

**Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von SOCS1-Mutationen bei
der Entstehung des Hodgkin-Lymphoms**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Julia Stecki

aus Köln

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Pathologisches Institut

Abteilung für Molekulare Zytologie und Funktionelle Genomik

Gutachter: Prof. Dr. Roland Schmitz

Gutachterin: Prof. Dr. Christine Mauz-Körholz

Tag der Disputation: 11.12.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Immunologische Aspekte der B-Lymphozytenentwicklung.....	2
1.2 Pathogenese maligner B-Zell-Lymphome	3
1.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	5
1.3.1 Burkitt-Lymphom.....	6
1.3.2 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom	7
1.3.3 Primär mediastinales B-Zell-Lymphom.....	8
1.4 Hodgkin-Lymphom.....	9
1.4.1 Zellulärer Ursprung von HRS-Zellen.....	16
1.4.2 Molekularpathogenetische Aspekte der HRS-Zellen.....	17
1.4.3 Deregulierte Signalwege im Hodgkin-Lymphom	18
1.4.3.1 NF- κ B-Signalweg	19
1.4.3.2 JAK/STAT-Signalweg.....	22
1.4.3.2.1 Suppressor of cytokine signaling 1 – SOCS1	24
1.5 Funktionelle Untersuchungen von SOCS1 in Lymphomzellen	28
1.6 Zelllinien	29
1.6.1 Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms	29
1.6.1.1 SOCS1-Mutationsstatus	29
1.6.2 Zelllinien des Burkitt-Lymphoms	31
1.7 Fragestellung	32
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	32
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Materialliste.....	33
2.1.1 Geräte	33
2.1.2 Verbrauchsmaterial	34
2.1.3 Chemikalien, Puffer und Reagenzien.....	35
2.1.4 Laborkits.....	37
2.1.5 Enzyme.....	37
2.1.6 Vektoren	38

2.1.7	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	39
2.1.8	Primer.....	40
2.1.9	Bakterienstämme.....	40
2.1.10	Antikörper für Western-Blotting.....	40
2.1.11	Antikörper für Färbung.....	41
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	DNA-Arbeitstechniken.....	41
2.2.1.1	Restriktionsendonukleaseverdau.....	41
2.2.1.2	Trennung von DNA mittels Gelelektrophorese.....	41
2.2.1.3	DNA-Elution aus Agarose-Gelen.....	41
2.2.1.4	Ligation von DNA.....	42
2.2.1.5	Klonierung von sgRNA in pLenti-Guide Plasmid.....	42
2.2.1.6	Plasmidisolierung aus E.coli Bakterien (Mini-Präparation).....	43
2.2.1.7	Plasmidisolierung aus E.coli Bakterien (Midi-Präparation).....	43
2.2.1.8	DNA-Transformation.....	43
2.2.1.8.1	Hitzeschock-Verfahren.....	43
2.2.1.9	Sequenzreaktion.....	44
2.2.1.10	Entfernung nicht eingebauter Sequenzterminatoren aus Sequenzreaktionen.....	44
2.2.1.11	Sequenzierung.....	44
2.2.1.12	Site-Directed Mutagenesis.....	45
2.3	Protein Arbeitstechniken.....	45
2.3.1	Herstellung von Zellysaten.....	45
2.3.2	Gelelektrophorese.....	46
2.3.3	Western-Blotting.....	46
2.3.4	Immundetektion.....	47
2.4	Zellkultur.....	47
2.4.1	Kultivierung von Zelllinien.....	47
2.4.2	Zellzählung.....	48
2.4.3	Virale Arbeitstechniken.....	48
2.4.3.1	Virusproduktion.....	48
2.4.3.2	Transduktion.....	48
2.4.3.3	Durchflusszytometrische Analyse/FACS-Analyse.....	48
2.4.3.4	Antikörper Färbung.....	49
2.5	Statistische Auswertung.....	49

3	Ergebnisse	50
3.1	Klonierung.....	50
3.1.1	Klonierung des Reportergens in den sgRNA-Vektor pLentiGuide	50
3.1.2	Erzeugung des pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1.....	50
3.1.3	Vektor pLVX-Tre3GpuroGFP-wtSOCS1	54
3.1.3.1	Einbringung von Punktmutationen in	
	pLVX-Tre3G puroGFP-wtSOCS1	55
3.2	SIFT- Sorting Intolerant From Tolerant.....	55
3.3	Überexpression von SOCS1 und mutierter SOCS1-Varianten in	
	Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien	57
3.3.1	Versuchsaufbau	57
3.3.2	Tetracyclin-induzierbares Expressionssystem	58
3.3.3	Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung der Überexpression	
	in den Zelllinien: BL-41, BL-70, L-1236, KMH2	60
3.4	Nachweis der SOCS1 Überexpression in BL-41 mittels Western-Blotting....	66
3.4.1	SOCS1 Überexpression in Abhängigkeit unterschiedlicher	
	Doxycyclin-Konzentrationen	66
3.4.2	Überexpression des SOCS1-Wildtyps und mutierter SOCS1-Varianten..	67
3.5	SOCS1-Knockout in den Zelllinien BL-41 und EB-1	69
3.6	ICAM-1-Knockout in den Zelllinien L-1236, UHO-1 und BL-41	73
4	Diskussion.....	75
4.1	Transduktionseffizienz von Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms.....	76
4.2	Überexpression von SOCS1 und mutierter SOCS1-Varianten in	
	Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinienzellen	76
4.3	Western-Blot	80
4.4	SIFT – Sorting Intolerant from Tolerant	81
4.5	ICAM-1-Knockout in den Zelllinien L-1236, UHO-1 und BL-41	82
4.6	SOCS1-Knockout in den Zelllinien BL-41 und EB-1	83
5	Zusammenfassung und Ausblick	85
6	Literaturverzeichnis	87
7	Danksagung	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der Erstlinienbehandlung Hodgkin-Lymphom ...	12
Abbildung 2: Einteilung der Risikogruppen nach GHSG.....	14
Abbildung 3: Übersicht über deregulierte Signalwege im Hodgkin-Lymphom.....	19
Abbildung 4: NF- κ B-Signalweg: klassischer und alternativer Signalweg	21
Abbildung 5: Graphische Darstellung des JAK/STAT-Signalweges	24
Abbildung 6: SOCS1-Protein	25
Abbildung 7: Graphische Darstellung des JAK/STAT-Signalweges	27
Abbildung 8: SOCS1-Mutationsstatus der HL-Zelllinien	30
Abbildung 9: Klonierung des Vektors pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1.....	50
Abbildung 10: Vektorkarte pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1 #3.....	52
Abbildung 11: Chromatogramme der SOCS1-Sequenz aus pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1	53
Abbildung 12: Vektorkarte von pLVX-Tre3G-puroGFP-wtSOCS1	54
Abbildung 13: Tet-On 3G System	58
Abbildung 14: Induzierte und titrierte Expression des Luciferase-Konstruktes in HL- und BL-Zelllinienzellen.....	59
Abbildung 15: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in BL-41	61
Abbildung 16: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in BL-70	62
Abbildung 17: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in L-1236	64
Abbildung 18: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in KMH2.....	65
Abbildung 19: Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41 mittels pLVX-Tre-3G-PG + hSOCS1	66
Abbildung 20: Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41	67
Abbildung 21: Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41	67
Abbildung 22: Relative Proteinexpression nach Überexpression in BL-41	69
Abbildung 23: SOCS1-Knockout in BL-41.....	71
Abbildung 24: SOCS1-Knockout in EB-1.....	72

Abbildung 25: ICAM-1-Knockout in L-1236, UHO-1 und BL-41	74
-----------------------------------------------------------------------	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation	10
Tabelle 2: Aminosäuresequenz von SOCS1 mit jeweils zugehöriger Region	25
Tabelle 3: SOCS1-Mutationsstatus der HL-Zelllinien	29
Tabelle 4: Geräte	34
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial	35
Tabelle 6: Chemikalien, Puffer und Reagenzien	36
Tabelle 7: Laborkits.....	37
Tabelle 8: Enzyme.....	37
Tabelle 9: Vektoren	38
Tabelle 10: Zelllinien und Kulturbedingungen	39
Tabelle 11: Primer	40
Tabelle 12: Antikörper für Western-Blotting.....	40
Tabelle 13: SIFT-Vorhersage für die SOCS1-Varianten	56

Abkürzungsverzeichnis

AAVS1	engl. Adeno-Associated Virus Integration Site 1
ABC	engl. Activated B-cell like
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidin Desaminase
AML	Akute myeloische Leukämie
ATR	Serin/Threonin-Protein Kinase
BCL2	engl. BCL2 Apoptosis Regulator
BCL6	engl. BCL6 Transcription Repressor
CD30	TNF-Rezeptor 8 (engl. tumor necrosis factor receptor superfamily member 8)
CD40	engl. Cluster of differentiation 40
CHEK1	Checkpoint-Kinase 1
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom; engl. classical Hodgkin lymphoma
CIS	engl. cytokine-inducible SRC homology 2 (SH2)-domain-containing proteins
CYLD	engl. CYLD lysine 63 deubiquitinase (CYLD Lysin 63 Deubiquitinase)
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
DPBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung von Dulbecco
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EZH2	Histon-Lysin-N-Methyltransferase
FCS	fetales Kälberserum
FGFR3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3

FL	Follikuläres Lymphom
GC	Keimzentrum
GCB	Keimzentrumstyp engl. germinal center B-cell like
GFP	grünfluoreszierendes Protein
hSOCS1	engl. human <i>SOCS1</i> (siehe <i>wtSOCS1</i>)
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Meerrettichperoxidase
HRS-Zellen	Hodgkin Reed Sternberg Zellen
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (Synonym: CD54)
ID3	engl. Inhibitor of DNA Binding 3
IGH	engl. Immunglobulin Heavy Locus
I κ B α	engl. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha; entspricht NFKBIA
I κ B ϵ	engl. Inhibitor of kappa B epsilon
IKK α	I κ B Kinase α
IKK β	I κ B Kinase β
JAK2	Januskinase 2
LFA-1	engl. Lymphocyte function-associated antigen 1
LMP1	latentes Membranprotein-1
LMP2a	latentes Membranprotein-2a
Mac-1	engl. Macrophage-1 antigen
MALT	engl. mucosal-associated lymphoid tissues
MAP3K14 (NIK)	engl. Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14; NF-kappa-B-inducing kinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom

MedB-1	Zelllinie des primär mediastinalen B-Zell-Lymphoms
NEMO	IKK γ engl. NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B, der an leichte κ -Kette von B-Lymphozyten bindet
NFKBIA	siehe I κ B α
NGS	engl. Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIK	siehe MAP3K14
NLPHL	Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
NS	Noduläre Sklerose
PAX5	Paired-box-Protein 5
PD-1	engl. Programmed cell death Protein 1
PD-L2	engl. Programmed cell death 1 ligand 2
PMBL	Primär mediastinales B-Zell-Lymphom
PTPN1	engl. Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1
P21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinase; engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDK-Inhibitor-1)
p50	NF- κ B1, engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells p105/p50 subunit
p52	NF- κ B2, engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells p100/p52 subunit
p65	Transkriptionsfaktor p65; engl. Transcription factor p65
REL	engl. REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit
RELA	RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit
RELB	RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit RTK Rezeptor Tyrosinkinase

SHM	Somatische Hypermutation
SH2	engl. Src-Homology-2
SIFT	engl. Sorting intolerant from tolerant
SOCS1	engl. Suppressor of Cytokine Signaling1
STAT	engl. Signal Transducers and Activators of Transcription
TCF-3	Transkriptionsfaktor 3
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidtransferase
TNF	engl. Tumor necrosis factor
TNFAIP3	engl. TNF Alpha Induced Protein 3
TP53	engl. Tumor Protein 53
TRAF3	engl. TNF Receptor Associated Factor 3
wtSOCS1	Wildtyp-SOCS1; entspricht hSOCS1; Suppressor Of Cytokine Signaling
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Pathogenese von malignen Lymphomen wird häufig bestimmt durch Deregulation von Signalwegen, welche die Proliferation und das Überleben von Zellen regulieren. Durch Mutationen von Genen, die für Komponenten dieser Signalwege kodieren, kann es zu Störungen dieser Signalketten und zu einer konstitutiven Aktivierung dieser Signalwege kommen. Dies kann zur ungehemmten Proliferation von Zellen führen oder einem verlängertem Überleben dieser. Ein Beispiel eines solchen Signalwegs stellt der JAK/STAT-Signalweg dar, der Auswirkungen auf die Proliferation von Zellen hat. Bisher konnten in einigen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem primären mediastinalen B-Zell-Lymphom oder dem Hodgkin-Lymphom, genetische Läsionen welche den JAK/STAT-Signalweg betreffen, beschrieben werden (Weniger und Küppers 2021; Melzner et al. 2005; Weniger et al. 2005).

Das Zusammenspiel mehrerer Faktoren spielt in der Entstehung des Hodgkin-Lymphoms eine wichtige Rolle. Lange Zeit waren die Möglichkeiten molekularer Untersuchungen erschwert, da die neoplastischen Zellen in der Tumormasse nur einen sehr geringen Anteil von meist 0,1-10 % ausmachen, sodass die Isolierung dieser Zellen nicht einfach war (Swerdlow 2017). Bisher sind *SOCS1*-Mutationen in einigen Fällen und Zelllinien beschrieben worden (Desch et al. 2020; Weniger et al. 2005).

Das Hodgkin-Lymphom zeigt nach Chemotherapie und/oder Radiochemotherapie eine sehr gute Prognose, da über 90 % der Patienten bei stadienadaptierter Therapie geheilt werden können. Allerdings ist bei einigen Patienten die Therapie refraktär oder die Patienten erleiden ein oder mehrere Rezidive, was die Prognose deutlich verschlechtert. Zusätzlich kann sich die Therapie toxisch auf Organe wie das Herz oder die Lunge auswirken und die Fertilität negativ beeinflussen. Aber auch Zweitmalignome können Konsequenz der aggressiven Therapie sein (Deutsche Gesellschaft für Haematologie und medizinische Onkologie). Ziel im Allgemeinen ist es also die therapeutischen Möglichkeiten zu optimieren und dabei die Toxizität der Therapie zu senken. Um diesem Ziel nachzukommen ist die Entschlüsselung der pathogenetischen Faktoren wegweisend. In der vorliegenden Arbeit wurden funktionelle Untersuchungen zur pathogenetischen Rolle von *SOCS1*-Mutationen im Hodgkin-Lymphom und im Burkitt-Lymphom durchgeführt, um langfristig funktionelle Konsequenzen von *SOCS1*-Veränderungen mechanistisch zu verstehen und weitere biologische Mechanismen zu entschlüsseln mit dem übergeordneten Ziel neue mögliche therapeutische Ansätze zu ermitteln.

1.1 Immunologische Aspekte der B-Lymphozytenentwicklung

Die Lymphozytopoese erfolgt in mehreren Schritten, wobei sich die B-Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark entwickeln. Ziel ist, dass die Lymphozyten mit einer Vielzahl diverser Rezeptoren ausgestattet werden. Dies ist wichtig, um eine adäquate Immunantwort auf verschiedene Pathogene der Umwelt generieren zu können (Rajewsky 1996). Die frühe B-Zellentwicklung besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Umlagerungsschritten der Immunglobulin-Gene, auch als VDJ-Rekombination bekannt. Aus dieser Phase geht dann eine unreife B-Zelle mit einem IgM-Antigenrezeptor hervor (Gellert 2002). Im nächsten Schritt tritt diese Zelle mit Antigenen aus der Umgebung in Kontakt, dabei werden während der negativen Selektion stark autoreaktive B-Zellen eliminiert. Darauffolgend wandern diese Zellen in die Peripherie sekundärer lymphatischer Organe, wo sie durch spezifischen Fremdantigenkontakt aktiviert werden können und sich daraufhin in Antikörper produzierende Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren (MacLennan 1994). Die Umlagerungsprozesse sind sehr fehleranfällig, wie beispielsweise durch den Einbau freier Nukleotide in die Verbindungsstellen zwischen den umgelagerten Gensegmenten durch die Terminale Desoxyribonucleotidtransferase (TdT). Die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten der Gensegmente und die Veränderungen an den Verbindungsstellen steigern die Diversität der Antigenrezeptoren auf den B-Lymphozyten (Murphy und Weaver 2018). In den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe, wie beispielsweise der Milz oder den Lymphknoten wird die Antikörpervielfalt nochmals gesteigert. Keimzentren sind Strukturen, welche in sekundären lymphatischen Organen entstehen. Dorthin gelangen die unreifen B-Zellen, die sich dann zu reifen B-Zellen entwickeln und es findet die Entwicklung und Selektion von Immunglobulinen statt. Nach Aktivierung durch eine T-Helferzelle tritt die B-Zelle in das Keimzentrum des Follikels ein, wo sie anschließend proliferiert. Grundsätzlich werden Keimzentrums-B-Zellen in Zentrozyten und Zentroblasten unterschieden (Rademakers 1992; Stein et al. 1980). Zentrozyten befinden sich in der *light zone* und Zentroblasten in der *dark zone* (MacLennan 1994). In den Keimzentren findet auch der Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) statt, der eine Steigerung der Immunglobulinvielfalt bewirkt. Dabei werden durch das Enzym AID im Gen, welches für antigenspezifische Bindungsstellen kodiert, einzelne Basen ausgetauscht. Dies ist von essenzieller Bedeutung im Prozess der SHM. Die so eingebrachten Mutationen in den

Immunglobulinen bewirken eine Herstellung von bis zu 10^{14} verschiedenen Immunglobulinen (Sanz 1991 und Tonegawa 1983). Bei der darauffolgenden Selektion wird bei schwacher Immunglobulinbindung an das präsentierte Antigen die Zelle in Apoptose befördert. Ist die Bindung allerdings stärker, so kommt es zur Entwicklung der B-Gedächtniszellen (Murphy und Weaver 2018).

1.2 Pathogenese maligner B-Zell-Lymphome

Das pathogenetische Verständnis von Lymphomen ist wichtig, da Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten existieren. Basierend auf pathogenetischen Merkmalen können therapeutische Möglichkeiten verbessert und zielgerichteter gestaltet werden. Maligne Lymphome sind Neoplasien, die ihren Ursprung im monoklonalen Wachstum lymphatischer Zellen haben. Häufig äußern sich Lymphome durch derb-vergrößerte indolente Lymphknoten und B-Symptomatik. Neben dem Befall der Lymphknoten ist auch ein extranodaler Befall möglich. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation und gilt mit einigen Ausnahmen für alle Lymphome. Nach der WHO wird im Allgemeinen zwischen dem Hodgkin- und dem Non-Hodgkin-Lymphom differenziert. Hodgkin-Lymphome stellen 10 % aller Lymphome dar, 90 % beziehen sich auf Non-Hodgkin-Lymphome (Swerdlow 2017). 95 % der Lymphome sind B-Zell-Neoplasien, 5 % T-zellulären Ursprungs (Swerdlow 2017). Die B-Zell-NHL stammen überwiegend von Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums-B-Zellen ab (Küppers 2005).

Während der Entstehung verschiedener B-Zell-Lymphome spielen diverse Mechanismen eine Rolle. Darunter bedeutsam sind chromosomale Translokationen, welche Immunglobulin-Loci und Protoonkogene beinhalten (Küppers und Dalla-Favera 2001; Willis und Dyer 2000). Dies führt zu einer deregulierten und konstitutiven Expression der translozierten Gene. Einige Translokationen finden während der VDJ-Rekombination in der frühen B-Zell-Entwicklung statt (Tsujimoto et al. 1985; Tsujimoto et al. 1988; Jäger et al. 2000). Manche treten als sogenannte „Nebenprodukte“ der Somatischen Hypermutation auf (Küppers und Dalla-Favera 2001; Goossens et al. 1998). Aus weiteren durchgeführten Arbeiten ergeben sich Hinweise, dass die aberrante somatische Hypermutation einen weiteren Faktor in der Pathogenese von einigen Entitäten, wie beispielsweise dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), dem primär mediastinalen B-Zell-Lymphom (PMBL) sowie dem Hodgkin-Lymphom (HL) darstellt

(Pasqualucci et al. 2004; Mottok et al. 2009; Pasqualucci et al. 2001). Zusätzliche Untersuchungen verweisen darauf, dass sich *SOCS1*-Mutationen im HL, DLBCL, PMBL und im Follikulärem Lymphom (FL) aus der aberranten somatischen Hypermutation ableiten (Mottok et al. 2009).

Es gibt Hinweise, dass viele Lymphome abhängig von der B-Zell-Rezeptorexpression sind (Guvén et al. 1980; Segal et al. 1991; Yano et al. 1992). Ausnahmen hierbei stellen das HL und das PMBL dar. HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) stammen von präapoptotischen Keimzentrums-B-Zellen ab, die keinen B-Zell-Rezeptor exprimieren (Küppers 2005). Zusätzlich spielt die Interaktion der Tumorzellen mit der Mikroumgebung im Hodgkin- und follikulärem Lymphom eine wichtige pathogenetische Rolle im Überleben und der Proliferation der neoplastischen Zellen. Es gibt Hinweise, dass in einigen Lymphomen die Lymphomzellen durch Antigenbindung zur Proliferation stimuliert werden (Küppers 2005).

Einen weiteren Faktor stellen virale Infektionen dar. So ist das cHL in ungefähr 40 % der Fälle EBV-positiv (Kapatai und Murray 2007). In bereits durchgeführten Arbeiten zeigte sich, dass in EBV-positiven Fällen zwei Membranproteine exprimiert werden, das LMP1 und LMP2a. LMP1 imitiert dabei den aktiven CD40 Rezeptor und LMP2a die Signalkaskade über den B-Zell-Rezeptor. In beiden Fällen handelt es sich um überlebenswichtige Signale der Keimzentrums-B-Zellen (Kapatai und Murray 2007). Die endemische Form des Burkitt-Lymphoms (BL) ist in nahezu 100 % EBV-assoziiert (Neri et al. 1991).

Darüber hinaus birgt das Durchlaufen der Keimzentrumsreaktionen Risiken einer malignen Transformation physiologischer Prozesse während der Keimzentrumsreaktion. Die neoplastischen Zellen sind in der Lage die physiologischen Reaktionen für den eigenen Proliferationsvorteil zu nutzen (Pasqualucci 2019). Es kommt zur massiven Proliferation und klonalen Expansion der B-Zellen. Eine Ursache hierfür ist eine transiente *MYC*-Induktion und Suppression repressiver Faktoren wie *EZH2* und *BCL6* (Chang et al. 1996; Béguelin et al. 2013). Zusätzlich werden in Keimzentrums-B-Zellen Tumorsuppressorgene herunterreguliert. Während der somatischen Hypermutation kommt es zu Punktmutationen in der DNA. Um den Prozess der somatischen Hypermutation zu erleichtern, werden in Keimzentrums-B-Zellen Proteine herunterreguliert, die als DNA-Schädigungssensoren fungieren, wie z.B. *ATR* oder *CHEK1*

(Ranuncolo et al. 2008; Ranuncolo et al. 2007). Die hohe Proliferationsrate der Keimzentrums-B-Zellen und Mutationen während der somatischen Hypermuation steigern das Risiko maligner transformierender Ereignisse in den Keimzentrums-B-Zellen (Ramiro et al. 2004; Dorsett et al. 2007; Pasqualucci et al. 2008).

1.3 B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome umfassen eine heterogene Gruppe maligner Neoplasien und leiten sich von Zellen des lymphatischen Systems ab, häufig von Keimzentrums-B-Zellen (Pasqualucci 2019; Küppers 2005; Küppers et al. 1999). Wie bereits erwähnt, steigern die hohe Proliferationsrate der Keimzentrums-B-Zellen und Mutationen während der somatischen Hypermuation das Risiko eines malignen Wachstums der Zellen (Ramiro et al. 2004; Dorsett et al. 2007; Pasqualucci et al. 2008). Klinisch werden B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome bezüglich ihrer Proliferationsrate in indolente und aggressive Entitäten eingeteilt (Armitage und Weisenburger 1998). 95 % leiten sich von B-Zellen ab, die verbleibenden 5 % stammen von T-Lymphozyten (Küppers 2005). Klinisch präsentiert sich das NHL abhängig von der Lokalisation und des Subtyps in einer schmerzlosen Lymphadenopathie, die zervikal, axillär und inguinal auftreten kann. B-Symptomatik kann dabei auch auftreten. Zusätzlich sind extranodale Manifestationen möglich (Swerdlow 2017). Die Inzidenz der NHL ist ansteigend und betrifft hauptsächlich Patienten, die älter als 60 Jahre alt sind (Shankland et al. 2012). Die einzelnen Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Ätiologie, molekularpathogenetischer Faktoren, ihres Immunphänotyps, aber auch in ihrem klinischen Bild und dem therapeutischen Ansprechen (Swerdlow 2017; Küppers 2005). Zu den größten Risikofaktoren zählt die Immunsuppression. Patienten, die beispielsweise aufgrund einer Autoimmunerkrankung, eine immunsuppressive Therapie erhalten, oder an HIV erkranken, haben ein erhöhtes Risiko, ein NHL zu entwickeln (Zintzaras et al. 2005; Shiels et al. 2013). Auch hochdosierte Chemotherapien oder bestimmte virale Infektionen erhöhen das Risiko für das NHL (Shankland et al. 2012). Eine Infektion mit EBV steht in Zusammenhang mit dem endemischen BL (Araujo et al. 1999; Magrath 2012).

Epidemiologisch tritt am häufigsten das DLBCL auf, mit etwa 30 %, gefolgt vom Follikulärem Lymphom, dem Mantel-Zell-Lymphom und dem BL, welches vorwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen vorkommt (Fisher 2003).

1.3.1 Burkitt-Lymphom

Das BL zählt zu den aggressiven NHL und kann in einen sporadischen Subtyp charakterisiert werden, der vorwiegend in Industrieländern vorkommt. Zudem in eine EBV-assoziierte endemische Form, welche in Afrika, Neu Guinea und Teilen Südamerikas vorkommt und eine HIV-assoziierte Form (Araujo et al. 1999; Davi et al. 1998; Blum et al. 2004). Charakteristisch für das BL ist eine hohe Proliferationsrate. Aus diesem Grund neigt es zusätzlich zu einer Metastasierung in das ZNS, welches eine prophylaktische Applikation einer intrathekalen Chemotherapie notwendig macht (Sariban et al. 1983). Studien zeigen, dass eine kurze und intensive Chemotherapie zu einem signifikant verbesserten Überleben führt (Magrath et al. 1996).

Kennzeichnend für das BL sind Translokationen des *MYC*-Onkogens (Dalla-Favera et al. 1982; Taub et al. 1982). Es finden sich in 70 % der Fälle *MYC*-Mutationen, die häufig die Transaktivierungsdomäne betreffen (Schmitz et al. 2012). In 85 % der Fälle zeigen sich, sowohl in EBV-positiven als auch -negativen Formen, chromosomale 8;14 Translokationen (Zech et al. 1976). Ähnliche Translokationen finden sich auch im DLBCL (Schmitz et al. 2012). *MYC* spielt bei der Genregulation eine wichtige Rolle. Dazu gehören beispielsweise Prozesse im Zellzyklus oder während der Signaltransduktion. Eine deregulierte *MYC*-Expression kann also zu einer abnormalen Genregulation führen und basierend darauf eine erhöhte Zellproliferation bewirken (Dang et al. 2005; Johnston und Carroll 1992; Zeller et al. 2006). Eine deregulierte *MYC*-Expression ist nicht alleiniger Faktor in der Pathogenese des BLs. Darüber hinaus sind weitere Läsionen, die ebenfalls mit *MYC* interagieren, verantwortlich für die Entwicklung des BLs (Schmitz et al. 2012; Love et al. 2012; Richter et al. 2012). In ungefähr 35 % der Fälle finden sich inaktivierende *TP53*-Mutationen (Evan et al. 1992; Meyer et al. 2006). Darüber hinaus zeigen sich *CCND3*-Mutationen, die zur hohen Proliferationsrate des BLs beitragen. *CCND3* kodiert für Cyklin D3, welches ein Regulator im Zellzyklus ist (Schmitz et al. 2012; Richter et al. 2012; Peled et al. 2010). *TCF-3*-Mutationen und

Mutationen dessen negativen Regulators *ID3* sind darüber hinaus auch häufig im BL vertreten (Love et al. 2012; Schmitz et al. 2012; Richter et al. 2012).

Das BL leitet sich von Keimzentrums-B-Zellen ab (Yustein und Dang 2007). Hinweise dafür liefern Genexpressionsprofilstudien, in denen gezeigt werden konnte, dass Zellen des BLs DZ-Keimzentrumszellen ähneln (Victora et al. 2012). Zusätzlich weisen weitere Arbeiten darauf hin, dass EBV-negative Zellen sich aus den frühen Zentroblasten ableiten und EBV-positive Zellen von B-Gedächtniszellen beziehungsweise von späten Keimzentrums-Zellen ableiten (Bellan et al. 2005).

1.3.2 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Das sowohl klinisch als auch biologisch sehr heterogene diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) ist mit ungefähr 30-40 % aller Lymphomdiagnosen das am häufigsten vorkommende Lymphom unter den NHL weltweit. Klinisch präsentiert sich diese Entität in einem schnellen Wachstum der betroffenen nodalen oder extranodalen Manifestation des Tumors (Swerdlow 2017; Martelli et al. 2017). In bereits durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das DLBCL in Subgruppen eingeteilt werden kann. Die Einteilung richtet sich nach dem Zellursprung und umfasst die Gruppen: *ABC – activated B-cell-like*, *GCB – germinal centre B-cell-like* und *unclassified* (Li et al. 2018). Dabei zeigen die Subtypen Unterschiede im Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung. Der GCB-Subtyp zeigt eine bessere Prognose verglichen mit dem ABC-Subtypen, welcher eine schlechtere Heilbarkeit hat (Rosenwald et al. 2002). Zusätzlich konnte in NGS-Analysen gezeigt werden, dass beide Subtypen unterschiedliche Mutationsprofile tragen (Li et al. 2018). Das primär mediastinale B-Zell-Lymphom ist als weiterer Subtyp des DLBCLs beschrieben. Auf dieses wird im Folgenden näher eingegangen. Das DLBCL wurde darüber hinaus in einer Studie mit 574 DLBCL-Biopsien weiter genetisch subtypisiert. Dafür wurde eine Exon- und Transkriptom-Sequenzierung durchgeführt und die Subtypisierung, basierend auf dem gemeinsamen Auftreten genetischer Alterationen, etabliert (Schmitz et al. 2018). Dabei wurden vier genetische Hauptsubtypen im DLBCL identifiziert und in einer späteren Arbeit sechs Hauptsubtypen (Shen et al. 2023).

Durchgeführte Untersuchungen ergaben drei Haupttranslokationen im DLBCL. Die am häufigsten auftretende beinhaltet *BCL6* (Offit et al. 1994; Kramer et al. 1998), gefolgt

von *IGH-BCL2* und *MYC* (Kramer et al. 1998; Barrans et al. 2010). Einen weiteren Faktor in der Pathogenese des DLBCLs stellen *SOCS1*-Mutationen dar. Hinweise dafür liefern zu dem Thema durchgeführte Arbeiten. In einer Studie konnten aus 154 DLBCL-Patientenproben 24 *SOCS1*-Mutationen mittels Sequenzierung nachgewiesen werden (Schif et al. 2013). Es konnte auch gezeigt werden, dass inaktivierende *SOCS1*-Mutationen Folge aberranter somatischer Hypermutation sind (Mottok et al. 2009). Aberrante somatische Hypermutationen im DLBCL sind im Allgemeinen sehr heterogen und betreffen sowohl kodierende als auch nicht-kodierende Bereiche. Dies ist vermutlich ein wichtiger Mechanismus, der für die Heterogenität des DLBCLs mitverantwortlich ist. Verschiedene Signalwege sind davon betroffen (Schmitz et al. 2018; Chapuy et al. 2018; Pasqualucci et al. 2011). So zeigte sich im ABC-DLBCL der onkogene NF- κ B-Signalweg konstitutiv aktiv (Davis et al. 2001). Im GCB-DLBCL sind die Signalwege PI3K und JAK/STAT von Mutationen betroffen (Karube et al. 2018; Morin et al. 2013).

1.3.3 Primär mediastinales B-Zell-Lymphom

Das primär mediastinale B-Zell-Lymphom (PMBL) ist, aufgrund klinischer, histopathologischer, immunologischer und zytogenetischer Merkmale, ein Subtyp des DLBCL. Interessanterweise weisen das PMBL und das HL pathogenetische Ähnlichkeiten auf. Es wurde beobachtet, dass einige Patienten mit HL ein Jahr nach Therapie ein PMBL entwickelten, woraus die Annahme resultierte, dass die beiden Entitäten eine pathogenetische Verwandtschaft aufweisen. Eine Genexpressionsprofilstudie konnte ebenfalls auf eine Ähnlichkeit hinweisen. Mehr als ein Drittel der Gene, die im PMBL hoch exprimiert werden, aber nicht hoch im DLBCL exprimiert sind, weisen auch eine gesteigerte Expression im HL auf. Dies gilt insbesondere für *PDL2* (Rosenwald et al. 2003a). Wie im HL sind im PMBL *SOCS1*-Mutationen beschrieben (Melzner et al. 2005; Weniger et al. 2005). Hierzu durchgeführte Studien zeigen, dass in den PMBL-Zelllinien MedB-1 und Karpas1106P *SOCS1*-Mutationen zu einem verzögertem JAK2-Abbau führen (Melzner et al. 2005; Melzner et al. 2006). Die Zelllinie MedB-1 besitzt eine biallelische *SOCS1*-Mutation, welche zum Funktionsverlust von SOCS1, genauer der SOCS-Box-Region, führt, wodurch phospho-JAK2 länger aktiv bleibt, was einen deregulierten JAK/STAT-Signalweg zur Folge haben kann. Aufgrund dieser Tatsache kann *SOCS1* auch als Tumorsuppressorgen interpretiert werden (Melzner et al. 2005). Karpas1106P zeigt eine chromosomale Deletion von

16p13.13, was das gesamte *SOCS1*-Gen beinhaltet, was einen kompletten *SOCS1*-Verlust zur Folge hat. Dies führt, wie in MedB-1 beobachtet, zu einem verzögerten JAK2-Abbau und somit zu einem deregulierten JAK/STAT-Signalweg (Melzner et al. 2006). Zusätzlich wurden in Studien kodierende *SOCS1*-Sequenzen aus 20 PMBL-Tumoren analysiert. Dabei konnten verschiedene *SOCS1*-Mutationen in der Hälfte der Fälle nachgewiesen werden (Melzner et al. 2005).

1.4 Hodgkin-Lymphom

Einleitung

Als Erstbeschreiber des Hodgkin-Lymphoms gilt Thomas Hodgkin, der diese Neoplasie 1832 beschrieb (Hodgkin 1832). Das HL macht einen Anteil von ungefähr 10 % aller Lymphome aus und betrifft, abhängig vom Subtyp, Patienten unterschiedlichen Alters (Swerdlow 2017). Es kommt sowohl bei jüngeren, als auch bei älteren Patienten vor, wobei der Altersgipfel bei 32 Jahren liegt. Die Inzidenz beträgt ungefähr 3/100000 pro Jahr, womit das HL zu den häufigsten Lymphomen in den westlichen Ländern gehört (Swerdlow 2017). Klinisch präsentiert sich das HL in einer schmerzlosen Lymphadenopathie, die meist zervikale (in 75 % der Fälle), mediastinale, axilläre oder paraaortale Lymphknoten betrifft. Extranodale Manifestationen, wie Befall der Leber, Lunge oder des Knochenmarks sind möglich, treten aber seltener auf. Eine B-Symptomatik ist in 40 % der Fälle beschrieben (Swerdlow 2017). Weitere Symptome, wie chronischer Pruritus oder schmerzende befallene Lymphknoten nach Alkoholkonsum, sind charakteristisch für das HL (Brewin 1966; Villafranca et al. 2014). Die Stadieneinteilung des HLs erfolgt nach Ann Arbor (siehe Tabelle 1). Abhängig von der risikoadaptierten Stadieneinteilung wird das HL mit einer Radio-Chemotherapie in kurativer Intention therapiert und ist in bis zu 90 % der Fälle heilbar (Bröckelmann et al. 2018). Allerdings birgt die konventionelle Therapie die Gefahr, aufgrund ihrer Toxizität, ein Zweitmalignom zu entwickeln. Neuere Checkpoint-Inhibitoren und Anti-CD30-Antikörper konjugiert mit Chemotherapeutika, die therapeutisch genutzt werden, zeigen weniger toxische Nebeneffekte (Anas Younes und Stephen M. Ansell 2016). Auf diese und die Therapie im Allgemeinen wird im Folgenden näher eingegangen.

