mutierter Gene in den HRS-Zellen primärer cHL-Fälle

Gen in Mindestanzahl Fälle mutiert	Anzahl der Gene
2	3821
3	1231
4	406
5	120
6	39

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines lentiviralen Systems zur shRNA-vermittelten Herabregulation von Genen in cHL-Zelllinien

In den Projekten zur Rolle von MYC und CEBPB in der Pathogenese des cHLs sollten beide Faktoren in den cHL-Zelllinien herabreguliert werden, um die Konsequenz des Verlustes dieser Faktoren auf den Phänotyp der Zellen zu studieren. Dafür sollte ein lentivirales System zur Expression von shRNAs verwendet werden, obwohl die Herstellung der Lentiviren sehr aufwendig und langwierig im Vergleich zu anderen Methoden zur Herabregulation von Genen wie z.B. Transfektion von siRNAs ist. Generell gelten die cHL-Zelllinien aber als schlecht transfizierbar und in Lipofektionen mit GFP-Kontrollplasmiden und FAM-markierten siRNAs konnten nur ca. 1% erfolgreich transfizierte Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit Nukleofektionen wurden zwar einige cHL-Zelllinien in anderen Arbeitsgruppen erfolgreich transfiziert (Ushmorov *et al.*, 2006; Hirsch *et al.*, 2008), allerdings konnten in unserer Arbeitsgruppe keine Erfolge mit der Nukleofektion von cHL-Zelllinien erzielt werden (persönliches Gespräch Dr. Roland Schmitz). Aufgrund dieser Tatsachen wurde für die Herabregulation von MYC und CEBPB ein lentivirales Vektor-System zur Expression von shRNAs in den cHL-Zelllinien etabliert. Lentivirale Vektoren können auch ruhende Zellen infizieren, was bei den langsam-wachsenden cHL-Zelllinien von Vorteil ist. Zusätzlich führen lentivirale Vektoren durch Intergration ins Wirtsgenom zu persistierender Ausprägung der shRNAs und ermöglichen somit die Beobachtung des Phänotyps über einen längeren Zeitraum. Mit dem LeGO.G-Vektor konnte ein sehr potentes System zur lentiviral-vermittelten Ausprägung von shRNAs und damit Herabregulation von Zielgenen in den cHL-Zelllinien etabliert werden. Wie in anderen Arbeiten beschrieben konnten mit dem LeGO.G-Vektor hohe Virustiter und sehr gute Transduktionsraten erzielt werden (Weber *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte die erfolgreiche Herabregulation von Zielgenen in den cHL-Zelllinien mit Hilfe des LeGO.G-Vektors gezeigt werden. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wird der LeGO.G-Vektor mittlerweile in mehreren Projekten unserer Arbeitsgruppe zur Herabregulation von verschiedenen Zielgenen in diversen Zelllinien verwendet.

Die Ursachen für die Fehlschläge mit den pViG- und dem pGIPZ-Vektoren konnten nicht aufgeklärt werden. Das pViG-System sollte verwendet werden, da es zuvor in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich verwendet worden war, um GATA3 in den cHL-Zelllinien herabzuregulieren (Stanelle *et al.*, 2010). In den damaligen Virusproduktionen wurden Virustiter von bis zu 5×10^6 Viruspartikeln pro ml erzielt (Aufzeichnungen von Dr. Jens Stanelle). Damit waren diese Titer ca. 5-fach höher als die besten Titer in dieser Arbeit. Trotz verschiedener Anpassungen des Protokolls zur Virusproduktion und durch die Verwendung

von Plasmiden aus verschiedenen Plasmid-Präparationen, um so Defekte der Verpackungsplasmide oder hemmende Verunreinigungen in den Plasmid-Präparationen auszuschließen, konnten keine höheren Virustiter erzielt werden. Selbst bei der Verwendung der Plasmide zur Herstellung der Viren, die shRNAs gegen GATA3 ausprägen, wurden sehr niedrige Virustiter erzielt (Daten nicht gezeigt). Auch nach Rücksprache mit Dr. Jens Stanelle konnten die Virustiter nicht verbessert werden, da kein Fehler identifiziert werden konnte. Ein wenig relativiert werden die schlechten Virustiter durch den Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Virustitern für pViG. So wurde in der Arbeit von Schnell und Kollegen der pViG-Vektor zusammen mit dem Δ SP2- und einem VSV-G-codierenden Plasmid zur Virusproduktion verwendet und Virustiter von $1,6 \times 10^6$ Viren pro ml erzielt (Schnell *et al.*, 2000), was nur etwa doppelt so hoch ist wie die Titer in dieser Arbeit. Zusammenfassend waren die erreichten Virustiter der pViG-Viren aber zu gering um Experimente mit den cHL-Zelllinien durchführen zu können.

Beim pGIPZ-System wurden zwar ausreichend hohe Virustiter für Infektionen der cHL-Zelllinien erreicht, allerdings konnte in den nachfolgenden Experimenten keine Herabregulation von *MYC* oder *CEBPB* in den cHL-Zelllinien nachgewiesen werden. Da in den 293T-Zellen hingegen eine moderate Herabregulation von *MYC* durch die pGIPZ-Viren gezeigt werden konnte, wurde ein genereller Defekt der Viren ausgeschlossen. Eine Besonderheit des pGIPZ-Vektors ist, dass die shRNAs in einem mir-30-basierten shRNAmir-Design ausgeprägt werden und somit von der kompletten miRNA-Maschinerie prozessiert werden müssen. Daher könnte ein Defekt in der Prozessierung der miRNAs in den cHL-Zelllinien für die ausbleibende Herabregulation der Zielgene verantwortlich sein. Dies ist aber unwahrscheinlich, da für die in dieser Arbeit verwendeten cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und KM-H2 ein breites Spektrum an ausgeprägten miRNAs gezeigt werden konnte (Navarro *et al.*, 2008; Gibcus *et al.*, 2009). Die geringe Effizienz der Herabregulation der Zielgene mit Hilfe der pGIPZ-Vektoren könnte auch am verwendeten CMV-Promotor liegen. So wurde in einer Studie mit LeGO-Vektoren gezeigt, dass der SFFV-Promotor zu einer stärkeren Expression von GFP als der CMV-Promotor führt (Weber *et al.*, 2008). Genauso wurde für den H1-Promotor eine höhere Effizienz der Herabregulation bei gleicher shRNA aufgrund stärkerer Ausprägung der shRNA gezeigt (Maczuga *et al.*, 2012). Somit könnte die erfolglose Herabregulation in den cHL-Zelllinien mit dem pGIPZ-Vektor an einer schwächeren Ausprägung der shRNAs liegen. Dem widersprechend wurde eine starke Ausprägung von EBF1 unter Kontrolle des CMV-Promotors mit dem pGIPZ-Vektor in den cHL-Zelllinien erzielt (Bohle *et al.*, 2013).

4.2 Die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHLs

MYC ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Zelle und reguliert die Expression vieler verschiedener Gene, die in diversen zellulären Prozessen, wie z.B. Proliferation, Zellzyklus-

Kontrolle, Differenzierung, Metabolismus, Zelladhäsion und Apoptose, involviert sind (Patel *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2006; Seitz *et al.*, 2011). Als starkes Onkogen ist MYC abhängig vom jeweiligen Kontext auf unterschiedliche Art und Weise an der Pathogenese verschiedenster humaner Tumorerkrankungen beteiligt (Nesbit *et al.*, 1999; Dang, 2012). Auch in einigen Fällen des cHLs scheint MYC eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen. So wurde in ca. 70% der cHL-Fälle MYC in einem Teil der HRS-Zellen nachgewiesen (Chisholm *et al.*, 2015). Zusätzlich zeigten GEPs von HRS-Zellen primärer Fälle des cHLs und verschiedener normaler B-Zellpopulationen eine erhöhte Expression von MYC und dessen Zielgenen in einem Teil der cHL-Fälle im Vergleich zu GC-B-Zellen, den putativen Ursprungszellen der HRS-Zellen des cHLs (Tiacci *et al.*, 2012). Daher sollte die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHLs genauer untersucht werden. Dabei sind funktionelle Untersuchungen an Primärgewebe durch die Seltenheit der HRS-Zellen im Primärgewebe und des mangelnden Überlebens von primären HRS-Zellen in Kultur oder einem geeigneten Mausmodell nicht möglich. Ein gutes alternatives Modell der primären HRS-Zellen stellen die wenigen etablierten cHL-Zelllinien dar. So wurden diese cHL-Zelllinien zwar alle von Patienten in einem späten Stadium der Erkrankung und nicht aus den Lymphknoten der Patienten, die primäre Lokalisation des cHLs, isoliert, dennoch zeigen sie eine große Übereinstimmung zu den primären HRS-Zellen in der Morphologie, der Fähigkeit zur Rosettenbildung mit T-Zellen, der Ausprägung charakteristischer Oberflächenmarker und den Mangel von Immunglobulinen (Schaadt *et al.*, 1980). Zusätzlich demonstrierten GEPs von primären HRS-Zellen und den cHL-Zelllinien die Ausprägung einer gemeinsamen typischen cHL-Signatur, die durch eine hohen Ausprägung von NF- κ B-Zielgenen und der geringen bzw. fehlenden Ausprägung von B-Zellgenen charakterisiert wird (Tiacci *et al.*, 2012). Allerdings zeigten sich auch Unterschiede, wie z.B. eine erhöhte Expression von Genen zur Interaktion mit dem Mikromilieu in den primären HRS-Zellen und eine erhöhte Expression von Genen, die in der Proliferation und dem Wachstum der Zelle involviert sind, in den cHL-Zelllinien. Einzig für die Zelllinie L-1236 konnte die Herkunft von den primären HRS-Zellen nachgewiesen werden (Kanzler *et al.*, 1996a). Generell wurden aber bis heute viele Erkenntnisse zur Biologie der primären HRS-Zellen durch Untersuchungen der Zelllinien gewonnen. So wurden z.B. die in primären Fällen identifizierten Mutationen ursprünglich in Zelllinien gefunden. Daher dienten die cHL-Zelllinien auch in den Studien zu MYC und CEBPB als Modellorganismen der primären HRS-Zellen. Dafür wurde zunächst die erhöhte Expression von MYC auf mRNA- und Proteinebene in den cHL-Zelllinien bestätigt. Anschließend wurde MYC in den cHL-Zelllinien mittels eines lentiviralen System zur Expression von shRNAs herabreguliert und die Konsequenzen dieser Herabregulation auf den Phänotyp der Zellen analysiert. Die erhöhte MYC-Expression in den cHL-Zelllinien im Vergleich zu den GC-B-Zellen aus den GEPs konnte mittels TagMan[®]-qPCRs bestätigt werden. Dabei zeigten die cHL-Zelllinien

ähnlich zu den primären Fällen eine unterschiedlich starke Expression von *MYC*. Auch in den Western Blots konnte mit Ausnahme der Zelllinie L-1236 in allen cHL-Zelllinien eine erhöhte Proteinexpression im Vergleich zu den GC-B-Zellen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Expressionsstärken von *MYC* auf mRNA- und Proteinebene zwischen den Zelllinien lässt auf eine starke post-transkriptionelle Regulation von *MYC* in den cHL-Zelllinien schließen. So wird z.B. *MYC* in der Zelllinie L-1236 auf mRNA-Ebene stärker ausgeprägt als in den GC-B-Zellen, allerdings ist auf Proteinebene kein Unterschied zu erkennen. Genauso weist die Zelllinie KM-H2 die schwächste *MYC*-Expression unter den cHL-Zelllinien auf, exprimiert aber mit den Zelllinien L-428, U-HO1 und HDLM-2 am stärksten *MYC*. In diesem Sinne sind für *MYC* diverse Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation bekannt. Dies schließt die Kontrolle der mRNA-Stabilität und der Translation, die Regulation durch miRNAs, sowie die Beeinflussung der Protein-Stabilität durch Phosphorylierung und proteosomaler Degradation ein (Meyer & Penn, 2008; Dang, 2012).

Bei der Einschätzung der erhöhten *MYC*-Expression der cHL-Zelllinien im Vergleich zu den GC-B-Zellen ist zu bedenken, dass in dieser Arbeit Gesamt-GC-B-Zellen verwendet wurden. In der Arbeit von Cattoretti wurde allerdings beschrieben, dass nur ein kleiner Teil der GC-B-Zellen positiv für *MYC* ist und der Großteil der GC-B-Zellen wird als *MYC* negativ beschrieben (Cattoretti, 2013). Interessanterweise sind die *MYC*-positiven GC-B-Zellen, wie die HRS-Zellen auch, positiv für CD30. Zusätzlich konnte mit GEPs von primären HRS-Zellen und den CD30-positiven GC-B-Zellen eine sehr hohe Ähnlichkeit dieser beiden Populationen gezeigt werden (Persönliche Kommunikation Dr. Marc Weniger, noch nicht publiziert). Daher besteht die Möglichkeit, dass die HRS-Zellen von diesen CD30-positiven GC-B-Zellen abstammen. Allerdings wird vermutet, dass es sich bei den CD30-positiven *MYC*-positiven GC-B-Zellen um positiv-selektionierte GC-B-Zellen handelt, die in die dunkle Zone des GCs rezirkulieren, um dort eine erneute Runde von Proliferation mit SHM und anschließender Selektion in der hellen Zone des GCs durchzuführen (Cattoretti, 2013), was der Abstammung der HRS-Zellen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen widersprechen würde. Auf jeden Fall sollte ein Vergleich der *MYC*-Expression der cHL-Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene mit dieser neuen CD30-positiven und *MYC*-positiven GC-B-Zellpopulation und den entsprechenden CD30-negativen und *MYC*-negativen GC-B-Zellen erfolgen, um die aberrante *MYC*-Ausprägung in den cHL-Zelllinien besser zu den normalen B-Zellpopulationen des GCs einschätzen zu können.

Der Vergleich der *MYC*-Expression zwischen cHL-Zelllinien und den beiden Burkitt-Lymphom-Zelllinien Raji und DAUDI zeigte eine nochmal 2,5-fach höhere Ausprägung von *MYC* in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien. Da das Burkitt-Lymphom durch eine starke *MYC*-Ausprägung charakterisiert wird und bereits im Vergleich mit anderen Lymphomen die stärkste *MYC*-Ausprägung aufwies (Chisholm *et al.*, 2015), war eine höhere *MYC*-Expression in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien erwartet worden. Die *MYC*-Ausprägung

wird in diesen Zellen in Folge einer t(8;14)-Translokation durch den Ig-*Enhancer* kontrolliert und ist somit sehr stark. Für das cHL wurden solche Translokationen nur in 1 von 37 untersuchten Fällen detektiert (Martin-Subero *et al.*, 2006a; Szymanowska *et al.*, 2008), wobei in diesem Fall aufgrund des verlorenen B-Zell-Phänotyps der HRS-Zellen und die damit in vielen Fällen verbundene Stilllegung des Ig-Locus keine Aussage über die Expression von MYC gemacht werden kann. So ist die Ursache der erhöhten MYC-Expression in fast allen Fällen unbekannt. In einer Studie zur aberranten SHM in cHL wurden in 4 von 9 untersuchten Fälle Mutationen in MYC entdeckt (Liso *et al.*, 2006). Es wäre denkbar dass solche Mutationen die Regulation von MYC in einigen Fällen des cHLs beeinflussen. Weiterhin wurde gezeigt, dass MYC ein direktes Zielgen des NOTCH1-Signalweges ist (Palomero *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2006). Da HRS-Zellen einen aktivierten NOTCH1-Signalweg aufweisen, konnte dies auch zur erhöhten MYC-Expression beitragen (Jundt *et al.*, 2002). Durch Veränderung des Chromatinstatus von MYC scheinen JAK2 und JMJD2C im cHL die Ausprägung von MYC positiv zu beeinflussen (Rui *et al.*, 2010). Ein weiterer möglicher Mechanismus zur erhöhten MYC-Ausprägung ist die erhöhte Expression von IRF4 in den HRS-Zellen des cHLs (Aldinucci *et al.*, 2010). So wurde im Multiplem Myelom und im ALCL eine positive Regulation von MYC durch IRF4 gezeigt (Shaffer *et al.*, 2008; Weilemann *et al.*, 2015). Zusätzlich könnten bisher unbekannt Translokationen von MYC oder andere aberrant aktivierte Signalwege zur Deregulation von MYC beitragen.

Die TaqMan[®]-qPCRs und Western Blots zeigten, dass die Expression von shMYC1 und shMYC2 zu einer sehr deutlichen Herabregulation von MYC sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in den cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 führten. Die shMYC3 hingegen bewirkte eine schwächere Herabregulation von MYC. Generell ist bekannt, dass unterschiedliche shRNAs unterschiedliche Effizienzen in der Herabregulation des Zielgenes aufweisen können. So wird diese Effizienz zum einen durch die Sequenz und damit verbundene thermodynamische Eigenschaften der RNA beeinflusst, zum Teil hängt die Stärke der Herabregulation aber auch von der Zugänglichkeit der Bindestelle der siRNA auf der Ziel-mRNA ab, die z.B. durch mRNA-bindende Proteine oder Sekundärstrukturen der mRNA unzugänglich sein kann (Kurreck, 2006). In der cHL-Zelllinie KM-H2 konnte mit den drei shRNAs gegen MYC nur eine schwache Herabregulation erreicht werden, wodurch keine weiterführenden Experimente mit dieser Zelllinie durchgeführt wurden. Da diese Zelllinie auch in den Experimenten zu CEBPB nur eine schwache Regulation zeigte, ist anzunehmen, dass die schwächere Herabregulation nicht durch suboptimale shRNA-Sequenzen begründet ist, sondern dass stattdessen eine andere unbekannt Inkompatibilität der KM-H2 mit dem LeGO.G-Vektor besteht. Ein Defekt der shRNA-Prozessierung in der KM-H2 kann allerdings ausgeschlossen werden, da in anderen Studien verschiedene Gene erfolgreich mit shRNAs in der KM-H2 herunterreguliert wurden (Stanelle *et al.*, 2010;

Gunawardana *et al.*, 2014). Evtl. könnte die Effizienz der Herabregulation in der Linie KM-H2 durch eine Steigerung der MOI verbessert werden. So würden mehr Kopien des Vektors ins Wirtsgenom integrieren und somit die Expression der shRNA gesteigert werden (Weber *et al.*, 2008). Allerdings würde dies das Risiko von unerwünschten Effekten durch Insertionsmutagenese (Knight *et al.*, 2013) und das Risiko erhöhter Toxizität durch Sättigung der miRNA-Maschinerie erhöhen (Grimm *et al.*, 2006).

