

Aus dem Charité-Centrum für Tumormedizin  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie  
Campus Virchow-Klinikum  
Direktor: Professor Dr. med. Bernd Dörken

## **Habilitationsschrift**

### **Molekulare Mechanismen gestörter Differenzierung und maligner Transformation in der Pathogenese humaner Lymphome**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Martin Janz  
geboren am 13. Januar 1967 in Langenhagen

Eingereicht: April 2013

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hubert Serve/Frankfurt am Main

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald/Würzburg

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 E-Proteine als zentrale Regulatoren der lymphatischen Differenzierung .....	4
1.2 Die Bedeutung gestörter Differenzierung und zellulärer Reprogrammierung für die Transformation lymphatischer Zellen .....	8
Untersuchungen im Mausmodell .....	8
Beobachtungen im humanen System .....	11
1.3 Die Keimzentrumsreaktion als Schlüsselereignis in der Lymphompathogenese .....	13
1.4 Das Hodgkin-Lymphom .....	15
Einteilung und Histopathologie .....	15
Der zelluläre Ursprung der Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen .....	16
Das Epstein-Barr-Virus in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms ...	17
Molekulare Grundlagen des malignen Wachstums der HRS-Zellen .....	18
Der Verlust des B-Zell-Phänotyps beim klassischen Hodgkin-Lymphom .....	20
1.5 Das Multiple Myelom .....	22
Genetische Veränderungen in der Pathogenese des Multiplen Myeloms .....	22
Das Knochenmark-Microenvironment als zentraler Faktor für das maligne Wachstum von Myelomzellen .....	24
<b>2. Originalarbeiten zum Habilitationsthema</b> .....	<b>27</b>
2.1 Inhibition der E2A-Aktivität als molekularer Mechanismus der gestörten Differenzierung lymphatischer Zellen .....	27
2.2 ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms .....	52
2.3 Analyse p53-abhängiger und p53-unabhängiger Apoptosewege im Hodgkin-Lymphom .....	58
2.4 Wachstums- und Überlebenssignale beim Multiplen Myelom .....	69
<b>3. Diskussion</b> .....	<b>80</b>
3.1 Veränderungen der Aktivität des Transkriptionsfaktors E2A als Mechanismus der malignen Transformation lymphatischer Zellen .....	80
3.2 Zelluläre Plastizität und Reprogrammierung in der Pathogenese lymphatischer Neoplasien .....	83
3.3 Der Verlust des B-Zell-Phänotyps und des B-Zell-Rezeptors in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms .....	85
3.4 ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren in der Tumorbologie des klassischen Hodgkin- Lymphoms und des anaplastischen großzelligen Lymphoms .....	87

3.5 Neue therapeutische Ansätze für die Behandlung lymphatischer Malignome .....	89
3.6 Ausblick: Mausmodelle für die Analyse onkogener Defekte <i>in vivo</i> .....	92
<b>4. Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>119</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>120</b>
<b>8. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>121</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 E-Proteine als zentrale Regulatoren der lymphatischen Differenzierung

Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in definierte Zellreihen wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die Linien-spezifische Genexpressionsprogramme etablieren und/oder alternative Entwicklungswege unterdrücken. Eine Schlüsselrolle für die Differenzierung in B- und T-Lymphozyten spielt die Familie der E-Proteine, die von den Transkriptionsfaktoren E12, E47, HEB und E2-2 gebildet wird (Murre, 2005). Sie gehören strukturell zur Gruppe der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Proteine. Die HLH-Domäne ist verantwortlich für die Bildung von Homo- oder Heterodimeren, während die basische Region die spezifische Bindung an eine DNA-Konsensussequenz vermittelt, die als E-Box bezeichnet wird (CANNTG) (Murre et al., 1989). E-Proteine weisen zwei hoch konservierte Regionen auf, AD1 und AD2, über die Koaktivator- oder Korepressor-Komplexe rekrutiert werden können, wodurch sie je nach Dimerisierungspartner und Zell- oder Promotorkontext als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription wirken (Quong et al., 1993). Als zusätzliche Besonderheit werden E12 und E47 vom selben Gen, *E2A*, kodiert und entstehen durch alternatives Splicing eines Exons im Bereich der bHLH-Domäne, woraus unterschiedliche DNA-Bindungsaktivitäten resultieren (Murre et al., 1989).