Ann-Arbor-Klassifikation

Stadium I	Befall in einer Lymphknotenregion oder Vorliegen eines einzigen lokalisierten Befalls außerhalb des lymphatischen Systems
Stadium II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells oder lokalisierter Befall außerhalb des lymphatischen Systems und von Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells
Stadium III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen bzw. von Organen außerhalb des lymphatischen Systems auf beiden Seiten des Zwerchfells
Stadium IV	Nicht lokalisierter, diffuser oder disseminierter Befall einer oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von lymphatischem Gewebe
A	Keine B-Symptome
B	B-Symptome liegen vor

Tabelle 1: Ann-Arbor-Klassifikation erstellt nach ONKOPEDIA, Hodgkin-Lymphom, 12/2023, <https://www.onkopedia.com/s/CQR0D1>, Zugriff am 17.01.2024, Nutzungsgenehmigung vorliegend

Morphologische Klassifikation

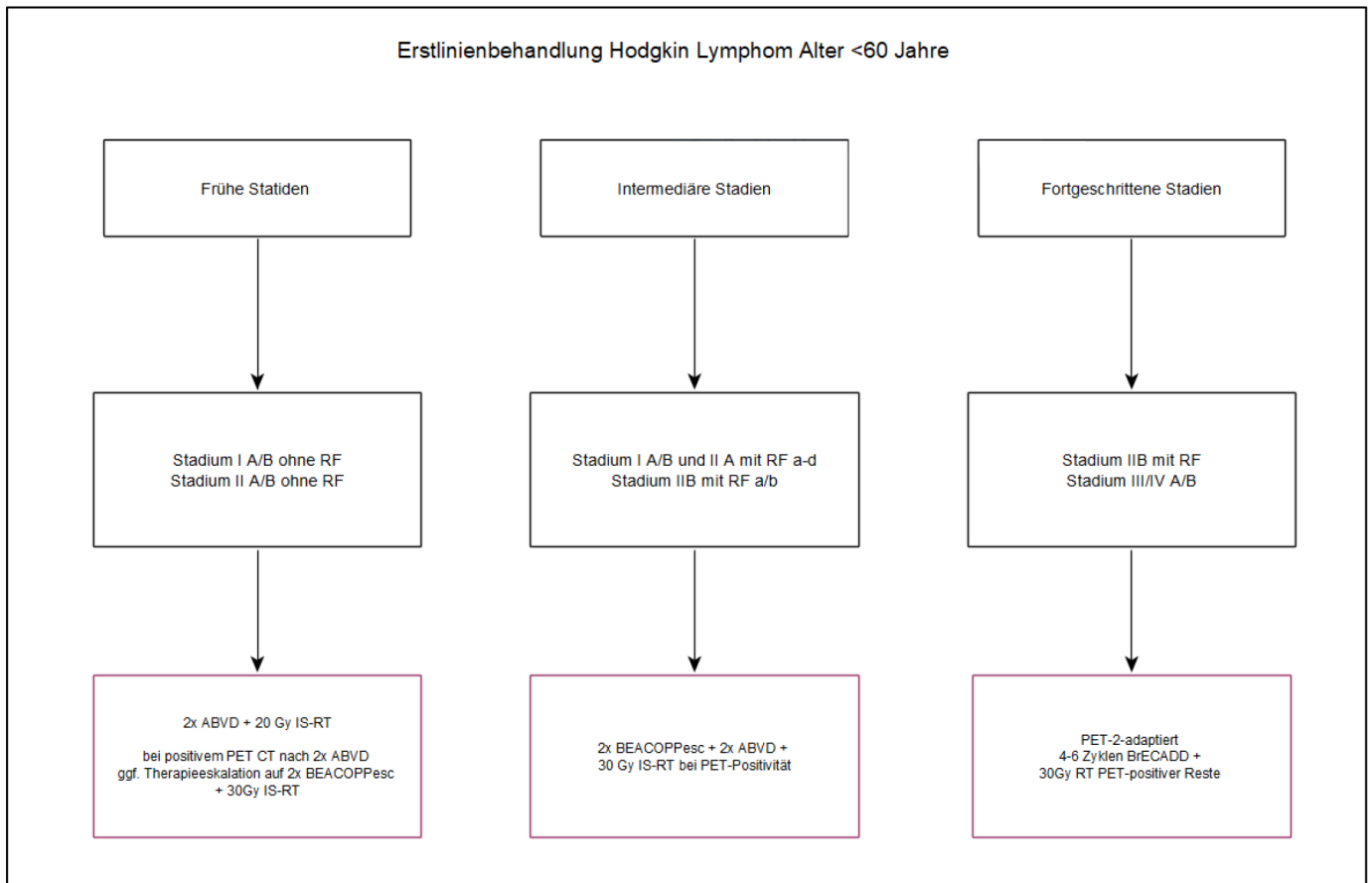
Morphologisch wird das HL in zwei Hauptgruppen unterteilt – Nodulär-lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom (NLPHL) und Klassisches Hodgkin-Lymphom (cHL). Die beiden Subtypen unterscheiden sich weiterhin im Immunphänotypen der Lymphomzellen und in der zellulären Umgebung, aber auch in ihrer klinischen Erscheinungsform (Swerdlow 2017). Das cHL, welches 90 % der HL ausmacht, wird in vier Subtypen gegliedert: Lymphozytenreicher Typ, Noduläre Sklerose, Mischtyp und Lymphozytenarmer Typ. Das NLPHL tritt mit 10 % deutlich seltener auf. Charakteristisch für das HL ist eine sehr niedrige Anzahl neoplastischer Zellen. Im Gegensatz zu anderen Lymphomen liegen diese meist bei <5 % der Tumormasse. Zu den neoplastischen Zellen des cHLs gehören einkernige Hodgkin-Zellen und mehrkernige Reed-Sternberg(RS)-Zellen, welche zusammengenommen als HRS-Zellen bezeichnet werden. Den zellulären Hintergrund bilden entzündliche, nicht-neoplastische, Zellen, wie T- und B-Lymphozyten, Histozyten, Plasmazellen, eosinophile- und neutrophile Granulozyten und Mastzellen. Im NLPHL handelt es sich bei den neoplastischen Zellen um lymphozyten-prädominante Zellen (Swerdlow 2017).

Pathogenese

In der Pathogenese spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Hierbei handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel aus diversen genetischen Läsionen, der GC-B-Zell-Abstammung der neoplastischen Zellen, welche Immunglobulin-V-Genmutationen tragen, deregulierten Signalwegen, wie dem NF- κ B- und JAK/STAT-Signalweg und der Interaktion der neoplastischen Zellen mit der Mikroumgebung, in der sie sich befinden (Küppers 2005; Kanzler et al. 1996; Küppers et al. 2012; Beaurivage et al. 2016). Einen weiteren pathogenetischen Faktor stellt eine EBV-Infektion dar, da in 40 % der Fälle die Tumorzellen EBV-infiziert sind (Kapatai und Murray 2007). Bisher konnten noch nicht alle Mechanismen ausreichend erschlossen werden und bedürfen weiterer Forschung.

Da HRS-Zellen einen außergewöhnlichen Phänotyp zeigen, sich in dem befallenen Gewebe nur wenige neoplastische Zellen befinden und die HRS-Zellen diverse Marker verschiedener Vorläuferzellen unterschiedlichen Ursprungs koexprimieren, war der zelluläre Ursprung der HRS-Zellen schwer zu identifizieren. Zu dem Thema durchgeführte Arbeiten geben Hinweise, dass HRS-Zellen von reifen B-Zellen im GC- oder post-GC-Stadium abstammen (R Küppers et al. 1994). Darauf wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

Therapie des Hodgkin-Lymphoms



Legende:

IS-RT: involved-site Radiotherapie

RF: Risikofaktoren

BEACOPPesc: BEACOPP-eskaliert = Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, Procarbazine, Prednison, Vincristin, Bleomycin, peg. G-CSF

ABVD: Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastin, DTIC

BrECADD: Brentuximab Vedotin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, DTIC, Dexamethason, peg. G-CSF

Risikofaktoren: a: ≥ 3 LK-Areale ; b: hohe BSG; c: großer Mediastinaltumor; d: Extranodaler-Befall

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema Erstlinienbehandlung Hodgkin-Lymphom skizziert nach ONKOPEDIA, Hodgkin-Lymphom, 12/2023, <https://www.onkopedia.com/s/CQR0DI>, Zugriff am 17.01.2024, Nutzungsgenehmigung vorliegend

Die Therapie des HLs erfolgt stadienadaptiert und hat eine langfristige Heilungschance von >80 %. Der Beginn der Therapie erfolgt unmittelbar nach Diagnosestellung, Stadieneinteilung, Risikogruppenklassifikation und ggf. fertilitätserhaltender Maßnahmen. Bei Erstdiagnose ist die Therapieintention in der Regel kurativ. Spätfolgen der Chemo- und Strahlentherapie, welche abhängig von der kumulativen Dosis der Therapie sind, sind Infertilität, Hypothyreose und die Entwicklung koronarer Herzkrankheiten oder von Sekundärmalignomen wie beispielsweise einer AML, eines MDS, eines NHLs oder anderer solider Tumore. Im Folgenden ist eine schematische Darstellung der Therapie für Patienten <60 Jahre dargestellt (Deutsche Gesellschaft fuer

Haematologie und medizinische Onkologie). In frühen Stadien erfolgt eine Kombinationstherapie aus Chemo- und involved-site Radiotherapie. Eine Kombinationstherapie ist hinsichtlich des Heilungserfolges und der Tumorkontrolle vorzuziehen, anstatt einer alleinigen Chemo- oder Radiotherapie (Fermé et al. 2007; Engert et al. 2007). Im intermediärem Stadium erfolgt ebenfalls eine Kombinationstherapie mit BEACOPPesc, ABVD und einer *involved-site* Radiotherapie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF; Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie). Neuer Standard für die Therapie im fortgeschrittenem Stadium ist eine Kombination aus Chemotherapie mit BrECADD und Bestrahlung PET-positiver Reste. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Verträglichkeit im Sinne einer relevanten Verringerung der therapieassoziierten Nebenwirkungen und toxischen Effekte (Borchmann et al. 2022). Beim NLPHL im frühen oder intermediärem Stadium erfolgt die Therapie wie beim cHL. Nur beim lokalisiertem Stadium IA ohne Risikofaktoren ist eine alleinige Strahlentherapie mit sehr guter Prognose ausreichend (Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie).

Für Patienten, die älter als 60 Jahre alt sind, ergeben sich ebenfalls stadienadaptierte Empfehlungen. Aufgrund der erhöhten Toxizität sollten diese Patienten nicht nach BEACOPPesc, sondern stadienadaptiert nach dem A(B)VD-Schema behandelt werden (Wongso et al. 2013). Im Stadium IV ist eine Therapie mit Brentuximab-Vedotin kombiniert mit AVD zugelassen. In der ECHELON-1-Studie zeigte dies gegenüber dem ABVD-Schema eine Verbesserung in der Tumorkontrolle (Straus et al. 2021). Des Weiteren kann in intermediärem oder fortgeschrittenem Stadium eine Therapie mit PVAG erfolgen, sofern Kontraindikationen gegen das ABVD-Schema bestehen (Böll et al. 2011). Zusätzlich ergibt sich eine Empfehlung zur involved-site Radiotherapie für Patienten des frühen und intermediären Stadiums. Patienten in fortgeschrittenen Stadien sollten eher eine lokale Bestrahlung PET-positiver residueller Lymphome erhalten (Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie).

		Stadium (Ann Arbor)			
		IA, IB, IIA	IIB	IIIA	IIIB, IVA, IVB
Risikofaktoren	keine	frühe Stadien		fortgeschrittene Stadien	
	≥ 3 befallene LK-Areale	Intermediäre Stadien			
	hohe BSG				
	großer Mediastinaltumor				
	extranodaler Befall				

Abbildung 2: Einteilung der Risikogruppen nach GHSG (Deutsche Hodgkin Studiengruppe) Hodgkin Lymphom aus ONKOPEDIA, Hodgkin Lymphom, 12/2023, <https://www.onkopedia.com/s/CQR0D1>, Zugriff am 17.01.2024, Nutzungsgenehmigung vorliegend

Therapie im Rezidiv

Zielgerichtete Therapiemöglichkeiten finden bereits in der Therapie des Rezidivs Anwendung. Hierbei sind zwei Medikamentengruppen zu erwähnen: die Checkpoint-Inhibitoren und die Immunkonjugate. Abhängig vom Stadium der Erkrankung kommt es in ca. 10 % der Fälle zum Rezidiv (Burlile et al. 2024). Nur bei ungefähr der Hälfte dieser Patienten kann durch eine Zweitlinienchemotherapie eine Heilung erzielt werden (Sibon et al. 2016). Die Therapie im Chemorezidiv ist dementsprechend eine Herausforderung in der Behandlung des HLs. Therapie der Wahl ist im ersten Rezidiv zunächst eine Reinduktionstherapie mit anschließender Hochdosis-Chemotherapie, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation. Zusätzlich ist, nach Hochdosis-Chemotherapie, eine Therapie mit Brentuximab-Vedotin für Patienten empfohlen, die mindestens einen Risikofaktor aufweisen (Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie). Die Ermittlung der Risikofaktoren erfolgte nach einer großen multivariaten Analyse der GHSG. Zu den Risikofaktoren zählen: Stadium IV im Rezidiv, frühes Rezidiv ≤ 3 Monaten nach Beendigung der Erstlinientherapie, ECOG ≥ 1 , *Bulky disease* $\geq 5\text{cm}$ und ein schlechtes Ansprechen auf die *Salvage*-Therapie (Bröckelmann et al. 2017).

Brentuximab-Vedotin gehört zu den Immunkonjugaten und ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, welcher an CD30 bindet. Über einen *Spacer* ist das Zytostatikum Monomethylauristatin E gebunden. Nach Bindung von Brentuximab-Vedotin an CD30 der Tumorzelle kommt es zur Endozytose des Antigen-Antikörperkomplexes. Hiernach erfolgt intrazellulär eine lysosomale Abspaltung des Zytotoxins. Monomethylauristatin E inhibiert die Polymerisation von Tubulin, was letztendlich die Apoptose der Tumorzelle nach Zellzyklusarrest zur Folge hat (van de Donk, Niels W C J und Dhimolea 2012). Das mediane progressionsfreie Überleben zeigte sich in der internationalen Phase-III-AETHERA-Studie während einer einjährigen Erhaltungstherapie mit Brentuximab-Vedotin, verglichen mit der Gabe eines Placebos, verbessert (42,9 zu 24,9 Monaten). Hiernach erlangte Brentuximab-Vedotin die Zulassung zur Erhaltungstherapie (Moskowitz et al. 2018).

Bei erneutem Rezidiv nach Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation zeigt sich in der Regel eine palliative Situation. In einer Phase-III-Studie Keynote-204 wurde Pembrolizumab, ein PD1-Inhibitor, mit Brentuximab-Vedotin verglichen. In die Studie eingeschlossen waren Patienten mit Rezidiv nach autologer Stammzelltransplantation und Patienten, die für die Transplantation nicht geeignet waren. Für Pembrolizumab zeigte sich ein längeres progressionsfreies Überleben verglichen mit Brentuximab-Vedotin von 13,2 zu 8,3 Monaten (Kuruvilla et al. 2021). Basierend hierauf sollte die Therapie mit Pembrolizumab für Patienten mit erneutem Rezidiv nach autologer Stammzelltransplantation eingesetzt werden (Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie). Pembrolizumab gehört als PD1-Inhibitor zu den Checkpoint-Inhibitoren. PD1 wird von T-Zellen exprimiert. Tumorzellen exprimieren die Liganden PD-L1 oder PD-L2. Durch Bindung dieser an den PD1-Rezeptor der T-Zellen wird der Rezeptor aktiviert und die intrinsische anti-Tumor-Antwort gehemmt. Pembrolizumab steigert diese intrinsische Immunantwort durch Hemmung über den PD1-Rezeptor (Shiravand et al. 2022; Sadeghi Rad et al. 2021; Barbari et al. 2020).

1.4.1 Zellulärer Ursprung von HRS-Zellen

Der zelluläre Ursprung der HRS-Zellen war lange Zeit unklar, da HRS-Zellen einen besonderen Immunphänotypen tragen, welcher, im Gegensatz zu den meisten B-Zell-Non-Hodgkin Lymphomen, keine Zuordnung zu nicht-malignen Immunzellen zulässt (Weniger und Küppers 2021). Was die molekularen Untersuchungen darüber hinaus erschwerte, ist die Tatsache, dass sich nur wenige neoplastische Zellen in der Tumormasse befinden. HRS-Zellen exprimieren diverse Oberflächenmarker, die unterschiedlichen Ursprungszellen zuzuordnen sind, wie beispielsweise B-Zellen, T-Zellen, dendritischen Zellen, NK-Zellen und myeloischen Zellen. So weist die Expression von PAX5 auf den B-Zell-Ursprung hin, doch das Fehlen des B-Zell-Rezeptors widerspricht diesem Ursprung (Foss et al. 1999; Tiacci et al. 2012; Schwering et al. 2003). Genetische Analysen isolierter HRS-Zellen weisen nun auf die Abstammung präapoptotischer GC-B-Zellen hin, da sie Immunglobulin-V-Rearrangements sowohl der Leicht- als auch der Schwereketten tragen (Kanzler et al. 1996; R Küppers et al. 1994; Marafioti et al. 2000). Diese Rearrangements sind spezifisch für B-Zellen, was die Hypothese des B-Zell-Ursprungs untermauert. Zusätzlich weist darauf hin, dass somatische Hypermutationen von IgV-Genen nur in aktivierten GC-B-Zellen stattfinden (Kanzler et al. 1996; Küppers et al. 2012; Bräuninger et al. 2003). Des Weiteren sind HRS-Zellen CD30-positiv. Aufgrund dessen wurden Parallelen zu CD30-positiven B-Zellen gezogen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich HRS-Zellen aus apoptoseanfälligen GC-Zellen entwickeln und dabei das Apoptoseprogramm dieser durch bestimmte Mechanismen umgehen. Die Umgehung dieser Apoptose besteht vermutlich in der Aktivierung von *MYC*, NF- κ B- und des JAK/STAT-Signalwegs. CD30-positive Zellen tragen, wie HRS-Zellen, mutierte *IgV*-Gene, weisen Immunglobulin-Klassenwechsel auf und exprimieren *MYC* (Weniger et al. 2018). Eine weitere Rolle in der Transformation spielt in ca. 40 % der Fälle eine EBV-Infektion. Über die Induktion der Expression von LMP2a, einem Membranprotein, verhindert es die Apoptose von GC-B-Zellen (Mancao und Hammerschmidt 2007) In 30 % der cHL-Fälle konnten EBV-positive HRS-Zellen nachgewiesen werden (Kapatai und Murray 2007). Es scheint, dass diese Umgehungsmechanismen und somit die Transformation präapoptotischer GC-B-Zellen zu HRS-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen, die bisher noch nicht ausreichend untersucht worden sind (Weniger und Küppers 2021).

1.4.2 Molekularpathogenetische Aspekte der HRS-Zellen

Charakteristisch für das HL ist das Zusammenspiel diverser Faktoren, die zur Pathogenese dieser Entität beitragen. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, stellt der zelluläre Ursprung der HRS-Zellen einen wichtigen pathogenetischen Faktor dar. Molekularpathogenetische Merkmale ließen sich bisher nur erschwert untersuchen, da die Isolation der HRS-Zellen aus dem Gewebe, aufgrund der geringen Anzahl im neoplastischen Gewebe, problematisch war. So konnten erst kürzlich durchgeführte Arbeiten, wie Gesamtexomsequenzierungen, nähere Einblicke in genetische Läsionen bieten (Tiacci et al. 2018; Reichel et al. 2015; Wienand et al. 2019). Das cHL weist eine Vielzahl chromosomaler Abnormalitäten auf, wie Aneuploidien oder strukturelle Aberrationen (K. Weber-Matthiesen et al. 1995). Darüber hinaus konnte in bereits durchgeführten Arbeiten gezeigt werden, dass die Beteiligung deregulierter Signalwege pathogenetisch bedeutsam ist. Dieses Wissen kann für die Etablierung neuerer zielgerichteter Medikamente, wie beispielsweise Antikörper, genutzt werden. Betroffene deregulierte Signalwege sind der NF- κ B- und der JAK/STAT-Signalweg (Weniger et al. 2005; Joos et al. 2000; Gunawardana et al. 2014; Schmitz et al. 2009; Emmerich et al. 2003). Insgesamt benötigt es mehr als nur eine Mutation um den NF- κ B-Signalweg zu deregulieren (Weniger und Küppers 2021). Einen weiteren Aspekt in der Pathogenese spielt die Immunevasion der HRS-Zellen. Am häufigsten mit etwa 75 % sind dabei Variationen in der Kopieanzahl der Gene oder Amplifikationen, welche die Gene PD-L1 und PD-L2 auf Chromosom 9p24.1 betreffen (Green et al. 2010). Zusätzlich weisen einige Arbeiten auf die pathogenetische Rolle EBV-infizierter HRS-Zellen hin. In 40 % der Fälle des cHLs zeigt sich eine EBV-Positivität der neoplastischen Zellen. Hierbei ist vor allem pathogenetisch die Expression der folgenden Gene bedeutsam: *EBV nuclear antigen 1* (EBNA1), *latent membrane protein 1* (LMP1) und *latent membrane protein 2a* (LMP2a). LMP1 ähnelt dem Oberflächenmarker CD40 und wirkt somit costimulatorisch auf B-Zellen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass EBV-positive Zellen die Apoptose gestörter Keimzentrums-B-Zellen verhindern (Küppers et al. 2012).

Die Interaktion der neoplastischen Zellen mit ihrer direkten Umgebung ist komplex und pathogenetisch bedeutsam. Durch diese Prozesse wird sowohl die Proliferation als auch das Überleben der HRS-Zellen gefördert. Die HRS-Zellen sezernieren dabei Zytokine und Chemokine, die wiederum Immunzellen und Fibroblasten in die Mikroumgebung der HRS-Zellen rekrutieren und somit die HRS-Zellen in ihrer Proliferation und im

Überleben unterstützen. Zusätzlich trägt die Mikroumgebung vermutlich dazu bei, dass die HRS-Zellen nicht durch tumorhemmende Immunmechanismen erkannt werden (Weniger und Küppers 2021).

Zusammenfassend kann, basierend auf bereits durchgeführten Arbeiten, beobachtet werden, dass keine krankheitsdefinierende genetische Läsion existiert. Es benötigt also ein Zusammenspiel aus mehreren Faktoren für die Pathogenese des HLs. Hierbei scheinen auch die deregulierten Signalwege JAK/STAT und NF- κ B von zentraler Bedeutung zu sein (Weniger und Küppers 2021).

1.4.3 Deregulierte Signalwege im Hodgkin-Lymphom

Deregulierte Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des HLs. Hierbei sind insbesondere zwei Signalwege von zentraler Bedeutung: der JAK/STAT-Signalweg und der NF- κ B-Signalweg, welcher in einen klassischen- und einen alternativen Signalweg eingeteilt werden kann (siehe schematische Darstellung in Abbildung 3 und 4). In HRS-Zellen wurden multiple genetische Läsionen im NF- κ B-Signalweg gefunden, welche essentiell für die Proliferation und das Überleben der neoplastischen Zellen sind (Küppers et al. 2012). EBV-positive Zellen können über die Expression von LMP1, welches einen aktiven CD40 Rezeptor imitiert, den NF- κ B-Signalweg stimulieren (Kilger et al. 1998). Der JAK/STAT-Signalweg wird über Zytokine aktiviert. In bereits durchgeführten Arbeiten konnte eine konstitutive Aktivität von STAT3, -5 und -6 in HRS-Zellen gezeigt werden (Kube et al. 2001; Guiter et al. 2004; Skinnider et al. 2002). Zusätzlich wurden chromosomale *JAK2*-Zugewinne, seltener Translokationen im *JAK2*-Gen und inaktivierende *SOCS1*-Mutationen beobachtet (Joos et al. 2000; van Roosbroeck et al. 2011; Weniger et al. 2005). Darauf wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. Weitere deregulierte Signalwege sind der PI3/AKT-Signalweg und der MAPK/ERK-Signalweg (Dutton et al. 2005; Zheng et al. 2003). Zusätzlich konnte eine aberrante Expression und Aktivität multipler Rezeptor-Tyrosin-Kinasen beobachtet werden, was eine Steigerung der Proliferation und des Überlebens zur Folge hat (Renné et al. 2005).

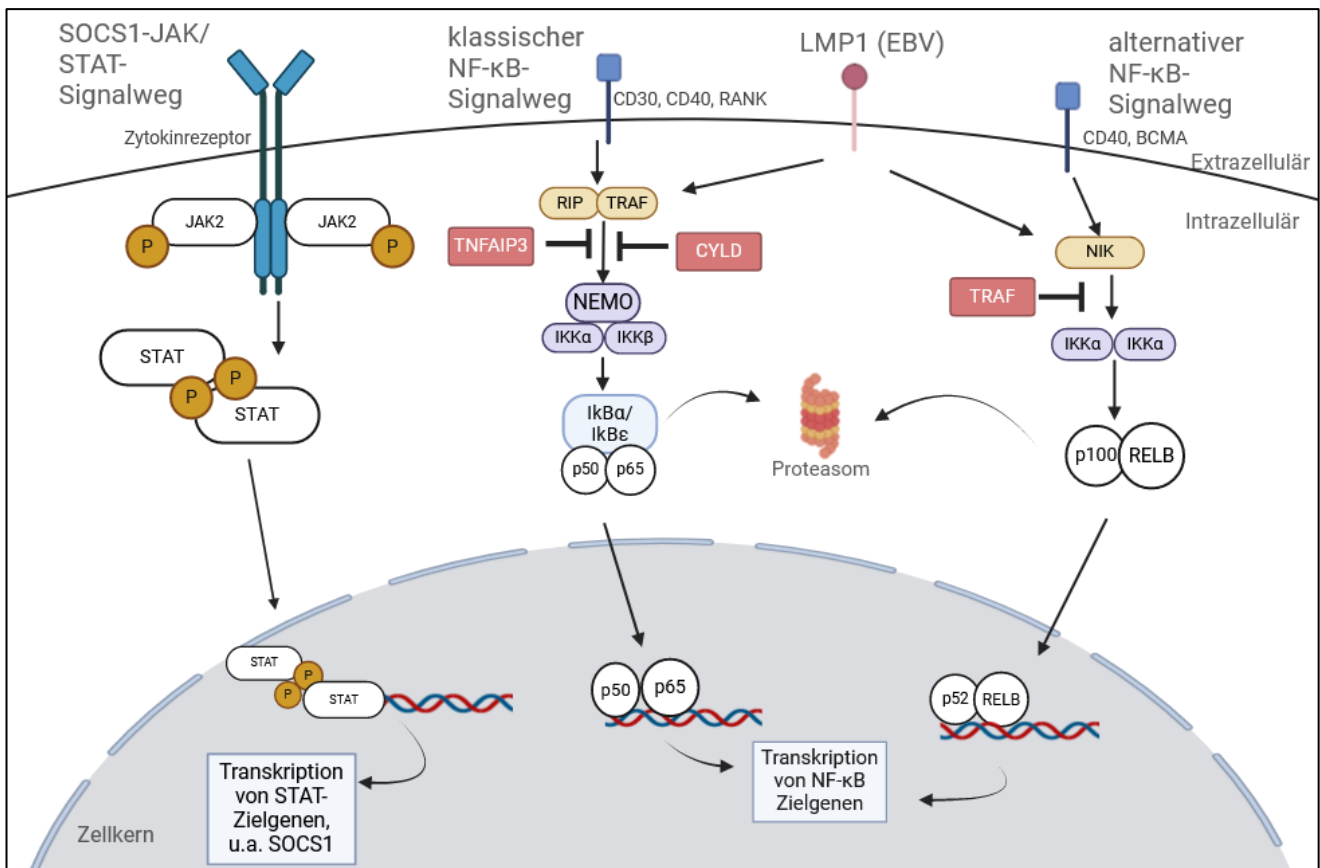


Abbildung 3: Übersicht über deregulierte Signalwege im Hodgkin-Lymphom, dargestellt JAK/STAT-Signalweg, klassischer- und alternativer NF-κB-Signalweg. Bei EBV-Infektion Expression eines LMP1-Rezeptors möglich, welcher einen aktiven CD40-Rezeptor imitiert, sodass auf diese Weise der NF-κB-Signalweg stimuliert wird. Skizziert nach (Küppers et al. 2012), Nutzungsgenehmigung vorliegend, created in BioRender. S, J. (2025) <https://BioRender.com/y69g77h>

1.4.3.1 NF-κB-Signalweg

Der NF-κB-Signalweg wird in zwei Signalwege aufgeteilt, den klassischen- und den alternativen NF-κB-Signalweg. Diese sind an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt, wie der Proliferation, des Überlebens und der Differenzierung von Zellen und Entzündungsreaktionen. Die NF-κB-Transkriptionsfaktor-Familie besteht aus fünf Faktoren: REL, RELA, RELB, p50 und p52 (Vallabhapurapu und Karin 2009; Küppers et al. 2012; Pahl 1999).

Der klassische NF-κB-Signalweg wird über TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren CD30, CD40 und RANK stimuliert. Dies führt im nächsten Schritt zur Aktivierung des IKK-Komplexes, bestehend aus IKKα, IKKβ und NEMO, welches eine Phosphorylierung von NF-κB-Inhibitoren, IκBα und IκBε zur Folge hat. Auf diese Weise sind die Inhibitoren für die Ubiquitinierung markiert und werden im Anschluss proteasomal abgebaut. Die NF-κB-Faktoren werden dadurch freigesetzt und können in den Zellkern translozieren.

TNFAIP3 und CYLD sind in diesem Signalweg negative Regulatoren (Vallabhapurapu und Karin 2009; Küppers et al. 2012). Der alternative NF- κ B-Signalweg wird über MAP3K14 (NIK) stimuliert. Dies bewirkt die Phosphorylierung und Aktivierung des IKK α -Komplexes, welches die Prozessierung von p100 zur Folge hat, woraus sich p52 entwickelt. p52 kann dann als Heterodimer mit RelB in den Zellkern gelangen und dort die Transkription der Zielgene stimulieren. TRAF3 stellt in diesem Signalweg den Hauptinhibitor von MAP3K14 dar (Vallabhapurapu und Karin 2009). Beide Signalwege sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Ein konstitutiv aktiver NF- κ B-Signalweg ist kennzeichnend in einigen B-Zell-Lymphomen, wie dem ABC-DLBCL, PMBL und dem MALT-B-Zell-Lymphom (Lim et al. 2012). Auch im HL ist dieser von pathogenetischer Relevanz. HRS-Zellen exprimieren alle oben genannten fünf Faktoren (Weniger und Küppers 2016). Durchgeführte Arbeiten geben Hinweise auf die Aktivität des klassischen und des alternativen NF- κ B-Signalweges in HRS-Zellen. In HL-Zelllinien konnte nukleäres Rel, p50 und p65 identifiziert werden, was auf die Aktivität des klassischen Weges hinweist (Ralf C. Bargou et al. 1996). Erstellte Genexpressionsprofile aus primären HRS-Zellen zeigten eine deutliche NF- κ B-Signatur, was einen weiteren Hinweis dafür darstellt (Brune et al. 2008). Hinweisend für den alternativen NF- κ B-Signalweg ist die Detektion des p52-RelB-Komplexes in HRS-Zellen und der Nachweis von NIK in HL-Zelllinien-Zellen (Weniger und Küppers 2016). In durchgeführten Arbeiten zeigte sich bei Inhibition beider Signalwege in HL-Zelllinien eine reduzierte Proliferation und gesteigerte Apoptose (R. Bargou et al. 1997; Izban et al. 2001; Ranuncolo et al. 2012). Darüber hinaus konnten genetische Läsionen in HRS-Zellen gefunden werden, die sowohl den klassischen als auch alternativen NF- κ B-Signalweg betreffen (Weniger und Küppers 2016). Es zeigten sich beispielsweise inaktivierende Mutationen in Genen der negativen Regulatoren *TNFAIP3* (40 %) und *NFKBIA* (20 %) (Schmitz et al. 2009; Cabannes et al 1999). Amplifikationen zeigten sich bei *REL* und *NIK* in 40 % und 30 % der Fälle (Joos et al. 2002; Martin-Subero et al. 2002; Otto et al 2012). Weitere seltene Mutationen betreffen *CYLD* und *TRAF3* (Schmidt et al. 2010; Otto et al. 2012).

Der NF- κ B-Signalweg zeigt auch Interaktionen mit dem JAK/STAT-Signalweg in HRS-Zellen. Über die auf diese Weise erfolgte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges kann das Zellüberleben vermittelt werden. In HL-Zelllinien konnte die positive Regulation von IL13 und STAT5a durch NF- κ B beschrieben werden, welches einen Indikator für

aktives NF- κ B in HRS-Zellen darstellt. NF- κ B kann direkt an *STAT5* binden und dessen Expression fördern. Dies führt zu hohen *STAT5*-Leveln in HRS-Zellen und verweist auf das Interaktionspotential des NF- κ B-Signalweges mit dem JAK/STAT-Signalweg (Hinz et al. 2002).

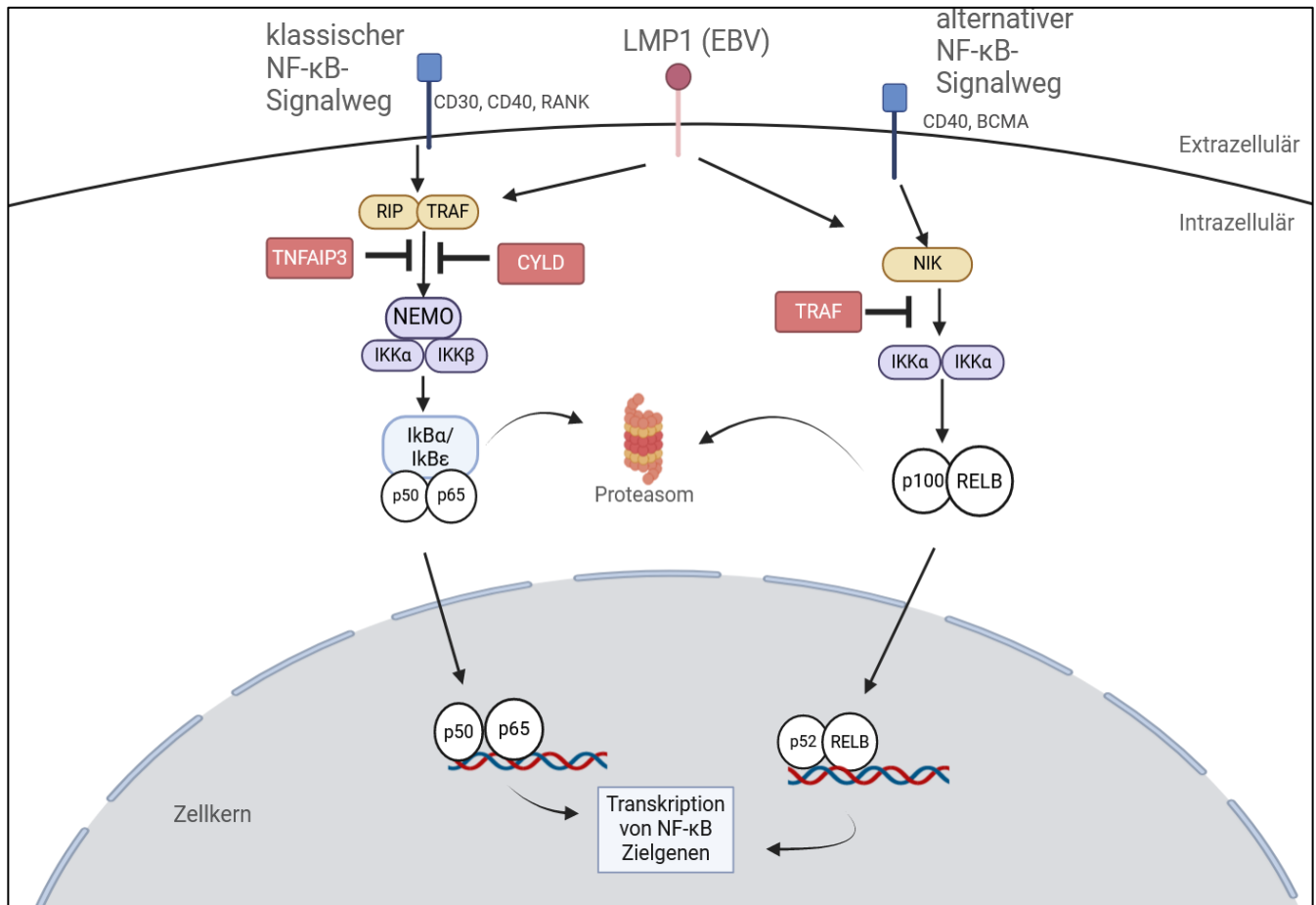


Abbildung 4 NF- κ B-Signalweg: klassischer und alternativer Signalweg, skizziert nach (Küppers et al. 2012), Nutzungsgenehmigung vorliegend. Created in BioRender. S, J. (2025) <https://BioRender.com/rpcjvqj>.