Nach Herabregulation von MYC wiesen die Zellen von beiden analysierten cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 ein schlechteres kompetitives Wachstum gegenüber Zellen auf die MYC normal ausprägten, wie es durch die Abnahme des GFP-Anteils der Mischkulturen der shMYC1- oder shMYC2-ausprägenden Zellen mit nicht-infizierten Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle angezeigt wurde. Zusätzlich konnte mit sortierten Zellen eine verminderte Proliferation oder das schlechtere Überleben der Zellen mit MYC-Herabregulation gezeigt werden. Auch in der Studie von Rui *et al.* konnte für die cHL-Zelllinien L-428, L-540 und L-1236 ein schlechteres kompetitives Wachstum der Zellen mit MYC-Herabregulation gegenüber nicht-infizierten Zellen gezeigt werden (Rui *et al.*, 2010). Somit bestätigen die vorgestellten Daten die Ergebnisse der Zelllinie L-428 und ergänzen sie mit der Linie U-HO1 um eine weitere cHL-Zelllinie.

Weiterführende Experimente zum Einfluss von MYC auf das Überleben und die Proliferation der Zellen der cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 zeigten eine unterschiedliche Rolle von MYC in beiden Zelllinien. In der Zelllinie L-428 scheint MYC sowohl proliferationsfördernd als auch positiv auf das Überleben der Zellen zu wirken. So konnte in den beiden untersuchten Infektionen der Zelllinie L-428 ein höherer Anteil an Annexin V-positiven Zellen in den shMYC1- oder shMYC2-ausprägenden Zellen im Vergleich zur ScrMYC-Kontrolle gemessen werden. Dieser Effekt der Toxizität der verminderten MYC-Ausprägung wurde z.B. auch schon für Multiple Myelom-Zelllinien und ALCL-Zelllinien gezeigt (Holien *et al.*, 2012; Weilemann *et al.*, 2015). Auch in der Studie von Rui *et al.* wurde eine erhöhte Apoptose in Zellen der primär mediastinalen B-Zell-Lymphom-Zelllinie Karpas 1106P nach MYC-Herabregulation gezeigt und die Ergebnisse auf die cHL-Zelllinien übertragen (Rui *et al.*, 2010). Somit bestätigen die hier präsentierten Daten diese Vermutung für die cHL-Zelllinie L-428. Allerdings konnte zusätzlich ein positiver Effekt von MYC auf die Proliferation der Zellen der L-428 nachgewiesen werden, indem eine reduzierte Teilungsrate in den Zellen mit MYC-Herabregulation im Vergleich zu Zellen mit normaler MYC-Ausprägung in der Zelllinie L-428 gemessen wurde. In einer weiteren Studien in der MYC mittels siRNA in der cHL-Zelllinien L-428 transient herabreguliert wurde, konnte eine Akkumulation der Zellen mit MYC-Herabregulation in G0/G1-Phase des Zellzyklus gezeigt werden, was die hier präsentierten Daten ergänzt (Vogel *et al.*, 2014). In Vorversuchen zur Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung der infizierten Zellen der Zelllinie L-428 konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Passend dazu ist MYC als

Regulator vieler Faktoren des Zellzyklus bekannt, wie z.B. von CDKs und Cyclinen (Bretones *et al.*, 2015). In der cHL-Zelllinie U-HO1 scheint MYC vor allem eine starke proliferationsfördernde Wirkung zu haben. So zeigten die Vybrandt® DiD-Färbungen zwar, dass es durch die MYC-Herunterregulation nicht zu einem vollständigen Proliferationsstop kommt, da die Intensität des DiD-Signals über den Beobachtungszeitraum abnimmt, allerdings teilten sich die Zellen mit MYC-Herabregulation deutlich langsamer als die Zellen der ScrMYC-Kontrolle. Zusätzlich zeigten die Bestimmungen der Zellzahlen der sortierten Zellen, dass die Population der Zellen mit verminderter MYC-Ausprägung nicht mehr wächst. Somit scheint MYC in der Zelllinie U-HO1 ein kritischer Faktor für die Proliferation der Zellen zu sein. In zukünftigen Experimenten wäre es interessant zu überprüfen, in welcher Phase des Zellzyklus die Zellen der Linie U-HO1 mit MYC-Herabregulation akkumulieren, da gezeigt wurde, dass die MYC-Herabregulation die Proliferation von Tumorzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus hemmen kann (Wang *et al.*, 2008). So könnte der Vergleich mit der cHL-Zelllinie L-428 entweder Gemeinsamkeiten oder Unterschiede der Regulation der Proliferation durch MYC in den cHL-Zelllinien aufdecken. Die Annexin V-Färbungen der Zelllinie U-HO1 zeigten einen höheren Anteil an sterbenden Zellen in MYC-ausprägenden Zellen in der Linie U-HO1. Hierbei ist bekannt, dass eine erhöhte und dauerhafte Expression von MYC zur Apoptose der Zelle führt (Meyer & Penn, 2008). Dies erfolgt z.B. durch Aktivierung des TP53-Signalweges durch Induktion von ARF (Zindy *et al.*, 1998) und kontrolliert die MYC-Aktivität in gesunden Zellen. Erst durch zusätzliche Mutationen, die z.B. Apoptose-Signalwege betreffen, kann MYC sein onkogenes Potential entfalten (Meyer & Penn, 2008). So weist z.B. die cHL-Zelllinie L-428 eine Deletion in *TP53* auf, wobei die U-HO1 in dieser Studie nicht untersucht wurde (Feuerborn *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die MYC-Ausprägung zu einer erhöhten genomischen Instabilität unter anderem durch Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und durch die Induktion von Replikationsstress führt (Rohban & Campaner, 2015). Die erhöhte genomische Instabilität könnte daher zur erhöhten Sterberate in normalen Zellen der cHL-Zelllinie U-HO1 im Vergleich zu Zellen mit MYC-Herabregulation beitragen.

Die Analyse der Expression von B-Zellgenen, die Zielgene von MYC darstellen und typischerweise in HRS-Zellen des cHLs exprimiert werden, zeigte eine unterschiedliche Bedeutung von MYC für die Expression der untersuchten Gene in den beiden cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1. Zwar zeigten die meisten der untersuchten Gene keine einheitliche Regulation nach MYC-Herabregulation in beiden Zelllinien, allerdings konnte eine Beteiligung von MYC an der Regulation der Ausprägung einzelner Gene gezeigt werden. So scheint in der Zelllinie L-428 *CEBPB* durch MYC positiv reguliert zu werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen mit Burkitt-Lymphom-Zelllinien, in denen die Herabregulation von MYC zu einer verminderten Ausprägung von *CEBPB* führte (Seitz *et al.*, 2011). Somit trägt die erhöhte MYC-Ausprägung vermutlich zur erhöhten Expression von *CEBPB* in den

HRS-Zellen einiger primärer cHL-Fälle, die in GEPs gezeigt worden ist, bei (Tibaldi *et al.*, 2012). Interessanterweise konnte die verstärkte Expression von *PRDM1* in Folge der MYC-Herabregulation in der cHL-Zelllinie L-428, die in einer anderen Studie gezeigt worden war (Vogel *et al.*, 2014), nicht bestätigt werden. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar, da in beiden Arbeiten die Herabregulation von MYC sehr deutlich nachgewiesen wurde und in beiden Arbeiten ein Effekt der MYC-Herabregulation auf das Überleben der Zellen gezeigt wurde. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Arbeiten besteht in den verwendeten Methoden zur Herabregulation, deren Einfluss auf die Expression einzelner Gene allerdings nicht bekannt ist. Daher sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die Ursachen des Unterschieds in der Regulation von *PRDM1* nach MYC-Herabregulation in beiden Studien aufzuklären. In der cHL-Zelllinie U-HO1 hingegen deutete sich eine negative Regulation von *IRF5* und *PAX5* durch MYC an, die durch Analysen weiterer Proben unabhängiger Infektionen bestätigt werden sollte. Auch in Burkitt-Lymphom-Zelllinien wurde eine negative Regulation von *IRF5* durch eine erhöhte MYC-Ausprägung gezeigt (Ji *et al.*, 2011). Da die erhöhte *IRF5*-Ausprägung in den HRS-Zellen als treibender Faktor der Umprogrammierung der HRS-Zellen beschrieben wurde, scheinen andere Faktoren der negativen Regulation von *IRF5* durch MYC in den HRS-Zellen entgegenzuwirken. In diesem Sinne wurde beschrieben, dass die erhöhte *IRF5*-Ausprägung durch die Aktivierung eines endogenen retroviralen „*long terminal repeats*“ (LTR) hervorgerufen wird (Babaian *et al.*, 2015). Auch für *PAX5* wurde bereits eine negative Regulation durch MYC in Burkitt-Lymphom-Zelllinien gezeigt (Seitz *et al.*, 2011). Somit könnte die erhöhte MYC-Expression in den HRS-Zellen eines Teils der primären Fälle des cHLs an der verminderten *PAX5*-Ausprägung beteiligt sein und somit könnte MYC auch zum verlorenen B-Zell-Phänotyp der HRS-Zellen beitragen (Dimitrova *et al.*, 2014). Generell fiel in dieser Analyse auf, dass nach MYC-Herabregulation nur kleine Änderungen in der Ausprägung der Zielgene gefunden wurden. Dies stimmt aber mit früheren Studien überein, die zeigten, dass MYC nur zu kleinen Änderungen der mRNA-Menge der kontrollierten Gene führt (Dang *et al.*, 2006).

Zusammenfassend konnte eine wichtige Rolle für MYC in der Pathogenese des cHL gezeigt werden. Dabei verdeutlichen die Ergebnisse, dass die exakte Rolle und Konsequenz der MYC-Ausprägung in den verschiedenen Fällen variieren kann. So wurde auch in anderen Tumorentitäten deutlich, dass die Konsequenz der MYC-Expression von dem jeweils vorliegenden zellulären Kontext, wie aktivierte Signalwege und vorhandene genetische Läsionen, bestimmt wird (Gabay *et al.*, 2014). Hierbei ist sicherlich auch die Funktion als genereller Verstärker der Transkription von MYC von entscheidender Bedeutung (Lin *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2012). Um ein besseres Verständnis der Funktion von MYC in den HRS-Zellen zu erlangen und evtl. die Funktion von MYC in der Pathogenese des cHLs von der in vielen Tumorentitäten bekannten allgemein proliferationsfördernden Wirkung zu erweitern, sollten zunächst die Konsequenzen der MYC-Herabregulation in weiteren

cHL-Zelllinien genauer untersucht werden. Zusätzlich könnten GEPs von cHL-Zelllinien mit herabreguliertem MYC, die z.B. mittels Gesamt-Transkriptom-Sequenzierungen generiert werden könnten, ein umfassenderes Bild der Funktion von MYC geben. Da die Funktion von MYC auch entscheidend von der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren abhängt, sollten auch Studien zum Interaktom von MYC in den cHL-Zelllinien durchgeführt werden. Die Gesamtheit der Daten könnte zu neuen Ideen zur Verbesserung der Therapie des cHLs durch Modulation der MYC-Expression oder der Interaktionen von MYC führen. So gilt MYC selbst zwar als „undruggable“, aber neue Therapieansätze durch Ausnutzung der synthetischen Letalität von MYC in Tumorzellen sind vielversprechend und könnten evtl. auch die Therapie des cHLs ergänzen (Gabay *et al.*, 2014).

4.3 Die Rolle von CEBPB in der Pathogenese des cHLs

CEBPB ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, der an der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben, beteiligt ist (Zahnow, 2009; Huber *et al.*, 2012). In verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. Brustkrebs, ALCL, Multiplen Myelom und epitheliale Tumore, konnte eine erhöhte Ausprägung von CEBPB nachgewiesen werden (Oh & Smart, 1998; Jundt *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2009; Zahnow, 2009). Zusätzlich konnte z.B. in Multiplen Myelom und ALCL die wichtige Rolle von CEBPB für die Proliferation und Überleben der Tumorzellen gezeigt werden (Pal *et al.*, 2009; Anastasov *et al.*, 2010). *CEBPB* ist auch in den HRS-Zellen des cHLs im Vergleich zu den GC-B-Zellen, den putativen Ursprungszellen der HRS-Zellen, verstärkt exprimiert, wie es GEPs von HRS-Zellen primärer cHL-Fälle und verschiedenen B-Zellpopulationen zeigten (Tibaldi *et al.*, 2012) (Abbildung 22). Auch konnte für das cHL eine wichtige Rolle der LIP-Isoform von CEBPB für die Proliferation und das Zellüberleben einiger cHL-Zelllinien gezeigt werden (Jundt *et al.*, 2005). Da sich die Untersuchungen von Jundt *et al.* aber auf die phänotypische Charakterisierung der Zellen nach Regulation des LAP/LIP-Verhältnis durch Hemmung des mTOR-Signalweges beschränkte und die LAP-Isoformen von CEBPB auch Tumor-fördernde Eigenschaften aufweisen können, wie es im folliculären Lymphom gezeigt worden ist (Heckman *et al.*, 2003), wurde in dieser Arbeit der Einfluss aller Isoformen von CEBPB auf den Phänotyp der cHL-Zelllinien untersucht. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die erhöhte Expression der LAP-Isoformen eine Transdifferenzierung bzw. Umprogrammierung von B-Zellen in Zellen der myeloiden Zellreihe auslösen kann (Xie *et al.*, 2004; Stoilova *et al.*, 2013). Da die Umprogrammierung der HRS-Zellen ein entscheidender Faktor in der Pathogenese des cHLs darstellt (Küppers *et al.*, 2012), sollte die Rolle von CEBPB in diesem Prozess genauer untersucht werden. Dafür wurde CEBPB mittels des LeGO.G-Vektors in den cHL-Zelllinien herunterreguliert und die Konsequenzen auf den Phänotyp der Zellen bestimmt.

Die erhöhte CEBPB-Expression in den cHL-Zelllinien im Vergleich zu GC-B-Zellen, die bereits beim Vergleich der GEPs von HRS-Zellen und normalen B-Zellpopulationen (Tiacchi *et al.*, 2012), sowie in der Studie von Jundt *et al.* gezeigt worden war, konnte in den TaqMan[®]-qPCRs und in den Western Blots mit den cHL-Zelllinien und GC-B-Zellen validiert werden. Dass auch die HRS-Zellen von primären Fällen des cHLs CEBPB auf Proteinebene aberrant erhöht exprimieren, konnte durch immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten von primären Fällen des cHLs und reaktiven Lymphknoten als Kontrollen durch unsere Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hansmann am Senkenbergischen Instituts für Pathologie in Frankfurt am Main gezeigt werden. So waren in 19/37 cHL-Fällen die HRS-Zellen positiv für CEBPB, wohingegen die B-Zellen in mehreren reaktiven Lymphknoten negativ für CEBPB waren (Daten noch nicht publiziert). Der Vergleich der CEBPB-Expression zwischen der Multiplen Myelom-Zelllinie U-266 und den cHL-Zelllinien zeigte weiterhin, dass CEBPB in einem Teil der cHL-Zelllinien sehr stark ausgeprägt wird, was die Relevanz der CEBPB-Expression in diesen Zellen unterstreichen könnte. Interessanterweise wiesen alle cHL-Zelllinien im Gegensatz zur Multiplen Myelom-Zelllinie U-266 eine höhere Ausprägung der LAP-Isoformen im Vergleich zur LIP-Isoform auf, was in einem höheren LAP/LIP-Verhältnis resultierte. Da LIP ein Inhibitor der LAP-Isoformen ist (Descombes & Schibler, 1991), könnte die höhere Expression von LAP in den cHL-Zelllinien auf eine positive transkriptionelle Aktivität der LAP-Isoformen und somit auf eine Beteiligung an der Umprogrammierung der HRS-Zellen hindeuten. In den meisten Tumoren hingegen findet man eine erhöhte Expression von LIP und somit ein geringeres LAP/LIP-Verhältnis, was für die Tumorentwicklung von Bedeutung ist (Gomis *et al.*, 2006; Begay *et al.*, 2015). Generell werden LIP eher proliferationsfördernde und den LAP-Isoformen differenzierungsfördernde Eigenschaften zu gesprochen (Nerlov, 2007; Zahnaw, 2009; Huber *et al.*, 2012) Beim Vergleich der Menge an CEBPB auf mRNA- und Proteinebene wurde deutlich, dass die Ausprägung von CEBPB in den cHL-Zelllinien post-transkriptionell stark reguliert wird. So prägen die Zellen der cHL-Zelllinien HDLM-2 und SUP-HD1 oder KM-H2 und L-428 zwar die gleiche Menge an CEBPB aus, aber zeigen deutliche Unterschiede in der Proteinexpression. Welche der vielen bekannten Faktoren, wie z.B. die Änderung der mRNA-Stabilität durch Bindung von HuR oder der Proteinstabilität durch post-translationale Modifizierungen oder die Regulation durch miRNAs (Huber *et al.*, 2012), zu der post-transkriptionellen Regulation in den einzelnen cHL-Zelllinien beitragen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Durch Verwendung des LeGO.G-Vektors konnte eine erfolgreiche Herabregulation in den cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1 erzielt werden, wie es durch TaqMan[®]-qPCRs und Western Blots mit transduzierten Zellen gezeigt werden konnte. Dabei zeigte die Zelllinie L-1236 die robusteste Herabregulation von CEBPB. In den beiden Zelllinien HDLM-2 und KM-H2 hingegen konnte die Menge an CEBPB sowohl auf mRNA- als auch auf

Proteinebene nicht wesentlich reduziert werden. Da die Linie KM-H2 auch in den Infektionen zu MYC keine Herabregulation zeigte, wurde zuvor schon eine Inkompatibilität der Zelllinie KM-H2 mit dem LeGO.G-Vektor zur Herabregulation von Genen diskutiert. Ähnliches könnte für die Zelllinie HDLM-2 zutreffen. Allerdings ist zu beachten, dass für die Linie HDLM-2 bisher nur eine Infektion mit den LeGO.G-Viren durchgeführt worden ist. Daher könnte hier auch ein technischer Fehler aufgetreten sein und sich bei einer weiteren Infektion ein anderes Ergebnis ergeben.