Bemerkenswert ist, dass E-Proteine von der hämatopoetischen Stammzelle bis zu den späten Reifungsstadien lymphatischer Zellen wichtige Kontrollpunkte der Differenzierung beeinflussen (Abb. 1). In der frühen Phase der Hämatopoese ist E2A an der Aufrechterhaltung des Pools von Stammzellen und frühen Vorläuferzellen beteiligt (Semerad et al., 2009). E2A fördert dabei die Entwicklung in Richtung lymphatisch geprägter multipotenter Progenitoren (LMPPs), indem es bereits auf dieser Stufe an der Etablierung einer Gensignatur mitwirkt, die für Lymphozyten charakteristisch ist, einschließlich der Gene für *Rag1*, *Il7r*, *Dnnt*, *Igh6* und *Notch1* (*lymphoid priming*) (Dias et al., 2008). Anschließend treten die lymphatischen Vorläuferzellen in die B- oder T-Zell-Entwicklung ein, wobei Umgebungssignale, wie z. B. die Stimulation über Notch-Liganden im Thymus, die weitere Entwicklung in eine der beiden Reihen maßgeblich beeinflussen (Rothenberg et al., 2008). Im weiteren Verlauf besteht die DNA-Bindungsaktivität der E-Proteine in B-Zellen vorwiegend aus E47-Homodimeren, während im T-Zell-System Heterodimere aus E47 und HEB vorherrschen (Sawada und Littman, 1993; Shen und Kadesch, 1995).

In der frühen B-Zell-Entwicklung ist E2A an einem regulatorischen Netzwerk beteiligt, das im Wesentlichen aus den Transkriptionsfaktoren E2A, EBF1 und Pax5 besteht und den Eintritt in die B-Zell-Linie und die Aufrechterhaltung des B-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms kontrolliert (*lineage specification and commitment*) (Busslinger,

2004). Der Verlust von E2A im Mausmodell führt zu einem Block in der B-Zell-Differenzierung noch vor Einsetzen der V(D)J-Rekombination der Immunglobulin (Ig)-Gene (Bain et al., 1994). E2A ist notwendig für die Aktivierung der Transkription und Rekombination der Ig-Loci, vermittelt durch die Bindung an Enhancer-Elemente der Ig-Gene sowie die Induktion der Rekombinaseenzyme Rag1 und Rag2 (Hsu et al., 2003; Kee, 2009). Zusätzlich induziert E2A die Expression der Transkriptionsfaktoren EBF1 und FOXO1, was im Zusammenspiel mit IRF4, IRF8 und PU.1 wiederum zur Aktivierung von Pax5 führt (Decker et al., 2009; Lin et al., 2010). In unterschiedlichen Kombinationen sind diese Faktoren letztendlich für die Etablierung des B-Zell-spezifischen Expressionsprogramms verantwortlich, beispielsweise für die Transkription der Komponenten des prä-B-Zell-Rezeptors (*B cell receptor*, BCR; Ig- $\alpha$ , Ig- $\beta$ ,  $\lambda$ 5 und Vpre-B) oder des Korezeptors CD19 (Kee, 2009). Verglichen mit der frühen B-Zell-Entwicklung ist die Rolle von E-Proteinen in den späten Stadien der B-Zell-Reifung weniger gut charakterisiert. Im Hinblick auf die Keimzentrumsreaktion ist bekannt, dass die E2A-DNA-Bindungsaktivität bei Aktivierung von reifen B-Zellen stark ansteigt und E47 vor allem in Zentroblasten hoch exprimiert wird (Quong et al., 1999; Rutherford und LeBrun, 1998). Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang vor allem die Bedeutung von E2A für die Induktion des Enzyms *activation-induced cytidine deaminase* (AID, kodiert durch das Gen *AICDA*), das für die somatische Hypermutation und den Ig-Klassenwechsel unabdingbar ist (Gonda et al., 2003; Sayegh et al., 2003). Der gezielte *knockout* von E2A in reifen B-Zellen der Maus führt zu einer beeinträchtigten Bildung von Keimzentrums-B-Zellen nach Immunisierung, was sich in einer verminderten Zahl und Größe entstehender Keimzentren niederschlägt (Kwon et al., 2008).