Klassischer Signalweg: Stimulation über diverse Rezeptoren durch bspw. Wachstumsfaktoren, Zytokine etc. Daraufhin kommt es über Aktivierung des IKK-Komplexes zur Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau von I κ B α und I κ B ϵ . Dies ermöglicht die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren p50 und p65, die daraufhin in den Zellkern translozieren und somit die Transkription bestimmter Zielgene initiieren. Negative Feedbackregulatoren sind TNFAIP3 und CYLD. **Alternativer Signalweg:** NIK-induzierte Aktivierung des IKK α -Komplexes. Dies ermöglicht die Prozessierung von p100 zu p52. Daraufhin kann p52/RELB-Heterodimer in den Zellkern translozieren, wodurch es zur Stimulation der Transkription kommt. Negativer Feedbackregulator von NIK ist TRAF3.

Bei EBV-Infektion Expression eines LMP1-Rezeptors möglich, welcher einen aktiven CD40-Rezeptor imitiert, sodass auf diese Weise der NF- κ B-Signalweg stimuliert wird (Küppers et al. 2012).

1.4.3.2 JAK/STAT-Signalweg

Physiologisch ist der JAK/STAT-Signalweg in verschiedene biologische Prozesse der Zellen, wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Immunregulation, involviert (Ying et al. 2019; Lemmon und Schlessinger 2010; Endo et al. 1997) (siehe Abbildung 5). Er stellt eine wichtige Verbindung zwischen externen und internen zellulären Prozessen, vorwiegend über Zytokinbindung, dar und ist von zentraler Bedeutung für das Zellwachstum, die Entwicklung, Differenzierung und das Überleben der Zellen des hämatopoetischen Systems (Ghoreschi et al. 2009). Bisher konnte untersucht werden, dass Aberrationen dieses Signalwegs Auswirkung auf Tumorprogression und Metastasierung haben (Pencik et al. 2016).

Durch Ligandenbindung, meist Zytokinbindung, an den Rezeptor, kann dieser dimerisieren, woraufhin JAK2 phosphoryliert und somit aktiviert wird. Die aktivierte JAK2 ermöglicht die Phosphorylierung von STATs, die daraufhin über ihre SH2-Domäne ebenfalls dimerisieren und so in den Zellkern eintreten können. Im Zellkern binden sie an die DNA und induzieren die Expression von bestimmten Zielgenen, wie *SOCS1* (Ilangumaran et al. 2004) (siehe Abbildung 5). In einigen wenigen Fällen können sie die Expression einiger Gene unterdrücken (Kang et al. 2013). Das SOCS1-Protein fungiert als negativer Feedbackregulator, indem es pJAK2 für den proteasomalen Abbau markiert (Beaurivage et al. 2016).

Januskinasen, wie JAK2, gehören zu den Tyrosinkinasen und können im aktivierten Zustand Tyrosinreste phosphorylieren. Zur Januskinasefamilie gehören vier Mitglieder: JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2, welche verschiedene Domänen mit unterschiedlichen Funktionen tragen (Stark et al. 1998). *JAK*-Mutationen sind mitverantwortlich für einige maligne Erkrankungen, wie beispielsweise Polycythaemia Vera, myeloproliferative Erkrankungen oder einige Leukämien (Kiladjian 2012; Levine et al. 2005). In etwa 20 % der untersuchten HL-Fälle konnten chromosomale *JAK2*-Zugewinne entdeckt werden (Joos et al. 2000; van Roosbroeck et al. 2011).

STAT steht für *Signal Transducers and Activators of Transcription* und kann als aktiviertes Dimer in den Zellkern gelangen und dort als Transkriptionsfaktor fungieren. Zur STAT-Familie gehören sieben Mitglieder (STAT 1-4, 5a, 5b und 6). In bereits durchgeführten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass genetische Läsionen, welche *STATs*, insbesondere *STAT3* und *STAT5*, betreffen, maligne Auswirkungen haben

können. Bei Persistenz von STAT3 und STAT5 kommt es zur gesteigerten Proliferation und Überleben von Tumorzellen (Yu et al. 2014). So korreliert beispielsweise im DLBCL eine hohe STAT3-Aktivität mit einer schlechten Prognose (Wu et al. 2011; Ding et al. 2008).

In durchgeführten Untersuchungen im cHL konnte in 87 % der Fälle Deregulationen im JAK/STAT-Signalweg beobachtet werden. Es wurden genetische Veränderungen in *SOCS1*, *STAT3*, *STAT5*, *STAT6*, *JAK1*, *JAK2* und *PTPN1* gefunden (Tiacchi et al. 2018). Darüber hinaus konnte die konstitutive Aktivität dieses Signalwegs in einigen Tumorentitäten, wie dem Prostata-Karzinom, einigen Sarkomen und Lymphomen beobachtet werden (Thomas et al. 2015). Diese konstitutive Aktivität geht auch mit einer gesteigerten Tumorpheriferation einher sowie mit Mechanismen, welche die Tumorpheriferation steigern, wie beispielsweise eine gesteigerte Angiogenese im umliegenden Tumorgewebe (Lee et al. 2010; Jarnicki et al. 2010). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivität von STAT3, 5 und 6 auf einen deregulierten JAK/STAT-Signalweg hinweist. Dies wurde in einigen Lymphomen, wie dem cHL und dem PMBL beobachtet (Kube et al. 2001; Guiter et al. 2004; Skinnider et al. 2002).

Ein besseres Verständnis über den JAK/STAT-Signalweg und im Allgemeinen über Signalwege, ermöglicht den Einsatz neuer zielgerichteter Medikamente. So finden aktuell JAK2-Inhibitoren, wie Ruxolitinib, Einsatz in der Therapie einiger myeloproliferativer Erkrankungen (Baffert et al. 2010).

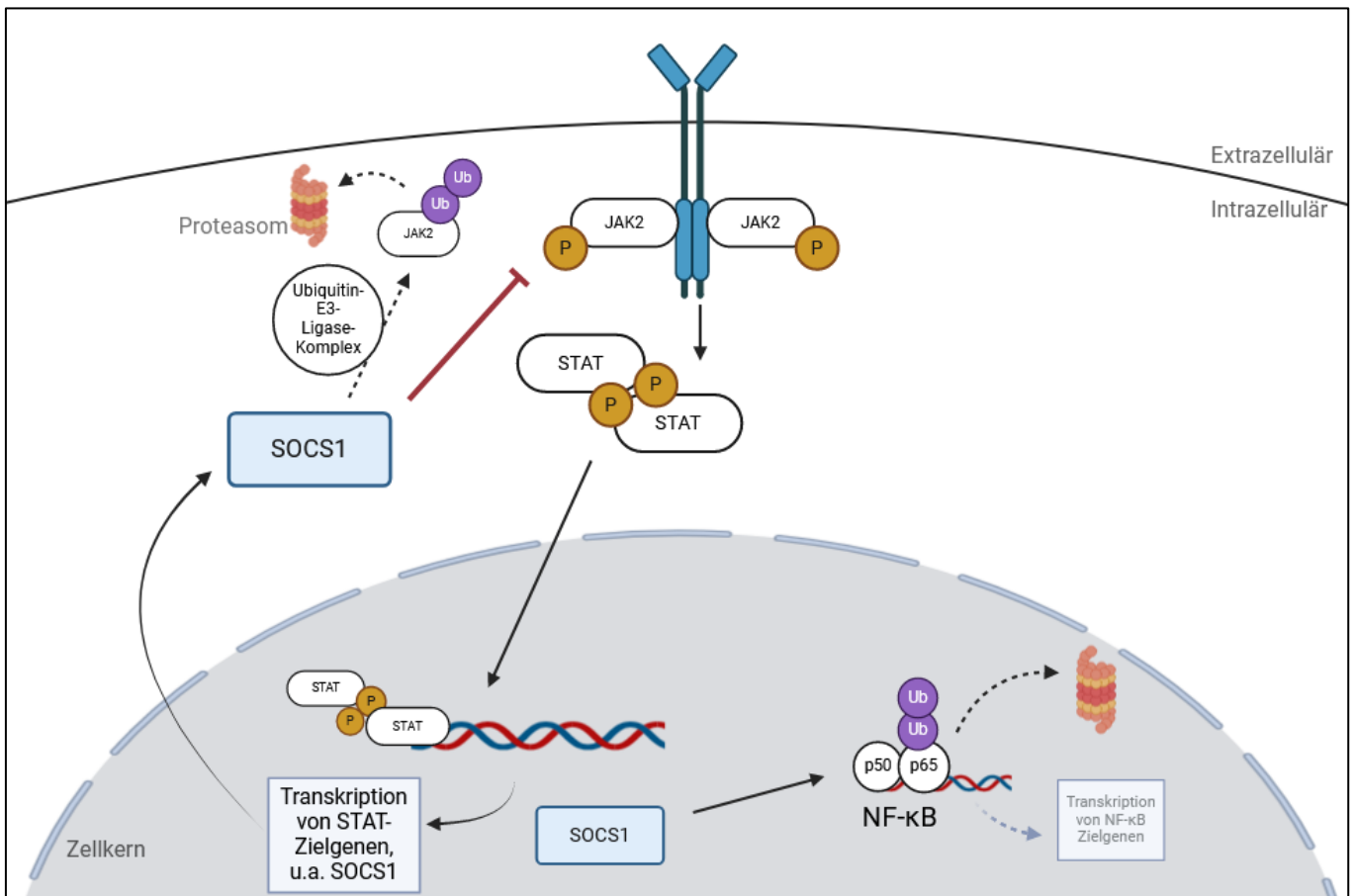


Abbildung 5: Graphische Darstellung des JAK/STAT-Signalweges, skizziert nach (Beaurivage et al. 2016), Nutzungsgenehmigung vorliegend. Created in BioRender. S, J. (2025) <https://BioRender.com/84jzipp>. Nach Ligandenbindung an Zytokinrezeptor erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors mit anschließender JAK2-Phosphorylierung, woraufhin die STAT-Phosphorylierung stattfindet. Nach Dimerisierung der p-STATs erfolgt die Translokation in den Zellkern, woraufhin die Transkription verschiedener Zielgene initiiert wird u.a. Transkription von SOCS1. SOCS1 fungiert als negativer Feedbackregulator über SOCS-Box, indem es über Bildung eines Ubiquitin-E3-Ligase-Komplex die Ubiquitinierung von JAK bewirkt, sodass dieses proteasomal abgebaut werden kann. Interaktion mit dem NF-κB-Signalweg über Ubiquitinierung von von p65/RELA und somit Minderung der Aktivität des NF-κB-Signalweges.

1.4.3.2.1 Suppressor of cytokine signaling 1 – SOCS1

SOCS1 gehört zur SOCS-Familie (*Suppressor of cytokine signaling*), welche aus acht intrazellulären Proteinen besteht (SOCS1-7 und CIS). Es ist ein Zytokin-induzierbarer negativer Feedbackregulator im JAK/STAT-Signalweg. Alle Mitglieder verfügen über eine zentrale SH2-Domäne, welche mit phosphorylierten Tyrosin-Resten interagiert (Yoshimura et al. 2007). Darüber hinaus besitzen alle eine N-terminale Domäne unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz und eine C-terminale SOCS-box-Domäne, welche in der Lage ist, einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex zu rekrutieren und auf diese Weise die Degradation von bestimmten Proteinen zu vermitteln. Die SOCS-Box hat eine Länge von 40 Aminosäuren (Linossi und Nicholson 2012). Die Struktur des

SOCS1-Proteins ist in der Abbildung 6 graphisch dargestellt und beschrieben (Beaurivage et al. 2016).



Abbildung 6: SOCS1-Protein aus (Beaurivage et al. 2016), Nutzungsgenehmigung vorliegend. KIR (Kinase Inhibitory Region): hemmt katalytische Aktivität von JAK; SH2-Domäne (Src-homology2): bindet pTyr; ESS-Subdomäne (extended SH2 subdomain): komplettiert SH2-Bindungsaktivität; SOCS-Box: kann E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex bilden über Rekrutierung von Elongin B/C und Cullin 5-Proteine; NLS (nuclear localized signal)

Aminosäuresequenz	Region/Domäne
55-66	KIR
67-78	ESS
79-174	SH2
161-210	SOCS box
173-182	Interaktion mit Elongin BC-Komplex

Tabelle 2: Aminosäuresequenz von SOCS1 mit jeweils zugehöriger Region (Weniger et al. 2006)

Das SOCS1-Gen ist auf dem Chromosom 16p13.13 lokalisiert und codiert für ein Protein der Länge von 211 Aminosäuren. Bisher sind einige Funktionen von SOCS1 beschrieben worden. SOCS1 fungiert als Inhibitor im JAK/STAT-Signalweg (siehe Abbildung 5 und 7). Darüber hinaus kann SOCS1 sowohl als Tumorsuppressor angesehen werden als auch als Onkogen (Beaurivage et al. 2016). Mithilfe der SH2-Domäne ist SOCS1 in der Lage über phosphorylierte Tyrosin-Reste von JAK2 und den Zytokinrezeptoren, diese zu blockieren. Des Weiteren ermöglicht die KIR-Region von SOCS1 eine direkte Interaktion mit JAK2 und dessen katalytischer Aktivität (Strebovsky et al. 2011; Koelsche et al. 2009). Zusätzlich spielt SOCS1 eine wichtige Rolle beim proteasomalen Abbau bestimmter Substrate. Dies wird über die SOCS-Box ermöglicht, indem diese mit Elongin-B und -C, Cullin-5 und RING-box-2 (RBX2) interagiert und somit einen Ubiquitin-E3-Ligase-Komplex bildet und die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von JAK fördert (Linossi und Nicholson 2012). Darüber hinaus interagiert SOCS1 mit dem NF- κ B-Signalweg und mindert dessen Aktivität, indem die SOCS-Box-Domäne dazu beiträgt, nukleäres p65 (RELA) zu ubiquitinieren. Auf diese Weise wird p65, ein Transkriptionsfaktor im NF- κ B-Signalweg, zum proteasomalen Abbau befördert (Strebovsky et al. 2011).

Die Funktion als Tumorsuppressor erreicht es durch verschiedene Mechanismen. Es aktiviert p53-Tumorsuppressor-Funktionen, limitiert P21-Funktionen und inhibiert RTK-Signalwege (siehe Abbildung 7) (Beaurivage et al. 2016). SOCS1 steigert die p53-Phosphorylierung auf Ser15 und fördert somit die Transkription p53-abhängiger Gene, die mitunter an der DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind (Calabrese et al. 2009). In einer durchgeführten Studie konnte beobachtet werden, dass SOCS1 die P21-Expression hemmt, und somit dessen onkogene Funktion in Hepatozyten (Yeganeh et al. 2016). In Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwegen fungiert SOCS1 auch als negativer Regulator. Dies konnte in einigen durchgeführten Arbeiten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass SOCS1 mit verschiedenen RTK-Signalwegen interagieren kann, wie beispielsweise mit den Rezeptoren für CSF1, FLT3, PDGF, FGF und EGF. Dabei führte die Aktivierung über diese Rezeptoren auch zur Expression von SOCS1 (Kazi et al. 2014; Beaurivage et al. 2016). Die inhibierende Wirkung erzielt SOCS1 über die Bindung über Phospho-Tyrosin (pTyr) an den aktivierten Rezeptor. Die SOCS-Box ermöglicht den proteasomalen Abbau des jeweiligen Rezeptors (Kazi et al. 2014; Beaurivage et al. 2016). Zusätzlich konnte in weiteren Arbeiten gezeigt werden, dass SOCS1 den HGF-induzierten MET-Signalweg hemmt (siehe Abbildung 7) (Gui et al. 2014). So zeigte sich bei gesteigerter Proliferation von SOCS1 in humanen und murinen HCC-Zellen eine Minderung der MET-Signalweg-abhängigen Proliferation (Gui et al. 2015). Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von SOCS1 als Tumorsuppressor stellen Hypermethylierungen von *SOCS1*-Promotorregionen in einigen Tumorentitäten dar. Diese wurden im Pankreaskarzinom sowie in Akuten Myeloischen Leukämien und Hepatozellulären Karzinomen beobachtet (Chen et al. 2003; Yoshikawa et al. 2001; Komazaki et al. 2004). Zusammengefasst fungiert SOCS1 als Signalinhibitor und trägt somit zur Regulation der Zellproliferation und Apoptose bei. Zudem greift es in die Ubiquitinierung ein und reguliert das Zellwachstum durch seine Rolle als Mediator im proteasomalen Abbau markierter Substrate (Ying et al. 2019).

SOCS1 kann in einigen Fällen auch als Onkogen wirken. Aus durchgeführten Arbeiten ergeben sich Hinweise bezüglich des onkogenen Potentials von SOCS1. Das SOCS1-Protein und die zugehörige mRNA zeigte sich in Proben des malignem Melanoms erhöht, was mit einer Tumordinvasion und Tumordicke korrelierte (Li et al. 2004). Beim *SOCS1*-*Silencing* konnte eine reduzierte Proliferation in humanen Mel526-Melanomzellen detektiert werden (Xu et al. 2015). Des Weiteren spielt SOCS1 eine Rolle bei der

Vermittlung der Resistenz gegen krebshemmende Wirkungen von Interferonen. Dies wird vermittelt durch die Unterdrückung ihrer Fähigkeit, die Tumormunität zu stärken und durch Limitierung antiproliferativer und proapoptotischer Effekte dieser Zytokine (Beaurivage et al. 2016). Zusätzlich konnte die onkogene Wirkung auch darin beobachtet werden, dass SOCS1 die FGFR3-induzierte Aktivierung des MAPK-Signalweges in humanen Chondrozyten verbessert (Ben-Zvi et al. 2006). Diese Ergebnisse weisen zusammengenommen auf das onkogene Potential von SOCS1 hin.

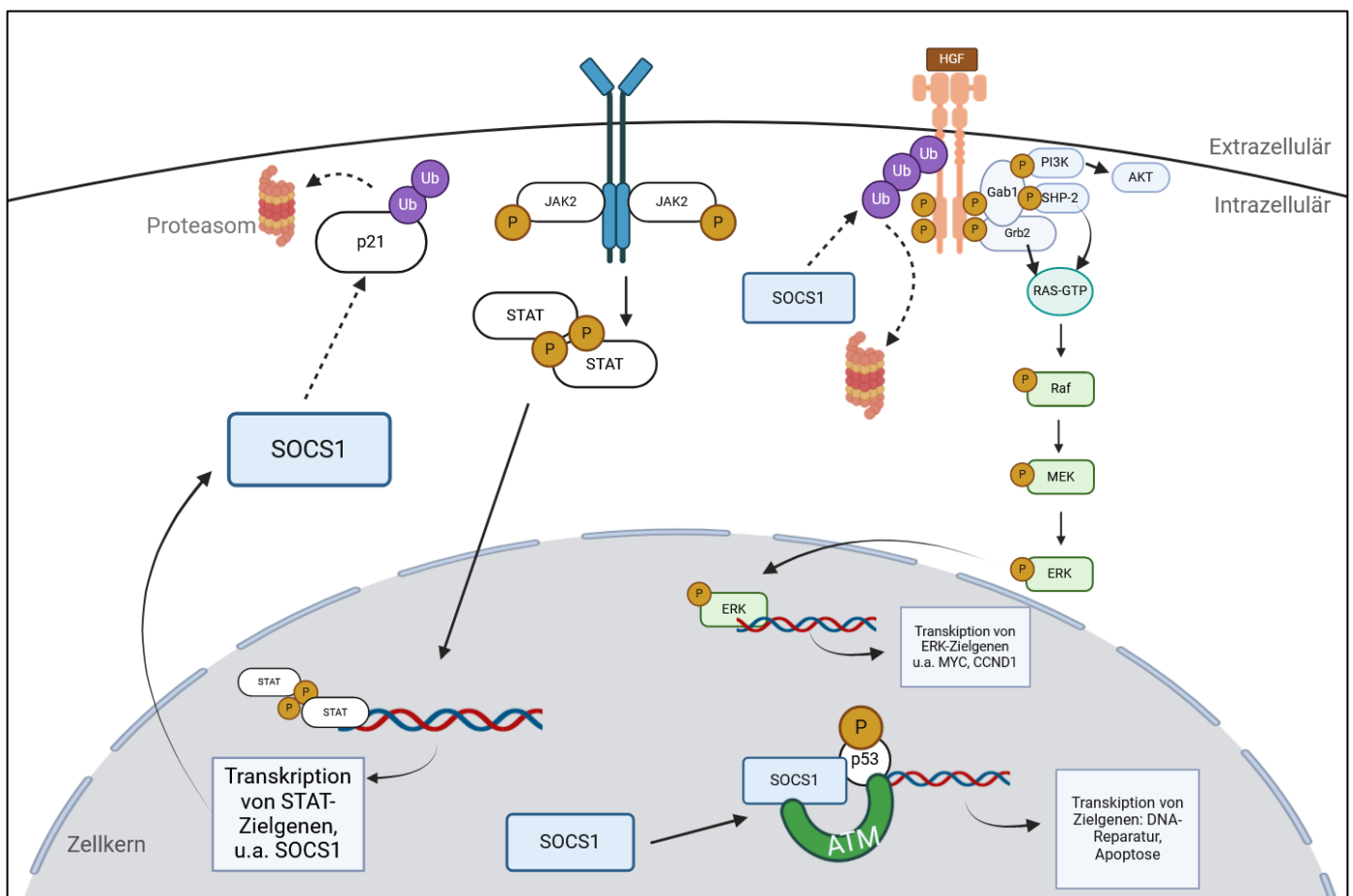


Abbildung 7: Graphische Darstellung des JAK/STAT-Signalweges, SOCS1 als Tumorsuppressor, skizziert nach (Beaurivage et al. 2016), Nutzungsgenehmigung vorliegend. Created in BioRender. S, J. (2025) <https://BioRender.com/iom5d94>.

P53-Aktivierung über Phosphorylierung von p53 und Bildung eines ternären Komplexes über ATM/ATR und somit Aktivierung der Transkription von p53-abhängiger Transkription von Zielgenen (u.a. DNA-Reparatur, Apoptose). Inhibition der onkogenen Wirkung von P21 im Zytosol (im Zellkern trägt P21 eine tumorsuppressive Funktion über CDK-Inhibition, im Zytosol trägt es zur Zellzyklusprogression und Inhibition der Apoptose bei) über Interaktion und konsekutiver Ubiquitinierung und somit proteasomalem Abbau von P21. SOCS1 inhibiert über Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau den MET-Rezeptor Signalweg. HGF aktiviert den MET-Rezeptor, sodass MAPK- und PI3K-Signalweg aktiviert wird (Beaurivage et al. 2016).

1.5 Funktionelle Untersuchungen von SOCS1 in Lymphomzellen

SOCS1-Mutationen konnten durch Untersuchungen von HRS-Zellen aus HL-Patientenproben in 61 % der Fälle detektiert werden (Lennerz et al. 2015). In pädiatrischen HL lag die Mutationsfrequenz sogar bei 80 % (Desch et al. 2020). Bei der Sequenzierung von HL-Zelllinien zeigten sich ebenfalls *SOCS1*-Mutationen. HDLM-2 weist ein mutiertes *SOCS1*-Allel auf und die Zelllinien L-1236 und L-428 tragen eine biallelische *SOCS1*-Mutation (Weniger et al. 2005). Auf den *SOCS1*-Mutationsstatus wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen. Hinweise auf die pathogenetische Rolle von *SOCS1* im HL liefern funktionelle Arbeiten mit HL-Zelllinienzellen (Tiacci et al. 2018). Hierbei konnte eine Proliferationsabnahme nach *SOCS1*-Überexpression in L-1236 beobachtet werden. Auch die Gabe von Fedratinib, einem JAK2-Inhibitor, zeigte einen toxischen Effekt auf das Zellüberleben (Tiacci et al. 2018). Weitere Arbeiten mit cHL-Tumorbiopsien und HL-Zelllinien verweisen auf eine signifikante Assoziation zwischen *SOCS1*-Mutationen und der Akkumulation von pSTAT5 (Weniger et al. 2006).

Bereits durchgeführte Arbeiten zu *SOCS1* im PMBL weisen auf die Rolle von *SOCS1* als Tumorsuppressor hin. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in der kodierenden *SOCS1*-Region in MedB-1-Zelllinienzellen eine biallelische *SOCS1*-Mutation vorliegt, welche die SOCS-Box betrifft. Somit beeinflusst das mutierte SOCS1-Protein den JAK2/STAT5- Signalweg, indem der JAK2-Abbau gestört wird. Zusätzlich zeigte sich bei der Transfektion der MedB-1-Zellen mit einem *SOCS1*-Expressionsplasmid eine Proliferationsverlangsamung verglichen mit dem Kontrollvektor, sowie eine deutliche Reduktion von pJAK2 und pSTAT5 (Melzner et al. 2005). Auch in der PMBL-Zelllinie, Karpas1106P, konnte eine biallelische *SOCS1*-Deletion entdeckt werden (Melzner et al. 2006). Des Weiteren wurden 35 % *SOCS1*-Mutationen in untersuchten Patientenproben des primären mediastinalen B-Zell-Lymphoms gefunden (Lennerz et al. 2015). Da Zellen des PMBLs und des HLs in ihrer Ätiologie Analogien aufweisen, deuten die Ergebnisse der Untersuchungen zu *SOCS1* im primären mediastinalen B-Zell-Lymphom auf die Relevanz von *SOCS1*-Mutationen in der Pathogenese des HLs hin. Die Analogien der beiden genannten Entitäten bestehen in ihrem gemeinsamen mediastinalen Ursprung, dem Verlust der Immunglobulin-Expression und in der Ähnlichkeit in Bezug auf die Hoch- und Runterregulation einiger Gene (Savage et al. 2003; Rosenwald et al. 2003b; Weniger et al. 2005).

1.6 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Hodgkin- und Burkitt-Zelllinien. Für die Arbeit genutzt wurden die Hodgkin-Zelllinien: UHO-1, KM-H2 und L-1236. Bei den Burkitt-Zelllinien handelt es sich um die Zelllinien: BL-41, BL-70 und EB-1.

1.6.1 Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms

1.6.1.1 SOCS1-Mutationsstatus

Zelllinie	Mutationsstatus Genom	Mutationsstatus Proteinsequenz
L-1236	Biallelische <i>SOCS1</i> -Mutation Allel 1: del nt191-nt218 Allel 2: del nt 435-nt446	Allel 1: fs aa64; stop aa74 Allel 2: del aa145-148
KM-H2	<i>wtSOCS1</i>	<i>wtSOCS1</i>
UHO-1	Homozygote Deletion des ganzen Genlokus` inklusive <i>SOCS1</i> Chromosom 16 11,594,740 11,203,525	<i>SOCS1</i> -Verlust
L-428	Biallelische <i>SOCS1</i> -Mutation Allel 1: del nt349-nt359 Allel 2: del nt393-nt407	Allel 1: fs aa117 Allel 2: del aa131-135
SUP-HD1	Homozygote Nonsensemutation c.192C>G	p.Tyr64*
L-540	<i>wtSOCS1</i>	<i>wtSOCS1</i>

Tabelle 3: *SOCS1*-Mutationsstatus der HL-Zelllinien; (Weniger et al. 2006); (Mader et al. 2007); Unveröffentlichte Exom-Sequenzierungen des Instituts für Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

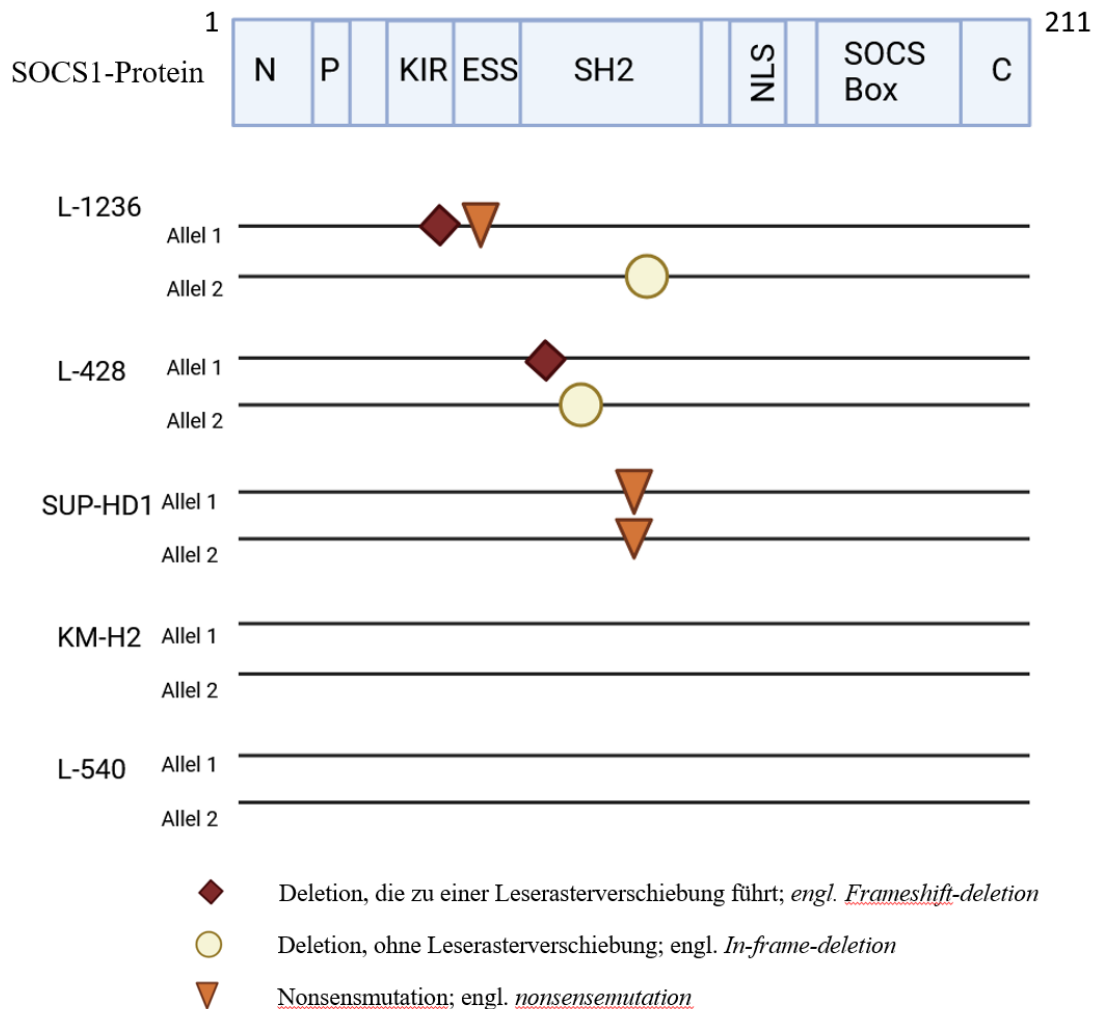


Abbildung 8: SOCS1-Mutationsstatus der HL-Zelllinien: L-1236, L-428, SUP-HD1, KM-H2 (*wtSOCS1*), L-540 (*wtSOCS1*); UHO-1 nicht dargestellt bei homozygoter Deletion des gesamten Genlokus' inkl. SOCS1, betreffend Chromosom 16. Symbole in der Abbildung näher erläutert. SOCS1-Protein oben dargestellt: 1 markiert Beginn und 211 Ende der Aminosäuresequenz; N (N-Terminus); C (C-Terminus); P (PEST-Sequenz und prolinreiche Sequenz) KIR (Kinase Inhibitory Region); SH2-Domäne (Src-homology2); ESS-Subdomäne (extended SH2 subdomain); SOCS-Box; NLS (nuclear localized signal). Created in BioRender. H, F. (2025) <https://BioRender.com/d165rpi>

Die *in frame*-Mutationen der Zelllinien L-1236 und L-428, welche ein SOCS1-Allel betreffen, zeigen einen Verlust von fünf Aminosäuren bei L-428 und vier Aminosäuren bei L-1236. Diese sind in der Nähe der SH2-Domäne lokalisiert. Die SOCS-Box ist in diesem Fall nicht betroffen (Weniger et al. 2006). Da die L-428-Zellen keinen verzögerten JAK2-Abbau zeigen, lässt dies auf eine restliche Proteinfunktion von SOCS1 schließen (Melzner et al. 2005). SUP-HD1 besitzt eine homozygote Nonsensemutation, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt. In Abbildung 8 sind schematisch SOCS1-Mutationen der betroffenen HL-Zelllinien dargestellt. UHO-1 zeigt eine homozygote Deletion des ganzen Genlokus' inklusive SOCS1 (chr 16: 11,594,740 11,203,525).

1.6.2 Zelllinien des Burkitt-Lymphoms

Die genutzten Burkitt-Zelllinien, BL-41, BL-70 und EB-1, weisen keine *SOCS1*-Mutationen auf (Schmitz et al. 2012).

1.7 Fragestellung

Welche funktionelle Rolle spielen wildtyp-*SOCS1* und *SOCS1*-Mutationsvarianten in der Pathogenese des HL und in der Pathogenese von Zellen, welche sich aus Keimzentrums-B-Zellen ableiten? Hieraus leiten sich insbesondere zwei Fragestellungen ab. Inwieweit beeinflusst die Überexpression von *SOCS1* und *SOCS1*-Mutationsvarianten das Wachstum von HL- und BL-Zelllinienzellen? Führt der Verlust von *SOCS1* in Burkitt-Zelllinienzellen, die sich aus Keimzentrums-B-Zellen ableiten, zu einer Proliferationssteigerung?

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Experimente war es die pathogenetische Rolle von *SOCS1* im HL durch die Überexpression von *wtSOCS1* sowie verschiedener *SOCS1*-Mutationsvarianten in Zelllinienzellen des Hodgkin Lymphoms zu untersuchen. Hierfür wurden die HL-Zelllinienzellen L-1236 und KM-H2 gewählt, wobei L-1236 eine biallelische *SOCS1*-Mutation aufweist und KM-H2 keine *SOCS1*-Mutationen hat (siehe Tabelle 3).

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es zu analysieren, ob der Verlust von *SOCS1* in Burkitt-Zelllinienzellen, die als Modell für Keimzentrums-B-Zellen dienen, mit einer Proliferationssteigerung einhergeht. Die hierfür genutzten Burkitt-Zelllinienzellen weisen keine *SOCS1*-Mutation auf (Schmitz et al. 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugen	MULTIFUGE X3 FR	Thermo Fisher Scientific, Thermo Scientific, Waltham, USA
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	MEGAFUGE 16R	Thermo Fisher Scientific, Thermo Scientific, Waltham, USA
Schüttler	KS 4000 ic control	IKA, Staufen, Deutschland
	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR Thermocycler	T100 Thermal cycler	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Multiwellenlängen-UV-Tisch	UV-Tisch	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
Gelkammer	XCell SureLock Electrophoresis Cell 101001-1060	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Gelkammer DNA- Gelelektrophorese	CompactM	Analytik Jena, Biometra, Jena, Deutschland
Elektrophorese-Netzteil	Elektrophorese- Netzteil	CONSORT
Fotoentwickler	INTAS Chemostar XL Fluorescence Imager	Intas, Göttingen, Deutschland
Clean Bench	TecNo Flow, 2F120-II GS	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland

Mikroskop	Primovert	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Inkubator	Hera Cell 150i CO ₂ - Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Thermo Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer, freundlicherweise durch Herrn PhD Vijay Singh zur Verfügung gestellt	FACSLyric™ Flow Cytometry System, drei Laser (blau, rot und violett); 12 Fluoreszenzkanäle; 14 Parameter FACSLyric wird von der Erfassungs- und Analysesoftware BD FACSuite™ unterstützt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA, Hudson, USA
Sequenzier	Sequenzier 3730XI, DNA-Analyzer	Applied Biosystems
Spektralphotometer	NanoDrop One	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wasserbad		Memmert, Schwabach, Deutschland

Tabelle 4: Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Blottingkammer, Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon 10-50 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier 7 cm x 8,4 cm, Immobilon	Merck, Millipore, Darmstadt, Deutschland

Gele 4-12 % Bis Tris 1,5 mm x 10 Well	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Mikroreaktionsgefäß 0,5-2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nitrocellulose Membran, Amersham Protran 0,45 µm NC	Cytiva, Marlborough, USA
PCR-Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1 µl-1000 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
96-Well- und 24-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-Well-, 12-Well- und 48-Platten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen 100 mm x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

2.1.3 Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Acetat	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Bio & SELL, Feucht/Nürnberg, Deutschland
ATP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Big Dye Buffer	Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, USA
Big Dye 1.1	Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, USA
CytoflexS	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Cytoflex Sheath Fluid	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Dubbecco's PBS	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
ECL-Reagenz A	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
ECL-Reagenz B	Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA
EDTA	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
FCS – Fetal bovine serum	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
Gel red, LSYBR Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Gel loading Dye (6x)	New England Biolabs, Ipswich, USA

Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli Sample Buffer 2x	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
LentiX-Concentrator	Takara Bio, Clontech
Marker Protein Spectra Multicolor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPage MES SDS Laufpuffer 20X	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Nukleasefreies Wasser, Ambion	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin/Glutamin (100x)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Quick Ligase Buffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ripa Lysepuffer	Serva, Heidelberg, Deutschland
RPMI 1640 (1X)	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
TransIT-293 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %) in DPBS	Thermo Fisher Scientific, Gibco, Waltham, USA
Tween	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4 PNK Buffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4 Ligation Buffer	New England Biolabs, Ipswich, USA

Tabelle 6: Chemikalien, Puffer und Reagenzien

2.1.4 Laborkits

Für die Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben folgende Kits verwendet.