Generell war die geringe Anzahl der biologischen Replikate, d.h. für die Zelllinien L-1236 und L-428 je zwei unabhängige Infektionen und für die Zelllinien SUP-HD1, KM-H2 und HDLM-2 je nur eine Infektion, eine Beeinträchtigung für die Auswertung der Ergebnisse und sollte in Zukunft durch weitere Infektionen ergänzt werden.

Die Analysen zur Herabregulation von CEBPB zeigten deutlich, dass die shCEBPB1 in allen Infektionen schlechter und zum Teil gar nicht funktionierte. Ähnlich zur bereits diskutierten Situation der shMYC3, spielen hier die unterschiedlichen Effizienzen in der Herabregulation des Zielgenes von unterschiedlichen shRNAs aufgrund der Sequenz der shRNA und der Zugänglichkeit der Bindestelle der shRNA auf der Ziel-mRNA eine Rolle (Kurreck, 2006).

Wie bereits erwähnt, ist ein wichtiger Aspekt in der Regulation der Aktivität von CEBPB das LAP/LIP-Verhältnis. Leider wurde eine große Heterogenität in Bezug auf das LAP/LIP-Verhältnis zwischen den unterschiedlichen Tagen einer Infektion und zusätzlich zwischen unterschiedlichen Infektionen derselben Zelllinien festgestellt. Aufgrund dessen war es nicht möglich eine einheitliche Konsequenz der Herabregulation von CEBPB auf das LAP/LIP-Verhältnis zu beschreiben. Hier würden sicherlich mehr technische Replikate der Infektionen helfen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Heterogenität der Expression der CEBPB-Isoformen technisch bedingt ist und sich aus Einflüssen der Infektion und des Sortiervorganges, sowie der schwierigen Detektion von CEBPB in den Western Blots ergibt.

Bei den Analysen zur Herabregulation und den nachfolgenden Experimenten zeigte sich ein teils großer Unterschied zwischen der *mock*-Bedingung und der ScrCEBPB-Kontrolle. Allerdings war eine Interpretation zur Ursache dieses Unterschieds schwierig, weil dieser an den unterschiedlichen Tagen und verschiedenen Infektionen einer Zelllinie sehr heterogen im Ausmaß und Richtung war, d.h. mal eine erhöhte und mal eine schwächere Expression zeigte. Normalerweise dient der Vergleich der *mock*-Bedingung und der „*scramble*“-Kontrolle dazu die Einflüsse der Infektion und der Ausprägung einer unspezifischen shRNA in den Zellen darzustellen und sollte, wenn es Einflüsse gibt, relativ konstant sein. Auch eine mögliche Heterogenität zwischen den verschiedenen Infektionen sollte nicht zu solch großen Schwankungen führen. Ein Teil des Unterschiedes zwischen *mock*-Bedingung und ScrCEBPB-Kontrolle könnte möglicherweise durch die wichtige Rolle von CEBPB in Entzündungsreaktionen erklärt werden (Poli, 1998). So könnte die Infektion mit dem

LeGO.G-Virus eine Immunantwort auslösen, die zwischen den verschiedenen Infektionen unterschiedlich stark ausfällt, und CEBPB könnte als wichtiger Faktor der Immunantwort im Verlauf dieser Immunantwort unterschiedlich reguliert werden. Dies müsste allerdings durch weitere Experimente überprüft werden.

In der Analyse zur Expression der CEBPB-Zielgene wies *IL6* eine übereinstimmende negative Regulation nach CEBPB-Herabregulation in den cHL-Zelllinien L-1236 und L-428 auf. Dies lässt vermuten, dass die erhöhte CEBPB-Expression zur Expression von *IL6* in den HRS-Zellen eines Teils der primären cHL-Fälle beiträgt (Steidl *et al.*, 2011a). Eine starke *IL6*-Expression der HRS-Zellen scheint mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Vener *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2002). Zusätzlich konnte in den Zelllinien L-1236 und SUP-HD1 eine übereinstimmende negative Regulation von *BCL2A1* nach Herabregulation von CEBPB festgestellt werden, wobei die *BCL2A1*-Herabregulation in der Linie SUP-HD1 an Tag 6 nach der Infektion nur noch schwach vorhanden war. *BCL2A1* ist ein antiapoptotischer Faktor, der aber bisher im cHL nicht beschrieben worden ist. Somit deuten die Ergebnisse an, dass die erhöhte Expression von CEBPB in den HRS-Zellen der primären cHL-Fälle auch zu antiapoptotischen Mechanismen in den HRS-Zellen beitragen könnte. Weiter konnte in der Zelllinie L-1236 die, zwar unterschiedlich starke, negative Regulation der übrigen untersuchten Zielgene durch CEBPB-Herabregulation nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass CEBPB in einem Teil der cHL-Fälle an weiteren wichtigen pathologischen Prozessen beteiligt ist. So wurde mit *BCL2* die Regulation eines weiteren wichtigen antiapoptotischen Faktors gezeigt. *PTGS2* ist ein wichtiges Enzym in der Synthese von Prostaglandinen, die in HRS-Zellen primärer cHL-Fälle produziert werden und durch die Hemmung von CD4-positiven T-Helferzellen zur Immunevasion der HRS-Zellen beitragen (Küppers, 2009). Für *IRF4* hingegen wurde gezeigt, dass es die Proliferation und das Überleben der HRS-Zellen fördert (Aldinucci *et al.*, 2011). Generell ist bei dieser Untersuchung zu beachten, dass die Expression der untersuchten Gene auch durch andere in den HRS-Zellen aktive Transkriptionsfaktoren kontrolliert wird. So wird z.B. *IRF4* auch durch NF- κ B und MYC induziert (Shaffer *et al.*, 2009). Solche komplexen Regulationsmechanismen sind auch eine mögliche Erklärung für die unveränderte Expression der CEBPB-Zielgene *BCL2A1*, *BCL2* und *IRF4* in der Linie L-428 und *BCL2* sowie *IRF4* in der Linie SUP-HD1, da andere Faktoren den Verlust der Ausprägung von CEBPB kompensieren könnten.

Die Untersuchung zum kompetitiven Wachstum der transduzierten Zellen lassen vermuten, dass der Verlust aller CEBPB-Isoformen keinen Einfluss auf die Proliferation oder das Überleben der Zellen hat. In allen drei untersuchten Zelllinien zeigte sich kein Unterschied zur ScrCEBPB-Kontrolle im Verlauf des Anteils GFP-positiver Zellen. Dies ist hinsichtlich der gezeigten Herabregulation von *BCL2A1* und *BCL2* nach CEBPB-Herabregulation in der cHL-Zelllinie L-1236 und von *BCL2A1* in der Linie SUP-HD1 unerwartet, da diese beiden

Gene antiapoptotische Proteine codieren. In einer anderen Studie war allerdings die kritische Rolle von LIP für die Proliferation und das Überleben einiger cHL-Zelllinien gezeigt worden (Jundt *et al.*, 2005). Somit deuten die hier vorgestellten Daten darauf hin, dass in den cHL-Zelllinien nicht wie im Multiplem Myelom die generelle Ausprägung von CEBPB wichtig für die Proliferation und das Überleben der Zellen ist (Pal *et al.*, 2009), sondern dass die Proliferation und das Überleben der Zellen der cHL-Zelllinien vom LAP-LIP-Verhältnis oder entscheidender von der Expression von LIP abhängen.

Ein Beitrag von CEBPB zur Umprogrammierung der HRS-Zellen schien durch die erhöhte Expression der LAP-Isoformen wahrscheinlich. So wurde gezeigt, dass die LAP-Isoformen zur Umprogrammierung von B-Zellen in Zellen der myeloiden Zellreihe, insbesondere in Makrophagen, führen können (Xie *et al.*, 2004; Stoilova *et al.*, 2013). Die Ergebnisse der TaqMan[®]-qPCRs zeigten allerdings kein einheitliches Bild in den cHL-Zelllinien bzgl. der Bedeutung von CEBPB zur Expression von B-Zellgenen. Stattdessen wurde nur die Expression einzelner Gene in verschiedenen Zelllinien in Folge der CEBPB-Herabregulation, teilweise unterschiedlich in den verschiedenen Zelllinien, verändert. So konnte als einheitlichster Effekt eine negative Regulation von *PAX5* durch CEBPB-Herabregulation in der cHL-Zelllinie L-1236 nachgewiesen werden. Dies widerspricht dem Konzept, dass CEBPB-Expression zum Verlust des B-Zell-Phänotyps beiträgt. In der Literatur ist eine positive Regulation von *PAX5* bisher nicht beschrieben worden. In einer *in-silico*-Analyse der Promotorregion von *PAX5* konnten allerdings mehrere mögliche Bindestellen für CEBPB ermittelt werden. Für CEBPA, das ein homologes Gen von CEBPB ist und auch zur Umprogrammierung von B-Zellen in Makrophagen führen kann, wurde beschrieben, dass es die Expression von *PAX5* im Zuge dieser Umprogrammierung hemmt (Hsu *et al.*, 2006). Für CEBPB wurde zusätzlich gezeigt, dass es die transkriptionelle Aktivität von *PAX5* hemmt (Xie *et al.*, 2004). Daher ist funktionelle Konsequenz dieser möglichen positiven Regulation von *PAX5* durch CEBPB nicht eindeutig. In der Zelllinie L-428 hingegen zeigte sich zumindest an Tag 3 nach der Infektion eine erhöhte Expression von *PAX5* nach CEBPB-Herabregulierung, was eine Beteiligung von CEBPB in der Umprogrammierung der HRS-Zellen in einem Teil der primären cHL-Fälle unterstützen würde. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass die erhöhte *PAX5*-Expression an Tag 5 bzw. 6 nach der Infektion nicht mehr vorhanden war, wodurch die Interpretation der Regulation der *PAX5*-Expression durch CEBPB in der Linie L-428 nicht eindeutig ist. Eine mögliche Erklärung für die transiente *PAX5*-Regulation durch CEBPB-Herabregulierung wäre, dass andere Faktoren, die die *PAX5*-Ausprägung hemmen, durch CEBPB-Herabregulation induziert wurden. Dies führt somit zu einer Abnahme der *PAX5*-Ausprägung an Tag 5 bzw. 6 nach der Infektion im Vergleich zu Tag 3 nach der Infektionen in L-428-Zellen mit verminderter Menge an CEBPB. Durch die Ergebnisse in der Linie SUP-HD1, in der keine Regulation von *PAX5* erfolgte, wird klar, dass weitere Studien nötig sind, um die Regulation von *PAX5* in den cHL-Zelllinien

besser zu verstehen. Die Ergebnisse zur *EBF1*-Expression nach CEBPB-Herabregulation zeigten auch kein eindeutiges Bild in den Zelllinien L-1236 und L-428. So konnte in der Linie L-1236 eine erhöhte Expression von *EBF1* in den shCEBPB2-ausprägenden Zellen gefunden werden, wohingegen shCEBPB3-exprimierende Zellen eine normale Menge an *EBF1* ausprägten. Dies würde darauf hindeuten, dass die gefundene Regulation von *EBF1* in den shCEBPB2-ausprägenden Zellen ein Artefakt ist. Allerdings konnte eine erhöhte Expression von *EBF1* in Zellen, die shCEBPB2 oder shCEBPB3 ausprägten, auch in der Zelllinie L-428 an Tag 3 nach der Infektion und in den shCEBPB3-ausprägenden Zellen der Zelllinie L-428 an Tag 5 bzw. 6 nach der Infektion nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass CEBPB in den HRS-Zellen in einem Teil der cHL-Fälle an der herabregulierten *EBF1*-Expression und daraus resultierenden verminderten Ausprägung von B-Zellgenen beteiligt sein könnte (Bohle *et al.*, 2013). Für *BLK* zeigte sich eine gegensätzliche Regulation nach CEBPB-Herabregulation in den Zelllinien L-428 und SUP-HD1. Während in der Linie L-428 an Tag 3 nach der Infektion eine leicht reduzierte Menge an *BLK* nach CEBPB-Herabregulation nachgewiesen wurde, führte die Herabregulation von CEBPB in der Linie SUP-HD1 zu einer stark erhöhten Ausprägung von *BLK* an Tag 3 nach der Infektion und einer moderaten erhöhten *BLK*-Expression an Tag 6 nach der Infektion. *BLK* ist ein wichtiger Bestandteil des BCR-Signalweges, dessen Komponenten in der Regel in HRS-Zellen herabreguliert sind oder gar nicht exprimiert werden (Schwering *et al.*, 2003). So passen die Ergebnisse der Linie SUP-HD1 zur Annahme, dass die erhöhte CEBPB-Ausprägung in den HRS-Zellen primärer cHL-Fälle an der verminderten *BLK*-Expression in den HRS-Zellen einiger cHL-Fälle beteiligt ist. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Linien L-428 und L-1236, dass dies nicht in jedem Fall zu trifft.

Zusammenfassend scheint die Rolle von CEBPB in den cHL-Zelllinien und damit vermutlich auch in den HRS-Zellen primärer cHL-Fälle sehr heterogen zu sein. So konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass in den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Gene durch CEBPB reguliert werden, die zu verschiedenen Aspekten in der Pathogenese des cHLs beitragen können. So wurden antiapoptotische Faktoren, Faktoren die zur Immunevasion beitragen, aber auch B-Zellgene und weitere Transkriptionsfaktoren in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich durch CEBPB reguliert. Dies deutet darauf hin, dass die exakte Funktion von CEBPB in den cHL-Zelllinien durch das komplexe Zusammenspiel mehrerer Faktoren bestimmt wird. Zusätzlich konnten weitere Hinweise dafür gesammelt werden, dass nicht alle drei CEBPB-Isoformen, sondern nur LIP eine positive Wirkung auf die Proliferation und das Zellüberleben der cHL-Zelllinien hat.

Um ein besseres Verständnis von der Funktion von CEBPB zu gewinnen und Gemeinsamkeiten in den verschiedenen cHL-Zelllinien zu finden, wäre es sinnvoll mit Hilfe von GEPs von Zellen mit herunterreguliertem CEBPB im Vergleich zu Zellen mit normalen

CEBPB-Mengen ein umfassenderes Bild über die durch CEBPB bedingten mRNA-Regulationen in den cHL-Zelllinien zu erhalten. Zusätzlich könnten Studien der Protein-Interaktionen von CEBPB in den cHL-Zelllinien mehr über die Regulation der CEBPB-Aktivität und Rolle von CEBPB ermöglichen. Da post-translationale Modifizierungen auch eine entscheidende Rolle in der Funktion und biologischen Aktivität von CEBPB spielen (Zahnow, 2009), sollten weitere Untersuchungen auch die Charakterisierung der in den cHL-Zelllinien vorherrschenden post-translationalen Modifizierungen von CEBPB umfassen. Insgesamt könnte so die Rolle von CEBPB in der Pathogenese des cHLs besser aufgeklärt werden. Um dabei auch die Untersuchung der Rolle von CEBPB in den Zelllinien zu ermöglichen, in denen keine Herabregulierung von CEBPB erreicht wurde und die Effekte in den cHL-Zelllinien L-1236, L-428 und SUP-HD1 evtl. zu verstärken, sollte in Zukunft über die Verwendung des CRISPR/CAS-Systems in den cHL-Zelllinien zur Entfernung von Genen nachgedacht werden (Jinek *et al.*, 2012). Durch das Ausschneiden der Gene mittels CRISPR/CAS-System könnten die residualen Aktivitäten, die bei den in dieser Arbeit durchgeführten Herabregulationen noch vorhanden waren und die Ergebnisse evtl. verfälschen, eliminiert werden. Die Kombinierbarkeit des CRISPR/CAS-Systems mit einem lentiviralen Vektor, der zur Infektion der schwierig transfizierbaren cHL-Zelllinien nötig wäre, wurde bereits gezeigt (Zhou *et al.*, 2014). Daher konnte das CRISPR/Cas-System eine entscheidende Verbesserung zur Analyse der Funktion von Genen in cHL-Zelllinien darstellen und sollte getestet werden.