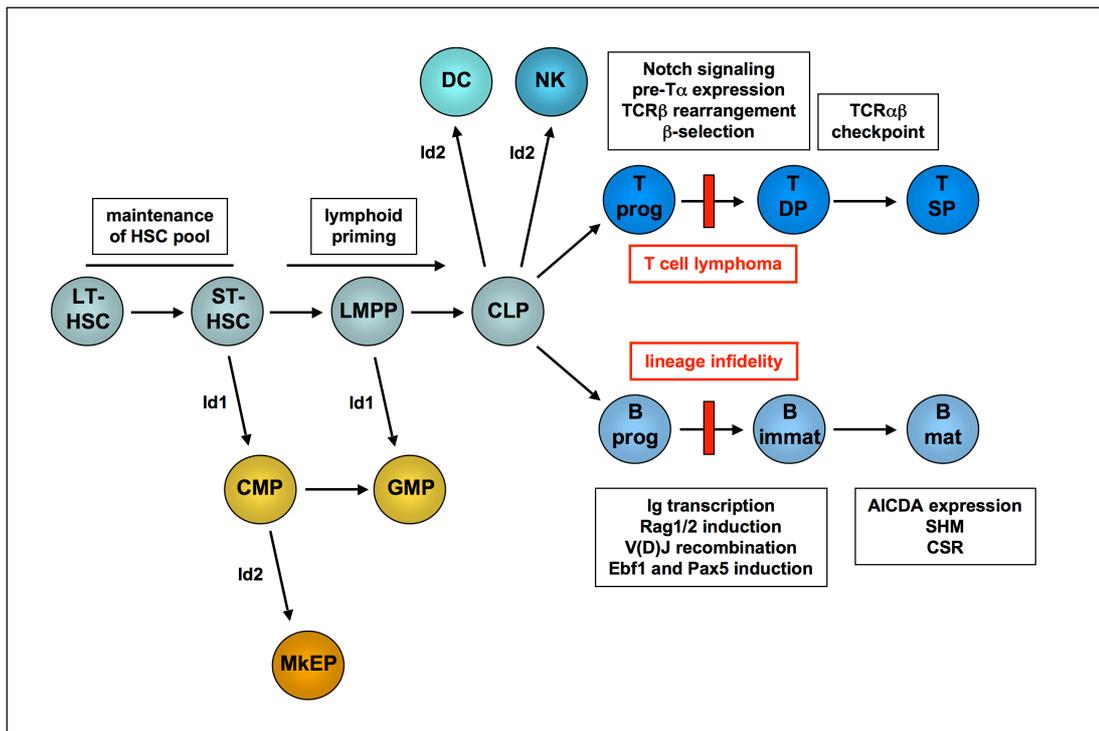
Ähnlich wie bei B-Lymphozyten führt der *knockout* von E2A in T-Zellen zu einem frühen, allerdings unvollständigen Stopp in der T-Zell-Differenzierung beim Übergang vom doppelt-negativen Stadium 1 zum Stadium 2 (*double-negative 1/2*, DN1/2) (Bain et al., 1997). E-Proteine regulieren verschiedene kritische Prozesse in T-Zellen: Sie aktivieren die Expression T-Zell-assoziiierter Gene, fördern die Rekombination des T-Zell-Rezeptors  $\beta$  (TCR $\beta$ ) und kontrollieren den Übergang zu späteren Stadien der T-Zell-Entwicklung (Murre, 2005). Bei der Induktion von T-Zell-Genen besteht eine Kooperation mit dem Notch-Signalweg, der für die T-Zell-Entwicklung essentiell ist. E-Proteine verstärken die zelluläre Antwort auf Notch-vermittelte Stimuli, indem sie mehrere Komponenten des Notch-Signalwegs transkriptionell aktivieren, u. a. Notch1 und 3, und zusätzlich synergistisch an der Induktion von Notch-Zielgenen mitwirken (z. B. *Hes1*, *CD7* und *pre-TCR $\alpha$* ) (Ikawa et al., 2006). Das TCR $\beta$ -Rearrangement wird dadurch vorangetrieben, dass E-Proteine an der Induktion von Rag1 und Rag2 beteiligt sind und die Zugänglichkeit des TCR $\beta$ -Locus durch Rekrutierung von Koaktivatoren erhöhen (Agata et al., 2007). Gleichzeitig verlangsamen E-