Kit	Hersteller
NucleoSpin Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
DyeEx 2.0 Spin Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Ipswich, USA

Tabelle 7: Laborkits

2.1.5 Enzyme

Es wurden folgende Enzyme des Herstellers New England Biolabs (Frankfurt a.M.) zur Klonierung verwendet.

Enzym	Puffer	Temperatur	Inkubationszeit
BsmBI	10X NEBuffer 3.1	55 °C	> 5-15 Minuten
PflMI	10X NEBuffer 3.1	37 °C	> 5-15 Minuten
BstEII	10X NEBuffer Cut Smart	37 °C	> 5-15 Minuten
Quick Ligase	2X Quick Ligase Reaction Buffer	25 °C	>5 Minuten
KLD Enzyme Mix	2X KLD Reaction Buffer	25°C	5 Minuten
T4 PNK	10X T4 Ligation Buffer	37°C	30 Minuten
Quick CIP	10X NEBuffer Cut smart	37	30 Minuten

Tabelle 8: Enzyme

2.1.6 Vektoren

Für weitere Klonierungsarbeiten wurden die in Tabelle 9 vorgestellten Ausgangsvektoren genutzt. pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 entspricht dem Vektor pLVX-Tre3G-PG + wtSOCS1. In der Arbeit wird *wtSOCS1* äquivalent zu *hSOCS1* verwendet. pLVX-Tre3G-PG + mCD8A variant lacks cytoplasmic domain entspricht pLVX-Tre3G-PG Lyt2 und dient in den Überexpressionsexperimente als Kontrolle.

Ausgangsvektor	Herkunft	Katalognummer	Klonierung
pLVX-Tre3G-puro (entnommen aus Tet-On® 3G Inducible Expression System)	Takara	631168	pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C201G pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 G232A pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C136T pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 G243A pLVX-Tre3G-PG + mCD8A variant lacks cytoplasmic domain Für alle Vektoren gilt: Induzierbarkeit durch Zugabe von Doxycyclin
pLentiGuide-puro	Addgene	52963	pLentiGuide puroGFP- sgRNA-antiSOCS1
pLentiCRISPR- PuroGFP-AAVS1	Masao Nakagawa, Hokkaido University, Japan		
pCR-XL-TOPO	Invitrogen	K8050-10	
pLentiGuide- sgICAM-PG	James Phelan, NIH, Bethesda, USA		

Tabelle 9: Vektoren

2.1.7 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die verwendeten Zelllinien stammen, sofern nicht anders angegeben, aus dem Leibniz Institute DSMZ und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die verwendeten Zellkulturmedien für die Kultivierung der Zellen stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific (Gibco).

Zelllinien und Kulturbedingungen

Zelllinie	Typ	Ursprung	Medium
U-HO1	human	Hodgkin-Lymphom, Pleuraerguss, cHL, noduläre Sklerose	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
L-1236	human	Hodgkin-Lymphom, peripheres Blut, cHL, Mischtyp	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
SUP-HD1	human	Hodgkin-Lymphom, nach zweitem Rezidiv, cHL, noduläre Sklerose	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
L-428	human	Hodgkin-Lymphom, Pleuraerguss, cHL, noduläre Sklerose	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
KM-H2	human	Hodgkin-Lymphom, Pleuraerguss, cHL, Mischtyp	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
BL-70	human	Burkitt-Lymphom, Tumorgewebe	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
BL-41	human	Burkitt-Lymphom, Tumorgewebe	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
EB-1	human	Burkitt-Lymphom, maxillärer Lymphknoten	RPMI 1640 (1X) 20 % FKS
HEK-293T	human	Embryonale Niere	DMEM 10 % FKS

Tabelle 10: Zelllinien und Kulturbedingungen

2.1.8 Primer

Die, im Folgenden gelisteten, genutzten Primer stammen von dem Hersteller IDT.

Primer	Sequenz
Seq_Hu6_fwd	GAGGGCCTATTTCCCATGATT
Seq_PPT-CTS_rev	CTTTATCCATCTTTGCAC
Seq_PG_fwd	GCAACCTCCCCTTCTACGAGC
1SDM_kill_BsmBI in GFP_fwd	CGGCCACAAATTTTC ^G GTCTCTGGGGAAGGTG
11SDM_kill_BsmBI in GFP_rev	CACCTTCCCCAGAGAC ^C GAAAATTTGTGGCCG
BamHI SOCS1 fwd	GCC ^G GAT ^C CGCCACCATGGTAGCACACAACCAGGTGG

Tabelle 11: Primer; grün markiert: mutierte Base für Site-directed Mutagenesis; rot markiert: Schnittstelle des Enzyms

2.1.9 Bakterienstämme

Die chemisch kompetenten Bakterien E. coli OneShot Stb13 (A10469) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Invitrogen) bezogen. Der chemisch kompetente Bakterienstamm DH5- α wurde ebenfalls von Thermo Fisher Scientific bezogen.

2.1.10 Antikörper für Western-Blotting

Die genutzten Antikörper für das Western-Blotting stammen von der Firma Cell Signaling Technologies.

Antikörper	Funktion
SOCS1 A156 Rabbit Ab 3950S	Primärantikörper zur SOCS1-Detektion
β -Tubulin (9F3) Rabbit mAb	Primärantikörper zur β -Tubulin-Detektion
Anti Rabbit IgG HRP 7074S	Sekundärantikörper

Tabelle 12: Antikörper für Western-Blotting

2.1.11 Antikörper für Färbung

Für die Färbung wurde der Antikörper APC anti mouse CD8a Antikörper (Klon-ID: 53-6.7 Katalognummer: 100711) der Firma BioLegend genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1 Restriktionsendonukleaseverdau

Der Restriktionsendonukleaseverdau wurde, mit den in 2.1.5. angegebenen Enzymen der Firma New England Biolabs, nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.2 Trennung von DNA mittels Gelelektrophorese

Die Proben wurden nach dem Restriktionsendonukleaseverdau mit 6x gel loading dye versetzt und in 1 % Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Laufpuffer diente der 1 X TAE Puffer. Für die Gelelektrophorese wurde 120 V/cm für 30-40 Minuten angelegt. Mit Hilfe von UV-Licht erfolgte der Nachweis der Fragmente.

1X TAE:	TRIS Acetat EDTA
---------	------------------------

Agarose-Gel:	Agarose 1x TAE Gel red
--------------	------------------------------

2.2.1.3 DNA-Elution aus Agarose-Gelen

Die DNA-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aus den Agarose-Gelen eluiert.

2.2.1.4 Ligation von DNA

Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden mit dem Quick Ligation Kit (New England Bio Labs) nach Herstellerangaben ligiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDropOne (Thermoscientific).

2.2.1.5 Klonierung von sgRNA in pLenti-Guide Plasmid

Die Klonierung der sgRNA-anti-*SOCS1* in pLenti-Guide-PG wurde mithilfe des Target Guide Sequence Protocols (Zhang Lab) durchgeführt.

Hierfür wurde im ersten Schritt der Vektor (pLenti-Guide-PG) mit BsmBI verdaut und bei 55 °C für ca. 90 Minuten inkubiert. Zur Dephosphorylierung der 5`-Enden der DNA wurde anschließend Quick CIP (New England Biolabs) hinzugefügt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 80 °C für 20 Minuten.

Der Ansatz wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die > 2kb große Bande wurde mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten und mittels des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) gereinigt.

Für das Phosphorylieren und *Annealing* der Oligonukleotide (sgRNA-anti-*SOCS1*-Sequenzen #3 und #4, siehe Ergebnisse) wurde dem T4 PNK Buffer 1 mM ATP hinzugefügt und der 10x T4 Ligation Buffer verwendet.

Anschließend wurden die Ansätze in den Thermocycler gestellt bei folgender Einstellung:

- 1. 37 °C 30 Minuten*
- 2. 95 °C 5 Minuten*
- 3. 25 °C mit einer Abkühlungstemperatur von 5 °C/min*

Im nächsten Schritt wurden die Ansätze mit sterilem Wasser 1:200 verdünnt.

Für die Ligation des geschnittenen Vektors (pLenti-Guide-PG) mit jeweils einem zusammengesetzten Oligo wurde der 2X Quick Ligase Buffer (NEB) und der Quick Ligase Buffer (NEB M2200S) verwendet.

Die Transformation erfolgte mittels chemisch kompetenten E.coli Stbl 3 und dem Hitzeschock-Verfahren.

2.2.1.6 Plasmidisolierung aus E.coli Bakterien (Mini-Präparation)

Die Mini-Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers mithilfe des NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits (Macherey-Nagel) oder des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen).

Für die Präparation wurden am vorangegangenen Tag LB-Medium-Kulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angelegt. Hierfür wurden einzelne Bakterienkolonien von den Agar-Platten entnommen und in 5 ml LB-Medium-Selektionsantibiotikum-Gemisch bei 37 °C und 175 rpm kultiviert.

LB-Medium: 10 g Trypton/Pepton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 ad 1 L H₂O
 1 ml 1 N NaOH
 pH 7,5 (autoklaviert)

2.2.1.7 Plasmidisolierung aus E.coli Bakterien (Midi-Präparation)

Die Midi-Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers mithilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits (Macherey-Nagel).

Für die Präparation wurden am vorangegangenen Tag LB-Medium-Kulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angelegt. Hierfür wurden Bakterienklone von den Agar-Platten entnommen und in 200 ml LB-Medium-Selektionsantibiotikum-Gemisch bei 37 °C und 175 rpm kultiviert.

Die Konzentrationsbestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte sowohl bei der Mini- als auch bei der Midi-Präparation mithilfe des NanoDropOne (Thermoscientific).

2.2.1.8 DNA-Transformation

2.2.1.8.1 Hitzeschock-Verfahren

Kompetente Bakterien wurden jeweils mit 50 ng DNA oder mit bis zu 5 µl der Ligationsansätze transformiert. Dafür wurden zunächst 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend das Plasmid hinzugeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 Sekunden bei 42 °C im Thermomixer (Eppendorf). Daraufhin wurden die Bakterien fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 250 µl SOC-Medium hinzugeben und die Bakterien wurden bei 37 °C und 250 rpm im

Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Daraufhin wurde dieser Ansatz auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.9 Sequenzreaktion

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde, nach Herstellerangaben, für einen Ansatz 400-600 ng DNA mit 2 µl 5x Big Dye Buffer und 1 µl Big Dye 1.1 mit 2 µM *Primer* gemischt. Dies wurde auf 10 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und in den T100 Thermal Cycler (Bio Rad) gestellt.

Thermal Cycler Einstellung:

96 °C – 60 Sekunden

96 °C – 10 Sekunden

50 °C – 5 Sekunden

60 °C – 75 Sekunden

x25

12 °C - ∞

2.2.1.10 Entfernung nicht eingebauter Sequenzterminatoren aus Sequenzreaktionen

Um die Sequenzreaktion von Nukleotiden, Oligonukleotiden und Puffern zu lösen, wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) genutzt und nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.11 Sequenzierung

Die Sequenzreaktion wurde auf einem Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer 96-Capillary Gerät im Institut für Pathologie ausgewertet.

2.2.1.12 Site-Directed Mutagenesis

Zum gezielten Basenaustausch wurde das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit Protocol (NEB) verwendet und nach Herstellerangaben angewandt. Für die Amplifikation der gewünschten DNA wurde ein Ansatz aus 12,5 µl Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 1,25 µl 10 µM Forward Primer, 1,25 µl 10 µM Reverse Primer, 1 µl 1-25 ng/µl Template DNA und 9 µl nukleasefreies Wasser angesetzt und anschließend im T100 Thermal Cycler (Bio Rad) inkubiert.

Thermal Cycler Einstellung:

98 °C – 30 Sekunden

98 °C – 10 Sekunden

50-72 °C – 10-30 Sekunden

72 °C – 20-30 Sekunden/kb

} x25

72 °C – 120 Sekunden

4-10 °C - ∞

Zur Optimierung der Annealing-Temperatur wurde der NEBaseChanger (NEB) angewandt.

Im Anschluss wurde 1 µl des PCR-Produktes mit 5 µl 2x KLD Reaction Buffer, 1 µl 10X KLD Enzyme Mix und 3 µl nukleasefreiem Wasser gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben mittels Hitzeschock-Verfahren.

2.3 Protein Arbeitstechniken

2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

3 Mio. Zellen der Zelllinie BL-41 wurden zunächst bei 1500 x g für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde mit kaltem PBS zwei Mal wiederholt. Das Pellet wurde in 150 µl kaltem RIPA-Lysis-Puffer, versetzt mit einem Phosphatase-Inhibitor, lysiert. Die Mischung wurde 20 min auf Eis geschüttelt und anschließend bei 14000 x g 15 min. bei 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer und DNA von Proteinen zu

trennen. Der Überstand mit den Gesamtzellproteinextrakten wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert und bei -20 °C gelagert.

RIPA-Puffer:	Tris buffer pH 7,1 1M solution	25 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1 %
	Deoxycyolic acid-Na-salt	1 %
	SDS solution, 20 %	0,1 %

2.3.2 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Lysate zunächst im Verhältnis 1:2 mit 2 x Laemmli Sample Buffer (Sigma) gemischt. Es wurden 15 µl Probe und 15 µl 2 x Laemmli Buffer verwendet. Daraufhin wurde das Gemisch bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Anschließend wurde es bei 16000 x g 1 Minute zentrifugiert und auf Eis gestellt. Pro Gelspur wurde jeweils 30 µl des Gemisches eingesetzt. Es wurde die Gelkammer XCell SureLock Electrophoresis Cell 101001-1060 in 1 x MES SDS Running Buffer (NuPage) verwendet. Es wurden NuPage 4-12 % Bis Tris Gele (Invitrogen) genutzt. Das System wurde bei 100 V für 1,5 bis 2 Stunden angeschlossen.

Running Buffer:	NuPage MES SDS Running Buffer 20x (NP0002)
	50 ml MES 20 x Running Buffer
	950 ml H ₂ O

2.3.3 Western-Blotting

Für das Blotting wurde das Tank-Blot-Verfahren genutzt und die Mini Trans-Blot-Kammer (Bio Rad) verwendet. Nach der Proteinauftrennung wurde die Nitrocellulose-Membran (Amersham Protran 0,45 µm NC) zunächst in 1x Transferpuffer equilibriert. Im Anschluss erfolgte der Transfer bei 100 V für 75 Minuten.

10x Transferpuffer:	30 g Tris
	145 g Glycin
	Add 1000 ml Wasser
1x Transferpuffer:	100 ml 10 x Transferpuffer
	700 ml Wasser
	200 ml Methanol

2.4.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte durch die Nutzung der Neubauer-Zählkammer. Die Zugabe von Trypanblau im gleichen Verhältnis zum Suspensionsvolumen ermöglichte eine Differenzierung vitaler von mortaler Zellen.

2.4.3 Virale Arbeitstechniken

2.4.3.1 Virusproduktion

Zur Virusproduktion wurden Hek-293T-Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen auf 10 cm-Schalen ausgesät und am Folgetag transfiziert. Hierfür wurde ein Transfektionsgemisch, bestehend aus gewünschtem Plasmid, psPAX (codierend für gag und pol-Protein), pMD2.G (codierend für VSV-G-env-Protein), Optimem und TransIT®-293 hergestellt und auf die Schale mit ausgesäten Hek-293T-Zellen gegeben. Nach drei Tagen wurden die Viren geerntet, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.3.2 Transduktion

Für die Transduktion wurden die entsprechenden Zellen, wie beschrieben, gezählt und in der gewünschten Zelldichte von je nach Zelllinie 200.000 – 500.000 Zellen/ml auf eine 96- oder 24-Well-Platte ausgesät. Dafür wurden die Zellen pelletiert und in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Viren zu den Zellen gegeben. Abhängig vom Experiment erfolgte eine Verdünnung der Virusmenge. Die Zellen wurden im Inkubator bis zur Analyse inkubiert. Abhängig von der Zelldichte wurden die Zellen von der 96-Well-Platte auf eine 24-Well-Platte überführt und auf 1000 µl Gesamtvolumen mit frischem Medium aufgefüllt.

2.4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse/FACS-Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mithilfe des Gerätes FACSLyric™ Flow Cytometry System. Für die Messung wurden die Zellen aus den Wells entnommen und in ein FACS-Messröhrchen überführt. Um das Medium zu entfernen, wurden die Zellen bei 500 x g pelletiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt und beim letzten Vorgang in 250 µl Flow für die Messung resuspendiert.

2.4.3.4 Antikörper Färbung

Zunächst wurde die gewünschte Menge an Zellen aus der Platte entnommen. Anschließend wurde die Probe bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Waschpuffer mit dem APC-CD8a-Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden zur Probe 1000 µl FACS-Waschpuffer hinzugefügt. Die Probe wurde bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 300 µl Flow-Lösung resuspendiert.

FACS-Waschpuffer: 49 ml DPBS
 1 ml FCS
 500 0,5 mM EDTA

2.5 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße der jeweiligen Experimente und der Variabilität in den zellkulturbasierten Experimenten, welche sich unter anderem aus der Kultivierung der Zellen und der Reaktion dieser auf exogene Einflüsse ergibt, ist eine statistische Validierung der Effekte nur eingeschränkt möglich. Die durchgeführten Untersuchungen sind also explorativ und dienen der qualitativen Einordnung der Experimente sowie der Trenddarstellung. In den dargestellten Toxizitätsassays wurden die Experimente je einzeln dargestellt.

Die quantitative Darstellung der Ergebnisse aus den Western-Blot Experimenten erfolgte zur übersichtlichen Darstellung in Form von gemittelten Werten, welche ebenfalls deskriptiv sind und keine statistische Validierung ermöglichen. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde hierbei ausschließlich bei einer Stichprobengröße von mindestens 3 angegeben und bei n=2 wurde darauf verzichtet.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung

Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die durch die Inaktivierung des *SOCS1*-Gens ausgelöst werden, wurde zunächst der benötigte Vektor mit der zugehörigen guideRNA kloniert. Hierfür wurden zwei verschiedene Sequenzen im Genlokus des *SOCS1*-Gens verwendet (siehe unten). Diese Sequenzen wurden aus der *Brunello library* entnommen (Doench et al. 2016).

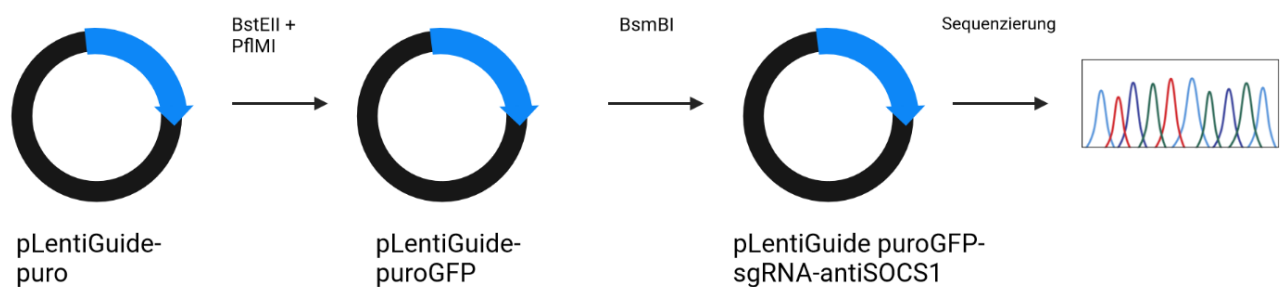


Abbildung 9: Klonierung des Vektors *pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1*, Created in BioRender. S, J. (2025) <https://BioRender.com/ghgdxwq>

3.1.1 Klonierung des Reportergens in den sgRNA-Vektor pLentiGuide

Im ersten Schritt wurde GFP aus dem Vektor: pCR-XL-Topo-puroGFP über die Schnittstellen BstEII und PflMI in pLentiGuide-puro kloniert, um pLentiGuide-puroGFP herzustellen.

3.1.2 Erzeugung des pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1

Die Klonierung der *guideRNAs* in pLentiGuide-puroGFP erfolgte über die Schnittstelle BsmBI an den Positionen 406 und 2291 mithilfe des Target Guide Sequence Protocols (Zhang Lab). Nach BsmBI-Verdau haben die Plasmide den gleichen Überhang, sodass die Überhänge der *SOCS1*-sgRNA Oligonukleotide, wie unten dargestellt, hergestellt werden müssen. Um eine Fehlklonierung zu verhindern und um das *puroGFP* zu erhalten, wurde zuvor die bestehende BsmBI-Schnittstelle im Bereich des *puroGFP* mit Hilfe des Q5® Site-Directed Mutagenesis Verfahrens (siehe Methoden 2.2.1.12) entfernt. Im

Anschluss wurden beide Expressionsvektoren zur Kontrolle der Klonierung mit den unten aufgeführten Oligonukleotiden sequenziert (siehe Abbildung 11).

Sequenzen für sgRNA anti *SOCS1*

SOCS1 #3

Fwd: 5' CACCGCGGCGTGCGAACGGAATGTG 3'

3' CGCCGCACGCTTGCCTTACACCAA 5'

Rev: 5' AAACACATTCCGTTGCACGCCGC 3'

SOCS1 #4

Fwd: 5' CACCGGGGCCCCAGTAGAATCCGC 3'

3' CCCCGGGGGTCATCTTAGGCGCAA 5'

Rev: 5' AAACGCGGATTCTACTGGGGGCCCC 3'

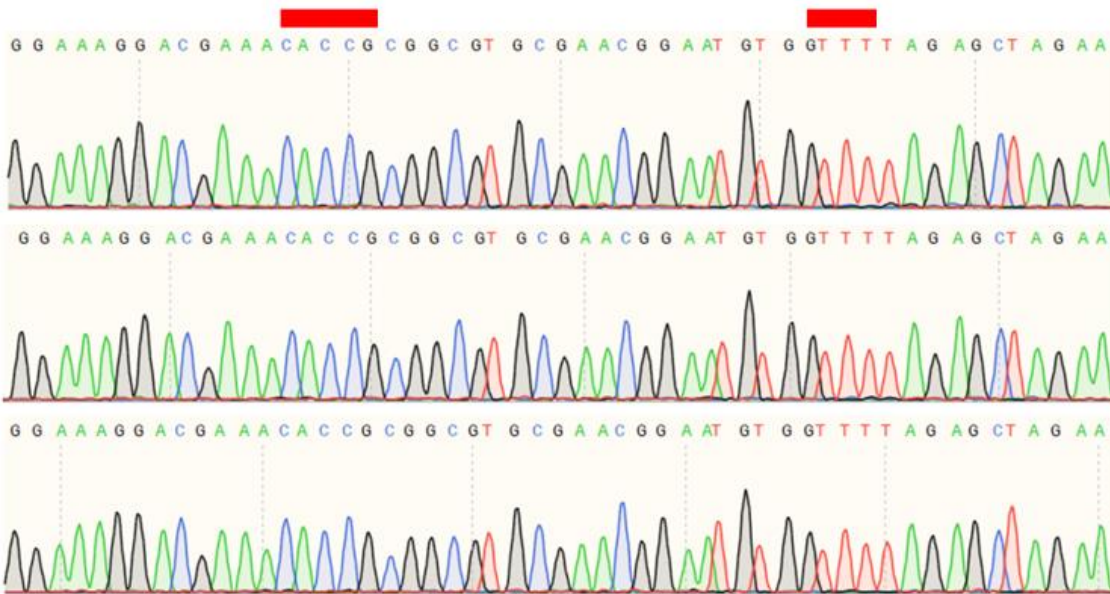
Legende: *SOCS1* sgRNA Oligonukleotide für pLentiGuide-puroGFP, entnommen aus *Brunello Library* (Doench et al. 2016), *Fwd*: forward; *Rev*: reverse; schwarz: Überhang *designed* nach dem *Target Guide Sequence Cloning Protocol* (Zhang Lab); rot: Sequenz der *sgRNA* anti *SOCS1*



Abbildung 10: Vektorkarte pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1 #3

sgRNA-

antiSOCS1 #3 CGGCGTGCGAACGGAATGTG



sgRNA-

antiSOCS1 #4 GGGCCCCCAGTAGAATCCGC

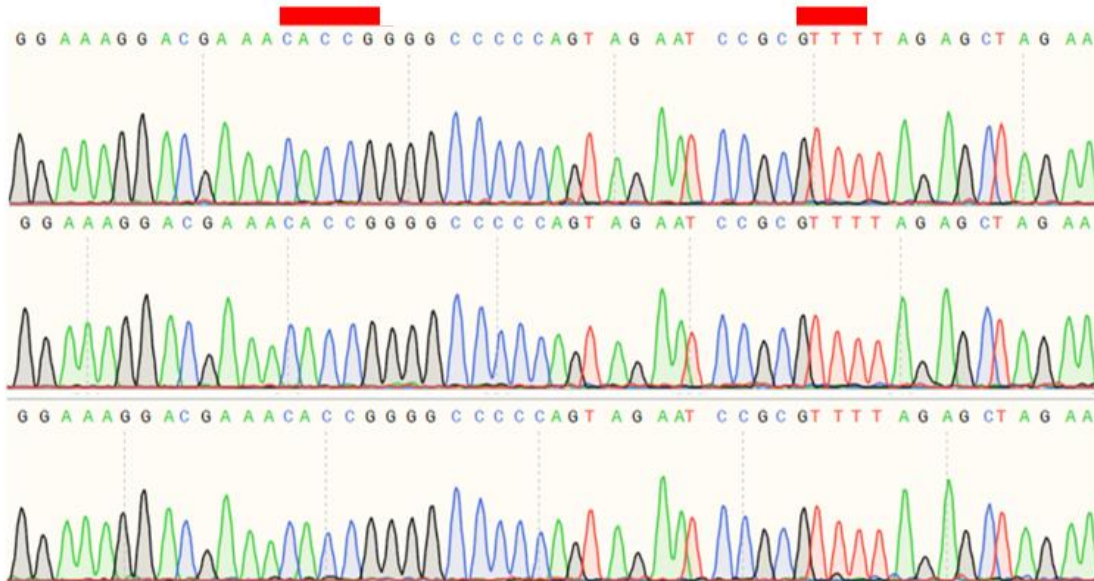


Abbildung 11: Chromatogramme der SOCS1-Sequenz aus den Expressionsvektoren pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1#3 und pLentiGuide puroGFP-sgRNA-antiSOCS1#4 nach Klonierung.

3.1.3 Vektor pLVX-Tre3GpuroGFP-wtSOCS1

Für den benötigten Expressionsvektor pLVX-Tre3GpuroGFP-wtSOCS1 wurde im ersten Schritt über die Schnittstellen BstEII und PflMI puroGFP in den Vektor pLVX-Tre3G eingebracht. Das puroGFP wurde dafür über die genannten Schnittstellen dem Vektor pCR-XL-Topo-puroGFP entnommen. Nach Ligation wurde der Vektor pLVX-Tre3GpuroGFP mit Hilfe des Herstellers Takara um wtSOCS1 erweitert.

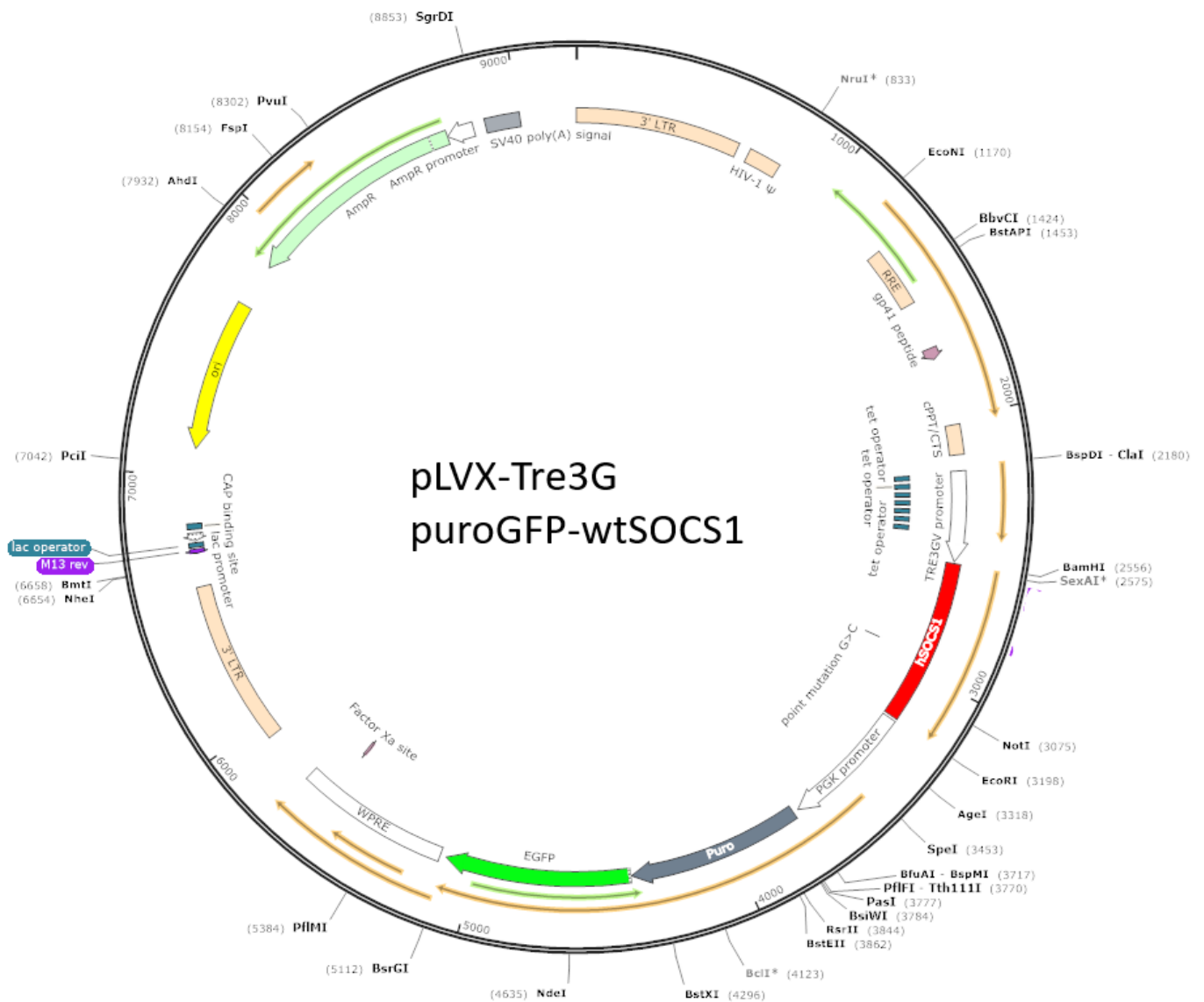


Abbildung 12: Vektorkarte von pLVX-Tre3G-puroGFP-wtSOCS1

3.1.3.1 Einbringung von Punktmutationen in pLVX-Tre3G puroGFP-wtSOCS1

Für die Auswahl von *SOCS1*-Mutationen zur Expression in Lymphomzelllinien wurde der SIFT-Algorithmus angewandt, der im Folgenden beschrieben wird.

3.2 SIFT- Sorting Intolerant From Tolerant

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) ist ein Algorithmus, mit dessen Hilfe vorhergesagt werden kann, ob eine Aminosäuresubstitution die Proteinfunktion beeinflussen kann. Es ermöglicht, bezogen auf die Funktion des Proteins, die Unterscheidung zwischen einem tolerierten Aminosäureaustausch und einem Austausch, der die Funktion des Proteins beeinträchtigt (Ng und Henikoff 2001). Funktionell wichtige Aminosäuren zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Laufe der Evolution überwiegend konserviert vorliegen. Dementsprechend würde eine Substitution in einer evolutiv stark konservierten Aminosäure in der Regel eine Veränderung oder einen Verlust der Proteinfunktion zur Folge haben. Substitutionen weniger stark konservierter Aminosäuren führen in der Regel zu geringer oder keiner Veränderung der Proteinfunktion (Kumar et al. 2009). Entsprechend der evolutiven Konservierung berechnet der SIFT-Algorithmus die Wahrscheinlichkeit, ob eine bestimmte Substitution einer Aminosäure an einer gegebenen Position zu einer Funktionsveränderung führt. Der Algorithmus klassifiziert diese Veränderungen in tolerierte oder schädliche Aminosäuresubstitutionen. In die Klassifikation von Veränderungen als toleriert oder schädlich fließen zudem weitere Faktoren ein. Beispielsweise spielt es eine Rolle, ob die Veränderung in einem konservierten Bereich eines Proteins auftritt und ob der Aminosäureaustausch mit einer chemisch ähnlichen Aminosäure erfolgt, etwa in Bezug auf deren Ladung (Ng und Henikoff 2003, 2002). Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit erfolgt dann in mehreren Schritten. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit für jede mögliche Substitution aus 20 möglichen Aminosäuren für jede Position der Aminosäurekette des angegebenen Proteins berechnet (Ng und Henikoff 2003; Ng und Henikoff 2001). Die Betrachtung eines Alignments, welches beispielsweise aus nahezu identischen Sequenzen bestünde, würde bewirken, dass funktionell neutrale Aminosäuresubstitutionen fälschlicherweise als schädlich vorhergesagt würden. Um dieses Problem zu lösen und so die Wahrscheinlichkeit präziser zu berechnen, ermittelt

SIFT einen Wert, den „conservation value“. Dieser wird für jede Position im Alignment ermittelt und kann von 0 bis 4,32 reichen. Der Wert 4,32 ($\log_2 20$) ergibt sich aus einer komplett konservierten Position (Ng und Henikoff 2003; Ng und Henikoff 2001). Insgesamt ergibt sich ein optimaler „median conservation value“ von 3, der bei der Wahrscheinlichkeitsberechnung die bestmögliche Diversität der Sequenzen im betrachteten Alignment widerspiegelt. Berechnete Vorhersagen, die auf Werten höher als 3,25 basieren, weisen eine erhöhte falsch-positive Rate auf, da die Sequenzen im betrachteten Alignment zu ähnlich sind. Zur Erhöhung der Sensitivität der Vorhersage, dass eine Aminosäuresubstitution als schädlich vorhergesagt wird, nutzt SIFT einen quantitativen Wert, welcher bei 0,05 liegt. Bei einem Wert kleiner als 0,05 wird die Substitution als nicht-tolerabel vorhergesagt (Ng und Henikoff 2003).

Neben SIFT sind noch weitere Algorithmen verfügbar, welche genutzt werden können, wie beispielsweise PolyPhen-2 oder PROVEAN, die auch den Effekt einer Aminosäuresubstitution vorhersagen können (Adzhubei et al. 2010; Choi et al. 2015). In dieser Arbeit wurde der SIFT Algorithmus für *SOCS1* angewandt, um den Effekt der unterschiedlichen *SOCS1*-Varianten auf die Proliferation der verwendeten Zelllinien zu untersuchen. Für die Berechnung wurde ein „Median conservation of sequence“ von 3,00 gewählt und Sequenzen wurden aus der Berechnung ausgeschlossen, die mehr als 90 % Übereinstimmung mit der *SOCS1*-Proteinsequenz hatten. „UniProt_SwissProt 2010_09“ wurde als Datenbank genutzt.