4.4 Arbeiten zur umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen in HRS-Zellen des cHLs

Im Allgemeinen werden Untersuchungen der HRS-Zellen durch ihre Seltenheit im Tumorgewebe des cHL erschwert. Daher beschränkten sich die meisten Analysen zu genetischen Läsionen, die zur Pathogenese des cHLs beitragen, bisher auch auf einzelne Gene (siehe Einleitung). Vor kurzem konnte allerdings eine erste Studie zur umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen der HRS-Zellen des cHL mittels Exom-Sequenzierung von durchflusszytometrisch angereicherten HRS-Zellen publiziert werden (Reichel *et al.*, 2015). Die durchflusszytometrische Sortierung der HRS-Zellen primärer cHL-Fälle wurde zwar vor einiger Zeit beschrieben (Fromm *et al.*, 2006), konnte aber in unserer Arbeitsgruppe nicht angewendet werden, da zu wenige Lymphknoten-Biopsate mit Verdacht auf cHL zur Verfügung standen. Dadurch konnte die Sortierung zum einen nicht etabliert werden und zum anderen hätten in absehbarer Zeit nicht genügend Fälle für eine umfassende Untersuchung gesammelt werden können. Daher wurde in dieser Arbeit die Mikrodissektion zur Isolierung von HRS- und NT-Zellen aus Gewebeschnitten von cHL-Fällen verwendet. Da die Mikrodissektion sehr zeitaufwendig ist und nur begrenztes Material zur Verfügung steht, wurde eine WGA mit den mikrodissektierten Zellen

durchgeführt, um ausreichende Mengen an DNA für die Exom-Sequenzierung zu erhalten. Bei der Etablierung der WGA-Methode zeigte sich, dass im Vergleich zu sortierten Zellen viel mehr mikrodisektierte Zellen für eine erfolgreiche WGA eingesetzt werden müssen. Im Allgemeinen benötigt die WGA lange DNA-Fragmente für eine effiziente Amplifizierung mit mehreren Replikationsstartpunkten, die in der Bildung einer stark verzweigten Struktur, der sogenannten „*hyperbranched structure*“, resultieren. Daher war vermutlich die schlechtere DNA-Qualität der mikrodisektierten Zellen der Grund für die benötigte höhere Mindestanzahl an Zellen für eine erfolgreiche WGA mit mikrodisektierten Zellen. Die DNA-Qualität der mikrodisektierten Zellen wird vermutlich zum Teil durch das Einfrieren der Zellen bei der Lagerung vermindert. Zusätzlich wird bei der Anfertigung der Gewebeschnitte nur ein Teil des relativ großen Zellkerns der HRS-Zellen angeschnitten und ein weiterer Teil des Zellkerns kann während der Mikrodisektion abgeschnitten oder durch den Laser beschädigt werden. Dadurch reduzierte sich die Menge an Startmaterial in der WGA, was die erhöhte Menge an mikrodisektierten Zellen weiter erklärt. Weiter deuten die WGAs der verschiedenen cHL-Fälle einen Unterschied in der DNA-Qualität zwischen den Fällen an, da ausgehend von 2000 mikrodisektierten Zellen das Genom von manchen Fällen erfolgreich in der WGA amplifiziert werden konnte und bei manchen nicht. Dies wurde auch schon in zwei Studien von Bräuninger und Kollegen gezeigt, in den IgV-Gen-PCRs mit Einzelproben von HRS-Zellen durchgeführt wurden und unterschiedliche PCR-Effizienzen der verschiedenen Fälle ermittelt wurden (Bräuninger *et al.*, 1999; Bräuninger *et al.*, 2003). Durch Verwendung einer WGA zur Vermehrung der DNA konnte zwar genug Material für die Exom-Sequenzierung gewonnen werden, allerdings weist die WGA auch Nachteile auf, die in der Auswertung der Daten berücksichtigt werden mussten und weitere Kontrollen nötig machten. Ein großer Nachteil der gewählten Methode der WGA ist, dass sie verschiedene Bereiche des Genom unterschiedlich stark amplifiziert und daher die Detektion von Kopienzahlvariationen erschwert bis unmöglich macht (Zong *et al.*, 2012). Dieses Problem betrifft auch die VAFs, die verwendet werden, um heterozygote von homozygoten Mutationen zu unterscheiden, sowie Hinweise auf eine Subklonalität der Mutation geben können. Um dieses Problem abzumildern wurden drei technische Replikate der WGA pro Zelltyp und Fall durchgeführt, da durch Mischen von technischen Replikaten Ungleichheiten in den WGAs teilweise kompensiert werden können (Rook *et al.*, 2004). Bisher konnten aber keine Auswertungen zu Kopienzahlvariationen in den HRS-Zellen mit den in dieser Arbeit generierten Daten durchgeführt werden und der Einfluss auf die Allelfrequenzen der Varianten konnte bisher nicht hinreichend untersucht werden. Generell gibt es Methoden der WGA, die eine bessere Identifizierung von Kopienzahlvariationen ermöglichen, wie z.B. MALBAC (Zong *et al.*, 2012). Allerdings weisen diese eine erhöhte Anzahl falsch-positiver Einzelnukleotid-Austauschmutationen auf (de Bourcy *et al.*, 2014). Das Auftreten von falsch-positiven Varianten ist ein zweites großes Problem bei der Verwendung einer WGA.

Daher wurde in dieser Arbeit eine WGA-Methode angewendet, die eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion verwendet und bei einem Vergleich von verschiedenen WGA-Methoden die geringste Fehlerquote aufwies (de Bourcy *et al.*, 2014). Zusätzlich sollte die hohe Anzahl an mikrodisezierten Zellen und damit Kopien des Genoms die Gefahr für falsch-positive Mutationen senken. Polymerasefehler treten zufällig auf und somit wurde angenommen, dass ein evtl. Polymerasefehler auf einem Allel durch das Vorhandensein mehrerer Allele, die den Polymerasefehler nicht besitzen, kompensiert wird. Als weitere Kontrolle der WGAs wurden technische Replikate der WGAs angesetzt, da zufällige Fehler in den verschiedenen WGAs nicht die gleichen Varianten in separaten WGA-Einheiten generieren sollten. Somit sollte die getrennte Analyse der WGA-Einheiten, die Identifizierung möglicher Artefakte in den einzelnen WGA-Einheiten ermöglichen. Leider war die Auswertung der separat analysierten WGA-Einheiten und die anschließende Analyse der gemeinsamen Mutationen nicht eindeutig zu interpretieren. So zeigte sich eine große Heterogenität zwischen den einzelnen WGA-Einheiten eines Falles, was sich in der geringen Anzahl an gemeinsamen Varianten der separat analysierten WGA-Einheiten im Vergleich zu der Auswertung der zusammen analysierten WGA-Einheiten zeigte. Dies deutete eine hohe Anzahl an falsch-positiven Varianten in den einzelnen WGA-Einheiten an. Auch in den Multiplex-PCRs zur Validierung ausgewählter Varianten in den HRS-Zellen dreier Fälle konnte im Fall 2 ein hoher Anteil der nur in einer WGA-Einheit vorkommenden Varianten nicht validiert werden. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist allerdings zu beachten, dass der Fall 2 bereits in der Erfolgskontrolle der WGA und auch in den allgemeinen Sequenzierstatistiken schlechte Qualitäten aufwies. Daher ist es möglich, dass der hohe Anteil an falsch-positiven Varianten durch die schlechtere Qualität der WGA-Produkte des Falls 2 verursacht wurde und die Ergebnisse daher nicht auf die anderen Fälle übertragen werden sollten. Zusätzlich wurde mit der Variante in *NFKBID* auch eine Variante bestätigt, die in nur einer WGA-Einheit gefunden wurde. Eine mögliche Erklärung für die geringe Anzahl an gemeinsamen Varianten in den verschiedenen WGA-Einheiten könnte auch die geringe „Coverage“ der einzelnen WGA-Einheiten sein. So könnten einige Varianten in den unterschiedlichen WGA-Einheiten nicht oder mit wenigen Sequenzen abgedeckt sein, wodurch die Varianten in dieser WGA-Einheit nicht identifiziert werden konnten. Hierbei ist auch zu bedenken, dass für die meisten Fälle faktisch nur zwei WGA-Einheiten separat analysiert wurden, da nur zwei verschiedene Barcodes für die drei WGA-Einheiten verwendet wurden. Daher stellte die gewählte Bedingung, dass eine Variante in beiden WGA-Einheiten auftauchen musste, ein sehr stringentes Filterungskriterium dar. Die Auswertungen zu den rekurrent somatisch mutierten Genen in den HRS-Zellen gaben weitere Hinweise für ein Problem mit vermutlich falsch-positiven Varianten. So waren viele der in mindestens sechs Fällen mutierten Gene, die überprüft wurden, sehr große Gene. Aufgrund ihrer Größe besitzen diese Gene eine höhere Wahrscheinlichkeit von Fehlern in

der WGA und auch in der Exom-Sequenzierung betroffen zu sein. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um richtige Varianten handelt, da bisher keine Validierungen durchgeführt wurden. Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von falsch-positiven Varianten, die bisher nicht weiteruntersucht wurde, war, dass eine Keimbahn-Variante in den NT-Zellen nicht abgedeckt war und daher als somatisch in den HRS-Zellen identifiziert wurde. Dies könnte durch komplexe Vergleiche der Daten der HRS- und NT-Zellen korrigiert werden. Aufgrund all dieser Möglichkeiten für falsch-positive Varianten sind weitere Analysen, wie z.B. die Überprüfung weiterer nur in einer der WGA-Einheiten nachgewiesenen Varianten eines Falles mittels direkter PCR mit mikrodisezierten Zellen und anschließender Sanger-Sequenzierung, notwendig. So könnte das Ausmaß an falschen Varianten genauer erfasst und besser verstanden werden. Anschließend könnten durch verfeinerte Filterkriterien bessere Ergebnisse erzielt werden. Ein weiteres Problem der WGA stellt die Generierung von falsch-negativen Varianten dar. So könnte eine kleine Kontamination mit DNA von NT-Zellen und deren Amplifikation in der WGA eine größere Deletion in den HRS-Zellen überdecken, wodurch die HRS-Zellen unmutiert erscheinen würden. Leider bestand keine Möglichkeit solche Situationen in unseren Analysen zu erkennen.

Eine weitere Einschränkung der in dieser Arbeit durchgeführten Methode zur Identifizierung von somatischen Mutationen in den HRS-Zellen primärer cHL-Fälle bestand in der Wahl der Keimbahn-Kontrolle. Durch Auswahl von Zellen des Mikromilieus der HRS-Zellen handelte es sich bei der Keimbahn-Kontrolle um Zellen des hämatopoetischen Systems. In diesem Zusammenhang wurde allerdings gezeigt, dass einige sehr frühe Mutationen in einigen Lymphomen und Leukämien bereits in einem Teil der hämatopoetischen Stammzellen vorhanden sein können (Quivoron *et al.*, 2011). Daher könnten einige wenige Varianten in den HRS-Zellen durch Verwendung der Zellen des hämatopoetischen Systems als Keimbahn-Kontrolle nicht erkannt werden.

Trotz der Bedenken zur Verwendung der WGA und der Implikationen für die Auswertung der generierten Exom-Daten konnte in dieser Arbeit die Exom-Sequenzierung von mikrodisezierten HRS- und NT-Zellen primärer Fälle des cHLs größtenteils erfolgreich durchgeführt werden. So zeigen die guten Sequenzierstatistiken und die erfolgreiche Validierung der meisten ausgewählten Varianten der HRS-Zellen dreier repräsentativer Fälle die Verlässlichkeit der Daten und die Korrektheit der Auswertungen an. Des Weiteren konnten in den generierten Daten der Exom-Sequenzierung einige somatische Mutationen in Genen, die bereits als rekurrent somatisch mutiert in den HRS-Zellen beschrieben wurden, in den HRS-Zellen einiger der untersuchten Fälle identifiziert werden. Die in dieser Analyse beobachteten Abweichungen in den Mutationsfrequenzen der Fälle in einzelnen Genen im Vergleich zu den Frequenzen in der Literatur lassen sich durch die bisher geringe Anzahl an untersuchten Fällen erklären, da so der Mutationsstatus einzelner Fälle die

Mutationsfrequenz noch stark beeinflusst. So könnten bei den geringen Fallzahlen zunächst durch Zufall mehr unmutierte Fälle eines Gens untersucht worden sein. Durch Erhöhung der Anzahl der untersuchten Fälle sollten sich die Mutationsfrequenzen der Exom-Sequenzierungen mit denen der Literatur angleichen.

Insgesamt deuteten die Auswertungen eine sehr hohe Anzahl an somatischen Mutationen in den HRS-Zellen der verschiedenen cHL-Fälle an. So wurden im Median 1222 somatische Mutationen in den HRS-Zellen der cHL-Fälle nachgewiesen, wobei zu bedenken ist, dass einige genetische Läsionen wie z.B. Translokationen, die meist in intergenischen Regionen auftreten, durch Exom-Sequenzierungen nicht identifiziert werden können und damit die genaue Anzahl an somatischen Mutationen evtl. sogar unterschätzt wurde. Zwischen den Fällen konnte eine große Heterogenität festgestellt werden. Allerdings zeigten zusammengefasste Auswertungen von bisherigen Massiv-Parallel-Sequenzierungen verschiedener Tumorerkrankungen, dass große Unterschiede in der Anzahl der somatischen Mutationen zwischen einzelnen Fällen in vielen Tumorarten auftreten (Vogelstein *et al.*, 2013). Somit stellt dies in den HRS-Zellen vermutlich ein normales Phänomen dar. Bisher konnte für Non-Hodgkin-Lymphome gezeigt werden, dass diese im Median ca. 75 nicht-synonyme Mutationen pro Tumor aufweisen (Vogelstein *et al.*, 2013). Mit im Median 750 nicht-synonymen Mutationen stellte das Kolonkarzinom bisher die am stärksten mutierte Tumorerkrankung dar (Vogelstein *et al.*, 2013). Somit würde die hohe Anzahl an somatischen Mutationen in den HRS-Zellen, sollten diese zutreffen, bedeuten, dass das cHL die am stärksten somatisch mutierte Tumorerkrankung wäre und es sehr viel mehr somatische Mutation aufwiese als andere Lymphomerkrankungen. Dazu passend wurde bereits in zytogenetischen Analysen von HRS-Zellen ein hohes Maß an numerischen und strukturellen chromosomalen Aberrationen gefunden, welches untypisch für viele andere Lymphomerkrankungen ist (Weber-Matthiesen *et al.*, 1995). Der zusätzliche Nachweis vieler subklonaler Aberrationen in den HRS-Zellen deutete eine hohe genetische Instabilität an (Weber-Matthiesen *et al.*, 1995). Die enorme Anzahl an somatischen Mutationen in den Daten der Exom-Sequenzierung könnte diese Annahme weiter unterstützen und eine hohe genetische Instabilität in den HRS-Zellen würde gleichzeitig eine Erklärung für die hohe Anzahl an Mutationen liefern. Dabei würde eine genauere Auswertung der VAFs in den Daten der Exom-Sequenzierung helfen, da niedrigere VAFs auf die Subklonalität einer Mutation hindeuten können. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die VAFs in den Exom-Daten möglicherweise zum einen durch präferentielle Amplifikation eines Allels in der WGA (Hou *et al.*, 2012) und zum anderen aber auch durch eine bessere Anreicherung des unmutierten Allels aufgrund höherer Affinitäten zur Sonde in der Exom-Anreicherung verändert wurde (Sims *et al.*, 2014). Bisher konnte allerdings keine detaillierte Auswertung in Bezug auf die VAFs mit den in dieser Arbeit generierten Exom-Daten durchgeführt werden.

Die Auswertung zu rekurrent somatisch mutierten Genen in den HRS-Zellen primärer Fälle des cHLs identifizierte eine hohe Anzahl an Genen, von denen die meisten nur in einem kleineren Anteil der Fälle mutiert waren. Dies deutet darauf hin, dass eine große genetische Heterogenität zwischen den Fällen besteht und dass unterschiedliche genetische Läsionen in den HRS-Zellen der verschiedenen cHL-Fälle zu den charakteristischen Merkmalen der HRS-Zellen des cHLs, wie z.B. die konstitutive NF- κ B-Aktivität, der Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges und unter anderem auch dem Verlust des B-Zell-Phänotyps, beitragen. Weniger wahrscheinlich scheint, dass das cHL eine charakteristische somatische Mutation aufweist, wie es z.B. in der Haarzell-Leukämie mit Mutationen in *BRAF* der Fall ist (Tiacci *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten in bisherigen Untersuchungen zu genetischen Läsionen in den HRS-Zellen nur in einem Teil der Fälle somatische Mutationen in verschiedenen Genen detektiert werden (Küppers *et al.*, 2012).

In der Studie von Reichel und Kollegen konnte eine erste Exom-Sequenzierung von durchflusszytometrisch angereicherten HRS-Zellen des cHLs durchgeführt werden (Reichel *et al.*, 2015). So konnten ähnlich zu der aktuellen Studie bereits publizierte genetische Läsionen bestätigt werden, aber auch neue somatisch mutierte Gene in den HRS-Zellen beschrieben werden. Ein erster einfacher Vergleich der Ergebnisse der Studie von Reichel und Kollegen mit der aktuellen Studie zeigt in einigen Punkten deutliche Unterschiede. So wurde in der Reichel Arbeit eine mediane Anzahl an somatischen Mutationen von 244 Mutationen pro Fall in den HRS-Zellen gefunden. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit im Median 1222 somatische Mutationen pro Fall in den HRS-Zellen nachgewiesen. Allerdings zeigte sich in beiden Arbeiten eine große Heterogenität zwischen den Fällen. Interessanterweise passt die Anzahl an Mutationen, die in mindestens zwei der separat analysierten WGA-Einheiten identifiziert wurden, besser zu den Ergebnissen der Reichel-Arbeit, was auf viele falsch-positive Varianten in der Exom-Sequenzierung nach WGA hindeuten würde. Dies muss aber wie oben diskutiert noch weiter analysiert werden. Die Diskrepanz zwischen den Arbeiten zeigte sich auch bei der Analyse der rekurrent somatisch mutierten Gene. So wurden 99 unterschiedliche Gene in der Studie von Reichel und Kollegen in mindestens zwei Fällen mutiert gefunden, wohingegen in der aktuellen Arbeit 3821 Gene mit gleichen Suchkriterien identifiziert wurden. Eine mögliche Erklärung der geringen Anzahl identifizierter Varianten in der Studie von Reichel und Kollegen könnte an einer geringen Reinheit der sequenzierten HRS-Zellen liegen, wodurch gerade subklonale Mutationen schlechter nachzuweisen sind. So wurde berichtet, dass die Zellen im Durchschnitt zu 75% angereichert wurden. Dem widersprechend wurden allerdings auch Fälle mit 100% Tumoranteil analysiert, in denen trotzdem weniger Mutationen als in der aktuellen Studie nachgewiesen werden konnten. Weiterhin kann die Anzahl an gefundenen Varianten stark durch die gewählten Filterkriterien in der Variantensuche beeinflusst werden. Leider fehlen genaue Angaben zu den Filterkriterien in der Arbeit von Reichel und Kollegen,

wodurch ein Vergleich nicht möglich war. Eine weitere große Diskrepanz, die sich zwischen den beiden Studien bereits andeutet, ist die Mutationsfrequenz der Fälle in *B2M*. In der Studie von Reichel und Kollegen wurden in sieben von 10 Fällen inaktivierende Mutationen in *B2M* nachgewiesen, wobei es sich bei diesen Fällen ausschließlich um NSHL handelte. Zusätzlich konnte der Verlust der *B2M*-Expression in ca. 60% der cHL-Fällen einer größeren Kohorte mittels immunhistochemischen Färbungen bestätigt werden. In der aktuellen Studie konnten hingegen nur eine „*Missense*“-Mutation und eine Deletion in den HRS-Zellen zweier NSHL-Fälle detektiert werden, wobei insgesamt neun NSHL-Fälle untersucht wurden. Somit entstehen aufgrund der Validierungen des Verlustes der Expression von *B2M* in einer größeren Kohorte von cHL-Fällen Zweifel an der Richtigkeit der in der aktuellen Arbeit generierten Daten der Exom-Sequenzierung. Weitere Analysen sind notwendig um die Ursachen dieser Diskrepanzen zwischen den zwei Studien zur Exom-Sequenzierung der HRS-Zellen besser zu verstehen. So könnte die Sequenzierung nach Sanger von PCR-Produkten von *B2M* aus mikrodisektierten Zellen der in dieser Arbeit analysierten Fälle klären, ob die Exom-Sequenzierung der vermeintlich unmutierten Fälle richtig waren oder ob Fehler aufgetreten sind. Auch könnten weiterführende Vergleiche der beiden Datensätze der Exom-Sequenzierung bzgl. gemeinsam mutierter und getrennt mutierter Gene ein besseres Verständnis der Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Studien hervorbringen. Durch diese Analysen könnten auch Gene identifiziert werden, die in den getrennten Auswertungen bisher nicht mit der Pathogenese des cHLs assoziiert wurden. Zusätzlich könnten auch die Daten der Exom-Sequenzierungen der cHL-Zelllinien verwendet werden, um Kandidaten für weiterführende Untersuchungen zu identifizieren (Liu *et al.*, 2014).