Proteine die Zellzyklusprogression und blockieren die Differenzierung solange, bis ein produktives Rearrangement des TCR $\beta$  stattgefunden hat. Erst nach erfolgreicher Rekombination wird die E-Protein-Aktivität durch prä-TCR-abhängige Signale reduziert und die zelluläre Expansion freigegeben (Engel et al., 2001). Eine ähnliche Situation besteht beim Übergang vom doppelt-positiven (CD4+ CD8+) zum einfach-positiven Stadium (CD4+ versus CD8+). E2A und HEB sind notwendig, um in dieser Phase die Reifung bis zu einem kompletten Rearrangement der TCR $\alpha$ -Kette zu verzögern (Jones und Zhuang, 2007). Vergleichbar mit dem prä-TCR wird die E-Protein-Aktivität anschließend durch TCR $\alpha\beta$ -vermittelte Signale, die über die Stimulation von MAP-Kinasen und die Induktion von Id3 verlaufen, weiter abgesenkt (Bain et al., 2001).

Die Aktivität der E-Proteine wird auf mehreren Ebenen reguliert. Ein zentraler Mechanismus ist die Kontrolle ihrer DNA-Bindungsaktivität durch die Interaktion mit anderen HLH-Proteinen. Besonders bedeutende Interaktionspartner sind die Faktoren der Id-Familie (*inhibitor of DNA binding 1 – 4*). Id-Proteine besitzen eine HLH-Domäne, aber keine basische Region für die Bindung an DNA, so dass sie nach Bildung von Heterodimeren mit E-Proteinen deren DNA-Bindungsaktivität blockieren (Murre, 2005). Die Wechselwirkungen zwischen E-Proteinen und Id-Faktoren haben starke Auswirkungen auf Linienentscheidungen in der Hämatopoese. Dies beginnt bereits auf der Ebene früher multipotenter Vorläuferzellen, in denen eine höhere Expression von Id1 oder Id2 – und daraus resultierend eine verminderte E2A-Aktivität – die Differenzierung von einer lymphatischen Orientierung in Richtung myeloischer bzw. erythroider Zellen verschiebt (Cochrane et al., 2009; Ji et al., 2008). Besonders ausgeprägt ist der Effekt von Id2 in Bezug auf die Linienentscheidung zwischen lymphatischer Differenzierung und NK-Zell-Entwicklung. Im Zuge der Differenzierung in NK-Zellen steigt die Expression von Id2 stark an. Dem entspricht die Beobachtung, dass der *knockout* von Id2 in der Maus zu einer beträchtlichen Reduktion von NK-Zellen führt (Yokota et al., 1999). Die zusätzliche Deletion von E2A in Id2-defizienten Mäusen wiederum bewirkt eine teilweise Wiederherstellung der NK-Zell-Reifung (Boos et al., 2007). Zusammengenommen ergibt sich daraus ein Szenario, in dem die Abschwächung der E2A-Aktivität durch Induktion von Id2 eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung von Vorläuferzellen in reife NK-Zellen ist. Ein sehr ähnlicher Mechanismus ist bei der Entwicklung bestimmter Subtypen dendritischer Zellen erkennbar. Während der Entwicklung dendritischer Zellen sinkt einerseits die Expression von E2A, während andererseits Id2 induziert wird, was in der Summe die E-Protein-Aktivität stark reduziert (Hacker et al., 2003).