Substitutionen in *SOCS1*

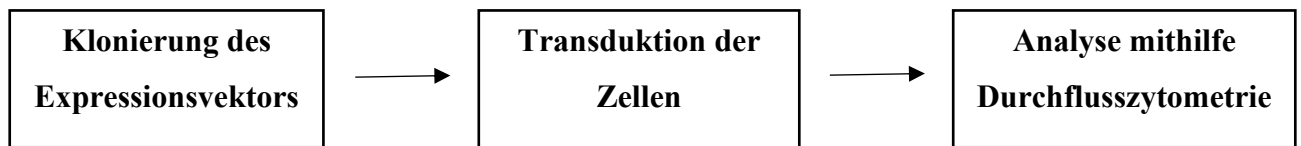
Gensequenz	Proteinsequenz	SIFT-Vorhersage
C136T	P46S	<i>Tolerated</i>
C201G	I67M	<i>Deleterious</i>
G232A	G78R	<i>Deleterious</i>
G243A	W81Stop	Stop-Codon

Tabelle 13: SIFT-Vorhersage für die *SOCS1*-Varianten

3.3 Überexpression von SOCS1 und mutierter SOCS1-Varianten in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien

3.3.1 Versuchsaufbau

SOCS1-Überexpression



Für die Überexpression von *wtSOCS1* und der mutierten Varianten von *SOCS1* in den verwendeten Zelllinien wurden virale, Tetracyclin-induzierbare Expressionsvektoren mit der Co-Expression von GFP genutzt, die in den untersuchten Zelllinien über sehr geringe basale, also nicht induzierte, Genexpression verfügen. Dies ist wichtig für die Experimente, da der Effekt der Expression, wie beispielsweise die Toxizität, in den Zellen synchron und zu einem definierten Zeitpunkt gemessen werden soll. Um dies zu erreichen, wurde die Genexpression von *SOCS1* durch die Gabe von Doxycyclin induziert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen in Abständen von zwei Tagen das Verhältnis der *SOCS1*-exprimierenden Zellen zu den nicht-transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Vorhandensein des *SOCS1*-Expressionsvektors in den untersuchten Zellen wurde dabei durch das Reportergen *GFP* nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Messungen konnten Rückschlüsse auf die Auswirkung der *SOCS1*-Expression auf Proliferation und das Überleben der untersuchten Zellen gezogen werden. Verringert sich in dieser Untersuchung die relative Anzahl der Zellen, die durch die *GFP*-Expression des *SOCS1*-Vektors markiert sind, lässt dies darauf schließen, dass die *SOCS1*-Expression eine toxische Wirkung auf die Zellen hat. Die Gensequenzen für die mutierten *SOCS1*-Varianten wurden mithilfe des SIFT-Algorithmus, welcher zuvor beschrieben wurde, ermittelt.

3.3.2 Tetracyclin-induzierbares Expressionssystem

Das Tetracyclin-induzierbare Expressionssystem basiert auf dem bakteriellen Tet-Operon. Es ermöglicht die Transkription eines gewünschten Zielgens in Eukaryoten in Abhängigkeit von der Zugabe von Doxycyclin (Gossen und Bujard 1992; Gossen et al. 1995). Doxycyclin bewirkt eine Konformationsänderung des reversen Transaktivators, sodass dieser an die DNA-Bindungsstelle binden kann und somit die Expression aktiviert wird (siehe Abbildung 13) (Zhou et al. 2006). Einige Transaktivator-Varianten können zu einem gewissen Teil, ohne die Zugabe von Doxycyclin, die Expression des Zielgens bewirken. Dabei handelt es sich um eine „leaky“ Genexpression (Roney et al. 2016). Das in der Arbeit genutzte Tetracyclin-induzierbare Expressionssystem (Tet-On®3G, Takara Bio) weist eine sehr geringe basale Genexpression auf, um die Auswirkung der nicht induzierten Expression so gering wie möglich zu halten. Dies wird durch den induzierbaren Promotor P_{TRE3G} ermöglicht, welcher für eine sehr niedrige basale Expression sorgt aber für eine hohe Expression nach Induktion durch Doxycyclin (Loew et al. 2010). So konnte eine asynchrone und zeitlich nicht-definierte Expression des *SOCS1*-Gens bzw. der *SOCS1*-Varianten verhindert werden. Dies ermöglichte eine präzisere Messung des Effektes auf die Proliferation der transduzierten Zellen. Zusätzlich wurde die nicht induzierte *Cas9*-Expression im *SOCS1*-Knockout-Experiment minimiert, da *Cas9* in den Zellen ebenfalls ionisierbar vorlag.

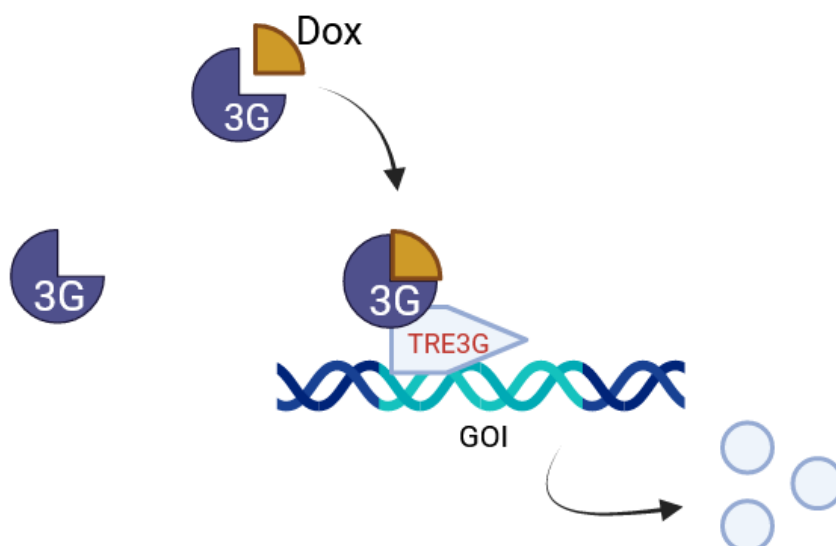


Abbildung 13: Schematische Zeichnung des Tet-On 3G System. Der Transaktivator (Tet-On-3G Protein) ist nur bei Anwesenheit von Doxycyclin aktiviert und kann an den Promotor P_{TRE3G} binden. Daraufhin erfolgt die Expression des gewünschten Gens.

Legende: 3G: Tet-On-3G-Protein; Dox.: Doxycyclin; GOI: Gene of interest, TRE3G: Promotor P_{TRE3G}

Created in BioRender. S, J. (2025) <https://BioRender.com/s8vt0cn>

Um die Induzierbarkeit des pLVX-Vektorsystems zu überprüfen, wurden HL- und BL-Zelllinien mit einem Tet-induzierbaren Luciferase-Expressionskonstrukt (pLVX-Luc) transduziert. Nach der Selektion des Konstrukts mittels Puromycin wurde die *Luciferase*-Expression durch verschiedene Doxycyclin-Konzentrationen im Bereich von 15 bis 500 ng/mL induziert. Die Lumineszenzmessung erfolgte nach zwei Tagen (siehe Abbildung 14). In den *SOCS1*-Expressionsexperimenten wurden in der Folge solche Doxycyclin-Konzentrationen gewählt, die im unteren Sättigungsbereich des Lumineszenz-Signals lagen. Hierdurch konnten toxische Effekte auf Zellen durch hohe Doxycyclin-Konzentrationen minimiert werden.

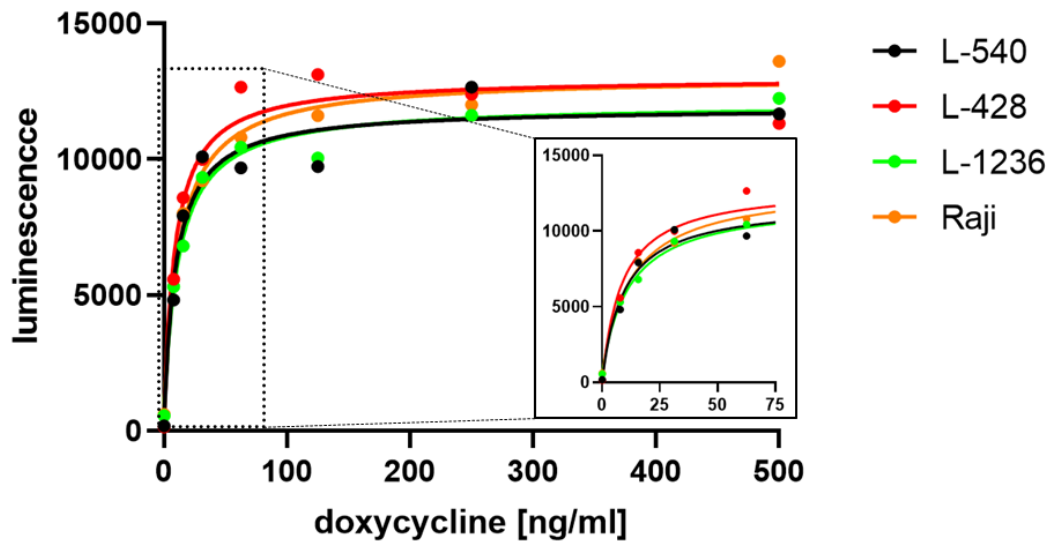


Abbildung 14: Induzierte und titrierte Expression des Luciferase-Konstruktes in HL- und BL-Zelllinienzellen

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Aufgrund stark variierender absoluter Biolumineszenz-Werte zwischen den Durchläufen wurde auf eine statistische Zusammenführung (und somit Bildung des Mittelwertes und der Standardabweichung) verzichtet. Beide Experimente zeigten jedoch hinsichtlich der Doxycyclin-Konzentrationen einen identischen Trend.

3.3.3 Durchflusszytometrische Analyse und Auswertung der

Überexpression in den Zelllinien: BL-41, BL-70, L-1236, KMH2

Nach Transduktion der angegebenen Zelllinien wurde die erste Messung nach 48 beziehungsweise 72 Stunden durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde als Zeitpunkt **Null** markiert und die Genexpression durch Doxycyclingabe aktiviert. Das Verhältnis von GFP-positiven zu GFP-negativen Zellen wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen durchflusszytometrisch gemessen. Die Genexpression der induzierbaren Genabschnitte des verwandten Konstrukts (pLVX-Tre3G) wurde mittels Zellen, in die das pLVX-Tre3G-PG mCD8A variant lacks cytoplasmic domain (im Folgenden abgekürzt durch pLVX-Tre3G-PG-Lyt2) Konstrukt übertragen wurde, überprüft. Hierzu wurden Doxycyclin-induzierte Zellen mit dem Antikörper APC anti-mouse-CD8a APC gefärbt, durchflusszytometrisch gemessen und mithilfe des Programms FlowJo ausgewertet. Dies diente auch gleichzeitig der Kontrolle, dass die GFP positiven Zellen auch das klonierte Gen exprimieren. Die Kontrollen, die das mCD8a-Gen exprimierten, dienten ferner als Kontrollen für mögliche unspezifische Effekte der lentiviralen Transduktion auf die Proliferation der untersuchten Zellen. Nach durchflusszytometrischer Messung und Auswertung mittels FlowJo, wurde daher der Anteil transduzierter GFP-positiver Zellen zu nicht-transduzierter GFP-negativer Zellen betrachtet. Es erfolgte jeweils eine Normalisierung auf Tag **Null**. Daraus ließ sich der Effekt der Überexpression der untersuchten *SOCS1*-Varianten bzw. des Kontrollgens auf die Proliferation und das Überleben der Zellen untersuchen.

SOCS1-Überexpression in BL-41

Es gibt keine Hinweise in der Literatur, die darauf hindeuten, dass der JAK/STAT-Signalweg eine Rolle bei der Pathogenese des Burkitt-Lymphoms spielt. So sind keine Mutationen von Bestandteilen dieses Signalweges, wie zum Beispiel *SOCS1*, nachgewiesen. Bei der Überexpression aller dargestellten Expressionsvektoren ließen sich keine negativen Effekte auf die Proliferation und das Überleben der Zellen beobachten. Das Verhältnis transduzierter zu nicht-transduzierter Zellen betrug zu allen Messzeitpunkten 100 % mit einer minimalen Schwankung von 2 % (Siehe Abbildung 15).

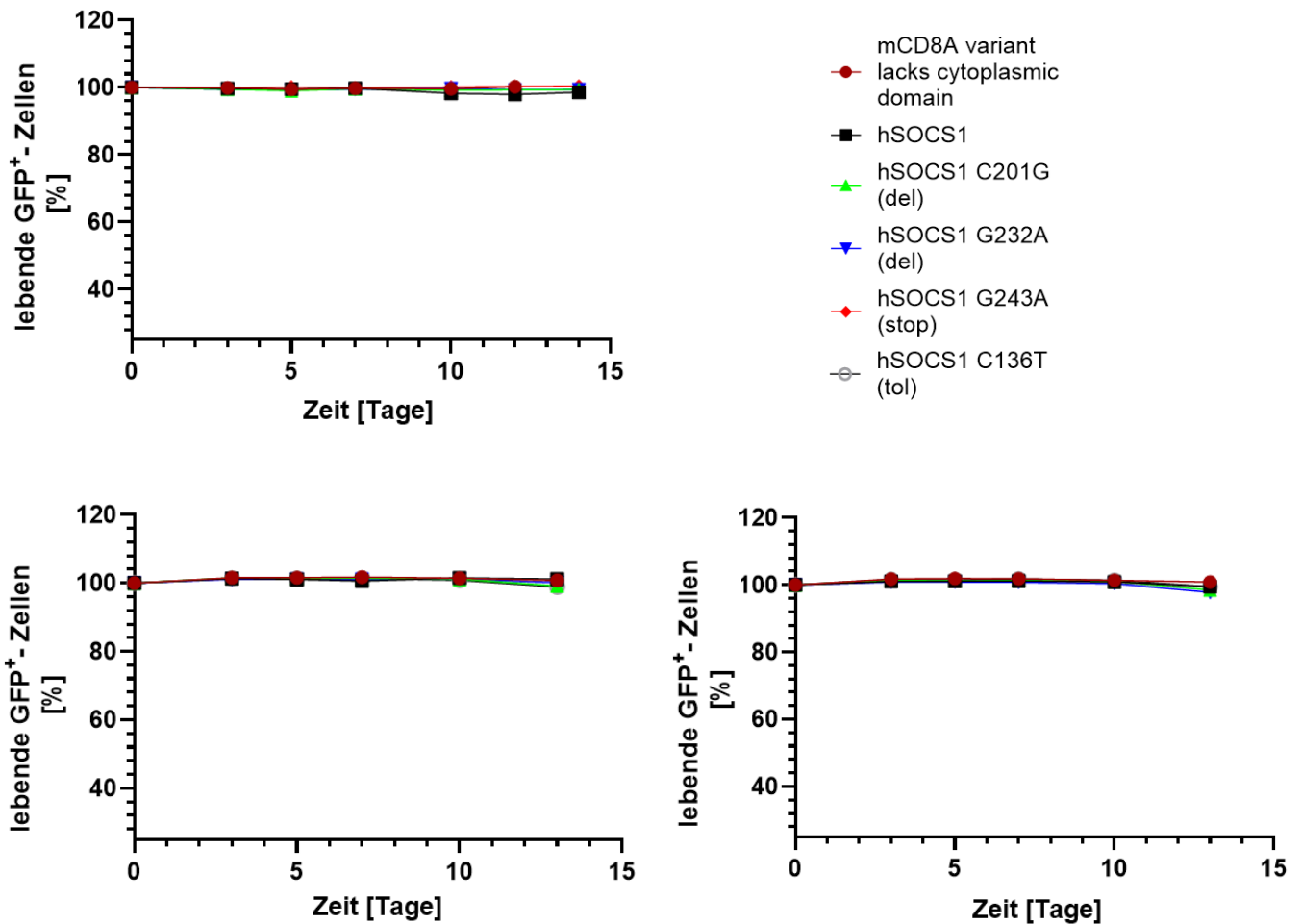


Abbildung 15: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in BL-41

Dargestellt jeweils pLVX-Tre3G-PG + Mutationsvariante. Abkürzungen: deleterious (del); tolerated (tol); stop codon (stop); hSOCS1 entspricht wtSOCS1; mCD8A variant lacks cytoplasmic domain stellt den Kontrollvektor dar. X-Achse: stellt den zeitlichen Verlauf dar. Y-Achse: zeigt den Anteil der GFP-positiven Zellen. Messzeitpunkt Tag "Null" stellt die Messung vor Doxycyclingabe dar. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Überexpressionskonstrukten auf Tag "Null" normiert. Die Experimente sind jeweils einzeln dargestellt, da auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde (siehe Kapitel 2.5). Das Experiment wurde drei mal durchgeführt.

Nach Überexpression von SOCS1 und der SOCS1-Mutationsvarianten in BL-41 ist kein Effekt auf die Proliferation zu beobachten.

SOCS1-Überexpression in BL-70

Bei der Überexpression der genannten Expressionsvektoren zeigte sich eine reproduzierbare Schwankung bis zu 25 % im Verlauf der Messung. Es zeigte sich im Zeitverlauf kein wesentlicher Effekt auf die Toxizität. Bei Betrachtung der Kontrolle ist ein leichter aber am ehesten unspezifischer Effekt auf die Toxizität zu beobachten (siehe Abbildung 16).

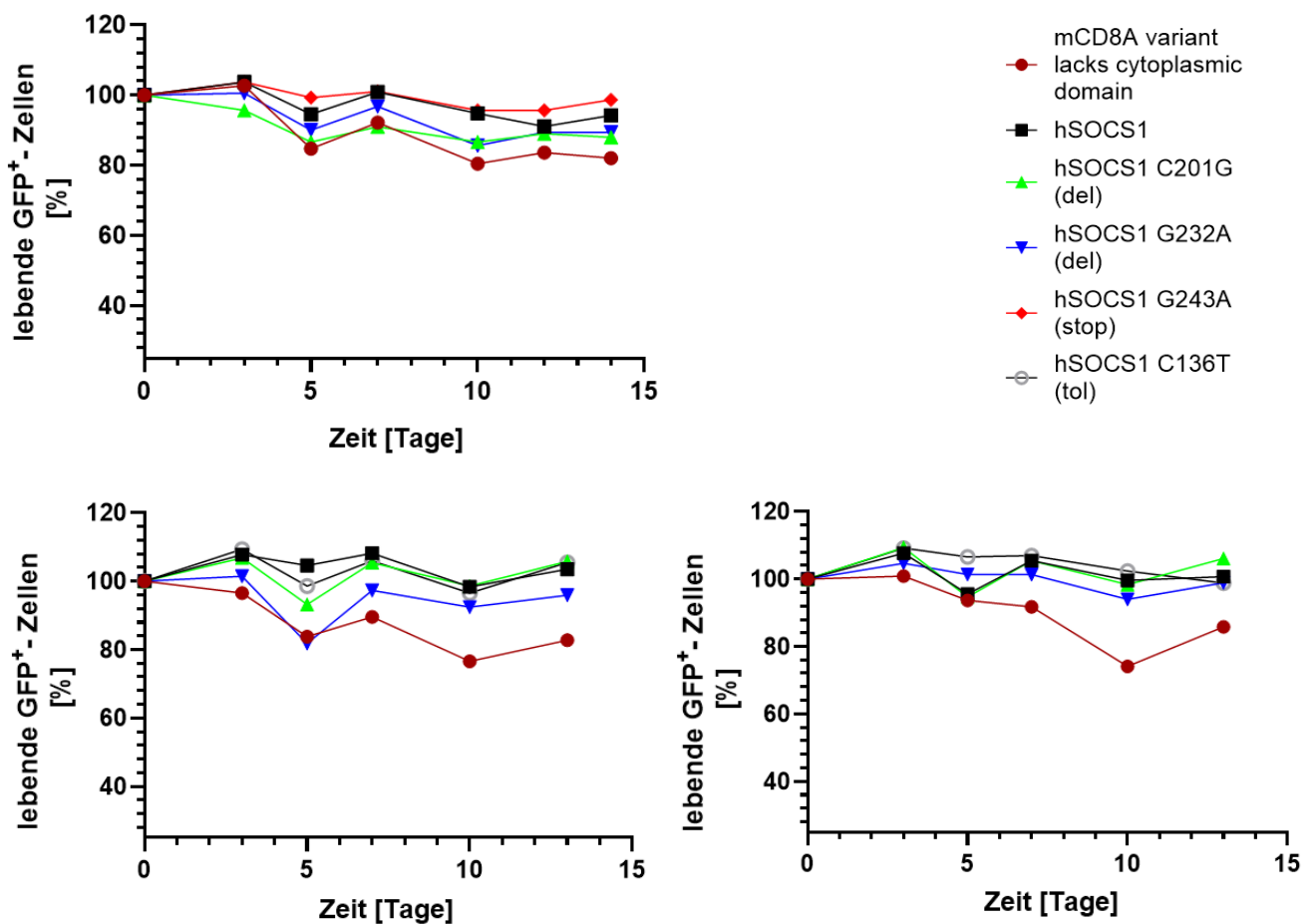


Abbildung 16: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in BL-70

Dargestellt jeweils pLVX-Tre3G-PG + Mutationsvariante. Abkürzungen: deleterious (del); tolerated (tol); stop codon (stop); hSOCS1 entspricht wtSOCS1; mCD8A variant lacks cytoplasmic domain stellt den Kontrollvektor dar. X-Achse: stellt den zeitlichen Verlauf dar. Y-Achse: zeigt den Anteil der GFP-positiven Zellen. Messzeitpunkt Tag "Null" stellt die Messung vor Doxycyclingabe dar. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Überexpressionskonstrukten auf Tag "Null" normiert. Die Experimente sind jeweils einzeln dargestellt, da auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde (siehe Kapitel 2.5). Das Experiment wurde drei mal durchgeführt.

Nach Überexpression von SOCS1 und der SOCS1-Mutationsvarianten in BL-70 ist kein wesentlicher Effekt auf die Proliferation zu beobachten.

SOCS1-Überexpression in L-1236

L-1236 besitzt eine biallelische *SOCS1*-Mutation, welche die SH2-Domäne betrifft. Die Überexpression des *SOCS1*-Wildtyps führte im Zeitverlauf zu einer relativen Abnahme der transduzierten Zellen, was auf eine verlangsamte Proliferation und einen negativen Effekt auf ihre Überlebensrate hindeutet. Eine vergleichbare Wirkung konnte für die *tolerated* Variante, pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C136T, beobachtet werden. Für die Überexpression der *deleterious* *SOCS1*-Punktmutations-Varianten, pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C201G (del) und G232A (del), zeigte sich ebenfalls ein toxischer Effekt auf das Überleben der Zellen. Dabei zeigte sich bei Überexpression von pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C201G (del) ein stärkerer toxischer Effekt auf das Zellüberleben als bei der Überexpression von pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 G232A (del). Bei der Überexpression von pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 G243A zeigte sich kein toxischer Effekt auf das Zellüberleben. Dies konnte auch für die Kontrolle pLVX-Tre3G-PG + Lyt2, beobachtet werden (siehe Abbildung 17).

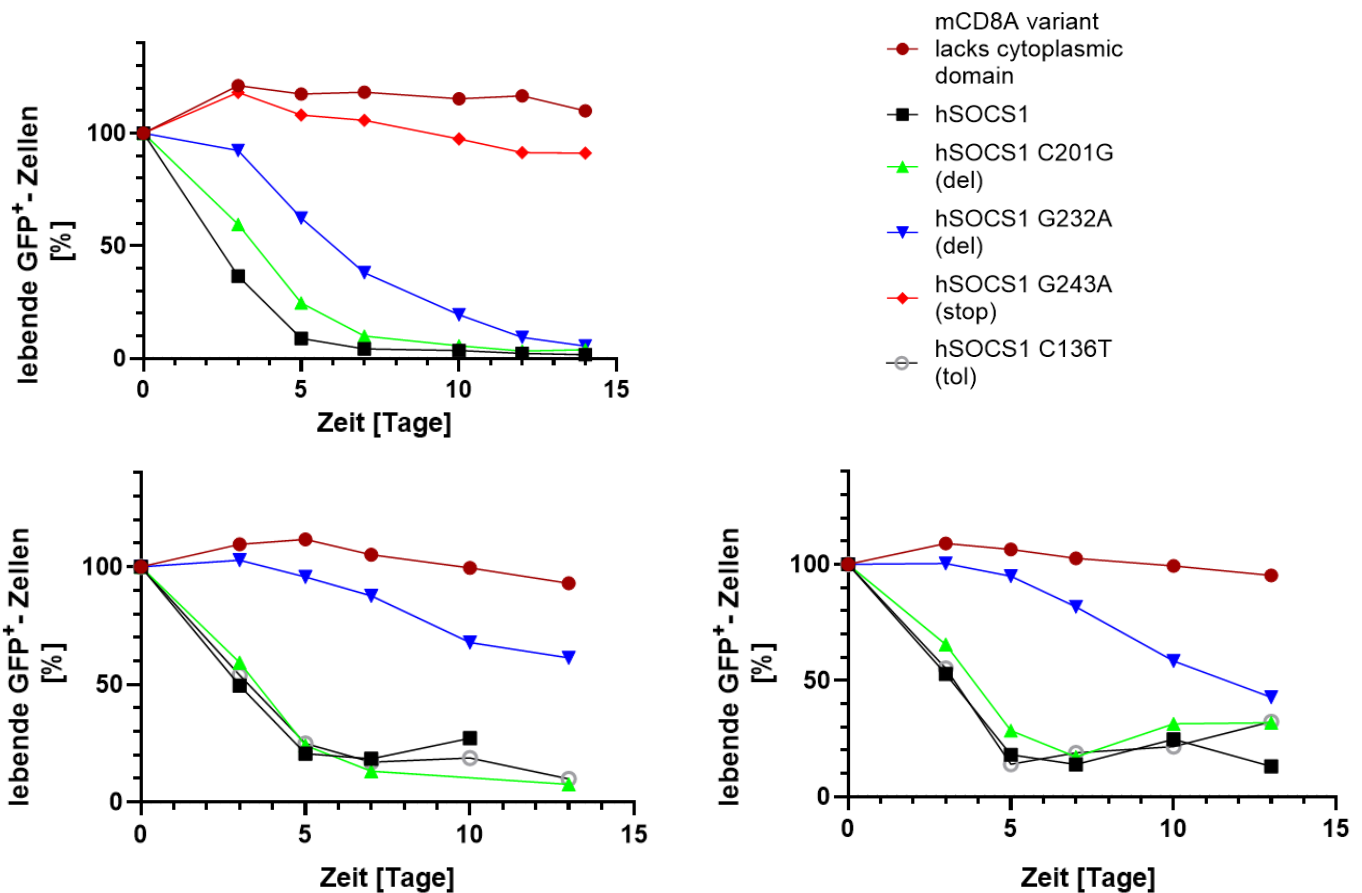


Abbildung 17: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in L-1236

Dargestellt jeweils pLVX-Tre3G-PG + Mutationsvariante. Abkürzungen: deleterious (del); tolerated (tol); stop codon (stop); hSOCS1 entspricht wtSOCS1; mCD8A variant lacks cytoplasmic domain stellt den Kontrollvektor dar. X-Achse: stellt den zeitlichen Verlauf dar. Y-Achse: zeigt den Anteil der GFP-positiven Zellen. Messzeitpunkt Tag "Null" stellt die Messung vor Doxycyclingabe dar. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Überexpressionskonstrukten auf Tag "Null" normiert. Die Experimente sind jeweils einzeln dargestellt, da auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde (siehe Kapitel 2.5). Das Experiment wurde drei mal durchgeführt.

Nach Überexpression von SOCS1 und der SOCS1-Mutationsvarianten in L-1236 sind unterschiedliche Auswirkungen auf die Proliferation zu beobachten. Der Kontrollvektor und die Stop codon-Variante zeigt keine Auswirkung die Proliferation. Für die Variante G232A (del) zeigt sich ein schwächerer toxischer Effekt auf die Proliferation im Vergleich zu den anderen Varianten. Für die wtSOCS1-Variante und die Variante C136T (tol) kann der größte Einfluss auf die Toxizität beobachtet werden. Für die Variante C201G zeigt sich in einem Experiment ein milderer Effekt auf die Toxizität verglichen mit der wtSOCS1-Variante.

SOCS1-Überexpression in KMH2

KMH2 weist keine *SOCS1*-Mutationen auf, sondern ausschließlich Wildtyp-Kopien des *SOCS1*- Gens. Bei der Überexpression der dargestellten Expressionsvektoren zeigte sich kein toxischer Effekt auf das Zellüberleben und keine Verminderung der Zellproliferation. Es konnte eine leichte Steigerung von maximal 20 % des Anteils transduzierter zu nicht-transduzierter Zellen beobachtet werden, die jedoch auch bei der Kontrolle pLVX-Tre3G-PG-Lyt2 beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 18). Das Experiment wurde zwei Mal, wie in Abbildung 18 dargestellt, durchgeführt.

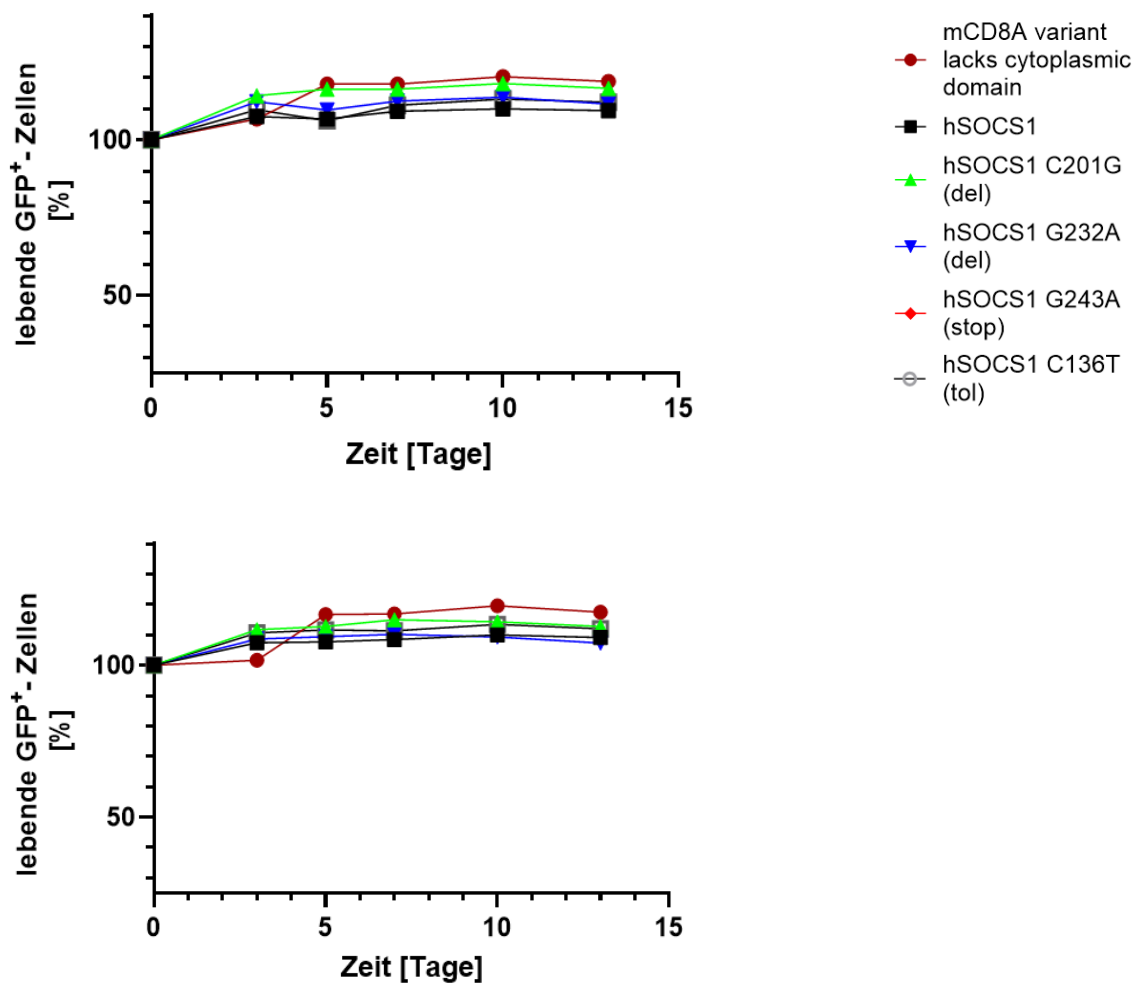


Abbildung 18: Überexpression von wtSOCS1 und SOCS1-Mutationsvarianten in KMH2

Dargestellt jeweils pLVX-Tre3G-PG + Mutationsvariante. Abkürzungen: deleterious (del); tolerated (tol); stop codon (stop); hSOCS1 entspricht wtSOCS1; mCD8A variant lacks cytoplasmic domain stellt den Kontrollvektor dar. X-Achse: stellt den zeitlichen Verlauf dar. Y-Achse: zeigt den Anteil der GFP-positiven Zellen. Messzeitpunkt Tag "Null" stellt die Messung vor Doxycyclingabe dar. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Überexpressionskonstrukten auf Tag "Null" normiert. Die Experimente sind jeweils einzeln dargestellt, da auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde (siehe Kapitel 2.5). Das Experiment wurde zwei mal durchgeführt. Nach Überexpression von SOCS1 und der SOCS1-Mutationsvarianten in KM-H2 ist kein wesentlicher Effekt auf die Proliferation zu beobachten

3.4 Nachweis der SOCS1 Überexpression in BL-41 mittels Western-Blotting

Um die *SOCS1*-Überexpression auf Proteinebene nachzuweisen, wurde ein Western-Blot angefertigt. Dafür wurde die Zelllinie BL-41 mit den Expressionsvektoren: pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1, pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C201G, pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 C136T, pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 G232A, , pLVX-Tre3G-PG + hSOCS1 G243A und transduziert. Nach ungefähr 36 Stunden wurden die Zellen mit Purmoycin selektioniert. Nach etwa 48 Stunden wurde die Genexpression durch Doxycyclin-Gabe induziert. Im ersten Versuch wurden die Doxycyclin-Konzentration variiert (siehe 3.4.1). Nach weiteren 48 Stunden wurden die Lysate der Zellen erstellt.

3.4.1 SOCS1 Überexpression in Abhängigkeit unterschiedlicher Doxycyclin-Konzentrationen

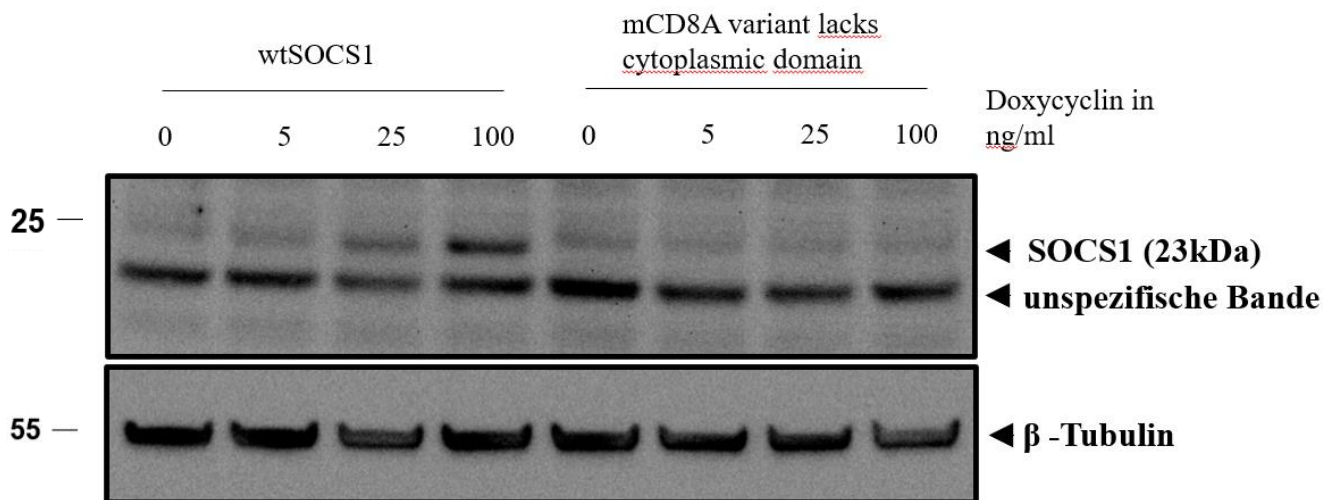


Abbildung 19: Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41 mittels pLVX-Tre-3G-PG + hSOCS1
 Die ersten vier Banden von links zeigen den SOCS1-Proteinnachweis mittels Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41 (hSOCS1 entspricht wtSOCS1) in Abhängigkeit der unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen (zwischen 0 und 100ng/ml). Bande fünf bis acht dient der Kontrolle nach Überexpression des Vektors pLVX-Tre3G-PG mCD8a variant lacks cytoplasmic domain in BL-41 zum Nachweis auf Proteinebene in Abhängigkeit der unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen (zwischen 0 und 100ng/ml). Höchste Intensität für SOCS1 nach SOCS1-Überexpression zeigte sich bei 100ng/ml, sodass diese Konzentration für die folgenden Experimente gewählt wurde.

Es erfolgte eine Testung der SOCS1-Proteine nach *SOCS1*-Überexpression in BL-41 bei unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen mithilfe eines Western-Blots (siehe Abbildung 19). Mit steigender Doxycyclin-Konzentration konnte eine Zunahme der

Intensität der SOCS1-Bande beobachtet werden. Auf Basis dieses Western-Blots wurde für die folgenden Western-Blots eine Doxycyclin-Konzentration von 100 ng/ml gewählt.