In nachfolgenden Analysen wird es zunächst wichtig sein, die Richtigkeit und Verlässlichkeit der in dieser Arbeit generierten Daten weiter zu charakterisieren. So könnten weitere Validierungen von identifizierten Varianten durch direkte PCRs und Sanger-Sequenzierungen von mikrodisektierten Zellen helfen, die Exom-Daten besser zu verstehen. Dadurch könnten bessere Filterkriterien gefunden werden, um falsch-positive Varianten besser ausschließen zu können. Weiterführend könnten „*Gene Ontology*“-Analysen helfen aus der Masse an rekurrent somatisch mutierten Gene in den HRS-Zellen Kandidatengene für weiterführende Untersuchungen zu identifizieren. So könnten bislang unentdeckte an der Pathogenese des cHLs beteiligte Gene aufgedeckt werden. Generell sollten in Zukunft auch weitere Fälle sequenziert werden, um die Analysen zu verfeinern. Dabei sollte beachtet werden, dass die Verteilung der bisher untersuchten cHL-Fälle bzgl. des Subtyps des cHLs und auch des EBV-Status nicht den tatsächlichen Inzidenzen entspricht. So sind im Moment z.B. NSHL-Fälle überrepräsentiert und EBV-positive Fälle unterrepräsentiert. Des Weiteren könnte in Zukunft die Suche nach Mutationssignaturen in den HRS-Zellen des cHLs interessant sein, da gezeigt worden ist, dass ein Teil der

Mutationen in verschiedenen Tumorarten gleiche Eigenschaften aufweist und durch gleiche Mechanismen, wie z.B. Fehler in der DNA-Reparatur oder AID-induziert, verursacht werden (Alexandrov *et al.*, 2013). Aufgrund des viel größeren Informationsgehaltes wäre es für diese Analysen auch sinnvoll Gesamt-Genom-Sequenzierungen einzelner Fälle des cHLs durchzuführen. Diese würden außerdem die Suche nach Translokationen und evtl. an der Pathogenese beteiligter Viren ermöglichen. Somit könnte die umfassende Charakterisierung der genetischen Läsionen der HRS-Zellen des cHLs verfeinert und neue an der Pathogenese des cHLs beteiligte Faktoren identifiziert werden. Dies könnte letztendlich auch in der Entwicklung von neuen oder verbesserten Therapieansätzen resultieren.

5 Zusammenfassung

Obwohl in den letzten Jahren bereits einige beteiligte Faktoren und Mechanismen der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) aufgeklärt wurden, ist sie bis heute größtenteils noch unbekannt. Um ein besseres Verständnis der Biologie des cHLs zu erlangen, wurden in dieser Dissertation drei Studien zu weiteren molekularen Mechanismen, die an der Pathogenese des cHLs beteiligt sind, durchgeführt.

Im ersten Teil wurde die Rolle von MYC in der Pathogenese des cHL analysiert. MYC ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Zelle und an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt. Als starkes Onkogen ist es an der Pathogenese verschiedenster humaner Tumorerkrankungen beteiligt. Auch in den Hodgkin- und Reed-Sternberg (HRS)-Zellen einiger Fälle des cHLs konnte eine erhöhte MYC-Ausprägung auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Um die pathogenetische Bedeutung dieser aberrant erhöhten MYC-Expression in den HRS-Zellen des cHLs zu untersuchen, wurde MYC in den cHL-Zelllinien L-428 und U-HO1 mittels eines lentiviralen Systems zur shRNA-Expression erfolgreich herabreguliert und die Konsequenzen auf den Phänotyp der transduzierten Zellen bestimmt. In beiden Zelllinien führte die MYC-Herabregulation zu einem schlechteren kompetitiven Wachstum der Zellen gegenüber nicht infizierten Zellen. Weiterführende Analysen zeigten, dass MYC in der Linie L-428 sowohl die Proliferation der Zellen als auch das Überleben positiv reguliert, wohingegen in der Linie U-HO1 der proliferationsfördernde Effekt von MYC dominiert und das Zellüberleben durch MYC-Herabregulation verbessert wurde. Zusätzlich scheint MYC an der Regulation der Expression einzelner Gene, die typischerweise in den HRS-Zellen primärer cHL-Fälle ausgeprägt werden, beteiligt zu sein. So konnte eine positive Regulation von *CEBPB* durch MYC in der Linie L-428 gezeigt werden, wohingegen MYC in der Zelllinie U-HO1 die Ausprägung von *IRF5* und *PAX5* vermutlich negativ reguliert.

In einem weiteren Projekt wurde die Rolle von *CEBPB* in der Pathogenese des cHLs untersucht. *CEBPB* ist ein pleiotropher Transkriptionsfaktor, der verschiedene zelluläre Prozesse reguliert. Für *CEBPB* wurde eine wichtige Beteiligung an der Proliferation und dem Überleben der Tumorzellen des Multiplen Myeloms und des anaplastisch großzelligem Lymphoms gezeigt. Auch in HRS-Zellen primärer cHL-Fälle konnte eine aberrant erhöhte *CEBPB*-Ausprägung im Vergleich zu normalen B-Zellpopulationen mittels Genexpressionsprofilen nachgewiesen werden. Daher wurde *CEBPB* mittels eines lentiviralen Systems zur shRNA-Expression in cHL-Zelllinien erfolgreich herabreguliert, um die Konsequenzen dieser *CEBPB*-Herabregulation auf den Phänotyp der Zellen zu studieren und dadurch mehr über die Bedeutung der erhöhten *CEBPB*-Expression in der Pathogenese des cHLs zu erfahren. Die Herbaregulation von *CEBPB* hatte in den cHL-Zelllinien keinen Einfluss auf die Proliferation oder das Überleben der Zellen. Allerdings konnte in verschiedenen cHL-Zelllinien die Regulation von *CEBPB*-Zielgenen, wie *IL6* und *BCL2A1*, in Folge der *CEBPB*-Herabregulation nachgewiesen werden. Obwohl HRS-Zellen von B-Zellen

abstammen, weisen sie typischerweise einen weitreichenden Verlust ihres B-Zell-Phänotyps auf. Da eine verstärkte Ausprägung von CEBPB zur Transdifferenzierung oder Umprogrammierung von B-Zellen in Makrophagen führen kann, wurde die Rolle von CEBPB in der Umprogrammierung der HRS-Zellen genauer untersucht. Allerdings zeigte sich nach CEBPB-Herabregulation in den verschiedenen cHL-Zelllinien ein heterogenes Bild in der Regulation von B-Zellgenen. Dennoch scheint die erhöhte CEBPB-Expression in den HRS-Zellen in einem Teil der primären HRS-Fälle zu dem Verlust des B-Zell-Phänotyps beitragen zu können.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde mit der umfassenden Charakterisierung der genetischen Läsionen der HRS-Fälle primärer cHL-Fälle begonnen. Aufgrund der Seltenheit der HRS-Zellen im Lymphomgewebe wurde zunächst eine Methode zur Exom-Sequenzierung ausgehend von mikrodisssektierten Zellen etabliert. Anschließend konnten 11 primäre cHL-Fälle erfolgreich sequenziert werden. Insgesamt zeigte sich eine hohe Anzahl von durchschnittlich 1222 somatischen Mutationen in den HRS-Zellen, was eine hohe genetische Instabilität in den HRS-Zellen andeutet. Indem 16 von 21 ausgewählten Mutationen in den HRS-Zellen dreier cHL-Fälle erfolgreich mittels direkter PCR mit mikrodisssektierten Zellen und Sanger-Sequenzierung validiert wurden, konnte die Zuverlässigkeit der Auswertung bestätigt werden. Zusätzlich wurden in ersten Analysen viele rekurrent in den HRS-Zellen somatisch mutierte Gene identifiziert, deren Bedeutung in der Pathogenese des cHLs in zukünftigen Studien untersucht werden sollte.

6 Literaturverzeichnis

- Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T. & Kishimoto T. (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J*, **9**, 1897-1906.
- Aldinucci D., Celegato M., Borghese C., Colombatti A. & Carbone A. (2011) IRF4 silencing inhibits Hodgkin lymphoma cell proliferation, survival and CCL5 secretion. *Br J Haematol*, **152**, 182-190.
- Aldinucci D., Lorenzon D., Cattaruzza L., Pinto A., Gloghini A., Carbone A. & Colombatti A. (2008) Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer*, **122**, 769-776.
- Aldinucci D., Rapana B., Olivo K., Lorenzon D., Gloghini A., Colombatti A. & Carbone A. (2010) IRF4 is modulated by CD40L and by apoptotic and anti-proliferative signals in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, **148**, 115-118.
- Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Borresen-Dale A.L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjord J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilcic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jager N., Jones D.T., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., Lopez-Otin C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N., Valdes-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome I., Consortium I.B.C., Consortium I.M.-S., PedBrain I., Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J. & Stratton M.R. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, **500**, 415-421.
- Amati B., Dalton S., Brooks M.W., Littlewood T.D., Evan G.I. & Land H. (1992) Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature*, **359**, 423-426.
- Ammerpohl O., Haake A., Pellissery S., Giefing M., Richter J., Balint B., Kulis M., Le J., Bibikova M., Drexler H.G., Seifert M., Shaknovic R., Korn B., Küppers R., Martin-Subero J.I. & Siebert R. (2012) Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. *Leukemia*, **26**, 185-188.
- Anastasov N., Bonzheim I., Rudelius M., Klier M., Dau T., Angermeier D., Duyster J., Pittaluga S., Fend F., Raffeld M. & Quintanilla-Martinez L. (2010) C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica*, **95**, 760-767.
- Ansell S.M., Lesokhin A.M., Borrello I., Halwani A., Scott E.C., Gutierrez M., Schuster S.J., Millenson M.M., Cattray D., Freeman G.J., Rodig S.J., Chapuy B., Ligon A.H., Zhu L., Grosso J.F., Kim S.Y., Timmerman J.M., Shipp M.A. & Armand P. (2015) PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **372**, 311-319.
- Armitage J.O. (2010) Early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **363**, 653-662.
- Babaian A., Romanish M.T., Gagnier L., Kuo L.Y., Karimi M.M., Steidl C. & Mager D.L. (2015) Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma. *Oncogene* (Im Druck).
- Bargou R.C., Emmerich F., Krappmann D., Bommert K., Mapara M.Y., Arnold W., Royer H.D., Grinstein E., Greiner A., Scheiderei C. & Dorken B. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, **100**, 2961-2969.
- Barth T.F., Martin-Subero J.I., Joos S., Menz C.K., Hasel C., Mechttersheimer G., Parwaresch R.M., Lichter P., Siebert R. & Moeller P. (2003) Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **101**, 3681-3686.
- Basso K. & Dalla-Favera R. (2015) Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, **15**, 172-184.
- Baumforth K.R., Birgersdotter A., Reynolds G.M., Wei W., Kapatai G., Flavell J.R., Kalk E., Piper K., Lee S., Machado L., Hadley K., Sundblad A., Sjoberg J., Bjorkholm M., Porwit A.A., Yap L.F., Teo S., Grundy R.G., Young L.S., Ernberg I., Woodman C.B. & Murray P.G. (2008) Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol*, **173**, 195-204.
- Baus D. & Pfitzner E. (2006) Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int J Cancer*, **118**, 1404-1413.
- Bechtel D., Kurth J., Unkel C. & Küppers R. (2005) Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*, **106**, 4345-4350.

- Begay V., Smink J.J., Loddenkemper C., Zimmermann K., Rudolph C., Scheller M., Steinemann D., Leser U., Schlegelberger B., Stein H. & Leutz A. (2015) Deregulation of the endogenous C/EBPbeta LIP isoform predisposes to tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)*, **93**, 39-49.
- Benassayag C., Montero L., Colombie N., Gallant P., Cribbs D. & Morello D. (2005) Human c-Myc isoforms differentially regulate cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **25**, 9897-9909.
- Blackwell T.K. & Alt F.W. (1984) Site-specific recombination between immunoglobulin D and JH segments that were introduced into the genome of a murine pre-B cell line. *Cell*, **37**, 105-112.
- Blackwood E.M. & Eisenman R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, **251**, 1211-1217.
- Blackwood E.M., Lugo T.G., Kretzner L., King M.W., Street A.J., Witte O.N. & Eisenman R.N. (1994) Functional analysis of the AUG- and CUG-initiated forms of the c-Myc protein. *Mol Biol Cell*, **5**, 597-609.
- Bohle V., Döring C., Hansmann M.L. & Küppers R. (2013) Role of early B-cell factor 1 (EBF1) in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, **27**, 671-679.
- Bonzheim I., Irmeler M., Klier-Richter M., Steinhilber J., Anastasov N., Schafer S., Adam P., Beckers J., Raffeld M., Fend F. & Quintanilla-Martinez L. (2013) Identification of C/EBPbeta target genes in ALK+ anaplastic large cell lymphoma (ALCL) by gene expression profiling and chromatin immunoprecipitation. *PLoS One*, **8**, e64544.
- Bräuninger A., Hansmann M.L., Strickler J.G., Dummer R., Burg G., Rajewsky K. & Küppers R. (1999) Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, **340**, 1239-1247.
- Bräuninger A., Küppers R., Strickler J.G., Wacker H.H., Rajewsky K. & Hansmann M.L. (1997) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9337-9342.
- Bräuninger A., Schmitz R., Bechtel D., Renne C., Hansmann M.L. & Küppers R. (2006) Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, **118**, 1853-1861.
- Bräuninger A., Wacker H.H., Rajewsky K., Küppers R. & Hansmann M.L. (2003) Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, **63**, 1644-1651.
- Bretones G., Delgado M.D. & Leon J. (2015) Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*, **1849**, 506-516.
- Brummelkamp T.R., Bernards R. & Agami R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Brune V., Tiacci E., Pfeil I., Döring C., Eckerle S., van Noesel C.J., Klapper W., Falini B., von Heydebreck A., Metzler D., Bräuninger A., Hansmann M.L. & Küppers R. (2008) Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med*, **205**, 2251-2268.
- Cabannes E., Khan G., Aillet F., Jarrett R.F. & Hay R.T. (1999) Mutations in the Ikbalpha gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for Ikbalpha. *Oncogene*, **18**, 3063-3070.
- Calado D.P., Sasaki Y., Godinho S.A., Pellerin A., Kochert K., Sleckman B.P., de Alboran I.M., Janz M., Rodig S. & Rajewsky K. (2012) The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol*, **13**, 1092-1100.
- Caldwell R.G., Wilson J.B., Anderson S.J. & Longnecker R. (1998) Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, **9**, 405-411.
- Calkhoven C.F., Muller C. & Leutz A. (2000) Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev*, **14**, 1920-1932.
- Carbone A., Ghoghini A., Gruss H.J. & Pinto A. (1995) CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **147**, 912-922.
- Carter P.S., Jarquin-Pardo M. & De Benedetti A. (1999) Differential expression of Myc1 and Myc2 isoforms in cells transformed by eIF4E: evidence for internal ribosome repositioning in the human c-myc 5'UTR. *Oncogene*, **18**, 4326-4335.
- Casellas R., Shih T.A., Kleinewietfeld M., Rakonjac J., Nemazee D., Rajewsky K. & Nussenzweig M.C. (2001) Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science*, **291**, 1541-1544.
- Cattaruzza L., Ghoghini A., Olivo K., Di Francia R., Lorenzon D., De Filippi R., Carbone A., Colombatti A., Pinto A. & Aldinucci D. (2009) Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, **125**, 1092-1101.
- Cattoretti G. (2013) MYC expression and distribution in normal mature lymphoid cells. *J Pathol*, **229**, 430-440.
- Chaganti S., Bell A.I., Pastor N.B., Milner A.E., Drayson M., Gordon J. & Rickinson A.B. (2005) Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*, **106**, 4249-4252.

- Chaganti S., Heath E.M., Bergler W., Kuo M., Buettner M., Niedobitek G., Rickinson A.B. & Bell A.I. (2009) Epstein-Barr virus colonization of tonsillar and peripheral blood B-cell subsets in primary infection and persistence. *Blood*, **113**, 6372-6381.
- Challa-Malladi M., Lieu Y.K., Califano O., Holmes A.B., Bhagat G., Murty V.V., Dominguez-Sola D., Pasqualucci L. & Dalla-Favera R. (2011) Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, **20**, 728-740.
- Chemnitz J.M., Driesen J., Classen S., Riley J.L., Debey S., Beyer M., Popov A., Zander T. & Schultze J.L. (2006) Prostaglandin E2 impairs CD4+ T cell activation by inhibition of Ick: implications in Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, **66**, 1114-1122.
- Chen X., Liu W., Ambrosino C., Ruocco M.R., Poli V., Romani L., Quinto I., Barbieri S., Holmes K.L., Venuta S. & Scala G. (1997) Impaired generation of bone marrow B lymphocytes in mice deficient in C/EBPbeta. *Blood*, **90**, 156-164.
- Chisholm K.M., Bangs C.D., Bacchi C.E., Molina-Kirsch H., Cherry A. & Natkunam Y. (2015) Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol*, **39**, 294-303.
- Chiu A., Xu W., He B., Dillon S.R., Gross J.A., Sievers E., Qiao X., Santini P., Hyjek E., Lee J.W., Cesarman E., Chadburn A., Knowles D.M. & Cerutti A. (2007) Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. *Blood*, **109**, 729-739.
- Cole M.D. & Cowling V.H. (2008) Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 810-815.
- Corbett S.J., Tomlinson I.M., Sonnhammer E.L., Buck D. & Winter G. (1997) Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol*, **270**, 587-597.
- Dang C.V. (2012) MYC on the path to cancer. *Cell*, **149**, 22-35.
- Dang C.V., O'Donnell K.A., Zeller K.I., Nguyen T., Osthus R.C. & Li F. (2006) The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*, **16**, 253-264.
- Dani C., Blanchard J.M., Piechaczyk M., El Sabouty S., Marty L. & Jeanteur P. (1984) Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 7046-7050.
- de Bourcy C.F., De Vlaminc I., Kanbar J.N., Wang J., Gawad C. & Quake S.R. (2014) A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PLoS One*, **9**, e105585.
- De Silva N.S. & Klein U. (2015) Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*, **15**, 137-148.
- Descombes P. & Schibler U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, **67**, 569-579.
- 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. (2007) 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.
- Dimitrova L., Seitz V., Hecht J., Lenze D., Hansen P., Szczepanowski M., Ma L., Oker E., Sommerfeld A., Jundt F., Klapper W. & Hummel M. (2014) PAX5 overexpression is not enough to reestablish the mature B-cell phenotype in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, **28**, 213-216.
- Doerr J.R., Malone C.S., Fike F.M., Gordon M.S., Soghomonian S.V., Thomas R.K., Tao Q., Murray P.G., Diehl V., Teitell M.A. & Wall R. (2005) Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J Mol Biol*, **350**, 631-640.
- Dominguez-Sola D., Victoria G.D., Ying C.Y., Phan R.T., Saito M., Nussenzweig M.C. & Dalla-Favera R. (2012) The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol*, **13**, 1083-1091.
- Drexler H.G., Gaedicke G., Lok M.S., Diehl V. & Minowada J. (1986) Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res*, **10**, 487-500.
- Dukers D.F., van Galen J.C., Giroth C., Jansen P., Sewalt R.G., Otte A.P., Kluin-Nelemans H.C., Meijer C.J. & Raaphorst F.M. (2004) Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Am J Pathol*, **164**, 873-881.
- Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D. & Naldini L. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, **72**, 8463-8471.
- Dutton A., Reynolds G.M., Dawson C.W., Young L.S. & Murray P.G. (2005) Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol*, **205**, 498-506.
- Dutton A., Woodman C.B., Chukwuma M.B., Last J.I., Wei W., Vockerodt M., Baumforth K.R., Flavell J.R., Rowe M., Taylor A.M., Young L.S. & Murray P.G. (2007) Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood*, **109**, 2597-2603.