3.4.2 Überexpression des SOCS1-Wildtyps und mutierter SOCS1-Varianten

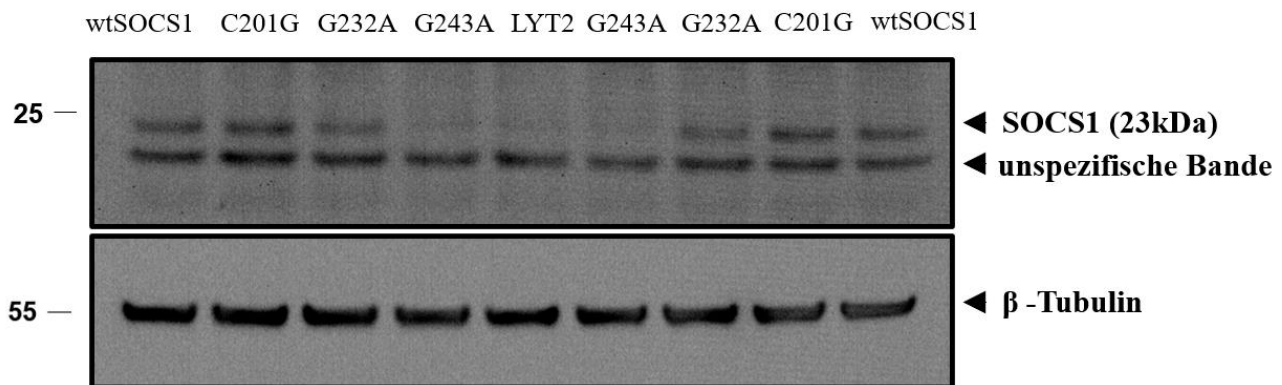


Abbildung 20: Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41

Dargestellt ist jeweils die Überexpression über pLVX-Tre-3G-PG + hSOCS1 oder SOCS1-Mutationsvariante: C201G (del) und G232A (del); G243A (stop codon); hSOCS1 entspricht wtSOCS1; mCD8A variant lacks cytoplasmic domain (LYT2) diente als Kontrolle. Es wurde eine Doxycyclin-Konzentration von 100ng/ml verwendet. C201G, G232A, G243A, wtSOCS1 wurden als Replikat aufgetragen.

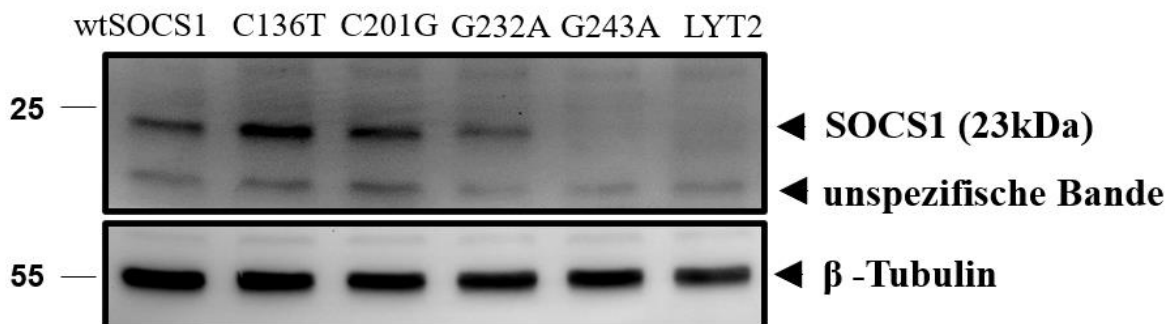


Abbildung 21: Western-Blot nach SOCS1-Überexpression in BL-41

Dargestellt ist jeweils die Überexpression über pLVX-Tre-3G-PG + hSOCS1 oder SOCS1-Mutationsvariante. C201G (del) und G232A (del); C136T (tol); G243A (stop codon); hSOCS1 entspricht wtSOCS1; mCD8A variant lacks cytoplasmic domain (LYT2) diente als Kontrolle. Es wurde eine Doxycyclin-Konzentration von 100 ng/ml verwendet.

Abbildung 20 und 21 zeigen exemplarisch durchgeführte Western-Blots nach Überexpression von SOCS1 und der SOCS1-Mutationsvarianten in BL-41. Abbildung 22 zeigt mittels Diagramm die quantitative Auswertung der durchgeführten Western-Blots. Hierfür wurde das Bildbearbeitungsprogramm Fiji genutzt. Auf der X-Achse zeigt sich

die jeweilig aufgetragene Probe. Die Y-Achse zeigt den quantitativen Mittelwert an, welcher mithilfe des Programmes ermittelt wurde. Der Wert zeigt das Verhältnis der Intensität der SOCS1-Bande zur β -Tubulin-Kontrollbande. Die höchste Intensität konnte für die *tolerated* Variante C136T ermittelt werden. Die niedrigste Intensität weisen die *Stop-Codon*-Variante G243A und die Kontrollprobe (Lyt2) auf. Dies weist auch darauf hin, dass die Variante G243A, wie die Variante Lyt2 ebenfalls als Kontrolle verwendet werden kann, wie bereits in den oben genannten Überexpressionsexperimenten erwähnt. wtSOCS1 weist, verglichen mit den beiden *deleterious*-Varianten, die niedrigste Intensität auf. C201G zeigt hier die höchste Intensität.

Zusammenfassend dient der Western-Blot dem Nachweis auf Proteinebene der *wtSOCS1*-Überexpression und der Überexpression der mutierten *SOCS1*-Varianten. Ebenfalls lassen sich Unterschiede in der Proteinstabilität der einzelnen Varianten erkennen. Interessanterweise zeigt sich für C201G (del) eine höhere Proteinstabilität, als für die Wildtyp-SOCS1-Variante (siehe Abbildungen 20 und 21). Erwartet wurde eine höhere Stabilität für wtSOCS1, da es sich bei C201G um eine *deleterious*-Mutation handelt. Wird dies mit dem Überexpressionsexperiment in L-1236 verglichen, zeigt sich für *wtSOCS1* aber eine höhere Toxizität, als für C201G (del) (siehe Abbildung 17). C136T (tol) weist eine höhere Proteinstabilität als wtSOCS1 auf (siehe Abbildung 21). Im Überexpressionsexperiment in L-1236 kann für C136T (tol) eine ähnliche Toxizität wie für *wtSOCS1* beobachtet werden (siehe Abbildung 17). Dies ist hinweisend dafür, dass eine höhere Proteinstabilität nicht unbedingt eine höhere Toxizität begünstigt und somit eine höhere Stabilität nicht in jedem Fall mit einer höheren Funktionalität korreliert.

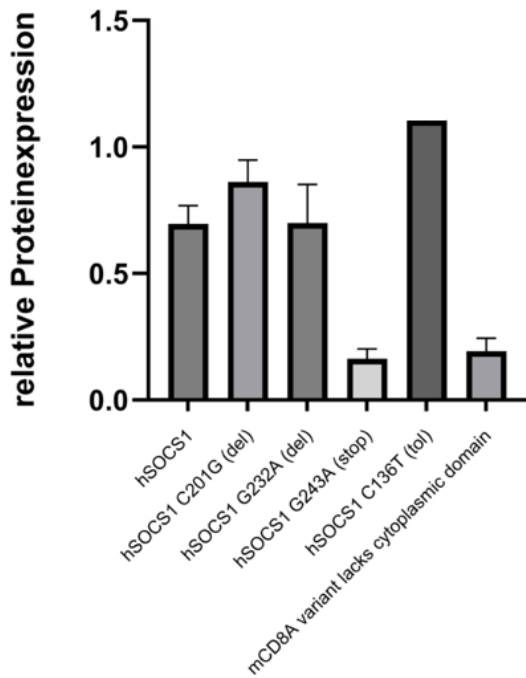


Abbildung 22: Relative Proteinexpression nach Überexpression in BL-41

X-Achse: Dargestellt ist jeweils pLVX-Tre-3G-PG + angegebene Mutationsvariante; Y-Achse: Quantitativer Wert ermittelt mithilfe Bildbearbeitungsprogramm Fiji; dargestellt ist je der arithmetische Mittelwert; Fehlerbalken mittels SEM (Standardfehler des Mittelwerts) ermittelt; aufgrund der geringen Stichprobengröße (n=2) bei der Variante hSOCS1 C136T wurde hier auf die Ermittlung des SEM verzichtet.

hSOCS1 entspricht wtSOCS (n=4); hSOCS1 C201G (n=4); hSOCS1 G232A (n=4); hSOCS1 G243A (n=3); hSOCS C136T (n=2); mCD8a variant lacks cytoplasmic domain (n=3).

3.5 SOCS1-Knockout in den Zelllinien BL-41 und EB-1

Das CRISPR-Cas9-System ist Teil des bakteriellen Immunsystems, das sich in den letzten Jahren zu einem bedeutenden Werkzeug in der Biotechnologie und Forschung entwickelt hat. In Bakterien dient das CRISPR-Cas-System als Abwehrmechanismus gegen Viren (z.B. Bakteriophagen). Es speichert DNA-Sequenzen vergangener Virusinfektionen (CRISPR-Sequenzen) und nutzt diese, um Viren bei erneuter Infektion zu erkennen und zu zerstören (Burmistrz und Pyré 2015).

Für die Knockout-Experimente wurde auch das CRISPR-Cas9-System genutzt. Dafür wurden die Zelllinien in Vorarbeiten des Labors mit induzierbaren *Cas9*-Genen ausgestattet. Cas9 ist eine Endonuklease und in der Lage, sowohl den komplementären als auch den nicht-komplementären DNA-Strang zu schneiden. Die sgRNA erkennt die Sequenz durch komplementäre Bindung an die Stelle der DNA und ermöglicht die Bindung von Cas9, sodass die Endonuklease an der gewünschten Stelle die DNA schneiden kann (Jinek et al. 2012; Nishimasu et al. 2014; Le Cong et al. 2013; Burmistrz und Pyré 2015). Der entstandene Doppelstrangbruch wird in den meisten Fällen durch nicht-homologe Endverknüpfung repariert. Daraus entsteht in den meisten Fällen Deletion und Funktionsverlust des betroffenen Gens (Jinek et al. 2013; Burmistrz und Pyré 2015).

In bereits durchgeführten Arbeiten zeigten Keimzentrums-B-Zellen eine gesteigerte Proliferation nach einem *SOCS1*-Knockout. Während dieser Experimente wurden primäre *in-vitro* kultivierte Keimzentrums-B-Zellen auf mögliche Tumorsuppressor-Gene untersucht. Nach Übertragung des *Cas9*-Gens und Transduktion einer *sgRNA library*, erfolgte die Ermittlung möglicher Tumorsuppressorgene. Hierbei zeigte sich das *GNAI3* als stärkstes potenzielles Tumorsuppressorgen in diesem Modell. Für *SOCS1* zeigte sich ebenfalls eine signifikante Anreicherung von Zellen, in denen das *SOCS1*-Gen inaktiviert wurde (Caeser et al. 2019). Da Burkitt-Lymphom-Zellen phänotypisch GCB-Zellen sehr stark ähneln, wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein *SOCS1*-Knockout in den Burkitt-Zelllinien BL-41 und EB-1 durchgeführt.

SOCS1-Knockout in BL-41

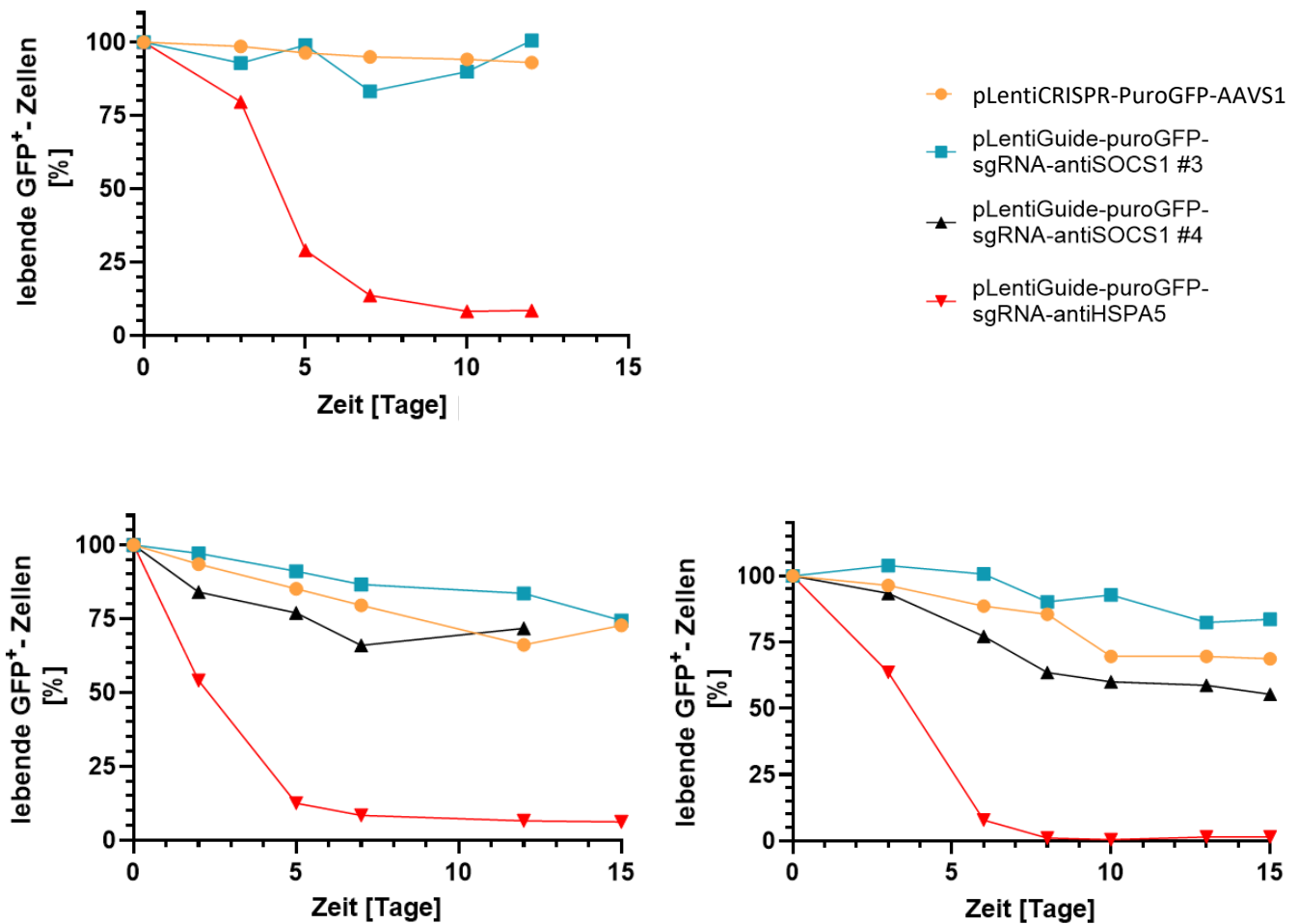


Abbildung 23: SOCS1-Knockout in BL-41

Dargestellt jeweils pLentiGuide-puroGFP + sgRNA-antiSOCS1 in zwei Varianten. pLentiCRISPR-PuroGFP-AAVS1 ist die Negativkontrolle. pLentiGuide-puroGFP-sgRNA-antiHSPA5 ist die Positivkontrolle. X-Achse: stellt den zeitlichen Verlauf dar. Y-Achse: zeigt den Anteil der GFP-positiven Zellen. Messzeitpunkt Tag "Null" stellt die Messung vor Doxycyclingabe dar. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Überexpressionskonstrukten auf Tag "Null" normiert. Die Experimente sind jeweils einzeln dargestellt, da auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde (siehe Kapitel 2.5). Das Experiment wurde drei mal durchgeführt. Der SOCS1-Knockout in BL-41 zeigt keine relevante Auswirkung auf die Proliferation

Der SOCS1-Knockout in BL-41 mithilfe der oben genannten sgRNAs zeigte keine relevante Auswirkung auf die Proliferation der Zellen. sgRNAs die den AAVS1-Lokus zum Ziel hatten, dienten als Kontrolle der Methode. Hierbei konnte eine Verringerung der Proliferation um bis zu 30 % beobachtet werden. Ähnliche Effekte erzielte der Knockout von SOCS1 mithilfe der oben genannten sgRNAs. Zusätzlich erfolgte ein Knockout von HSPA5. HSPA5 gehört zu der Familie der Hitzeschockproteine und codiert

für HSP70-5. Diese sind für die korrekte Faltung vieler Proteine zuständig und somit auch der Aktivierung dieser. Bei Funktionsverlust oder Abwesenheit dieser kann dies zur Apoptose der Zelle beitragen (Daugaard et al. 2007). Der Knockout von *HSPA5* diente als zusätzliche Kontrolle zur Testung der Proliferationsverlangsamung beziehungsweise des Proliferationsverlustes. Dies konnte für den *HSPA5*-Knockout nachgewiesen werden. Nach ungefähr fünf Tagen zeigten sich nur noch wenige lebende Zellen, die diese sgRNA enthielten.

SOCS1-Knockout in EB-1

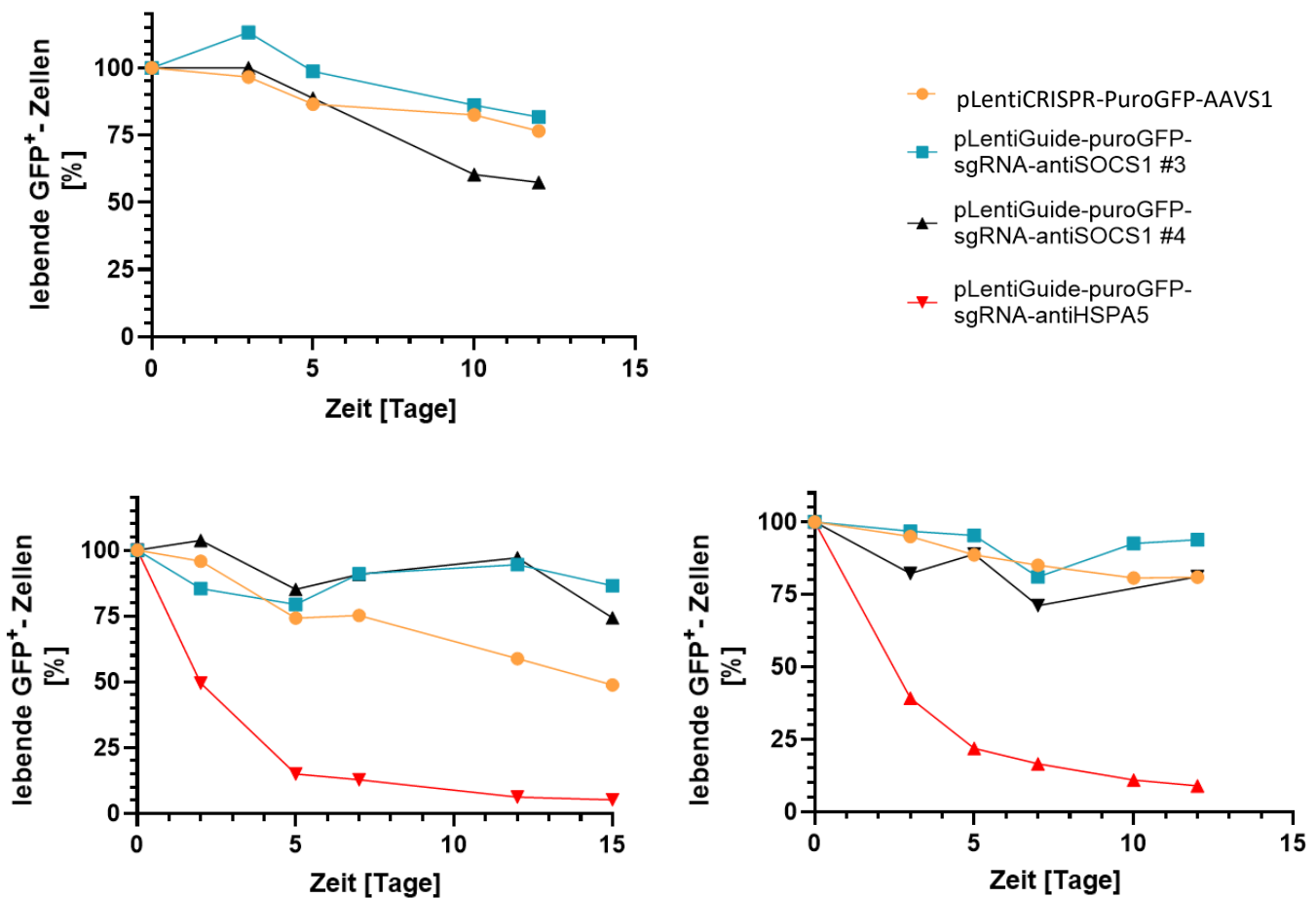


Abbildung 24: SOCS1-Knockout in EB-1

Dargestellt jeweils pLentiGuide-puroGFP + sgRNA-antiSOCS1 in zwei Varianten. pLentiCRISPR-PuroGFP-AAVS1 ist die Negativkontrolle. pLentiGuide-puroGFP-sgRNA-antiHSPA5 ist die Positivkontrolle. X-Achse: stellt den zeitlichen Verlauf dar. Y-Achse: zeigt den Anteil der GFP-positiven Zellen. Messzeitpunkt Tag "Null" stellt die Messung vor Doxycyclingabe dar. Es wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Überexpressionskonstrukten auf Tag "Null" normiert. Die Experimente sind jeweils einzeln dargestellt, da auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde (siehe Kapitel 2.5). Das Experiment wurde drei mal durchgeführt. Der SOCS1-Knockout in BL-70 zeigt keine relevante Auswirkung auf die Proliferation.

Vergleichbare Effekte konnten für den Knockout in EB-1 beobachtet werden, wie im Knockout in BL-41. Es zeigte sich ebenfalls eine Proliferationsverringering nach Knockout des *AAVS1*-Lokus von 20-50 %. Der *SOCSI*-Knockout mit den oben genannten sgRNAs zeigte wie bei BL-41 keinen wesentlichen Effekt auf die Proliferation. Nach dem Knockout von *HSPA5* konnte eine deutliche Proliferationsverlangsamung beobachtet werden, ähnlich wie bei BL-41.

3.6 ICAM-1-Knockout in den Zelllinien L-1236, UHO-1 und BL-41

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) ist ein induzierbares Zelloberflächen-Glykoprotein, welches zur Superfamilie der Immunglobuline gehört. Es stellt ein Zelladhäsionsmolekül dar. Die Liganden LFA-1 und Mac-1 binden an ICAM-1 (Diamond et al. 1991; Greve et al. 1989; Berendt et al. 1989). ICAM-1 wird von diversen Zellen, wie Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, B-Lymphozyten, Plasmazellen und T-Lymphozyten, exprimiert. Es ist an der interzellulären Adhäsion beteiligt, an Entzündungsprozessen sowie in die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel involviert (van de Stolpe und van der Saag, P T 1996; Roebuck und Finnegan 1999).

Um die Effizienz des CRISPR-Cas9-Systems in den untersuchten Zelllinien zu kontrollieren, wurde ein Knockout dieses Gens in L-1236, UHO-1 und BL-41 Zellen durchgeführt. In diesem Experiment konnte der *ICAM-1*-Knockout durchgeführt und nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25). Dafür wurden die oben genannten Zelllinien mit pLentiGuide-sgICAM-PG transduziert. Den Kontrollvektor stellte in diesem Fall pLentiCRISPR-PuroGFP-AAVS1 dar. 48-72 Stunden nach Transduktion wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert und durch Doxycyclingabe die *Cas9*-Genexpression induziert. Nach 18 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Vor der Messung wurden die Proben mit dem Antikörper Anti CD54 ICAM APC gefärbt.

In allen untersuchten Zelllinien konnte ein *ICAM-1*-Knockout nachgewiesen werden. Links ist jeweils die Messung vor Durchführung des *ICAM-1*-Knockouts dargestellt, rechts die Darstellung nach dem *ICAM-1*-Knockout. Vor dem Knockout lassen sich nur weniger als 1 % der Zellen als ICAM-1-negativ darstellen. Nach Durchführung des Knockouts konnte in allen Zelllinien ein Anteil von jeweils über 90 % ICAM-1-negativer Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse belegen die erfolgreiche Einbringung sowie die Funktionalität des CRISPR-Cas9-Systems in den untersuchten Zellen.

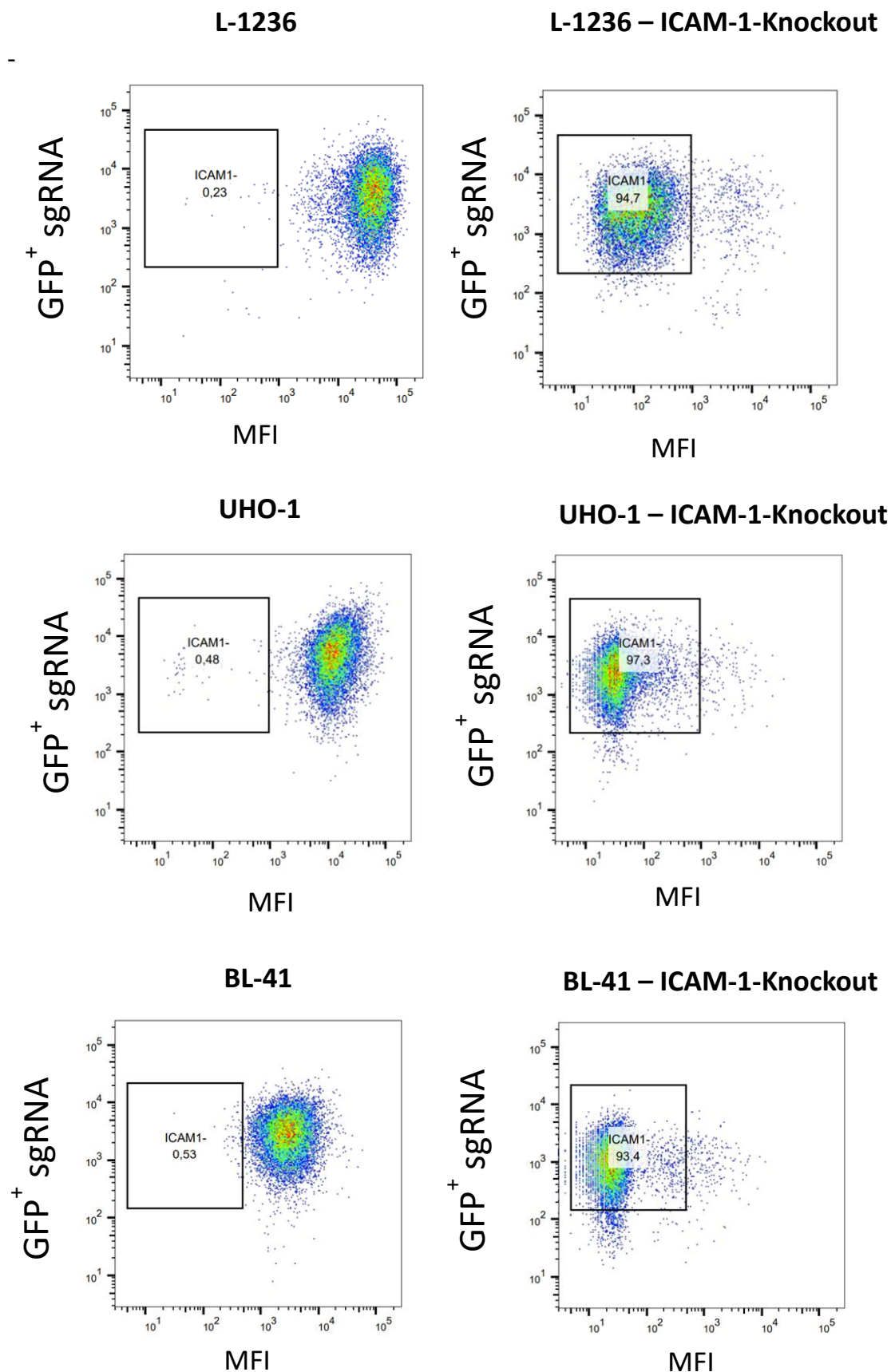


Abbildung 25: ICAM-1-Knockout in L-1236, UHO-1 und BL-41

Durchflusszytometrische Analyse des ICAM-1-Knockouts. Darstellung ICAM-1-negativer Zellen. X-Achse: ICAM-1-Fluoreszenzintensität (MFI); Y-Achse: GFP-Koexpression als Nachweis der Expression der anti-ICAM-1-sgrNA. Nach Induktion, durch Doxycyclingabe, des CRISPR-Cas9-Systems zeigt sich eine deutliche Anreicherung GFP-positiver, ICAM-1- negativer Zellen.

4 Diskussion

Das Hodgkin-Lymphom hat eine komplexe Biologie und Pathogenese, welche lange Zeit wenig erforscht war. Ein Grund dafür war, dass sich nur wenige neoplastische Zellen im Tumorgewebe befinden, sodass molekulare Analysen erschwert waren. Erst in den vergangenen Dekaden konnten, dank verbesserter Analyse- und Isoliermethoden, einige pathogenetische Mechanismen entschlüsselt und neue Kenntnisse bezüglich der Biologie und Pathogenese dieser Erkrankung gesammelt werden. Insbesondere Gesamtexomsequenzierungen, die in letzter Zeit durchgeführt worden sind, ermöglichten detailliertere Einblicke in die verschiedenen genetischen Läsionen, welche ursächlich für das Hodgkin-Lymphom sind. Darunter auch die Deregulation von Signalwegen, wie dem NF- κ B- und dem JAK/STAT-Signalweg. Insgesamt konnten aus bisherigen Untersuchungen einige Beobachtungen aufgestellt werden. Es zeigt sich, dass keine alleinstehende Mutation oder genetische Läsion verantwortlich ist für das Hodgkin-Lymphom. Es scheint eher, dass sowohl das Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Risikofaktoren zur Pathogenese beiträgt als auch weitere Faktoren, wie die Interaktion der neoplastischen Zellen mit ihrer Mikroumgebung. Vor allem die Deregulation der Signalwege NF- κ B und JAK/STAT scheinen von besonderer Bedeutung zu sein, da in nahezu allen untersuchten Fällen, Komponenten der jeweiligen Signalwege Mutationen aufwiesen (Weniger und Küppers 2021). Zusätzlich zeigen EBV-positive HRS-Zellen ein pathogenetisches Interaktionspotential mit dem NF- κ B-Signalweg über LMP1 (siehe Abbildung 4, Einleitung). Dies zeigt nochmal, welche Bedeutung deregulierte Signalwege in der Pathogenese spielen. SOCS1 ist als negativer Feedbackregulator ein Bestandteil des JAK/STAT-Signalweges. Bisher durchgeführte Arbeiten zeigen, dass *SOCS1*-Mutationen sowohl im Hodgkin-Lymphom, als auch im primären mediastinalen B-Zell-Lymphom vorkommen. Untersuchungen von HRS-Zellen von HL-Patienten konnten 61 % *SOCS1*-Mutationen detektieren (Lennerz et al. 2015). In pädiatrischen Hodgkin-Lymphomen lag die Mutationsfrequenz sogar bei 80 % (Desch et al. 2020). Auch einige Zelllinien wie HDLM-2, L-1236 und L-428 zeigen *SOCS1*-Mutationen (Weniger et al. 2006). Dank zunehmender Forschung und neuer Erkenntnisse bezüglich genetischer Läsionen und weiterer pathogenetischer Mechanismen im Hodgkin-Lymphom, können therapeutische Möglichkeiten stetig verbessert werden, sodass diese zielgerichteter entwickelt werden können. Insgesamt sind aber die pathogenetischen Mechanismen bisher noch nicht vollständig entschlüsselt worden, wie beispielsweise die

Rolle von *SOCS1*-Mutationen, welche Auswirkung diese auf die Pathogenese haben und inwieweit dies mit weiteren Faktoren interagiert. Eine detailliertere Entschlüsselung von *SOCS1*-Mutationen im Hodgkin-Lymphom und der Auswirkung auf die Pathogenese kann zur Verbesserung bisher eingesetzter therapeutischer Strategien beitragen.

4.1 Transduktionseffizienz von Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms

Die Transduktion von Hodgkin-Lymphom-Zelllinien stellte eine lange Zeit eine technische Herausforderung dar. Verbesserte Effizienzen konnten durch stetige methodische Veränderungen erzielt werden. Dafür wurden in der Vergangenheit Hek293T-Zellen optimiert, welche in ihrer Transfizierbarkeit verbessert werden konnten. Zusätzlich konnten die Virustiter durch Nutzung des chemischen Transfektionsreagenzes LentiX gesteigert werden. Diese im Vorfeld durchgeführten Modifikationen haben die Transduktionseffizienz der für die Arbeit genutzten Zelllinien-Modelle verbessert.

4.2 Überexpression von *SOCS1* und mutierter *SOCS1*-Varianten in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinienzellen

SOCS1 weist, durch aberrante somatische Hypermutation, in diversen Lymphomen oftmals Mutationen auf. *SOCS1*-Mutationen konnten bereits in Zellen des Hodgkin-Lymphoms, des primären mediastinalen B-Zell-Lymphoms und des DLBCLs gefunden werden. Die erforschten Mutationen sind dabei vielfältig und stellen sich beispielsweise als *Missense*-Mutationen, *Frameshift*- oder als *Nonsense*-Mutationen dar. Insbesondere *Missense*-Mutationen treten an unterschiedlichen Positionen auf und sind bisher noch nicht ausreichend erforscht und interpretiert worden (Schif et al. 2013; Mottok et al. 2009; Melzner et al. 2005; Weniger et al. 2005). Da das *SOCS1*-Gen bei dem Prozess der aberranten somatischen Hypermutation in Keimzentrums-B-Zellen einer besonders hohen Mutationslast ausgesetzt ist, stellt sich die Frage, welche der Varianten, insbesondere der *Missense*-Mutationen, pathogenetisch relevant sind. Da die Überexpression des *wtSOCS1*-Gens in HL-Zellen toxisch wirkt, eignet sich dieses Modell besonders zur Untersuchung des Funktionsverlustes von Austausch-Varianten. Die Nutzung von SIFT sollte dazu dienen, eine erste Einteilung möglicher Mutationen nach der Funktion und Auswirkung dieser zu erstellen. Dafür wurden die oben genannten *SOCS1*-Varianten ausgewählt, davon C136T, welche als toleriert/*tolerated* vorhergesagt

worden ist, C201G und G232A, welche als funktionsschädigend/*deleterious* vorhergesagt worden sind und G243A mit einem vorzeitigen Stop-Codon.

Die Auswertung dieser Experimente erfolgt nicht durch Ermittlung eines Mittelwertes, da toxische Effekte auf die Proliferation im Zeitverlauf nicht exakt reproduzierbar sind. Beeinflussende Faktoren stellen hierbei die Kultivierung der Zellen dar und die Reaktion dieser auf exogene Einflüsse, wie beispielsweise Temperaturunterschiede, Passagierung der Zellen und Transduktion. Nach Wiederholung der Versuche kann die Auswirkung der Überexpression von *wtSOCS1* und der *SOCS1*-Mutationsvarianten aber trotzdem verglichen werden und ein reproduzierbarer Effekt auf die Proliferation beobachtet werden aus welchem Schlussfolgerungen gezogen werden können. In den Überexpressionsexperimenten mit KM-H2 wurde eine Überexpression mit der Stop-Codon-Variante G243A ausgelassen, da die Überexpression mit dieser Variante vergleichbar ist mit Überexpression des angegebenen Kontrollvektors. Dies konnte durch Überexpression in L-1236 bereits gezeigt werden, sodass die Funktion der Stop-Codon-Variante vergleichbar ist mit dem Kontrollvektor und somit ebenfalls als Kontrolle genutzt werden kann.

BL-41 und BL-70

Für die BL-Zelllinie BL-41 wurde angenommen, dass die Überexpression von *wtSOCS1* sowie der *SOCS1*-Varianten keine negativen Effekte auf Proliferation und Überleben der Zellen hat, da aus der Pathogenese des Burkitt-Lymphoms kein Hinweis auf die Abhängigkeit vom JAK/STAT-Signalweg bekannt ist. Charakteristisch für das Burkitt-Lymphom ist eine konstitutive Überexpression des *MYC*-Onkogens (Dalla-Favera et al. 1982; Taub et al. 1982). Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die beobachteten Ergebnisse könnte im Vorliegen von Wildtyp-*SOCS1*-Kopien in dieser Zelllinie liegen, welche potenzielle Effekte der überexprimierten Variante kompensieren können.

Diese Annahmen werden durch die Ergebnisse des Toxizitätsassays gestützt. Über den gesamten Messzeitraum hinweg konnte ein nahezu konstanter Wert von 100 % mit einer minimalen Schwankung von 2 % gemessen werden.

Verglichen mit den Hodgkin-Zelllinien, L-1236 und KM-H2 zeigte sich bei BL-41 zu Messbeginn keine Erhöhung des Anteils transduzierter zu nicht-transduzierter Zellen.

Ebenso sind auch keine relevanten Schwankungen in der Viabilität detektiert worden. Dies könnte auf den schnellen Metabolismus und die schnelle Proliferationsrate von BL-41 zurückzuführen sein, wodurch die *GFP*-Expression vermutlich bereits zu einem frühen Zeitpunkt, möglicherweise an Tag **Null**, vorhanden ist.

Für BL-70 zeigte sich erwartungsgemäß ebenfalls keine relevante Auswirkung der Überexpression von *wtSOCS1* und der *SOCS1*-Mutationsvarianten auf die Proliferation und das Überleben der Zellen. Im Gegensatz zu BL-41 konnte hier jedoch eine Schwankung von 10-20 % im Verhältnis transduzierter zu nicht-transduzierter Zellen beobachtet werden. Bei Betrachtung der Kontrolle zeigte sich ein leichter, jedoch vermutlich unspezifischer Effekt auf die Toxizität.

KM-H2

KM-H2 weist keine *SOCS1*-Mutationen auf, sondern *wtSOCS1*. Nach Überexpression von *wtSOCS* und der *SOCS1*-Varianten konnte kein negativer Effekt auf die Proliferation beobachtet werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte darin liegen, dass KM-H2 keine *SOCS1*-Mutationen aufweist und somit der Pathomechanismus dieser Zelllinie nicht *SOCS1* abhängig ist. Zusätzlich könnte ein weiterer Grund für den beobachteten Effekt in bereits vorliegenden *wtSOCS1*-Kopien liegen. Es zeigte sich eine maximale Steigerung transduzierter zu nicht-transduzierter Zellen nach Normalisierung auf Tag **Null** von 20 % nach zwei bis vier Tagen. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass GFP zu Beginn womöglich noch nicht in allen Zellen exprimiert wird, sodass der Anteil transduzierter zu nicht-transduzierter Zellen zunächst leicht ansteigt und sich dann auf einem konstanten Niveau hält.

Auch bei der Zelllinie L-1236 kann dieser Effekt beobachtet werden, insbesondere bei der Betrachtung der Kontrolle (Lyt2) und der Stop-Codon-Variante G243A. Dabei zeigt sich ebenfalls nach vier Tagen eine Steigerung von ungefähr 10 %. Diese bleibt im Anschluss konstant, mit einer marginalen Schwankung von einigen Prozentpunkten.

L-1236

L-1236 weist eine biallelische *SOCS1*-Mutation auf. Auf Proteinebene ist auf einem Allel die KIR und ESS-Region betroffen und es kommt zu einem vorzeitigem Stop-Codon

(Position 64 und 74). Auf dem anderen Allel handelt es sich um eine *in frame* Mutation der SH2-Domäne (Position 145-148) (Weniger et al 2006). Die KIR-Region hemmt die katalytische Aktivität von JAK. Mittels SH2-Domäne kann SOCS1 an phosphorylierte Tyrosinreste binden. Die ESS-Domäne komplettiert diese Funktion (siehe Abbildung 6).

Im Überexpressionsexperiment konnte beobachtet werden, dass die *wtSOCS1*-Überexpression in L-1236 den toxischsten Effekt auf Proliferation und Überleben der Zellen zeigte, verglichen mit der Überexpression der anderen Varianten. Dies spricht dafür, dass der bestehende *SOCS1*-Mutationsstatus der Zellen die beobachtete Toxizität maßgeblich beeinflusst und insbesondere ein intaktes SOCS1 in einem JAK/STAT-abhängigen zellulären Kontext besonders wirksam ist. Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass *SOCS1*-Mutationen zukünftig als prädiktive Biomarker für den Einsatz einer JAK/STAT-Inhibitortherapie in Betracht gezogen werden könnten.

Die in diesen Experimenten beobachteten Effekte stehen im Einklang mit früheren Arbeiten, in welchen ein toxischer Effekt auf die Proliferation nach *SOCS1*-Überexpression in der PMBL-Zelllinie MedB-1 beobachtet werden konnte aber auch in HL-Zelllinienzellen, wie L-1236 und HD-LM2 (Melzner et al. 2005; Tiacci et al. 2018).

Zusätzlich geben die durchgeführten Experimente Hinweise auf die mögliche Eignung von L-1236 als Modellsystem zur funktionellen Charakterisierung von *SOCS1*-Mutationsvarianten, insbesondere von *deleterious*-Mutationsvarianten. So wird die *tolerated*-Variante C136T auch als *tolerated* erkannt und zeigt eine vergleichbare Toxizität zur *wtSOCS1*-Variante. Die *deleterious*-Variante G232A zeigt, verglichen mit *wtSOCS1*, eine geringere Toxizität, was auch auf eine korrekte Detektion als *deleterious*-Variante hinweist. Interessanterweise zeigt die *deleterious*-Variante C201G eine ähnliche Toxizität wie *wtSOCS1*. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Lokalisation der Punktmutation in C201G keine relevante Änderung der Funktion des Proteins bewirkt. Die Punktmutation in der *deleterious*-Variante C201G befindet sich an Position 67, welches die erste Position der ESS-Domäne betrifft. In der *deleterious*-Variante G232A ist diese ebenfalls betroffen an Position 78, welche sich am Ende von ESS befindet. Die ESS-Domäne ist wichtig bei der vollständigen Entfaltung der SH2-Bindungsaktivität an phosphorylierte Tyrosinreste (Beaurivage et al. 2016). Dies ist auch für die Proteinfunktion von SOCS1 als negativer Feedbackregulator von Bedeutung. Basierend auf diesen Beobachtungen, kann vermutet werden, dass die Lokalisation der

Punktmutation auf der ESS-Domäne einen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat, da die Überexpression der C201G-Variante toxischer zu sein scheint als die Variante G232A. Zusätzlich kann aber im Western-Blot beobachtet werden, dass die Variante C201G stabiler ist als die Variante G232A. Dies könnte auch die stärkere Toxizität begünstigen. Zum anderen ist es auch möglich, dass SIFT für die Variante C201G eine unzutreffende Vorhersage trifft und die Variante eher als *tolerated* einzustufen wäre.

4.3 Western-Blot

Der Western-Blot diente primär dem Proteinnachweis von SOCS1 und der SOCS1-Mutationsvarianten nach Überexpression in BL-41. Damit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression in den verschiedenen Zelllinien im Toxizitätsassay möglich ist. Es stellt sich ebenfalls die Frage, ob und inwieweit die Proteinstabilität einen Einfluss auf die Toxizität des Proteins hat. Die *deleterious*-Variante C201G zeigt eine höhere Stabilität als die *deleterious*-Variante G232A. Konsistent hierzu wirkte im Toxizitätsassay C201G auch toxischer als G232A und zeigte insgesamt nur eine geringfügig reduzierte Toxizität im Vergleich zur wtSOCS1, obwohl wtSOCS1 im Western-Blot eine geringere Stabilität als C201G aufwies. Interessanterweise konnte für die *tolerated* C136T-Variante eine vergleichbare Toxizität zur wtSOCS1 beobachtet werden, trotz des Nachweises einer höheren Stabilität im Western-Blot. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass eine erhöhte Proteinstabilität womöglich nicht zwangsläufig mit einer verstärkten toxischen Wirkung einhergeht. Vermutlich spielen hier zusätzliche Aspekte der einzelnen Mutationsvarianten eine funktionelle Rolle. Vergleichbare Zusammenhänge zwischen Proteinstabilität und Funktionalität wurden bereits für das Tumorsuppressorprotein p53 beschrieben. In bereits durchgeführten Arbeiten mit *TP53* zeigte sich, dass *p53*-Mutationsvarianten die Fähigkeit verloren haben an die DNA zu binden. Dies bewirkt eine Beeinträchtigung der Funktion als Transkriptionsfaktor und somit der tumorsuppressiven Funktion von p53 (Kato et al. 2003). Gleichzeitig kommt es aber auch zur Unterbrechung der negativen Rückkopplungsschleife. Denn p53 aktiviert durch die Bindung an die DNA auch die E3-Ligase MDM2, wodurch es letztlich zum Abbau von p53 kommt (negative Feedbackschleife) (Momand et al. 1992; Fang et al. 2000; Boutelle 2021; Hafner et al. 2019; Kennedy et al. 2022). Die inadäquate MDM2-Aktivierung ermöglicht aber auch eine p53-Proteinstabilisierung der Mutationsvarianten. Dies kann auch zu abweichenden Interaktionen mit anderen zellulären Faktoren führen und womöglich auch die

Proteinfunktion verändern (Haupt et al. 1997; Midgley et al. 1997; Wiech et al. 2012). Dies kann auch mit den durchgeführten SOCS1-Überexpressionsexperimenten verglichen werden. SOCS1 hat ebenfalls die Funktion eines negativen Feedbackregulators, indem es über die Bildung eines Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexes die Ubiquitinierung von JAK2 bewirkt und somit dann letztendlich die Transkription von SOCS1 hemmt (siehe Abbildung 5). Eine Hypothese könnte sein, dass dieser negative Rückkopplungsmechanismus bei einigen Mutationsvarianten gestört ist, sodass dies eine Stabilisierung des Proteins bewirkt. So ist die Mutationsvariante G232A in der Proteinstabilität vergleichbar mit der wtSOCS1-Variante. Allerdings ist bei der Überexpression in L-1236 G232A weniger toxisch als wtSOCS1 und C201G. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, dass die SOCS1-Proteinvariante G232A durch eine veränderte und möglicherweise inadäquate negative Feedbackschleife stabilisiert wird und in der Funktionalität eine geringere Toxizität aufweist, verglichen mit der wtSOCS1-Variante. Der verminderte toxische Effekt bei Überexpression könnte möglicherweise an der dadurch veränderten Interaktion zu anderen zellulären Faktoren liegen, wie in den beschriebenen Arbeiten mit p53.

4.4 SIFT – Sorting Intolerant From Tolerant

SIFT kann vorhersagen, ob sich eine Mutation schädigend oder nicht schädigend auf die Proteinfunktion auswirkt. Es bezieht sich dabei also auf die Funktionalität des Proteins. Über den Einfluss auf die Proteinstabilität wird keine Vorhersage getroffen. Sie wird daher auch nicht in die Vorhersage einbezogen. In bereits durchgeführten Untersuchungen wurden verschiedene Algorithmen miteinander verglichen (Pshennikova et al. 2019). Dabei zeigten sich in der Genauigkeit der Vorhersage Unterschiede zwischen den untersuchten Algorithmen. Untersucht wurden unter anderem SIFT, PROVEAN, FATHMM und PolyPhen-2. SIFT und PROVEAN nutzen den gleichen Algorithmus für die Vorhersage. Hierbei erfolgte eine Untersuchung von bestimmten Connexingenen, dessen Missense-Mutationsvarianten mit Hörproblemen assoziiert sind. Nach der Testung zeigte sich die höchste Genauigkeit der Vorhersage für SIFT und PROVEAN, mit einer Sensitivität von jeweils 67 %, einer Spezifität von 100 % und einer Genauigkeit von 89 % (Pshennikova et al. 2019). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Algorithmen SIFT und PROVEAN gut für die Vorhersage

eignen, ob eine Missense-Mutation eine Funktionsbeeinträchtigung des Proteins bewirkt. Auf dieser Grundlage wurde für die vorliegende Arbeit SIFT gewählt und genutzt.

Im Toxizitätsassay von L-1236 zeigte sich nach Überexpression der *deleterious*-G232A-*SOCS1*-Variante ein geringerer toxischer Effekt, verglichen mit der Überexpression von *wtSOCS1* und der *tolerated*-Variante, was vereinbar mit der Vorhersage durch SIFT ist. Im Gegensatz dazu zeigte die ebenfalls als *deleterious* vorhergesagte Variante C201G im Überexpressionsexperiment eine vergleichbare Toxizität zur *wtSOCS1*-Variante. Der Western-Blot ergab jedoch, dass C201G eine höhere Proteinstabilität aufweist als die G232A-Variante. Dies deutet darauf hin, dass die Proteinstabilität möglicherweise einen Einfluss auf die Toxizität hat. Da SIFT keine Aussage zur Proteinstabilität treffen kann, kann dieser Aspekt durch die Vorhersage nicht abgebildet werden, obwohl er potenziell die funktionellen Effekte des Proteins beeinflussen kann.

4.5 ICAM-1-Knockout in den Zelllinien L-1236, UHO-1 und BL-41

Der *ICAM-1*-Knockout diente insbesondere der Kontrolle für das CRISPR-Cas9-System. Der Versuch zeigt, dass das Einbringen von CRISPR-Cas9 in die Zelllinien erfolgreich war, da es den gewünschten Genabschnitt schneiden kann. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der *SOCS1*-Knockout in den genannten Zelllinien durchgeführt und untersucht werden kann. Eine weitere Option stellte die Durchführung eines Western-Blots vor dem *SOCS1*-Knockout-Experiment und nach diesem dar, was allerdings nur eingeschränkt durchführbar war, da in einigen Vorversuchen beobachtet werden konnte, dass sich endogenes *SOCS1* mittels Western-Blot kaum nachweisen ließ. Ein möglicher Grund dafür könnte in der geringen Verfügbarkeit des *SOCS1*-Proteins in der Zelle liegen. *SOCS1* ist ein Protein, welches nicht permanent in einem hohen Level in der Zelle vorliegt. Darüber hinaus hat *SOCS1* eine sehr kurze Halbwertszeit, die die Detektion über einen Western-Blot deutlich erschwert (Larsen und Röpke 2002). Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass die niedrigen *SOCS1*-Level nicht ausreichend sind, um adäquat mittels des primären *SOCS1*-Antikörpers markiert werden zu können oder die Sensitivität des Antikörpers ist zu schwach zur Detektion.

Das *ICAM-1*-Knockout-Experiment erfolgt über einen längeren Zeitraum, da *ICAM-1*, ein Oberflächenrezeptor, zu Beginn noch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Nach Induktion der *Cas9*-Expression, erfolgte noch der Abbau der bereits exprimierten

Rezeptoren. Der Knockout findet auf genetischer Ebene statt, sodass eine weitere *ICAM-1*-Expression verhindert wird. Dieser Prozess des Abbaus der noch exprimierten *ICAM-1*-Rezeptoren und der Verlust der weiteren Expression dieser Rezeptoren kann einige Tage in Anspruch nehmen, sodass die Färbung mittels Antikörper und Messung erst nach bis zu drei Wochen durchgeführt werden kann.

Werden beide Knockout-Experimente miteinander verglichen, *ICAM-1*-Knockout und *SOCS1*-Knockout, handelt es sich beim *ICAM-1* um einen Oberflächenrezeptor und bei *SOCS1* um ein endogenes Protein. Daraus ergibt sich auch der Unterschied in der Nachweismethode. *ICAM-1* kann über Antikörperfärbung und eine anschließende durchflusszytometrische Messung nachgewiesen, beziehungsweise dessen Abwesenheit nach dem Knockout nachgewiesen werden. *SOCS1* wird nicht mit Hilfe eines Antikörpers detektiert, sondern es wird die Auswirkung des Knockouts von *SOCS1* auf die Proliferation und das Überleben der Zellen untersucht, äquivalent zu den Überexpressionsexperimenten. Es benötigt einen längeren Zeitraum, bis die Auswirkungen des Knockouts beobachtet werden können. *SOCS1* besitzt eine kürzere Halbwertszeit als *ICAM-1*, sodass das bereits vorhandene *SOCS1* schneller abgebaut wird als *ICAM-1*, sodass eine gleiche Messdauer wie im Überexpressionsexperiment gewählt wurde.

4.6 SOCS1-Knockout in den Zelllinien BL-41 und EB-1

Für das Burkitt-Lymphom liegen bislang keine Hinweise auf eine funktionelle Abhängigkeit vom JAK/STAT-Signalweg vor. Mutationen, welche diesen Signalweg betreffen, sind in dieser Entität nur selten beschrieben. Vor diesem Hintergrund sind die Beobachtungen nach dem *SOCS1*-Knockout in den BL-Zelllinienzellen vereinbar mit der bekannten Pathogenese des Burkitt-Lymphoms, da der Knockout von *SOCS1* keine relevante Auswirkung auf die Proliferation der Zellen auslöste.

Es zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum eine geringe Verringerung von Proliferation und des Zellüberlebens. Da dieser Effekt auch unabhängig vom *SOCS1*-Knockout zu beobachten ist, ist davon auszugehen, dass dieser nicht spezifisch auf den *SOCS1*-Verlust zurückzuführen ist. Dies könnte auf unspezifische exogene experimentelle Einflussfaktoren, wie beispielsweise Temperaturunterschiede während der Zellkultur, Passagierung der Zellen oder der Transduktion, zurückzuführen sein. Ein

weiterer möglicher Faktor, der sich unspezifisch auf die Proliferation auswirkt, könnte die Aktivierung des Cas9-Systems nach Doxycyclingabe darstellen und die damit einhergehende zelluläre Stressreaktion. Die Ergebnisse sprechen insgesamt jedoch dafür, dass der *SOCS1*-Knockout in den BL-Zelllinienzellen keine wesentliche funktionelle Relevanz für Proliferation und das Zellüberleben besitzt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms ist komplex und schließt mehrere Faktoren auf verschiedenen Ebenen ein. Dazu gehören unter anderem verschiedene somatische Mutationen und genetische Läsionen, welche Signalwege, wie den JAK/STAT-Signalweg, betreffen. Mutationen, die den negativen Feedbackregulator SOCS1 betreffen kommen häufig vor und sind ebenfalls relevant in der Pathogenese des Hodgkin Lymphoms. Weitere Faktoren betreffen die Interaktion der HRS-Zellen mit der Mikroumgebung und die Abstammung dieser von Keimzentrums-B-Zellen. Bislang konnten viele pathogenetische Faktoren ermittelt werden, allerdings ist die Biologie des Hodgkin-Lymphoms noch nicht vollständig erschlossen.

Bereits vorangegangene Arbeiten verweisen auf die pathogenetische Bedeutung des JAK/STAT-Signalweges und insbesondere der pathogenetischen Rolle von *SOCS1* im Hodgkin-Lymphom.

Ziel dieser Arbeit war es die funktionelle Rolle von *wtSOCS1* und verschiedener *SOCS1*-Mutationsvarianten im Hodgkin-Lymphom und im Burkitt-Lymphom zu untersuchen. Hierfür wurden *SOCS1*-Überexpressions- und Knockoutexperimente in Hodgkin- und Burkitt-Zelllinien durchgeföhrt.

Die Ergebnisse zeigen, dass SOCS1 funktionell als Tumorsuppressor wirkt und die Toxizität durch *SOCS1*-Überexpression zum einen vom zellulären Kontext und zum anderem vom Mutationsstatus der Zelllinie abhängt. Nach Überexpression von *SOCS1* und der Mutationsvarianten in der HL-Zelllinie L-1236, die eine biallelische *SOCS1*-Mutation besitzt, konnte ein toxischer Effekt, abhängig von der Mutationsvariante, beobachtet werden. In der HL-Zelllinie KM-H2, die keine *SOCS1*-Mutation aufweist, und in den Burkitt-Zelllinien konnten keine toxischen Effekte beobachtet werden. Zusätzlich weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass sich die Zelllinie L-1236 womöglich als Modellsystem zur Detektion von *deleterious-SOCS1*-Mutationsvarianten eignet.

Die Beobachtungen aus den *SOCS1*-Überexpressions- und Knockoutexperimente mit den BL-Zelllinienzellen deuten auf die fehlende Abhängigkeit von *SOCS1* in der Pathogenese dieser Entität hin.

Aufbauend auf diesen Beobachtungen könnten künftig weitere funktionelle Interaktionen und die Auswirkung von SOCS1 auf andere Signalwege und zelluläre Prozesse untersucht werden, um eine Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer

Ansätze im Hodgkin-Lymphom zu schaffen und womöglich *SOCS1* als möglichen Biomarker in der Therapie einzusetzen.

Summary

The pathogenesis of Hodgkin lymphoma is complex and multifactorial. It includes various somatic mutations, genetic lesions concerning signaling pathways, as JAK/STAT. In the pathogenesis of Hodgkin lymphoma mutations of the negative feedbackregulator *SOCS1* are common and relevant. Interactions with the microenvironment also plays a pathogenetic role. The origin of HRS cells from germinal center B cells are also pathogenetic relevant. So far, a lot of factors have been detected, but the biology of Hodgkin lymphoma has not yet been completely examined. Recent scientific works refer to the pathogenetic impact of the JAK/STAT pathway in Hodgkin lymphoma, especially the pathogenetic role of *SOCS1* mutations.

The aim of this study was to investigate the functional role of *wtSOCS1* and *SOCS1* mutation variants in Hodgkin lymphoma and Burkitt lymphoma. For this reason, overexpression and knockout of *SOCS1* was conducted in Hodgkin and Burkitt lymphoma cell lines.

The results indicate that *SOCS1* works as a tumor suppressor and that the toxicity, caused by *SOCS1* overexpression, depends on the cellular context and on the mutation status of the cell line. After overexpression of *SOCS1* and the mutation variants of *SOCS1* in the HL cell line L-1236, which has a biallelic *SOCS1* mutation, a toxic effect, depending of the mutational variant, could be observed. In the HL cell line KM-H2, which does not carry a *SOCS1* mutation, and in the Burkitt lymphoma cell lines, no toxic effects could be shown. These observations indicate that L-1236 could be used as a model system for detection of deleterious *SOCS1* mutation variants.

The observations from the overexpression and knockout of *SOCS1* in the BL cell lines indicate an independence of *SOCS1* in the pathogenesis of this entity.

Based on these findings, additional interactions and their effects of *SOCS1* on other signaling pathways and cellular processes could be investigated in order to provide a basis for the development of new therapeutic targets and a possible use of *SOCS1* as a potential biomarker in therapy of Hodgkin's lymphoma

6 Literaturverzeichnis

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9. doi: 10.1038/nmeth0410-248. PMID: 20354512; PMCID: PMC2855889.

Anas Younes; Stephen M. Ansell (2016): Novel agents in the treatment of Hodgkin lymphoma: Biological basis and clinical results. In: *Seminars in Hematology* 53 (3), S. 186–189. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2016.05.011.

Araujo, I.; Foss, H. D.; Hummel, M.; Anagnostopoulos, I.; Barbosa, H. S.; Bittencourt, A.; Stein, H. (1999): Frequent expansion of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma. In: *The Journal of pathology* 187 (3), S. 326–330. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199902)187:3<326::AID-PATH242>3.0.CO;2-N.

Armitage, J. O.; Weisenburger, D. D. (1998): New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (8), S. 2780–2795. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.8.2780.

Baffert, Fabienne; Régnier, Catherine H.; Pover, Alain de; Pissot-Soldermann, Carole; Tavares, Gisele A.; Blasco, Francesca et al. (2010): Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805. In: *Molecular cancer therapeutics* 9 (7), S. 1945–1955. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0053.

Barbari, Cody; Fontaine, Tyler; Parajuli, Priyanka; Lamichhane, Narottam; Jakubski, Silvia; Lamichhane, Purushottam; Deshmukh, Rahul R. (2020): Immunotherapies and Combination Strategies for Immuno-Oncology. In: *International journal of molecular sciences* 21 (14). DOI: 10.3390/ijms21145009.

Barrans, Sharon; Crouch, Simon; Smith, Alex; Turner, Kathryn; Owen, Roger; Patmore, Russell et al. (2010): Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (20), S. 3360–3365. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.3947.

Beaurivage, Claudia; Champagne, Audrey; Tobelaim, William S.; Pomerleau, Véronique; Menendez, Alfredo; Saucier, Caroline (2016): SOCS1 in cancer: An oncogene and a tumor suppressor. In: *Cytokine* 82, S. 87–94. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.01.005.

Béguelin, Wendy; Popovic, Relja; Teater, Matt; Jiang, Yanwen; Bunting, Karen L.; Rosen, Monica et al. (2013): EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. In: *Cancer cell* 23 (5), S. 677–692. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.011.

Cristiana Bellan, Stefano Lazzi, Michael Hummel, Nazzareno Palumbo, Margherita de Santi, Teresa Amato, Joshua Nyagol, Elena Sabattini, Thierry Lazure, Stefano A. Pileri, Martine Raphael, Harald Stein, Piero Tosi, Lorenzo Leoncini; Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood* 2005; 106 (3): 1031–1036.

Ben-Zvi, Tal; Yayon, Avner; Gertler, Arieh; Monsonego-Ornan, Efrat (2006): Suppressors of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 interact with and modulate fibroblast growth factor receptor signaling. In: *J Cell Sci* 119 (Pt 2), S. 380–387. DOI: 10.1242/jcs.02740.

Berendt, A. R.; Simmons, D. L.; Tansey, J.; Newbold, C. I.; Marsh, K. (1989): Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. In: *Nature* 341 (6237), S. 57–59. DOI: 10.1038/341057a0.

Blum, Kristie A.; Lozanski, Gerard; Byrd, John C. (2004): Adult Burkitt leukemia and lymphoma. In: *Blood* 104 (10), S. 3009–3020. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0405.

Böll, Boris; Bredenfeld, Henning; Görden, Helen; Halbsguth, Teresa; Eich, Hans T.; Soekler, Martin et al. (2011): Phase 2 study of PVAG (prednisone, vinblastine, doxorubicin, gemcitabine) in elderly patients with early unfavorable or advanced stage Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 118 (24), S. 6292–6298. DOI: 10.1182/blood-2011-07-368167.

Borchmann, Peter; Moccia, Alden; Greil, Richard; Hertzberg, Mark; Schaub, Valdete; Hüttmann, Andreas et al. (2022): Treatment Related Morbidity in Patients with Classical Hodgkin Lymphoma: Results of the Ongoing, Randomized Phase III HD21 Trial By the German Hodgkin Study Group. In: *Blood* 140 (Supplement 1), S. 771–773. DOI: 10.1182/blood-2022-165917.

Boutelle AM, Attardi LD. p53 and tumor suppression: it takes a network. *Trends Cell Biol.* 2021;31:298–310.

Bräuninger, Andreas; Wacker, Hans-Heinrich; Rajewsky, Klaus; Küppers, Ralf; Hansmann, Martin-Leo (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. In: *Cancer research* 63 (7), S. 1644–1651.

Brewin, T. B. (1966): Alcohol intolerance in neoplastic disease. In: *British medical journal* 2 (5511), S. 437–441. DOI: 10.1136/bmj.2.5511.437.

Bröckelmann, Paul J.; Eichenauer, Dennis A.; Jakob, Tina; Follmann, Markus; Engert, Andreas; Skoetz, Nicole (2018): Hodgkin Lymphoma in Adults. In: *Dtsch Arztebl International* 115 (31-32), S. 535–540. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0535.

Bröckelmann, P. J.; Müller, H.; Casasnovas, O.; Hutchings, M.; Tresckow, B. von; Jürgens, M. et al. (2017): Risk factors and a prognostic score for survival after autologous stem-cell transplantation for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 28 (6), S. 1352–1358. DOI: 10.1093/annonc/mdx072.

Brune, Verena; Tiacci, Enrico; Pfeil, Ines; Döring, Claudia; Eckerle, Susan; van Noesel, Carel J. M. et al. (2008): Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. In: *The Journal of experimental medicine* 205 (10), S. 2251–2268. DOI: 10.1084/jem.20080809.

Burlile, Jessica F.; Frechette, Kelsey M.; Breen, William G.; Hwang, Steven R.; Higgins, Alexandra S.; Nedved, Adrienne N. et al. (2024): Patterns of progression after immune checkpoint inhibitors for Hodgkin lymphoma: implications for radiation therapy. In: *Blood advances* 8 (5), S. 1250–1257. DOI: 10.1182/bloodadvances.2023011533.

Burmistrz, Michał; Pyrc, Krzysztof (2015): CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. In: *Polish journal of microbiology* 64 (3), S. 193–202.

Cabannes, E.; Khan, G.; Aillet, F.; Jarrett, R. F.; Hay, R. T. (1999): Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκBα. In: *Oncogene* 18 (20), S. 3063–3070. DOI: 10.1038/sj.onc.1202893.

Caeser, Rebecca; Di Re, Miriam; Krupka, Joanna A.; Gao, Jie; Lara-Chica, Maribel; Dias, João M. L. et al. (2019): Genetic modification of primary human B cells to model high-grade lymphoma. In: *Nature communications* 10 (1), S. 4543. DOI: 10.1038/s41467-019-12494-x.

Calabrese, Viviane; Mallette, Frédérick A.; Deschênes-Simard, Xavier; Ramanathan, Sheela; Gagnon, Julien; Moores, Adrian et al. (2009): SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. In: *Molecular Cell* 36 (5), S. 754–767. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.044.

Chang, C. C.; Ye, B. H.; Chaganti, R. S.; Dalla-Favera, R. (1996): BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (14), S. 6947–6952. DOI: 10.1073/pnas.93.14.6947.

Chapuy, Bjoern; Stewart, Chip; Dunford, Andrew J.; Kim, Jaegil; Kamburov, Atanas; Redd, Robert A. et al. (2018): Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. In: *Nature medicine* 24 (5), S. 679–690. DOI: 10.1038/s41591-018-0016-8.

Chen, Chien-Yuan; Tsay, Woei; Tang, Jih-Luh; Shen, Hwei-Ling; Lin, Shu-Wha; Huang, Sheng-Yi et al. (2003): SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. In: *Genes, chromosomes & cancer* 37 (3), S. 300–305. DOI: 10.1002/gcc.10222.

Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015 Aug 15;31(16):2745-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btv195. Epub 2015 Apr 6. PMID: 25851949; PMCID: PMC4528627.

Christian Koelsche; Julia Strebovsky; Andrea Baetz; Alexander H. Dalpke (2009): Structural and functional analysis of a nuclear localization signal in SOCS1. In: *Molecular Immunology* 46 (13), S. 2474–2480. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.05.020.

Dalla-Favera, R.; Bregni, M.; Erikson, J.; Patterson, D.; Gallo, R. C.; Croce, C. M. (1982): Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (24), S. 7824–7827. DOI: 10.1073/pnas.79.24.7824.

Dang, Chi V.; O'donnell, Kathryn A.; Juopperi, Tarja (2005): The great MYC escape in tumorigenesis. In: *Cancer cell* 8 (3), S. 177–178. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.08.005.

Daugaard, Mads; Rohde, Mikkel; Jäättelä, Marja (2007): The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. In: *FEBS letters* 581 (19), S. 3702–3710. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.039.

Davi, F.; Delecluse, H. J.; Guiet, P.; Gabarre, J.; Fayon, A.; Gentilhomme, O. et al. (1998): Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: characterization within a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. Burkitt's Lymphoma Study Group. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16 (12), S. 3788–3795. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.12.3788.

Davis, R. E.; Brown, K. D.; Siebenlist, U.; Staudt, L. M. (2001): Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. In: *The Journal of experimental medicine* 194 (12), S. 1861–1874. DOI: 10.1084/jem.194.12.1861.

Desch, Ann-Kathrin; Hartung, Kristin; Botzen, Ante; Brobeil, Alexander; Rummel, Mathias; Kurch, Lars et al. (2020): Genotyping circulating tumor DNA of pediatric Hodgkin lymphoma. In: *Leukemia* 34 (1), S. 151–166. DOI: 10.1038/s41375-019-0541-6.

Deutsche Gesellschaft fuer Haematologie und medizinische Onkologie: Hodgkin Lymphom. Online verfügbar unter <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/hodgkin-lymphom/@@guideline/html/index.html>, zuletzt geprüft am 30.01.2024.

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Hodgkin Lymphom. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten, Langversion 3.2, 2022. AWMF Registernummer: 018/029 OL., Online verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom/>, zuletzt geprüft am 30.01.2024.

Diamond, M. S.; Staunton, D. E.; Marlin, S. D.; Springer, T. A. (1991): Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. In: *Cell* 65 (6), S. 961–971. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90548-d.

Ding, B. Belinda; Yu, J. Jessica; Yu, Raymond Y-L; Mendez, Lourdes M.; Shaknovich, Rita; Zhang, Yonghui et al. (2008): Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. In: *Blood* 111 (3), S. 1515–1523. DOI: 10.1182/blood-2007-04-087734.

Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root DE. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2016 Feb;34(2):184-191. doi: 10.1038/nbt.3437. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26780180; PMCID: PMC4744125.

Dorsett, Yair; Robbiani, Davide F.; Jankovic, Mila; Reina-San-Martin, Bernardo; Eisenreich, Thomas R.; Nussenzweig, Michel C. (2007): A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (9), S. 2225–2232. DOI: 10.1084/jem.20070884.

Dutton, Amanda; Reynolds, Gary M.; Dawson, Christopher W.; Young, Lawrence S.; Murray, Paul 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. In: *The Journal of pathology* 205 (4), S. 498–506. DOI: 10.1002/path.1725.

Emmerich, Florian; Theurich, Sebastian; Hummel, Michael; Haeffker, Antje; Vry, Magnus S.; Döhner, Konstanze et al. (2003): Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. In: *The Journal of pathology* 201 (3), S. 413–420. DOI: 10.1002/path.1454.

Endo, T. A.; Masuhara, M.; Yokouchi, M.; Suzuki, R.; Sakamoto, H.; Mitsui, K. et al. (1997): A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. In: *Nature* 387 (6636), S. 921–924. DOI: 10.1038/43213.

Engert, Andreas; Franklin, Jeremy; Eich, Hans Theodor; Brillant, Corinne; Sehlen, Susanne; Cartoni, Claudio et al. (2007): Two Cycles of Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine Plus Extended-Field Radiotherapy Is Superior to Radiotherapy Alone in Early Favorable Hodgkin's Lymphoma: Final Results of the GHSG HD7 Trial. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (23), S. 3495–3502. DOI: 10.1200/JCO.2006.07.0482.

Evan, G. I.; Wyllie, A. H.; Gilbert, C. S.; Littlewood, T. D.; Land, H.; Brooks, M. et al. (1992): Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. In: *Cell* 69 (1), S. 119–128. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90123-t.

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*. 2000;275:8945–51.

Fermé, Christophe; Eghbali, Houchingue; Meerwaldt, Jacobus H.; Rieux, Chantal; Bosq, Jacques; Berger, Françoise et al. (2007): Chemotherapy plus Involved-Field Radiation in Early-Stage Hodgkin's Disease. In: *New England Journal of Medicine* 357 (19), S. 1916–1927. DOI: 10.1056/NEJMoa064601.

Fisher, Richard I. (2003): Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. In: *Seminars in oncology* 30 (2 Suppl 4), S. 3–9. DOI: 10.1053/sonc.2003.23797.

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. In: *Blood* 94 (9), S. 3108–3113.

Gellert, Martin (2002): V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. In: *Annual review of biochemistry* 71, S. 101–132. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203.

Ghoreschi, Kamran; Laurence, Arian; O'Shea, John J. (2009): Janus kinases in immune cell signaling. In: *Immunological reviews* 228 (1), S. 273–287. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00754.x.

Goossens, T.; Klein, U.; Küppers, R. (1998): Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5), S. 2463–2468. DOI: 10.1073/pnas.95.5.2463.

Gossen, M.; Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (12), S. 5547–5551. DOI: 10.1073/pnas.89.12.5547.

Gossen, M.; Freundlieb, S.; Bender, G.; Müller, G.; Hillen, W.; Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218), S. 1766–1769. DOI: 10.1126/science.7792603.

Green, Michael R.; Monti, Stefano; Rodig, Scott J.; Juszczynski, Przemyslaw; Currie, Treeve; O'Donnell, Evan et al. (2010): Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. In: *Blood* 116 (17), S. 3268–3277. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282780.

Greve, J. M.; Davis, G.; Meyer, A. M.; Forte, C. P.; Yost, S. C.; Marlor, C. W. et al. (1989): The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. In: *Cell* 56 (5), S. 839–847. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90688-0.

Gui, Y.; Yeganeh, M.; Donates, Y-C; Tobelaim, W-S; Chababi, W.; Mayhue, M. et al. (2015): Regulation of MET receptor tyrosine kinase signaling by suppressor of cytokine signaling 1 in hepatocellular carcinoma. In: *Oncogene* 34 (46), S. 5718–5728. DOI: 10.1038/onc.2015.20.

Gui, Yirui; Yeganeh, Mehdi; Cepero-Donates, Yuneivy; Ramanathan, Sheela; Saucier, Caroline; Ilangumaran, Subburaj (2014): Regulation of MET receptor signaling by SOCS1 and its implications for hepatocellular carcinoma. In: *Current pharmaceutical design* 20 (17), S. 2922–2933. DOI: 10.2174/13816128113199990597.

Guitar, Chrystelle; Dusanter-Fourt, Isabelle; Copie-Bergman, Christiane; Boulland, Marie-Laure; Le Gouvello, Sabine; Gaulard, Philippe et al. (2004): Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. In: *Blood* 104 (2), S. 543–549. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3545.

Gunawardana, Jay; Chan, Fong Chun; Telenius, Adèle; Woolcock, Bruce; Kridel, Robert; Tan, King L. et al. (2014): Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. In: *Nature genetics* 46 (4), S. 329–335. DOI: 10.1038/ng.2900.

Gunvén, P.; Klein, G.; Klein, E.; Norin, T.; Singh, S. (1980): Surface immunoglobulins on Burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients. In: *International journal of cancer* 25 (6), S. 711–719. DOI: 10.1002/ijc.2910250605.

Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:199–210.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997;387:296–9.