- Emmerich F., Meiser M., Hummel M., Demel G., Foss H.D., Jundt F., Mathas S., Krappmann D., Scheidereit C., Stein H. & Dorken B. (1999) Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood*, **94**, 3129-3134.
- Emmerich F., Theurich S., Hummel M., Haeffker A., Vry M.S., Dohner K., Bommert K., Stein H. & Dorken B. (2003) Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol*, **201**, 413-420.
- Engert A., Younes, A. (eds.) (2015) *Hodgkin lymphoma. A comprehensive overview. Second edition.* Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland.
- Ferlay J S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. France: International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Feuerborn A., Moritz C., Von Bonin F., Dobbelsstein M., Trumper L., Sturzenhofecker B. & Kube D. (2006) Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*, **47**, 1932-1940.
- Fischer M., Juremalm M., Olsson N., Backlin C., Sundstrom C., Nilsson K., Enblad G. & Nilsson G. (2003) Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer*, **107**, 197-201.
- Flavell J.R., Baumforth K.R., Wood V.H., Davies G.L., Wei W., Reynolds G.M., Morgan S., Boyce A., Kelly G.L., Young L.S. & Murray P.G. (2008) Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood*, **111**, 292-301.
- Foss H.D., Reusch R., Demel G., Lenz G., Anagnostopoulos I., Hummel M. & Stein H. (1999) Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*, **94**, 3108-3113.
- Fouchier R.A., Meyer B.E., Simon J.H., Fischer U. & Malim M.H. (1997) HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO J*, **16**, 4531-4539.
- Fromm J.R., Kussick S.J. & Wood B.L. (2006) Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am J Clin Pathol*, **126**, 764-780.
- Gabay M., Li Y. & Felsher D.W. (2014) MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **4**.
- Gandhi M.K., Moll G., Smith C., Dua U., Lambley E., Ramuz O., Gill D., Marlton P., Seymour J.F. & Khanna R. (2007) Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, **110**, 1326-1329.
- Garber M., Yosef N., Goren A., Raychowdhury R., Thielke A., Guttman M., Robinson J., Minie B., Chevrier N., Itzhaki Z., Blecher-Gonen R., Bornstein C., Amann-Zalcenstein D., Weiner A., Friedrich D., Meldrim J., Ram O., Cheng C., Gnirke A., Fisher S., Friedman N., Wong B., Bernstein B.E., Nusbaum C., Hacohen N., Regev A. & Amit I. (2012) A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol Cell*, **47**, 810-822.
- Geller S.A. (1984) Comments on the anniversary of the description of Hodgkin's disease. *J Natl Med Assoc*, **76**, 815-817.
- Georgakis G.V., Li Y., Rassidakis G.Z., Medeiros L.J., Mills G.B. & Younes A. (2006) Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, **132**, 503-511.
- Gibcus J.H., Tan L.P., Harms G., Schakel R.N., de Jong D., Blokzijl T., Moller P., Poppema S., Kroesen B.J. & van den Berg A. (2009) Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia*, **11**, 167-176.
- Glimelius I., Edstrom A., Amini R.M., Fischer M., Nilsson G., Sundstrom C., Enblad G. & Molin D. (2006) IL-9 expression contributes to the cellular composition in Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*, **76**, 278-283.
- Goldin L.R., McMaster M.L., Ter-Minassian M., Saddlemire S., Harmsen B., Lalonde G. & Tucker M.A. (2005) A genome screen of families at high risk for Hodgkin lymphoma: evidence for a susceptibility gene on chromosome 4. *J Med Genet*, **42**, 595-601.
- Gomis R.R., Alarcon C., Nadal C., Van Poznak C. & Massague J. (2006) C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell*, **10**, 203-214.
- Goodnow C.C., Crosbie J., Adelstein S., Lavoie T.B., Smith-Gill S.J., Brink R.A., Pritchard-Briscoe H., Wotherspoon J.S., Loblay R.H., Raphael K. & et al. (1988) Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, **334**, 676-682.
- Goossens T., Klein U. & Küppers R. (1998) Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2463-2468.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. & Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.

- Graubner B. (2014) *ICD-10-GM 2015 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme*. Deutscher Ärzte-Verlag.
- Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F. & Kay M.A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, **441**, 537-541.
- Gunawardana J., Chan F.C., Telenius A., Woolcock B., Kridel R., Tan K.L., Ben-Neriah S., Mottok A., Lim R.S., Boyle M., Rogic S., Rimsza L.M., Guiter C., Leroy K., Gaulard P., Haioun C., Marra M.A., Savage K.J., Connors J.M., Shah S.P., Gascoyne R.D. & Steidl C. (2014) Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet*, **46**, 329-335.
- Habib T., Park H., Tsang M., de Alboran I.M., Nicks A., Wilson L., Knoepfler P.S., Andrews S., Rawlings D.J., Eisenman R.N. & Iritani B.M. (2007) Myc stimulates B lymphocyte differentiation and amplifies calcium signaling. *J Cell Biol*, **179**, 717-731.
- Hacker C., Kirsch R.D., Ju X.S., Hieronymus T., Gust T.C., Kuhl C., Jorgas T., Kurz S.M., Rose-John S., Yokota Y. & Zenke M. (2003) Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol*, **4**, 380-386.
- Hanamoto H., Nakayama T., Miyazato H., Takegawa S., Hieshima K., Tatsumi Y., Kanamaru A. & Yoshie O. (2004) Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am J Pathol*, **164**, 997-1006.
- Hann S.R., Dixit M., Sears R.C. & Sealy L. (1994) The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site. *Genes Dev*, **8**, 2441-2452.
- Hann S.R. & Eisenman R.N. (1984) Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol*, **4**, 2486-2497.
- Hann S.R., Sloan-Brown K. & Spotts G.D. (1992) Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev*, **6**, 1229-1240.
- Heckman C.A., Wheeler M.A. & Boxer L.M. (2003) Regulation of Bcl-2 expression by C/EBP in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*, **22**, 7891-7899.
- Herbst H., Foss H.D., Samol J., Araujo I., Klotzbach H., Krause H., Agathangelou A., Niedobitek G. & Stein H. (1996) Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood*, **87**, 2918-2929.
- Hinz M., Lemke P., Anagnostopoulos I., Hacker C., Krappmann D., Mathas S., Dorken B., Zenke M., Stein H. & Scheidereit C. (2002) 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.
- Hirai H., Zhang P., Dayaram T., Hetherington C.J., Mizuno S., Imanishi J., Akashi K. & Tenen D.G. (2006) C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol*, **7**, 732-739.
- Hirsch B., Hummel M., Bentink S., Fouladi F., Spang R., Zollinger R., Stein H. & Durkop H. (2008) CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am J Pathol*, **172**, 510-520.
- Hodgkin (1832) On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*, **17**, 68-114.
- Holien T., Vatsveen T.K., Hella H., Waage A. & Sundan A. (2012) Addiction to c-MYC in multiple myeloma. *Blood*, **120**, 2450-2453.
- Hou Y., Song L., Zhu P., Zhang B., Tao Y., Xu X., Li F., Wu K., Liang J., Shao D., Wu H., Ye X., Ye C., Wu R., Jian M., Chen Y., Xie W., Zhang R., Chen L., Liu X., Yao X., Zheng H., Yu C., Li Q., Gong Z., Mao M., Yang X., Yang L., Li J., Wang W., Lu Z., Gu N., Laurie G., Bolund L., Kristiansen K., Wang J., Yang H., Li Y., Zhang X. & Wang J. (2012) Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell*, **148**, 873-885.
- Hsu C.L., King-Fleischman A.G., Lai A.Y., Matsumoto Y., Weissman I.L. & Kondo M. (2006) Antagonistic effect of CCAAT enhancer-binding protein-alpha and Pax5 in myeloid or lymphoid lineage choice in common lymphoid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 672-677.
- Hu M., Krause D., Greaves M., Sharkis S., Dexter M., Heyworth C. & Enver T. (1997) Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev*, **11**, 774-785.
- Huang X., van den Berg A., Gao Z., Visser L., Nolte I., Vos H., Hepkema B., Kooistra W., Poppema S. & Diepstra A. (2010) Expression of HLA class I and HLA class II by tumor cells in Chinese classical Hodgkin lymphoma patients. *PLoS One*, **5**, e10865.
- Huber R., Pietsch D., Panterodt T. & Brand K. (2012) Regulation of C/EBPbeta and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cell Signal*, **24**, 1287-1296.
- Irsch J., Nitsch S., Hansmann M.L., Rajewsky K., Tesch H., Diehl V., Jox A., Küppers R. & Radbruch A. (1998) Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10117-10122.
- Irsch J., Wolf J., Tesch H., Diehl V., Radbruch A. & Staratschek-Jox A. (2001) Class switch recombination was specifically targeted to immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's disease-derived cell lines. *Br J Haematol*, **113**, 785-793.

- Ji H., Wu G., Zhan X., Nolan A., Koh C., De Marzo A., Doan H.M., Fan J., Cheadle C., Fallahi M., Cleveland J.L., Dang C.V. & Zeller K.I. (2011) Cell-type independent MYC target genes reveal a primordial signature involved in biomass accumulation. *PLoS One*, **6**, e26057.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A. & Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816-821.
- Joos S., Granzow M., Holtgreve-Grez H., Siebert R., Harder L., Martin-Subero J.I., Wolf J., Adamowicz M., Barth T.F., Lichter P. & Jauch A. (2003) Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer*, **103**, 489-495.
- Joos S., Kupper M., Ohl S., von Bonin F., Mechttersheimer G., Bentz M., Marynen P., Moller P., Pfreundschuh M., Trumper L. & Lichter P. (2000) Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res*, **60**, 549-552.
- Joos S., Menz C.K., Wrobel G., Siebert R., Gesk S., Ohl S., Mechttersheimer G., Trumper L., Moller P., Lichter P. & Barth T.F. (2002) Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*, **99**, 1381-1387.
- Jundt F., Acikgoz O., Kwon S.H., Schwarzer R., Anagnostopoulos I., Wiesner B., Mathas S., Hummel M., Stein H., Reichardt H.M. & Dorken B. (2008) Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, **22**, 1587-1594.
- Jundt F., Anagnostopoulos I., Forster R., Mathas S., Stein H. & Dorken B. (2002) Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, **99**, 3398-3403.
- Jundt F., Raetzl N., Muller C., Calkhoven C.F., Kley K., Mathas S., Lietz A., Leutz A. & Dorken B. (2005) A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein {beta} and NF- κ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas. *Blood*, **106**, 1801-1807.
- Jungnickel B., Staratschek-Jox A., Bräuninger A., Spieker T., Wolf J., Diehl V., Hansmann M.L., Rajewsky K. & Küppers R. (2000) Clonal deleterious mutations in the I κ B gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med*, **191**, 395-402.
- Juszczynski P., Ouyang J., Monti S., Rodig S.J., Takeyama K., Abramson J., Chen W., Kutok J.L., Rabinovich G.A. & Shipp M.A. (2007) The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13134-13139.
- Kadin M.E., Agnarsson B.A., Ellingsworth L.R. & Newcom S.R. (1990) Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **136**, 1209-1214.
- Kamesaki H., Fukuhara S., Tatsumi E., Uchino H., Yamabe H., Miwa H., Shirakawa S., Hatanaka M. & Honjo T. (1986) Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*, **68**, 285-292.
- Kanzler H., Hansmann M.L., Kapp U., Wolf J., Diehl V., Rajewsky K. & Küppers R. (1996a) Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood*, **87**, 3429-3436.
- Kanzler H., Küppers R., Hansmann M.L. & Rajewsky K. (1996b) 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.
- Kapp U., Wolf J., Hummel M., Pawlita M., von Kalle C., Dallenbach F., Schwonzen M., Krueger G.R., Muller-Lantzsch N., Fonatsch C. & et al. (1993) Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Blood*, **82**, 1247-1256.
- Kapp U., Yeh W.C., Patterson B., Elia A.J., Kagi D., Ho A., Hessel A., Tipword M., Williams A., Mirsos C., Itie A., Moyle M. & Mak T.W. (1999) Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med*, **189**, 1939-1946.
- Kato M., Sanada M., Kato I., Sato Y., Takita J., Takeuchi K., Niwa A., Chen Y., Nakazaki K., Nomoto J., Asakura Y., Muto S., Tamura A., Iio M., Akatsuka Y., Hayashi Y., Mori H., Igarashi T., Kurokawa M., Chiba S., Mori S., Ishikawa Y., Okamoto K., Tobinai K., Nakagama H., Nakahata T., Yoshino T., Kobayashi Y. & Ogawa S. (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*, **459**, 712-716.
- Katz J., Janik J.E. & Younes A. (2011) Brentuximab Vedotin (SGN-35). *Clin Cancer Res*, **17**, 6428-6436.
- Kilger E., Kieser A., Baumann M. & Hammerschmidt W. (1998) Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, **17**, 1700-1709.
- Klein E., Klein G., Nadkarni J.S., Nadkarni J.J., Wigzell H. & Clifford P. (1968) Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res*, **28**, 1300-1310.
- Knight S., Collins M. & Takeuchi Y. (2013) Insertional mutagenesis by retroviral vectors: current concepts and methods of analysis. *Curr Gene Ther*, **13**, 211-227.
- Kochert K., Ullrich K., Kreher S., Aster J.C., Kitagawa M., Johrens K., Anagnostopoulos I., Jundt F., Lamprecht B., Zimmer-Strobl U., Stein H., Janz M., Dorken B. & Mathas S. (2011) High-level

- expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*, **30**, 1831-1840.
- Kocks C. & Rajewsky K. (1989) Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol*, **7**, 537-559.
- Kolar G.R., Mehta D., Pelayo R. & Capra J.D. (2007) A novel human B cell subpopulation representing the initial germinal center population to express AID. *Blood*, **109**, 2545-2552.
- Kowenz-Leutz E. & Leutz A. (1999) A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol Cell*, **4**, 735-743.
- Kreher S., Bouhrel M.A., Cauchy P., Lamprecht B., Li S., Grau M., Hummel F., Kochert K., Anagnostopoulos I., Johrens K., Hummel M., Hiscott J., Wenzel S.S., Lenz P., Schneider M., Küppers R., Scheidereit C., Giefing M., Siebert R., Rajewsky K., Lenz G., Cockerill P.N., Janz M., Dorken B., Bonifer C. & Mathas S. (2014) Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, E4513-4522.
- Kretzner L., Blackwood E.M. & Eisenman R.N. (1992) Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. *Nature*, **359**, 426-429.
- Kube D., Holtick U., Vockerodt M., Ahmadi T., Haier B., Behrmann I., Heinrich P.C., Diehl V. & Tesch H. (2001) STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*, **98**, 762-770.
- Kulwichit W., Edwards R.H., Davenport E.M., Baskar J.F., Godfrey V. & Raab-Traub N. (1998) Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11963-11968.
- Kupper M., Joos S., von Bonin F., Daus H., Pfreundschuh M., Lichter P. & Trumper L. (2001) MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. *Br J Haematol*, **112**, 768-775.
- Küppers R. (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, **3**, 801-812.
- Küppers R. (2009) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*, **9**, 15-27.
- Küppers R. (2012) New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2012**, 328-334.
- Küppers R., Dührsen U. & Hansmann M.L. (2014) Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *Lancet Oncol*, **15**, e435-446.
- Küppers R., Engert A. & Hansmann M.L. (2012) Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, **122**, 3439-3447.
- Küppers R., Klein U., Hansmann M.L. & Rajewsky K. (1999) Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, **341**, 1520-1529.
- Küppers R., Klein U., Schwering I., Distler V., Bräuninger A., Cattoretti G., Tu Y., Stolovitzky G.A., Califano A., Hansmann M.L. & Dalla-Favera R. (2003) Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest*, **111**, 529-537.
- Küppers R., Rajewsky K., Zhao M., Simons G., Laumann R., Fischer R. & Hansmann M.L. (1994) Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10962-10966.
- Kurreck J. (2006) siRNA efficiency: structure or sequence-that is the question. *J Biomed Biotechnol*, **2006**, 83757.
- Kuzu I., Delsol G., Jones M., Gatter K.C. & Mason D.Y. (1993) Expression of the Ig-associated heterodimer (mb-1 and B29) in Hodgkin's disease. *Histopathology*, **22**, 141-144.
- Lake A., Shield L.A., Cordano P., Chui D.T., Osborne J., Crae S., Wilson K.S., Tosi S., Knight S.J., Gesk S., Siebert R., Hay R.T. & Jarrett R.F. (2009) Mutations of NFKBIA, encoding I kappa B alpha, are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases. *Int J Cancer*, **125**, 1334-1342.
- Lamprecht B., Kreher S., Anagnostopoulos I., Johrens K., Monteleone G., Jundt F., Stein H., Janz M., Dorken B. & Mathas S. (2008) Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood*, **112**, 3339-3347.
- Lamprecht B., Walter K., Kreher S., Kumar R., Hummel M., Lenze D., Kochert K., Bouhrel M.A., Richter J., Soler E., Stadhouders R., Johrens K., Wurster K.D., Callen D.F., Harte M.F., Giefing M., Barlow R., Stein H., Anagnostopoulos I., Janz M., Cockerill P.N., Siebert R., Dorken B., Bonifer C. & Mathas S. (2010) Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med*, **16**, 571-579, 571p following 579.
- Land H., Parada L.F. & Weinberg R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, **304**, 596-602.
- Lasorella A., Nosedà M., Beyna M., Yokota Y. & Iavarone A. (2000) Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature*, **407**, 592-598.
- Lekstrom-Himes J. & Xanthopoulos K.G. (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, **273**, 28545-28548.

- Li H. & Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, **25**, 1754-1760.
- Li Y., Bevilacqua E., Chiribau C.B., Majumder M., Wang C., Croniger C.M., Snider M.D., Johnson P.F. & Hatzoglou M. (2008) Differential control of the CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) products liver-enriched transcriptional activating protein (LAP) and liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP) and the regulation of gene expression during the response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, **283**, 22443-22456.
- Lin C.Y., Loven J., Rahl P.B., Paranal R.M., Burge C.B., Bradner J.E., Lee T.I. & Young R.A. (2012) Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, **151**, 56-67.
- Liso A., Capello D., Marafioti T., Tiacci E., Cerri M., Distler V., Paulli M., Carbone A., Delsol G., Campo E., Pileri S., Pasqualucci L., Gaidano G. & Falini B. (2006) Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, **108**, 1013-1020.
- Liu Y., Abdul Razak F.R., Terpstra M., Chan F.C., Saber A., Nijland M., van Imhoff G., Visser L., Gascoyne R., Steidl C., Kluiver J., Diepstra A., Kok K. & van den Berg A. (2014) The mutational landscape of Hodgkin lymphoma cell lines determined by whole-exome sequencing. *Leukemia*, **28**, 2248-2251.
- Lukes R.J. & Butler J.J. (1966) The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res*, **26**, 1063-1083.
- Mack T.M., Cozen W., Shibata D.K., Weiss L.M., Nathwani B.N., Hernandez A.M., Taylor C.R., Hamilton A.S., Deapen D.M. & Rappaport E.B. (1995) Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med*, **332**, 413-418.
- Maczuga P., Koornneef A., Borel F., Petry H., van Deventer S., Ritsema T. & Konstantinova P. (2012) Optimization and comparison of knockdown efficacy between polymerase II expressed shRNA and artificial miRNA targeting luciferase and Apolipoprotein B100. *BMC Biotechnol*, **12**, 42.
- Mader A., Bruderlein S., Wegener S., Melzner I., Popov S., Muller-Hermelink H.K., Barth T.F., Viardot A. & Moller P. (2007) U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res*, **119**, 204-210.
- Mancao C., Altmann M., Jungnickel B. & Hammerschmidt W. (2005) Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*, **106**, 4339-4344.
- Mancao C. & Hammerschmidt W. (2007) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*, **110**, 3715-3721.
- Mani H. & Jaffe E.S. (2009) Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma*, **9**, 206-216.
- Manis J.P., Tian M. & Alt F.W. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*, **23**, 31-39.
- Marafioti T., Hummel M., Anagnostopoulos I., Foss H.D., Falini B., Delsol G., Isaacson P.G., Pileri S. & Stein H. (1997) Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med*, **337**, 453-458.
- Marafioti T., Hummel M., Foss H.D., Laumen H., Korbjuhn P., Anagnostopoulos I., Lammert H., Demel G., Theil J., Wirth T. & Stein H. (2000) Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*, **95**, 1443-1450.
- Marshall N.A., Christie L.E., Munro L.R., Culligan D.J., Johnston P.W., Barker R.N. & Vickers M.A. (2004) Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **103**, 1755-1762.
- Martin-Subero J.I., Gesk S., Harder L., Sonoki T., Tucker P.W., Schlegelberger B., Grote W., Novo F.J., Calasanz M.J., Hansmann M.L., Dyer M.J. & Siebert R. (2002) Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 1474-1477.
- Martin-Subero J.I., Klapper W., Sotnikova A., Callet-Bauchu E., Harder L., Bastard C., Schmitz R., Grohmann S., Hoppner J., Riemke J., Barth T.F., Berger F., Bernd H.W., Claviez A., Gesk S., Frank G.A., Kaplanskaya I.B., Moller P., Parwaresch R.M., Rudiger T., Stein H., Küppers R., Hansmann M.L., Siebert R. & Deutsche Krebshilfe Network Project Molecular Mechanisms in Malignant L. (2006a) Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*, **66**, 10332-10338.
- Martin-Subero J.I., Wlodarska I., Bastard C., Picquetot J.M., Hoppner J., Giefing M., Klapper W. & Siebert R. (2006b) Chromosomal rearrangements involving the BCL3 locus are recurrent in classical Hodgkin and peripheral T-cell lymphoma. *Blood*, **108**, 401-402; author reply 402-403.
- Mason D.Y., Banks P.M., Chan J., Cleary M.L., Delsol G., de Wolf Peeters C., Falini B., Gatter K., Grogan T.M., Harris N.L. & et al. (1994) Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol*, **18**, 526-530.
- Mathas S., Hinz M., Anagnostopoulos I., Krappmann D., Lietz A., Jundt F., Bommert K., Mechta-Grigoriou F., Stein H., Dorken B. & Scheidereit C. (2002) Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J*, **21**, 4104-4113.
- Mathas S., Janz M., Hummel F., Hummel M., Wollert-Wulf B., Lusatis S., Anagnostopoulos I., Lietz A., Sigvardsson M., Jundt F., Johrens K., Bommert K., Stein H. & Dorken B. (2006) Intrinsic inhibition

- of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*, **7**, 207-215.
- Mathas S., Johrens K., Joos S., Lietz A., Hummel F., Janz M., Jundt F., Anagnostopoulos I., Bommert K., Lichter P., Stein H., Scheidereit C. & Dorken B. (2005) Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood*, **106**, 4287-4293.
- McBlane J.F., van Gent D.C., Ramsden D.A., Romeo C., Cuomo C.A., Gellert M. & Oettinger M.A. (1995) Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, **83**, 387-395.
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytzky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M. & DePristo M.A. (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, **20**, 1297-1303.
- Meffre E., Casellas R. & Nussenzweig M.C. (2000) Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*, **1**, 379-385.
- Meggetto F., Muller C., Henry S., Selves J., Mariame B., Brousset P., Saati T.A. & Delsol G. (1996) Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferations in severe combined immunodeficient mice transplanted with Hodgkin's disease lymph nodes: implications of EBV-positive bystander B lymphocytes rather than EBV-infected Reed-Sternberg cells. *Blood*, **87**, 2435-2442.
- Melchers F., Rolink A., Grawunder U., Winkler T.H., Karasuyama H., Ghia P. & Andersson J. (1995) Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **7**, 214-227.
- Meyer N. & Penn L.Z. (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*, **8**, 976-990.
- Miyamoto T., Iwasaki H., Reizis B., Ye M., Graf T., Weissman I.L. & Akashi K. (2002) Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell*, **3**, 137-147.
- Moskowitz C.R., V.; Michot, JM.; Martinelli, G.; Zinzani, PL.; Gutierrez, M.; DeMaeyer, G.; Jacob, AG.; Giallella, K.; Anderson, JW. *et al.* (2014) PD-1 blockade with the monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure: preliminary results from a phase 1b study [abstract]. *Blood (Meeting Abstracts)*, 290.
- Munoz N., Davidson R.J., Witthoff B., Ericsson J.E. & De-The G. (1978) Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int J Cancer*, **22**, 10-13.
- Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y. & Honjo T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, **102**, 553-563.
- Murphy K.T., P.; Walport, M. (2008) *Janeway's Immunobiology Seventh Edition*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC and informa business, New York, USA.
- Muschen M., Rajewsky K., Bräuninger A., Baur A.S., Oudejans J.J., Roers A., Hansmann M.L. & Küppers R. (2000) Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, **191**, 387-394.
- Nagel S., Meyer C., Quentmeier H., Kaufmann M., Drexler H.G. & MacLeod R.A. (2013) Chromothripsis in Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **52**, 741-747.
- Naumovski L., Utz P.J., Bergstrom S.K., Morgan R., Molina A., Toole J.J., Glader B.E., McFall P., Weiss L.M., Warnke R. & et al. (1989) SUP-HD1: a new Hodgkin's disease-derived cell line with lymphoid features produces interferon-gamma. *Blood*, **74**, 2733-2742.
- Navarro A., Gaya A., Martinez A., Urbano-Ispizua A., Pons A., Balague O., Gel B., Abrisqueta P., Lopez-Guillermo A., Artells R., Montserrat E. & Monzo M. (2008) MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, **111**, 2825-2832.
- Nerlov C. (2007) The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol*, **17**, 318-324.
- Nerlov C., McNagny K.M., Doderlein G., Kowenz-Leutz E. & Graf T. (1998) Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev*, **12**, 2413-2423.
- Nesbit C.E., Tersak J.M. & Prochownik E.V. (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, **18**, 3004-3016.
- Nie Z., Hu G., Wei G., Cui K., Yamane A., Resch W., Wang R., Green D.R., Tessarollo L., Casellas R., Zhao K. & Levens D. (2012) c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*, **151**, 68-79.
- Nilsson K., Bennich H., Johansson S.G. & Ponten J. (1970) Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin Exp Immunol*, **7**, 477-489.
- Nozawa Y., Wakasa H. & Abe M. (1998) Costimulatory molecules (CD80 and CD86) on Reed-Sternberg cells are associated with the proliferation of background T cells in Hodgkin's disease. *Pathol Int*, **48**, 10-14.
- O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V. & Mendell J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, **435**, 839-843.
- Oh H.S. & Smart R.C. (1998) Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J Invest Dermatol*, **110**, 939-945.

- Ohno T., Stribley J.A., Wu G., Hinrichs S.H., Weisenburger D.D. & Chan W.C. (1997) Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, **337**, 459-465.
- Otto C., Giefing M., Massow A., Vater I., Gesk S., Schlesner M., Richter J., Klapper W., Hansmann M.L., Siebert R. & Küppers R. (2012) Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, **157**, 702-708.
- Overbeck B.M., Martin-Subero J.I., Ammerpohl O., Klapper W., Siebert R. & Giefing M. (2012) ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and down-regulated in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, **97**, 1612-1614.
- Pal R., Janz M., Galson D.L., Gries M., Li S., Johrens K., Anagnostopoulos I., Dorken B., Mapara M.Y., Borghesi L., Kardava L., Roodman G.D., Milcarek C. & Lentzsch S. (2009) C/EBPbeta regulates transcription factors critical for proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood*, **114**, 3890-3898.
- Palomero T., Lim W.K., Odom D.T., Sulis M.L., Real P.J., Margolin A., Barnes K.C., O'Neil J., Neuberg D., Weng A.P., Aster J.C., Sigaux F., Soulier J., Look A.T., Young R.A., Califano A. & Ferrando A.A. (2006) NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18261-18266.
- Pasqualucci L., Migliazza A., Fracchiolla N., William C., Neri A., Baldini L., Chaganti R.S., Klein U., Küppers R., Rajewsky K. & Dalla-Favera R. (1998) BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11816-11821.
- Patel J.H., Loboda A.P., Showe M.K., Showe L.C. & McMahon S.B. (2004) Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer*, **4**, 562-568.
- Pileri S.A., Ascani S., Leoncini L., Sabattini E., Zinzani P.L., Piccaluga P.P., Pileri A., Jr., Giunti M., Falini B., Bolis G.B. & Stein H. (2002) Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol*, **55**, 162-176.
- Poli V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J Biol Chem*, **273**, 29279-29282.
- Poppema S. (1996) Immunology of Hodgkin's disease. *Baillieres Clin Haematol*, **9**, 447-457.
- Portis T., Dyck P. & Longnecker R. (2003) Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **102**, 4166-4178.
- Pulvertaft J.V. (1964) Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet*, **1**, 238-240.
- Quivoron C., Couronne L., Della Valle V., Lopez C.K., Plo I., Wagner-Ballon O., Do Cruzeiro M., Delhommeau F., Arnulf B., Stern M.H., Godley L., Opolon P., Tilly H., Solary E., Duffourd Y., Dessen P., Merle-Beral H., Nguyen-Khac F., Fontenay M., Vainchenker W., Bastard C., Mercher T. & Bernard O.A. (2011) TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*, **20**, 25-38.
- Raaphorst F.M., van Kemenade F.J., Blokzijl T., Fieret E., Hamer K.M., Satijn D.P., Otte A.P. & Meijer C.J. (2000) Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **157**, 709-715.
- Rajewsky K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, **381**, 751-758.
- Ramji D.P. & Foka P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, **365**, 561-575.
- Re D., Muschen M., Ahmadi T., Wickenhauser C., Staratschek-Jox A., Holtick U., Diehl V. & Wolf J. (2001) Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res*, **61**, 2080-2084.
- Reddy S.T., Wadleigh D.J. & Herschman H.R. (2000) Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem*, **275**, 3107-3113.
- Reed D. (1902) On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep*, **10**, 133-193.
- Reichel J., Chadburn A., Rubinstein P.G., Giulino-Roth L., Tam W., Liu Y., Gaiolla R., Eng K., Brody J., Inghirami G., Carlo-Stella C., Santoro A., Rahal D., Totonchy J., Elemento O., Cesarman E. & Roshal M. (2015) Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*, **125**, 1061-1072.
- Renne C., Hirsch N., Willenbrock K., Fuchs M., Klapper W., Engert A., Küppers R., Hansmann M.L. & Bräuninger A. (2007) The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*, **120**, 2504-2509.
- Renne C., Martin-Subero J.I., Eickernjager M., Hansmann M.L., Küppers R., Siebert R. & Bräuninger A. (2006) Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*, **169**, 655-664.
- Renne C., Minner S., Küppers R., Hansmann M.L. & Bräuninger A. (2008) Autocrine NGFbeta/TRKA signalling is an important survival factor for Hodgkin lymphoma derived cell lines. *Leuk Res*, **32**, 163-167.
- Renne C., Willenbrock K., Küppers R., Hansmann M.L. & Bräuninger A. (2005) Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, **105**, 4051-4059.
- Retter M.W. & Nemazee D. (1998) Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med*, **188**, 1231-1238.

- Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Catalan N., Forveille M., Dufourcq-Labelouse R., Gennery A., Tezcan I., Ersoy F., Kayserili H., Ugazio A.G., Brousse N., Muramatsu M., Notarangelo L.D., Kinoshita K., Honjo T., Fischer A. & Durandy A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, **102**, 565-575.
- Reynolds G.M., Billingham L.J., Gray L.J., Flavell J.R., Najafipour S., Crocker J., Nelson P., Young L.S. & Murray P.G. (2002) Interleukin 6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. *Br J Haematol*, **118**, 195-201.
- Rohban S. & Campaner S. (2015) Myc induced replicative stress response: How to cope with it and exploit it. *Biochim Biophys Acta*, **1849**, 517-524.
- Rook M.S., Delach S.M., Deyneko G., Worlock A. & Wolfe J.L. (2004) Whole genome amplification of DNA from laser capture-microdissected tissue for high-throughput single nucleotide polymorphism and short tandem repeat genotyping. *Am J Pathol*, **164**, 23-33.
- Rosdahl N., Larsen S.O. & Clemmesen J. (1974) Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J*, **2**, 253-256.
- Rui L., Emre N.C., Kruhlak M.J., Chung H.J., Steidl C., Slack G., Wright G.W., Lenz G., Ngo V.N., Shaffer A.L., Xu W., Zhao H., Yang Y., Lamy L., Davis R.E., Xiao W., Powell J., Maloney D., Thomas C.J., Moller P., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H.K., Savage K., Connors J.M., Rimsza L.M., Campo E., Jaffe E.S., Delabie J., Smeland E.B., Weisenburger D.D., Chan W.C., Gascoyne R.D., Levens D. & Staudt L.M. (2010) Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell*, **18**, 590-605.
- Sabo A., Kress T.R., Pelizzola M., de Pretis S., Gorski M.M., Tesi A., Morelli M.J., Bora P., Doni M., Verrecchia A., Tonelli C., Faga G., Bianchi V., Ronchi A., Low D., Muller H., Guccione E., Campaner S. & Amati B. (2014) Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature*, **511**, 488-492.
- Sajesh B.V., Lichtensztejn Z. & McManus K.J. (2013) Sister chromatid cohesion defects are associated with chromosome instability in Hodgkin lymphoma cells. *BMC Cancer*, **13**, 391.
- Sanchez-Beato M., Sanchez E., Garcia J.F., Perez-Rosado A., Montoya M.C., Fraga M., Artiga M.J., Navarrete M., Abraira V., Morente M., Esteller M., Koseki H., Vidal M. & Piris M.A. (2004) Abnormal PcG protein expression in Hodgkin's lymphoma. Relation with E2F6 and NFkappaB transcription factors. *J Pathol*, **204**, 528-537.
- Schaadt M., Diehl V., Stein H., Fonatsch C. & Kirchner H.H. (1980) Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int J Cancer*, **26**, 723-731.
- Schaadt M., Fonatsch C., Kirchner H. & Diehl V. (1979) Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut*, **38**, 185-190.
- Scheeren F.A., Diehl S.A., Smit L.A., Beaumont T., Naspetti M., Bende R.J., Blom B., Karube K., Ohshima K., van Noesel C.J. & Spits H. (2008) IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood*, **111**, 4706-4715.
- Schmidt A., Schmitz R., Giefing M., Martin-Subero J.I., Gesk S., Vater I., Massow A., Maggio E., Schneider M., Hansmann M.L., Siebert R. & Küppers R. (2010) Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 803-809.
- Schmitz R., Hansmann M.L., Bohle V., Martin-Subero J.I., Hartmann S., Mechttersheimer G., Klapper W., Vater I., Giefing M., Gesk S., Stanelle J., Siebert R. & Küppers R. (2009) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*, **206**, 981-989.
- Schneider A., Peukert K., Eilers M. & Hanel F. (1997) Association of Myc with the zinc-finger protein Miz-1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol*, **224**, 137-146.
- Schneider E.M., Torlakovic E., Stuhler A., Diehl V., Tesch H. & Giebel B. (2004) The early transcription factor GATA-2 is expressed in classical Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*, **204**, 538-545.
- Schneider M., Schneider S., Zuhlke-Jenisch R., Klapper W., Sundstrom C., Hartmann S., Hansmann M.L., Siebert R., Küppers R. & Giefing M. (2015) Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **54**, 638-645.
- Schnell T., Foley P., Wirth M., Munch J. & Uberla K. (2000) Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther*, **11**, 439-447.
- Schwarzer R., Dorken B. & Jundt F. (2012) Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia*, **26**, 806-813.
- Schwering I., Bräuninger A., Klein U., Jungnickel B., Tinguely M., Diehl V., Hansmann M.L., Dalla-Favera R., Rajewsky K. & Küppers R. (2003) Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **101**, 1505-1512.
- Seitz V., Butzhammer P., Hirsch B., Hecht J., Gutgemann I., Ehlers A., Lenze D., Oker E., Sommerfeld A., von der Wall E., König C., Zinser C., Spang R. & Hummel M. (2011) Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PLoS One*, **6**, e26837.