Hinz, Michael; Lemke, Petra; Anagnostopoulos, Ioannis; Hacker, Christine; Krappmann, Daniel; Mathas, Stephan et al. (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. In: *The Journal of experimental medicine* 196 (5), S. 605–617. DOI: 10.1084/jem.20020062.

Hodgkin, Thomas (1832): On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans.* 1832;17:68-114.

Ilangumaran, Subburaj; Ramanathan, Sheela; Rottapel, Robert (2004): Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. In: *Seminars in immunology* 16 (6), S. 351–365. DOI: 10.1016/j.smim.2004.08.015.

Izban, K. F.; Ergin, M.; Huang, Q.; Qin, J. Z.; Martinez, R. L.; Schnitzer, B. et al. (2001): Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14 (4), S. 297–310. DOI: 10.1038/modpathol.3880306.

Jäger, U.; Böcskör, S.; Le, T.; Mitterbauer, G.; Bolz, I.; Chott, A. et al. (2000): Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. In: *Blood* 95 (11), S. 3520–3529.

Jarnicki, Andrew; Putoczki, Tracy; Ernst, Matthias (2010): Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? In: *Cell Div* 5 (1), S. 14. DOI: 10.1186/1747-1028-5-14.

Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

Jinek, Martin; East, Alexandra; Cheng, Aaron; Lin, Steven; Ma, Enbo; Doudna, Jennifer (2013): RNA-programmed genome editing in human cells. In: *eLife* 2, e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471.

Johnston, J. M.; Carroll, W. L. (1992): c-myc hypermutation in Burkitt's lymphoma. In: *Leukemia & lymphoma* 8 (6), S. 431–439. DOI: 10.3109/10428199209051025.

Joos, S.; Küpper, M.; Ohl, S.; Bonin, F. von; Mechttersheimer, G.; Bentz, M. et al. (2000): Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. In: *Cancer research* 60 (3), S. 549–552.

S. Joos, C.K. Menz, G. Wrobel, R. Siebert, S. Gesk, S. Ohl, G. Mechttersheimer, L. Trümper, P. Möller, P. Lichter, T.F. Barth, Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2, *Blood* 99 (2002) 1381–1387.

K. Weber-Matthiesen; J. Deerberg; M. Poetsch; W. Grote; B. Schlegelberger (1995): Numerical Chromosome Aberrations Are Present Within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg Cells in 100% of Analyzed Cases of Hodgkin's Disease. In: *Blood* 86 (4), S. 1464–1468. DOI: 10.1182/blood.V86.4.1464.bloodjournal8641464.

Kang, Keunsoo; Robinson, Gertraud W.; Hennighausen, Lothar (2013): Comprehensive meta-analysis of Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) genomic binding patterns discerns cell-specific cis-regulatory modules. In: *BMC Genomics* 14 (1), S. 4. DOI: 10.1186/1471-2164-14-4.

Kanzler, H.; Küppers, R.; Hansmann, M. L.; Rajewsky, K. (1996): Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. In: *The Journal of experimental medicine* 184 (4), S. 1495–1505. DOI: 10.1084/jem.184.4.1495.

Kapatai, G.; Murray, P. (2007): Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. In: *Journal of clinical pathology* 60 (12), S. 1342–1349. DOI: 10.1136/jcp.2007.050146.

Karube, K.; Enjuanes, A.; Dlouhy, I.; Jares, P.; Martin-Garcia, D.; Nadeu, F. et al. (2018): Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. In: *Leukemia* 32 (3), S. 675–684. DOI: 10.1038/leu.2017.251.

Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8424-9. doi: 10.1073/pnas.1431692100. Epub 2003 Jun 25. PMID: 12826609; PMCID: PMC166245.

Kazi, Julhash U.; Kabir, Nuzhat N.; Flores-Morales, Amilcar; Rönstrand, Lars (2014): SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. In: *Cell. Mol. Life Sci*. 71 (17), S. 3297–3310. DOI: 10.1007/s00018-014-1619-y.

Kennedy, M.C., Lowe, S.W. Mutant p53: it's not all one and the same. *Cell Death Differ* 29, 983–987 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00989-y>

Kiladjian, Jean-Jacques (2012): The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. In: *Hematology* 2012, S. 561–566. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.561.

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. In: *The EMBO journal* 17 (6), S. 1700–1709. DOI: 10.1093/emboj/17.6.1700.

Komazaki, Toshiaki; Nagai, Hisaki; Emi, Mitsuru; Terada, Yoshie; Yabe, Aya; Jin, Enjing et al. (2004): Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human pancreatic cancers. In: *Japanese journal of clinical oncology* 34 (4), S. 191–194. DOI: 10.1093/jjco/hyh035.

Kramer, M. H.; Hermans, J.; Wijburg, E.; Philippon, K.; Geelen, E.; van Krieken, J. H. et al. (1998): Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. In: *Blood* 92 (9), S. 3152–3162.

Kube, D.; Holtick, U.; Vockerodt, M.; Ahmadi, T.; Haier, B.; Behrmann, I. et al. (2001): STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. In: *Blood* 98 (3), S. 762–770. DOI: 10.1182/blood.v98.3.762.

Kumar, Prateek; Henikoff, Steven; Ng, Pauline C. (2009): Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. In: *Nature protocols* 4 (7), S. 1073–1081. DOI: 10.1038/nprot.2009.86.

Küppers, R.; Dalla-Favera, R. (2001): Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. In: *Oncogene* 20 (40), S. 5580–5594. DOI: 10.1038/sj.onc.1204640.

Küppers, R.; Klein, U.; Hansmann, M. L.; Rajewsky, K. (1999): Cellular origin of human B-cell lymphomas. In: *The New England journal of medicine* 341 (20), S. 1520–1529. DOI: 10.1056/NEJM199911113412007.

Küppers, Ralf (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. In: *Nature reviews. Cancer* 5 (4), S. 251–262. DOI: 10.1038/nrc1589.

Küppers, Ralf; Engert, Andreas; Hansmann, Martin-Leo (2012): Hodgkin lymphoma. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (10), S. 3439–3447. DOI: 10.1172/JCI61245.

Kuruvilla, John; Ramchandren, Radhakrishnan; Santoro, Armando; Paszkiewicz-Kozik, Ewa; Gasiorowski, Robin; Johnson, Nathalie A. et al. (2021): Pembrolizumab versus brentuximab vedotin in relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (KEYNOTE-204): an interim analysis of a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. In: *The Lancet. Oncology* 22 (4), S. 512–524. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00005-X.

Larsen, Lykke; Röpke, Carsten (2002): Suppressors of cytokine signalling: SOCS. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 110 (12), S. 833–844. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2002.1101201.x.

Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.

Lee, Heehyoung; Deng, Jiehui; Kujawski, Maciej; Yang, Chunmei; Liu, Yong; Herrmann, Andreas et al. (2010): STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors. In: *Nat Med* 16 (12), S. 1421–1428. DOI: 10.1038/nm.2250.

Lemmon, Mark A.; Schlessinger, Joseph (2010): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. In: *Cell* 141 (7), S. 1117–1134. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011.

Lennerz, Jochen K.; Hoffmann, Karl; Bubolz, Anna-Maria; Lessel, Davor; Welke, Claudia; Rüther, Nele et al. (2015): Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. In: *Oncotarget* 6 (30), S. 29097–29110. DOI: 10.18632/oncotarget.4829.

Levine, Ross L.; Wadleigh, Martha; Cools, Jan; Ebert, Benjamin L.; Wernig, Gerlinde; Huntly, Brian J. P. et al. (2005): Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in

polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. In: *Cancer cell* 7 (4), S. 387–397. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.023.

Li, Shaoying; Young, Ken H.; Medeiros, L. Jeffrey (2018): Diffuse large B-cell lymphoma. In: *Pathology* 50 (1), S. 74–87. DOI: 10.1016/j.pathol.2017.09.006.

Li, Zhuo; Metze, Dieter; Nashan, Dorothea; Müller-Tidow, Carsten; Serve, Hubert L.; Poremba, Christopher et al. (2004): Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. In: *The Journal of investigative dermatology* 123 (4), S. 737–745. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23408.x.

Lim, Kian-Huat; Yang, Yibin; Staudt, Louis M. (2012): Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF- κ B in lymphoid malignancies. In: *Immunological reviews* 246 (1), S. 359–378. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2012.01105.x.

Linossi, Edmond M.; Nicholson, Sandra E. (2012): The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. In: *IUBMB life* 64 (4), S. 316–323. DOI: 10.1002/iub.1011.

Loew, Rainer; Heinz, Niels; Hampf, Mathias; Bujard, Hermann; Gossen, Manfred (2010): Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. In: *BMC Biotechnology* 10 (1), S. 81. DOI: 10.1186/1472-6750-10-81.

Love, Cassandra; Sun, Zhen; Jima, Dereje; Li, Guojie; Zhang, Jenny; Miles, Rodney et al. (2012): The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. In: *Nature genetics* 44 (12), S. 1321–1325. DOI: 10.1038/ng.2468.

MacLennan, I. C. (1994): Germinal centers. In: *Annual review of immunology* 12, S. 117–139. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.001001.

Mader A, Bruderlein S, Wegener S, Melzner I, Popov S, Muller-Hermelink HK, Barth TF, Viardot A, Moller P. U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res.* 2007;119(3-4):204-10. doi: 10.1159/000112062. Epub 2008 Feb 1. PMID: 18253030.

Magrath, I.; Adde, M.; Shad, A.; Venzon, D.; Seibel, N.; Gootenberg, J. et al. (1996): Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 14 (3), S. 925–934. DOI: 10.1200/JCO.1996.14.3.925.

Magrath, Ian (2012): Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. In: *British journal of haematology* 156 (6), S. 744–756. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.09013.x.

Mancao, Christoph; Hammerschmidt, Wolfgang (2007): Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. In: *Blood* 110 (10), S. 3715–3721. DOI: 10.1182/blood-2007-05-090142.

Marafioti, T.; Hummel, M.; Foss, H. D.; Laumen, H.; Korbjuhn, P.; Anagnostopoulos, I. et al. (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. In: *Blood* 95 (4), S. 1443–1450.

Martelli, Maurizio; Ferreri, Andrés; Di Rocco, Alice; Ansuinelli, Michela; Johnson, Peter W. M. (2017): Primary mediastinal large B-cell lymphoma. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 113, S. 318–327. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.009.

J.I. Martin-Subero, S. Gesk, L. Harder, T. Sonoki, P.W. Tucker, B.

Schlegelberger, W. Grote, F.J. Novo, M.J. Calasanz, M.L. Hansmann, M.J. Dyer,

R. Siebert, Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma, *Blood* 99 (2002) 1474–1477.

Melzner, Ingo; Bucur, Alexandra Juliana; Brüderlein, Silke; Dorsch, Karola; Hasel, Cornelia; Barth, Thomas F. E. et al. (2005): Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. In: *Blood* 105 (6), S. 2535–2542. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3701.

Melzner, Ingo; Weniger, Marc A.; Bucur, Alexandra J.; Brüderlein, Silke; Dorsch, Karola; Hasel, Cornelia et al. (2006): Biallelic deletion within 16p13.13 including SOCS-1 in Karpas1106P mediastinal B-cell lymphoma line is associated with delayed degradation of JAK2 protein. In: *International journal of cancer* 118 (8), S. 1941–1944. DOI: 10.1002/ijc.21485.

Meyer, Natalie; Kim, Sam S.; Penn, Linda Z. (2006): The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. In: *Seminars in cancer biology* 16 (4), S. 275–287. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.07.011.

Midgley CA, Lane DP. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene*. 1997;15:1179–89.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. 1992;69:1237–45.

Morin, Ryan D.; Mungall, Karen; Pleasance, Erin; Mungall, Andrew J.; Goya, Rodrigo; Huff, Ryan D. et al. (2013): Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. In: *Blood* 122 (7), S. 1256–1265. DOI: 10.1182/blood-2013-02-483727.

Moskowitz, Craig H.; Walewski, Jan; Nademanee, Auayporn; Masszi, Tamas; Agura, Edward; Holowiecki, Jerzy et al. (2018): Five-year PFS from the AETHERA trial of brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma at high risk of progression or relapse. In: *Blood* 132 (25), S. 2639–2642. DOI: 10.1182/blood-2018-07-861641.

Mottok, Anja; Renné, Christoph; Seifert, Marc; Oppermann, Elsie; Bechstein, Wolf; Hansmann, Martin-Leo et al. (2009): Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. In: *Blood* 114 (20), S. 4503–4506. DOI: 10.1182/blood-2009-06-225839.

Murphy, Kenneth; Weaver, Casey (2018): Not Available. In: *Janeway Immunologie*, S. 377–440. DOI: 10.1007/978-3-662-56004-4_8.

A Neri, F Barriga, G Inghirami, DM Knowles, J Neequaye, IT Magrath, R Dalla-Favera Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma. *Blood*, 77 (1991), p. 1092Ng, P. C.; Henikoff, S. (2001): Predicting deleterious amino acid substitutions. In: *Genome research* 11 (5), S. 863–874. DOI: 10.1101/gr.176601.

Ng, Pauline C.; Henikoff, Steven (2002): Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. In: *Genome research* 12 (3), S. 436–446. DOI: 10.1101/gr.212802.

Ng, Pauline C.; Henikoff, Steven (2003): SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. In: *Nucleic acids research* 31 (13), S. 3812–3814. DOI: 10.1093/nar/gkg509.

Nishimasu, Hiroshi; Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Konermann, Silvana; Shehata, Soraya I.; Dohmae, Naoshi et al. (2014): Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. In: *Cell* 156 (5), S. 935–949. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.001.

Offit, K.; Lo Coco, F.; Louie, D. C.; Parsa, N. Z.; Leung, D.; Portlock, C. et al. (1994): Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 331 (2), S. 74–80. DOI: 10.1056/NEJM199407143310202.

Otto, Claudia; Giefing, Maciej; Massow, Anne; Vater, Inga; Gesk, Stefan; Schlesner, Matthias et al. (2012): Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. In: *British journal of haematology* 157 (6), S. 702–708. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09113.x.

Pahl, Heike L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. In: *Oncogene* 18 (49), S. 6853–6866. DOI: 10.1038/sj.onc.1203239.

Pasqualucci, L.; Neumeister, P.; Goossens, T.; Nanjangud, G.; Chaganti, R. S.; Küppers, R.; Dalla-Favera, R. (2001): Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. In: *Nature* 412 (6844), S. 341–346. DOI: 10.1038/35085588.

Pasqualucci, Laura (2019): Molecular pathogenesis of germinal center-derived B cell lymphomas. In: *Immunological reviews* 288 (1), S. 240–261. DOI: 10.1111/imr.12745.

Pasqualucci, Laura; Bhagat, Govind; Jankovic, Mila; Compagno, Mara; Smith, Paula; Muramatsu, Masamichi et al. (2008): AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. In: *Nature genetics* 40 (1), S. 108–112. DOI: 10.1038/ng.2007.35.

Pasqualucci, Laura; Guglielmino, Roberta; Malek, Sami N.; Novak, Urban; Compagno, Mara; Nanjangud, Gouri; Dalla-Favera, Riccardo (2004): Aberrant Somatic Hypermutation Targets an Extensive Set of Genes in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. In: *Blood* 104 (11), S. 1528. DOI: 10.1182/blood.V104.11.1528.1528.

Pasqualucci, Laura; Trifonov, Vladimir; Fabbri, Giulia; Ma, Jing; Rossi, Davide; Chiarenza, Annalisa et al. (2011): Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. In: *Nature genetics* 43 (9), S. 830–837. DOI: 10.1038/ng.892.

Peled, Jonathan U.; Yu, J. Jessica; Venkatesh, Jeganathan; Bi, Enguang; Ding, B. Belinda; Krupski-Downs, Melissa et al. (2010): Requirement for cyclin D3 in germinal

center formation and function. In: *Cell research* 20 (6), S. 631–646. DOI: 10.1038/cr.2010.55.

Pencik, Jan; Pham, Ha Thi Thanh; Schmoellerl, Johannes; Javaheri, Tahereh; Schlederer, Michaela; Culig, Zoran et al. (2016): JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome. In: *Cytokine* 87, S. 26–36. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.06.017.

Pshennikova, Vera G.; Barashkov, Nikolay A.; Romanov, Georgii P.; Teryutin, Fedor M.; Solov'ev, Aisen V.; Gotovtsev, Nyurgun N. et al. (2019): Comparison of Predictive In Silico Tools on Missense Variants in GJB2, GJB6, and GJB3 Genes Associated with Autosomal Recessive Deafness 1A (DFNB1A). In: *TheScientificWorldJournal* 2019, S. 5198931. DOI: 10.1155/2019/5198931.

R Küppers; K Rajewsky; M Zhao; G Simons; R Laumann; R Fischer; M L Hansmann (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. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (23), S. 10962–10966. DOI: 10.1073/pnas.91.23.10962.

R. Bargou; F. Emmerich; D. Krappmann; K. Bommert; M. Mapara; W. Arnold et al. (1997): Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. In: *undefined*. Online verfügbar unter <https://www.semanticscholar.org/paper/Constitutive-nuclear-factor-kappaB-RelA-activation-Bargou-Emmerich/a499574dc61e27909a68061650ec2cf286641006>.

Rademakers, L. H. (1992): Dark and light zones of germinal centres of the human tonsil: an ultrastructural study with emphasis on heterogeneity of follicular dendritic cells. In: *Cell and tissue research* 269 (2), S. 359–368. DOI: 10.1007/BF00319629.

Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. In: *Nature* 381 (6585), S. 751–758. DOI: 10.1038/381751a0.

Ralf C. Bargou; Corinna Leng; Daniel Krappmann; Florian Emmerich; Markus Y. Mapara; Kurt Bommert et al. (1996): High-Level Nuclear NF-κB and Oct-2 Is a Common Feature of Cultured Hodgkin/Reed-Sternberg Cells. In: *Blood* 87 (10), S. 4340–4347. DOI: 10.1182/blood.V87.10.4340.bloodjournal87104340.

Ramiro, Almudena R.; Jankovic, Mila; Eisenreich, Thomas; Difilippantonio, Simone; Chen-Kiang, Selina; Muramatsu, Masamichi et al. (2004): AID is required for c-myc/IgH

chromosome translocations in vivo. In: *Cell* 118 (4), S. 431–438. DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.006.

Ranuncolo, Stella M.; Pittaluga, Stefania; Evbuomwan, Moses O.; Jaffe, Elaine S.; Lewis, Brian A. (2012): Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival. In: *Blood* 120 (18), S. 3756–3763. DOI: 10.1182/blood-2012-01-405951.

Ranuncolo, Stella M.; Polo, Jose M.; Melnick, Ari (2008): BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. In: *Blood cells, molecules & diseases* 41 (1), S. 95–99. DOI: 10.1016/j.bcmed.2008.02.003.

Ranuncolo, Stella Maris; Polo, Jose M.; Dierov, Jamil; Singer, Michael; Kuo, Tracy; Grealley, John et al. (2007): Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. In: *Nature immunology* 8 (7), S. 705–714. DOI: 10.1038/ni1478.

Reichel, Jonathan; Chadburn, Amy; Rubinstein, Paul G.; Giulino-Roth, Lisa; Tam, Wayne; Liu, Yifang et al. (2015): Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. In: *Blood* 125 (7), S. 1061–1072. DOI: 10.1182/blood-2014-11-610436.

Renné, Christoph; Willenbrock, Klaus; Küppers, Ralf; Hansmann, Martin-Leo; Bräuninger, Andreas (2005): Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 105 (10), S. 4051–4059. DOI: 10.1182/blood-2004-10-4008.

Richter, Julia; Schlesner, Matthias; Hoffmann, Steve; Kreuz, Markus; Leich, Ellen; Burkhardt, Birgit et al. (2012): Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. In: *Nature genetics* 44 (12), S. 1316–1320. DOI: 10.1038/ng.2469.

Roebuck, K. A.; Finnegan, A. (1999): Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. In: *Journal of Leukocyte Biology* 66 (6), S. 876–888. DOI: 10.1002/jlb.66.6.876.

Roney, Ian J.; Rudner, Adam D.; Couture, Jean-François; Kærn, Mads (2016): Improvement of the reverse tetracycline transactivator by single amino acid substitutions

that reduce leaky target gene expression to undetectable levels. In: *Scientific reports* 6, S. 27697. DOI: 10.1038/srep27697.

Rosenwald, Andreas; Wright, George; Chan, Wing C.; Connors, Joseph M.; Campo, Elias; Fisher, Richard I. et al. (2002): The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 346 (25), S. 1937–1947. DOI: 10.1056/NEJMoa012914.

Rosenwald, Andreas; Wright, George; Leroy, Karen; Yu, Xin; Gaulard, Philippe; Gascoyne, Randy D. et al. (2003a): Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (6), S. 851–862. DOI: 10.1084/jem.20031074.

Rosenwald, Andreas; Wright, George; Leroy, Karen; Yu, Xin; Gaulard, Philippe; Gascoyne, Randy D. et al. (2003b): Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. In: *The Journal of experimental medicine* 198 (6), S. 851–862. DOI: 10.1084/jem.20031074.

Sadeghi Rad, Habib; Monkman, James; Warkiani, Majid E.; Ladwa, Rahul; O'Byrne, Ken; Rezaei, Nima; Kulasinghe, Arutha (2021): Understanding the tumor microenvironment for effective immunotherapy. In: *Medicinal research reviews* 41 (3), S. 1474–1498. DOI: 10.1002/med.21765.

Sariban, E.; Edwards, B.; Janus, C.; Magrath, I. (1983): Central nervous system involvement in American Burkitt's lymphoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1 (11), S. 677–681. DOI: 10.1200/JCO.1983.1.11.677.

Savage, Kerry J.; Monti, Stefano; Kutok, Jeffery L.; Cattoretti, Giorgio; Neuberg, Donna; Leval, Laurence de et al. (2003): The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 102 (12), S. 3871–3879. DOI: 10.1182/blood-2003-06-1841.

Schif, Birgit; Lennerz, Jochen K.; Kohler, Christian W.; Bentink, Stefan; Kreuz, Markus; Melzner, Ingo et al. (2013): SOCS1 mutation subtypes predict divergent outcomes in

diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL) patients. In: *Oncotarget* 4 (1), S. 35–47. DOI: 10.18632/oncotarget.774.

Schmidt, Annette; Schmitz, Roland; Giefing, Maciej; Martin-Subero, Jose Ignacio; Gesk, Stefan; Vater, Inga et al. (2010): Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. In: *Genes, Chromosomes and Cancer* 49 (9), S. 803–809. DOI: 10.1002/gcc.20789.

Schmitz, Roland; Hansmann, Martin-Leo; Bohle, Verena; Martin-Subero, Jose Ignacio; Hartmann, Sylvia; Mechttersheimer, Gunhild et al. (2009): TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (5), S. 981–989. DOI: 10.1084/jem.20090528.

Schmitz, Roland; Wright, George W.; Da Huang, Wei; Johnson, Calvin A.; Phelan, James D.; Wang, James Q. et al. (2018): Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 378 (15), S. 1396–1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1801445.

Schmitz, Roland; Young, Ryan M.; Ceribelli, Michele; Jhavar, Sameer; Xiao, Wenming; Zhang, Meili et al. (2012): Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. In: *Nature* 490 (7418), S. 116–120. DOI: 10.1038/nature11378.

Schwering, Ines; Bräuninger, Andreas; Klein, Ulf; Jungnickel, Berit; Tinguely, Marianne; Diehl, Volker et al. (2003): Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 101 (4), S. 1505–1512. DOI: 10.1182/blood-2002-03-0839.

Segal, G. H.; Edinger, M. G.; Owen, M.; McNealis, M.; Lopez, P.; Perkins, A. et al. (1991): Concomitant delineation of surface Ig, B-cell differentiation antigens, and HLADR on lymphoid proliferations using three-color immunocytometry. In: *Cytometry* 12 (4), S. 350–359. DOI: 10.1002/cyto.990120410.

Shankland, Kate R.; Armitage, James O.; Hancock, Barry W. (2012): Non-Hodgkin lymphoma. In: *Lancet (London, England)* 380 (9844), S. 848–857. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60605-9.

Shen, Rong; Di Fu; Dong, Lei; Zhang, Mu-Chen; Shi, Qing; Shi, Zi-Yang et al. (2023): Simplified algorithm for genetic subtyping in diffuse large B-cell lymphoma. In: *Signal transduction and targeted therapy* 8 (1), S. 145. DOI: 10.1038/s41392-023-01358-y.

Shiels, Meredith S.; Engels, Eric A.; Linet, Martha S.; Clarke, Christina A.; Li, Jianmin; Hall, H. Irene et al. (2013): The epidemic of non-Hodgkin lymphoma in the United States: disentangling the effect of HIV, 1992-2009. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 22 (6), S. 1069–10

Shiravand, Yavar; Khodadadi, Faezeh; Kashani, Seyyed Mohammad Amin; Hosseini-Fard, Seyyed Reza; Hosseini, Shadi; Sadeghirad, Habib et al. (2022): Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. In: *Current oncology (Toronto, Ont.)* 29 (5), S. 3044–3060. DOI: 10.3390/curroncol29050247.78. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0040.

Sibon, David; Morschhauser, Franck; Resche-Rigon, Matthieu; Ghez, David; Dupuis, Jehan; Marçais, Ambroise et al. (2016): Single or tandem autologous stem-cell transplantation for first-relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: 10-year follow-up of the prospective H96 trial by the LYSA/SFGM-TC study group. In: *Haematologica* 101 (4), S. 474–481. DOI: 10.3324/haematol.2015.136408.

Skinnider, Brian F.; Elia, Andrew J.; Gascoyne, Randy D.; Patterson, Bruce; Trumper, Lorenz; Kapp, Ursula; Mak, Tak W. (2002): Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 99 (2), S. 618–626. DOI: 10.1182/blood.v99.2.618.

Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H.; Schreiber, R. D. (1998): How cells respond to interferons. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 227–264. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.

Stein, H.; Bonk, A.; Tolksdorf, G.; Lennert, K.; Rodt, H.; Gerdes, J. (1980): Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 28 (8), S. 746–760. DOI: 10.1177/28.8.7003001.

Straus, David J.; Długosz-Danecka, Monika; Connors, Joseph M.; Alekseev, Sergey; Illés, Árpád; Picardi, Marco et al. (2021): Brentuximab vedotin with chemotherapy for stage III or IV classical Hodgkin lymphoma (ECHELON-1): 5-year update of an

international, open-label, randomised, phase 3 trial. In: *The Lancet. Haematology* 8 (6), e410-e421. DOI: 10.1016/S2352-3026(21)00102-2.

Strebovsky, Julia; Walker, Patrick; Lang, Roland; Dalpke, Alexander H. (2011): Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (3), S. 863–874. DOI: 10.1096/fj.10-170597.

Swerdlow, Steven H. (Hg.) (2017): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer (World Health Organization classification of tumours).

Taub, R.; Kirsch, I.; Morton, C.; Lenoir, G.; Swan, D.; Tronick, S. et al. (1982): Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (24), S. 7837–7841. DOI: 10.1073/pnas.79.24.7837.

Thomas, S. J.; Snowden, J. A.; Zeidler, M. P.; Danson, S. J. (2015): The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. In: *British journal of cancer* 113 (3), S. 365–371. DOI: 10.1038/bjc.2015.233.

Tiacci, Enrico; Döring, Claudia; Brune, Verena; van Noesel, Carel J M; Klapper, Wolfram; Mechttersheimer, Gunhild et al. (2012): Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 120 (23), S. 4609–4620. DOI: 10.1182/blood-2012-05-428896.

Tiacci, Enrico; Ladewig, Erik; Schiavoni, Gianluca; Penson, Alex; Fortini, Elisabetta; Pettirossi, Valentina et al. (2018): Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 131 (22), S. 2454–2465. DOI: 10.1182/blood-2017-11-814913.

Tsujimoto, Y.; Gorham, J.; Cossman, J.; Jaffe, E.; Croce, C. M. (1985): The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. In: *Science (New York, N.Y.)* 229 (4720), S. 1390–1393. DOI: 10.1126/science.3929382.

Tsujimoto, Y.; Louie, E.; Bashir, M. M.; Croce, C. M. (1988): The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. In: *Oncogene* 2 (4), S. 347–351.

Vallabhapurapu, Sivakumar; Karin, Michael (2009): Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. In: *Annual review of immunology* 27 (1), S. 693–733. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.

van de Donk, Niels W C J; Dhimolea, Eugen (2012): Brentuximab vedotin. In: *mAbs* 4 (4), S. 458–465. DOI: 10.4161/mabs.20230.

van de Stolpe, A.; van der Saag, P T (1996): Intercellular adhesion molecule-1. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 74 (1), S. 13–33. DOI: 10.1007/BF00202069.

van Roosbroeck, Katrien; Cox, Luk; Tousseyn, Thomas; Lahortiga, Idoia; Gielen, Olga; Cauwelier, Barbara et al. (2011): JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood* 117 (15), S. 4056–4064. DOI: 10.1182/blood-2010-06-291310.

Victoria, Gabriel D.; Dominguez-Sola, David; Holmes, Antony B.; Deroubaix, Stephanie; Dalla-Favera, Riccardo; Nussenzweig, Michel C. (2012): Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. In: *Blood* 120 (11), S. 2240–2248. DOI: 10.1182/blood-2012-03-415380.

Villafranca, Jose Javier Arenas; Siles, Marga Garrido; Casanova, María; Goitia, Begoña Tortajada; Domínguez, Antonio Rueda (2014): Paraneoplastic pruritus presenting with Hodgkin's lymphoma: a case report. In: *Journal of medical case reports* 8, S. 300. DOI: 10.1186/1752-1947-8-300.

Weniger, Marc A.; Küppers, Ralf (2016): NF- κ B deregulation in Hodgkin lymphoma. In: *Seminars in cancer biology* 39, S. 32–39. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.05.001.

Weniger, Marc A.; Küppers, Ralf (2021): Molecular biology of Hodgkin lymphoma. In: *Leukemia* 35 (4), S. 968–981. DOI: 10.1038/s41375-021-01204-6.

Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth TF, Möller P. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation.

Oncogene. 2006 Apr 27;25(18):2679-84. doi: 10.1038/sj.onc.1209151. PMID: 16532038.

Weniger, Marc A.; Tiacci, Enrico; Schneider, Stefanie; Arnolds, Judith; Rüschenbaum, Sabrina; Duppach, Janine et al. (2018): Human CD30+ B cells represent a unique subset related to Hodgkin lymphoma cells. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (7), S. 2996–3007. DOI: 10.1172/JCI95993.

Wiech M, Olszewski MB, Tracz-Gaszewska Z, Wawrzynow B, Zylicz M, Zylicz A. Molecular mechanism of mutant p53 stabilization: the role of HSP70 and MDM2. *PLoS One*. 2012;7:e51426.

Wienand, Kirsty; Chapuy, Bjoern; Stewart, Chip; Dunford, Andrew J.; Wu, David; Kim, Jaegil et al. (2019): Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. In: *Blood advances* 3 (23), S. 4065–4080. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019001012.

Willis, T. G.; Dyer, M. J. (2000): The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. In: *Blood* 96 (3), S. 808–822.

Wongso, Diana; Fuchs, Michael; Plütschow, Annette; Klimm, Beate; Sasse, Stephanie; Hertenstein, Bernd et al. (2013): Treatment-Related Mortality in Patients With Advanced-Stage Hodgkin Lymphoma: An Analysis of the German Hodgkin Study Group. In: *Journal of Clinical Oncology* 31 (22), S. 2819–2824. DOI: 10.1200/JCO.2012.47.9774.

Wu, Z. L.; Song, Y. Q.; Shi, Y. F.; Zhu, J. (2011): High nuclear expression of STAT3 is associated with unfavorable prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. In: *Journal of hematology & oncology* 4 (1), S. 31. DOI: 10.1186/1756-8722-4-31.

Xu, Yang; Wang, Wenling; Gou, Aihong; Li, Haitao; Tian, Yanli; Yao, Meihua; Yang, Rongya (2015): Effects of suppressor of cytokine signaling 1 silencing on human melanoma cell proliferation and interferon- γ sensitivity. In: *Molecular medicine reports* 11 (1), S. 583–588. DOI: 10.3892/mmr.2014.2674.

Yano, T.; van Krieken, J. H.; Magrath, I. T.; Longo, D. L.; Jaffe, E. S.; Raffeld, M. (1992): Histogenetic correlations between subcategories of small noncleaved cell lymphomas. In: *Blood* 79 (5), S. 1282–1290.

Yeganeh, M.; Gui, Y.; Kandhi, R.; Bobbala, D.; Tobelaim, W-S; Saucier, C. et al. (2016): Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic

functions of p21(CIP1/WAF1) in the liver. In: *Oncogene* 35 (32), S. 4200–4211. DOI: 10.1038/onc.2015.485.

Ying, Jie; Qiu, Xiaoyan; Lu, Yu; Zhang, Miaomiao (2019): SOCS1 and its Potential Clinical Role in Tumor. In: *Pathology oncology research : POR* 25 (4), S. 1295–1301. DOI: 10.1007/s12253-019-00612-5.

Yoshikawa, H.; Matsubara, K.; Qian, G. S.; Jackson, P.; Groopman, J. D.; Manning, J. E. et al. (2001): SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. In: *Nature genetics* 28 (1), S. 29–35. DOI: 10.1038/ng0501-29.

Yoshimura, Akihiko; Naka, Tetsuji; Kubo, Masato (2007): SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. In: *Nat Rev Immunol* 7 (6), S. 454–465. DOI: 10.1038/nri2093.

Yu, Hua; Lee, Heehyoung; Herrmann, Andreas; Buettner, Ralf; Jove, Richard (2014): Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (11), S. 736–746. DOI: 10.1038/nrc3818.

Yustein, Jason T.; Dang, Chi V. (2007): Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. In: *Current opinion in hematology* 14 (4), S. 375–381. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3281bccdee.

Zech, L.; Haglund, U.; Nilsson, K.; Klein, G. (1976): Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. In: *International journal of cancer* 17 (1), S. 47–56. DOI: 10.1002/ijc.2910170108.

Zeller, Karen I.; Zhao, XiaoDong; Lee, Charlie W. H.; Chiu, Kuo Ping; Yao, Fei; Yustein, Jason T. et al. (2006): Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells (103).

Zheng, Bei; Fiumara, Paolo; Li, Yang V.; Georgakis, Georgios; Snell, Virginia; Younes, Mamoun et al. (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. In: *Blood* 102 (3), S. 1019–1027. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3507.

Zhou, X.; Vink, M.; Klaver, B.; Berkhout, B.; Das, A. T. (2006): Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. In: *Gene therapy* 13 (19), S. 1382–1390. DOI: 10.1038/sj.gt.3302780.

Zintzaras, Elias; Voulgarelis, Michael; Moutsopoulos, Haralampos M. (2005): The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. In: *Archives of internal medicine* 165 (20), S. 2337–2344. DOI: 10.1001/archinte.165.20.2337.

Zinzani, Pier Luigi; Ramchandren, Radhakrishnan; Santoro, Armando; Paszkiewicz-Kozik, Ewa; Gasiorowski, Robin; Johnson, Nathalie A. et al. (2022): Quality-of-life analysis of pembrolizumab vs brentuximab vedotin for relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma. In: *Blood advances* 6 (2), S. 590–599. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021004970.

Teilpublikationen

ASH Meeting on Lymphoma Biology, geplante Posterpräsentation (2020)

Stecki J., Singh V., Niebert M., Schieferstein J., Keller C., Schmitz R.
Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von SOCS1-Mutationen bei der Entstehung des Hodgkin-Lymphoms

Die im Rahmen des ASH Meetings (2020) geplante Posterpräsentation zu dieser Arbeit ist pandemiebedingt entfallen.

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

7 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Roland Schmitz, für seine wunderbare Unterstützung und Betreuung bei dieser Dissertation bedanken.

Für die Zurverfügungstellung von Geräten und Materialien möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Körholz herzlich bedanken.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn PhD Vijay Singh für die Bereitstellung des *FACSLyric™ Flow Cytometry Systems* und für die Unterstützung bei der durchflusszytometrischen Analyse.

Ich möchte mich bei PD Dr. M. Niebert für die Zusammenarbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Ahmad F. Hussain für die Bereitstellung des *NanoDropOne (Thermoscientific)* und für die hilfreichen Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Jutta Schieferstein für ihre große Geduld, ihre Unterstützung bei der Arbeit im Labor und vor allem für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des pathologischen Instituts des UKGM in Gießen für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Acker und Frau Dr. Pütz-Rathke bedanken für Möglichkeit der Teilnahme am JLU-Trainee Programm. Eine Kongress-Präsentation war zu dem Zeitpunkt der Labortätigkeit geplant, konnte aber, bedingt durch Pandemie-Schutzmaßnahmen, nicht stattfinden.

Außerdem danke ich meinen Eltern Mirela und Thomas Stecki, die mir das Studium und diese Dissertation erst ermöglichten.

Meinem Freund Florian danke ich für die wundervolle Unterstützung und Geduld während der Schreibphase.