- Seitz V., Hummel M., Marafioti T., Anagnostopoulos I., Assaf C. & Stein H. (2000) Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, **95**, 3020-3024.
- Shaffer A.L., Emre N.C., Lamy L., Ngo V.N., Wright G., Xiao W., Powell J., Dave S., Yu X., Zhao H., Zeng Y., Chen B., Epstein J. & Staudt L.M. (2008) IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*, **454**, 226-231.
- Shaffer A.L., Emre N.C., Romesser P.B. & Staudt L.M. (2009) IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Cancer Res*, **15**, 2954-2961.
- Shaffer A.L., Lin K.I., Kuo T.C., Yu X., Hurt E.M., Rosenwald A., Giltnane J.M., Yang L., Zhao H., Calame K. & Staudt L.M. (2002) Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*, **17**, 51-62.
- Sharma V.M., Calvo J.A., Draheim K.M., Cunningham L.A., Hermance N., Beverly L., Krishnamoorthy V., Bhasin M., Capobianco A.J. & Kelliher M.A. (2006) Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol*, **26**, 8022-8031.
- Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M. & Sirotkin K. (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 308-311.
- Sims D., Sudbery I., Ilott N.E., Heger A. & Ponting C.P. (2014) Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*, **15**, 121-132.
- Skinnider B.F., Elia A.J., Gascoyne R.D., Patterson B., Trumper L., Kapp U. & Mak T.W. (2002) Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 618-626.
- Skinnider B.F., Elia A.J., Gascoyne R.D., Trumper L.H., von Bonin F., Kapp U., Patterson B., Snow B.E. & Mak T.W. (2001) Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **97**, 250-255.
- Skinnider B.F. & Mak T.W. (2002) The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 4283-4297.
- Spotts G.D., Patel S.V., Xiao Q. & Hann S.R. (1997) Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol*, **17**, 1459-1468.
- Stanelle J., Döring C., Hansmann M.L. & Küppers R. (2010) Mechanisms of aberrant GATA3 expression in classical Hodgkin lymphoma and its consequences for the cytokine profile of Hodgkin and Reed/Sternberg cells. *Blood*, **116**, 4202-4211.
- Stathis A. & Younes A. (2015) The new therapeutical scenario of Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol*.
- Steidl C., Connors J.M. & Gascoyne R.D. (2011a) Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*, **29**, 1812-1826.
- Steidl C., Shah S.P., Woolcock B.W., Rui L., Kawahara M., Farinha P., Johnson N.A., Zhao Y., Telenius A., Neriah S.B., McPherson A., Meissner B., Okoye U.C., Diepstra A., van den Berg A., Sun M., Leung G., Jones S.J., Connors J.M., Huntsman D.G., Savage K.J., Rimsza L.M., Horsman D.E., Staudt L.M., Steidl U., Marra M.A. & Gascoyne R.D. (2011b) MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*, **471**, 377-381.
- Steidl C., Telenius A., Shah S.P., Farinha P., Barclay L., Boyle M., Connors J.M., Horsman D.E. & Gascoyne R.D. (2010) Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood*, **116**, 418-427.
- Stein H., Marafioti T., Foss H.D., Laumen H., Hummel M., Anagnostopoulos I., Wirth T., Demel G. & Falini B. (2001) Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, **97**, 496-501.
- Stephens P.J., Greenman C.D., Fu B., Yang F., Bignell G.R., Mudie L.J., Pleasance E.D., Lau K.W., Beare D., Stebbings L.A., McLaren S., Lin M.L., McBride D.J., Varela I., Nik-Zainal S., Leroy C., Jia M., Menzies A., Butler A.P., Teague J.W., Quail M.A., Burton J., Swerdlow H., Carter N.P., Morsberger L.A., Jacobuzio-Donahue C., Follows G.A., Green A.R., Flanagan A.M., Stratton M.R., Futreal P.A. & Campbell P.J. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, **144**, 27-40.
- Sternberg C. (1898) Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates *Zeitstrift Heilkunde*, **19**, 21-90.
- Stoilova B., Kowenz-Leutz E., Scheller M. & Leutz A. (2013) Lymphoid to myeloid cell trans-differentiation is determined by C/EBPbeta structure and post-translational modifications. *PLoS One*, **8**, e65169.
- Szymanowska N., Klapper W., Gesk S., Küppers R., Martin-Subero J.I. & Siebert R. (2008) BCL2 and BCL3 are recurrent translocation partners of the IGH locus. *Cancer Genet Cytogenet*, **186**, 110-114.
- Tanijiri T., Shimizu T., Uehira K., Yokoi T., Amuro H., Sugimoto H., Torii Y., Tajima K., Ito T., Amakawa R. & Fukuhara S. (2007) Hodgkin's reed-sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+ cytotoxic T lymphocytes from CD4+ naive T cells. *J Leukoc Biol*, **82**, 576-584.
- Thorvaldsdottir H., Robinson J.T. & Mesirov J.P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform*, **14**, 178-192.

- Tiacci E., Döring C., Brune V., van Noesel C.J., Klapper W., Mechttersheimer G., Falini B., Küppers R. & Hansmann M.L. (2012) Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **120**, 4609-4620.
- Tiacci E., Trifonov V., Schiavoni G., Holmes A., Kern W., Martelli M.P., Pucciarini A., Bigerna B., Pacini R., Wells V.A., Sportoletti P., Pettirossi V., Mannucci R., Elliott O., Liso A., Ambrosetti A., Pulsoni A., Forconi F., Trentin L., Semenzato G., Inghirami G., Capponi M., Di Raimondo F., Patti C., Arcaini L., Musto P., Pileri S., Haferlach C., Schnittger S., Pizzolo G., Foa R., Farinelli L., Haferlach T., Pasqualucci L., Rabadan R. & Falini B. (2011) BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*, **364**, 2305-2315.
- Timchenko N.A., Wang G.L. & Timchenko L.T. (2005) RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2. *J Biol Chem*, **280**, 20549-20557.
- Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-581.
- Torlakovic E., Tierens A., Dang H.D. & Delabie J. (2001) The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, **159**, 1807-1814.
- Ushmorov A., Leithauser F., Sakk O., Weinhausel A., Popov S.W., Moller P. & Wirth T. (2006) Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **107**, 2493-2500.
- van den Berg A., Visser L. & Poppema S. (1999) High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*, **154**, 1685-1691.
- Van Roosbroeck K., Cox L., Tousseyn T., Lahortiga I., Gielen O., Cauwelier B., De Paepe P., Verhoef G., Marynen P., Vandenberghe P., De Wolf-Peeters C., Cools J. & Wlodarska I. (2011) JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **117**, 4056-4064.
- Vener C., Guffanti A., Pomati M., Colombi M., Alietti A., La Targia M.L., Bamonti-Catena F. & Baldini L. (2000) Soluble cytokine levels correlate with the activity and clinical stage of Hodgkin's disease at diagnosis. *Leuk Lymphoma*, **37**, 333-339.
- Verbeke C.S., Wenhe U., Grobholz R. & Zentgraf H. (2001) Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol*, **25**, 388-394.
- Victoria G.D. & Nussenzweig M.C. (2012) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, **30**, 429-457.
- Victoria G.D., Schwickert T.A., Fooksman D.R., Kamphorst A.O., Meyer-Hermann M., Dustin M.L. & Nussenzweig M.C. (2010) Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, **143**, 592-605.
- Vockerodt M., Morgan S.L., Kuo M., Wei W., Chukwuma M.B., Arrand J.R., Kube D., Gordon J., Young L.S., Woodman C.B. & Murray P.G. (2008) The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol*, **216**, 83-92.
- Vockerodt M., Soares M., Kanzler H., Küppers R., Kube D., Hansmann M.L., Diehl V. & Tesch H. (1998) Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged VH genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease. *Blood*, **92**, 2899-2907.
- Vockerodt M., Wei W., Nagy E., Prouzova Z., Schrader A., Kube D., Rowe M., Woodman C.B. & Murray P.G. (2013) Suppression of the LMP2A target gene, EGR-1, protects Hodgkin's lymphoma cells from entry to the EBV lytic cycle. *J Pathol*, **230**, 399-409.
- Vogel M.J., Xie L., Guan H., Tooze R.M., Maier T., Kostezka U., Maier H.J., Holzmann K., Chan F.C., Steidl C., Reichel J.B., Weitzer C.D., Gehringer F., Kick A.B., Cesarman E., Roshal M., Gascoyne R.D., Moller P., Wirth T. & Ushmorov A. (2014) FOXO1 repression contributes to block of plasma cell differentiation in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **124**, 3118-3129.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A., Jr. & Kinzler K.W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*, **339**, 1546-1558.
- Walz S., Lorenzin F., Morton J., Wiese K.E., von Eyss B., Herold S., Rycak L., Dumay-Odelot H., Karim S., Bartkuhn M., Roels F., Wustefeld T., Fischer M., Teichmann M., Zender L., Wei C.L., Sansom O., Wolf E. & Eilers M. (2014) Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, **511**, 483-487.
- Wang H., Mannava S., Grachtchouk V., Zhuang D., Soengas M.S., Gudkov A.V., Prochownik E.V. & Nikiforov M.A. (2008) c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle. *Oncogene*, **27**, 1905-1915.
- Watanabe K., Yamashita Y., Nakayama A., Hasegawa Y., Kojima H., Nagasawa T. & Mori N. (2000) Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology*, **36**, 353-361.
- Weber-Matthiesen K., Deerberg J., Poetsch M., Grote W. & Schlegelberger B. (1995) Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood*, **86**, 1464-1468.
- Weber K., Bartsch U., Stocking C. & Fehse B. (2008) A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther*, **16**, 698-706.

- Weilemann A., Grau M., Erdmann T., Merkel O., Sobhiafshar U., Anagnostopoulos I., Hummel M., Siegert A., Hayford C., Madle H., Wollert-Wulf B., Fichtner I., Dorken B., Dirnhofer S., Mathas S., Janz M., Emre N.C., Rosenwald A., Ott G., Lenz P., Tzankov A. & Lenz G. (2015) Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, **125**, 124-132.
- Weng A.P., Millholland J.M., Yashiro-Ohtani Y., Arcangeli M.L., Lau A., Wai C., Del Bianco C., Rodriguez C.G., Sai H., Tobias J., Li Y., Wolfe M.S., Shachaf C., Felsner D., Blacklow S.C., Pear W.S. & Aster J.C. (2006) c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev*, **20**, 2096-2109.
- Weniger M.A., Melzner I., Menz C.K., Wegener S., Bucur A.J., Dorsch K., Mattfeldt T., Barth T.F. & Moller P. (2006) 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.
- Wolf J., Kapp U., Bohlen H., Kornacker M., Schoch C., Stahl B., Mucke S., von Kalle C., Fonatsch C., Schaefer H.E., Hansmann M.L. & 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.
- Xiao Q., Claassen G., Shi J., Adachi S., Sedivy J. & Hann S.R. (1998) Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev*, **12**, 3803-3808.
- Xie H., Ye M., Feng R. & Graf T. (2004) Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*, **117**, 663-676.
- Yamamoto R., Nishikori M., Kitawaki T., Sakai T., Hishizawa M., Tashima M., Kondo T., Ohmori K., Kurata M., Hayashi T. & Uchiyama T. (2008) PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **111**, 3220-3224.
- Yokota Y., Mansouri A., Mori S., Sugawara S., Adachi S., Nishikawa S. & Gruss P. (1999) Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*, **397**, 702-706.
- Younes A., Connors J.M., Park S.I., Fanale M., O'Meara M.M., Hunder N.N., Huebner D. & Ansell S.M. (2013) Brentuximab vedotin combined with ABVD or AVD for patients with newly diagnosed Hodgkin's lymphoma: a phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol*, **14**, 1348-1356.
- Younes A., Gopal A.K., Smith S.E., Ansell S.M., Rosenblatt J.D., Savage K.J., Ramchandren R., Bartlett N.L., Cheson B.D., de Vos S., Forero-Torres A., Moskowitz C.H., Connors J.M., Engert A., Larsen E.K., Kennedy D.A., Sievers E.L. & Chen R. (2012a) Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, **30**, 2183-2189.
- Younes A., Sureda A., Ben-Yehuda D., Zinzani P.L., Ong T.C., Prince H.M., Harrison S.J., Kirschbaum M., Johnston P., Gallagher J., Le Corre C., Shen A. & Engert A. (2012b) Panobinostat in patients with relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma after autologous stem-cell transplantation: results of a phase II study. *J Clin Oncol*, **30**, 2197-2203.
- Young L.S. & Murray P.G. (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, **22**, 5108-5121.
- Zahnow C.A. (2009) CCAAT/enhancer-binding protein beta: its role in breast cancer and associations with receptor tyrosine kinases. *Expert Rev Mol Med*, **11**, e12.
- Zheng B., Fiumara P., Li Y.V., Georgakis G., Snell V., Younes M., Vauthey J.N., Carbone A. & Younes A. (2003) MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*, **102**, 1019-1027.
- Zhou Y., Zhu S., Cai C., Yuan P., Li C., Huang Y. & Wei W. (2014) High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, **509**, 487-491.
- Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J. & Roussel M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, **12**, 2424-2433.
- Zong C., Lu S., Chapman A.R. & Xie X.S. (2012) Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, **338**, 1622-1626.

7 Anhang

7.1 Publikationen

7.1.1 Originalpublikationen

Schneider S., Crescenzi B., Schneider M., Ascani S., Hartmann S., Hansmann M. L., Falini B., Mecucci C., Tiacci E. and Küppers R. (2014). "Subclonal evolution of a classical Hodgkin lymphoma from a germinal center B-cell-derived mantle cell lymphoma." *Int J Cancer* 134(4): 832-843.

Kreher S., Bouhlef M. A., Cauchy P., Lamprecht B., Li S., Grau M., Hummel F., Kochert K., Anagnostopoulos I., Johrens K., Hummel M., Hiscott J., Wenzel S. S., Lenz P., Schneider M., Küppers R., Scheidereit C., Giefing M., Siebert R., Rajewsky K., Lenz G., Cockerill P. N., Janz M., Dörken B., Bonifer C. and Mathas S. (2014). "Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(42): E4513-4522.

Schneider M.*, Schneider S.*, Zuhlke-Jenisch R., Klapper W., Sundstrom C., Hartmann S., Hansmann M. L., Siebert R., Küppers R. and Giefing M. (2015). "Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma." *Genes Chromosomes Cancer* 54(10): 638-645.
* M.S. und S.S teilen eine gemeinsame Koerstautorenschaft

Doose G., Haake A., Bernhart S. H., López C., Duggimpudi S., Wojciech F., Bergmann A. K., Borkhardt A., Burkhardt B., Claviez A., Dimitrova L., Haash S., Höll J., Hummel M., Karsch D., Klapper W., Kleo K., Kretzmer H., Kreuz M., Küppers R., Lawerenz C., Lenze D., Loeffler M., Mantovani-Löffler L., Möller P., Ott G., Richter J., Rohde M., Rosenstiel P., Rosenwald A., Schilhabel M., Schneider M., Scholz I., Stilgenbauer S., Stunnenberg H. G., Szczepanowski M., Trümper L., Weniger M. A., ICGC MMML-Seq Consortium, Hoffmann S., Siebert R. and Iaccarino I. (2015). "MINCR is an MYC-induced lncRNA able to modulate MYC's transcriptional network in Burkitt lymphoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.* (Im Druck)

7.1.2 Buchkapitel und Leserbriefe

Küppers R., Schneider M. and Hansmann M. L. (2013). "Laser-based microdissection of single cells from tissue sections and PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes from isolated normal and malignant human B cells." *Methods Mol Biol* 971: 49-63.

Schneider M., Szaumkessel M., Richter J., Ammerpohl O., Hansmann M. L., Küppers R., Siebert R. and Giefing M. (2014). "The PRDX2 gene is transcriptionally silenced and de novo methylated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma." *Blood* 123(23): 3672-3674.

7.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Küppers für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe II des Instituts für Zellbiologie bedanken. Vielen Dank auch für die vielseitige Unterstützung während der Betreuung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei den ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe II des Instituts für Zellbiologie für das nette Arbeitsklima, Hilfestellungen und Diskussionen. Im Besonderen danke ich den technischen Assistenten Philip Abstoß und Gwen Lorenz für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Klaus Lennartz danke ich vielmals für seine Hilfe beim Sortieren der Zellen und die damit verbunden netten Gespräche.

Herzlichen Dank an unsere Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe Prof. Martin-Leo Hansmann vom Senckenbergischen Instituts für Pathologie an der Universitätsklinik Frankfurt am Main für die gute Zusammenarbeit.

Weiter möchte ich mich auch bei unseren Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe Prof. Sven Rahmann der Genominformatik an der Universität Duisburg-Essen bedanken. Hier vor allem bei Johanna Christina Czeschik für die Hilfe bei der Auswertung der Exom-Daten.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitgliedern des Graduiertenkollegs GK1431 „Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung“ für die nette Zeit und interessanten Diskussionen.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Frau und meiner ganzen Familie für ihre fortwährende Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir geben, bedanken.

7.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen Kooperationsgruppen erzielt. Hierauf wird bei der Vorstellung der Ergebnisse an den entsprechenden Stellen hingewiesen.

7.4 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Molekulare Mechanismen in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Markus Schneider befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Ralf Küppers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Markus Schneider

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat.- Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Markus Schneider