Ein zweites Grundprinzip der Regulation der Aktivität von E-Proteinen ist ihre Interaktion mit bHLH-Proteinen, die ihre transaktivierende Wirkung modifizieren. Beispiel hierfür ist die Interaktion mit dem bHLH-Faktor *activated B cell factor 1* (ABF1), der eine Repressor-

Domäne besitzt. Dies hat zur Folge, dass E2A/ABF1-Heterodimere in Reporterassays nach Bindung an das E-Box-Motiv nicht mehr wie E2A-Homodimere als Aktivatoren wirken, sondern die Transkription hemmen, d. h. es ist denkbar, dass durch die Wirkung von ABF1 der Effekt von E-Proteinen am Zielpromotor umgekehrt wird (Massari et al., 1998). Vergleichbares gilt für die Wechselwirkung von E-Proteinen mit weiteren bHLH, wie z. B. TAL1/SCL (O'Neil und Look, 2007). TAL1/SCL kann ebenfalls Heterodimere mit E-Proteinen bilden, was durch die Rekrutierung von Korepressor-Komplexen wie mSin3a/HDAC eine Inhibition von Zielgenen zur Folge hat (O'Neil et al., 2004).



**Abb. 1. Übersicht über die Funktion von E-Proteinen während der hämatopoetischen Differenzierung.** Dargestellt ist die Reifung von der hämatopoetischen Stammzelle über die multipotenten Progenitorstadien bis hin zur T- und B-Zell-Reihe (Adolfsson et al., 2005; Iwasaki und Akashi, 2007). Für die einzelnen Reifungsschritte ist jeweils die Funktion der E-Box-Transkriptionsfaktoren angegeben. Zusätzlich ist die Modulation der E-Box-Aktivität durch die HLH-Proteine Id1 und Id2 während der Differenzierung in Richtung myeloische und dendritische Zellen sowie NK-Zellen markiert (Referenzen siehe Text und Kee, 2009). Rot hervorgehoben ist der Entwicklungsblock in der T- und B-Zell-Entwicklung nach E2A *knockout* im Mausmodell sowie die daraus resultierenden zellbiologischen Folgen (Entwicklung von T-Zell-Lymphomen bzw. Ausbildung eines multipotenten Entwicklungspotentials; siehe Abschnitt 1.2). LT-HSC, *long-term reconstituting hematopoietic stem cell*; ST-HSC, *short-term reconstituting HSC*; LMPP, *lymphoid primed multipotent progenitor*; CLP, *common lymphoid progenitor*; CMP, *common myeloid progenitor*; GMP, *granulocyte/macrophage progenitor*; MKEP, *megakaryocyte/erythroid progenitor*; T, T cell (prog, *progenitor*; DP, *double-positive*, SP, *single-positive*); B, B cell (prog, *progenitor*; immat, *immature*; mat, *mature*), SHM, *somatic hypermutation*; CSR *class switch recombination*.

## 1.2 Die Bedeutung gestörter Differenzierung und zellulärer Reprogrammierung für die Transformation lymphatischer Zellen

### Untersuchungen im Mausmodell

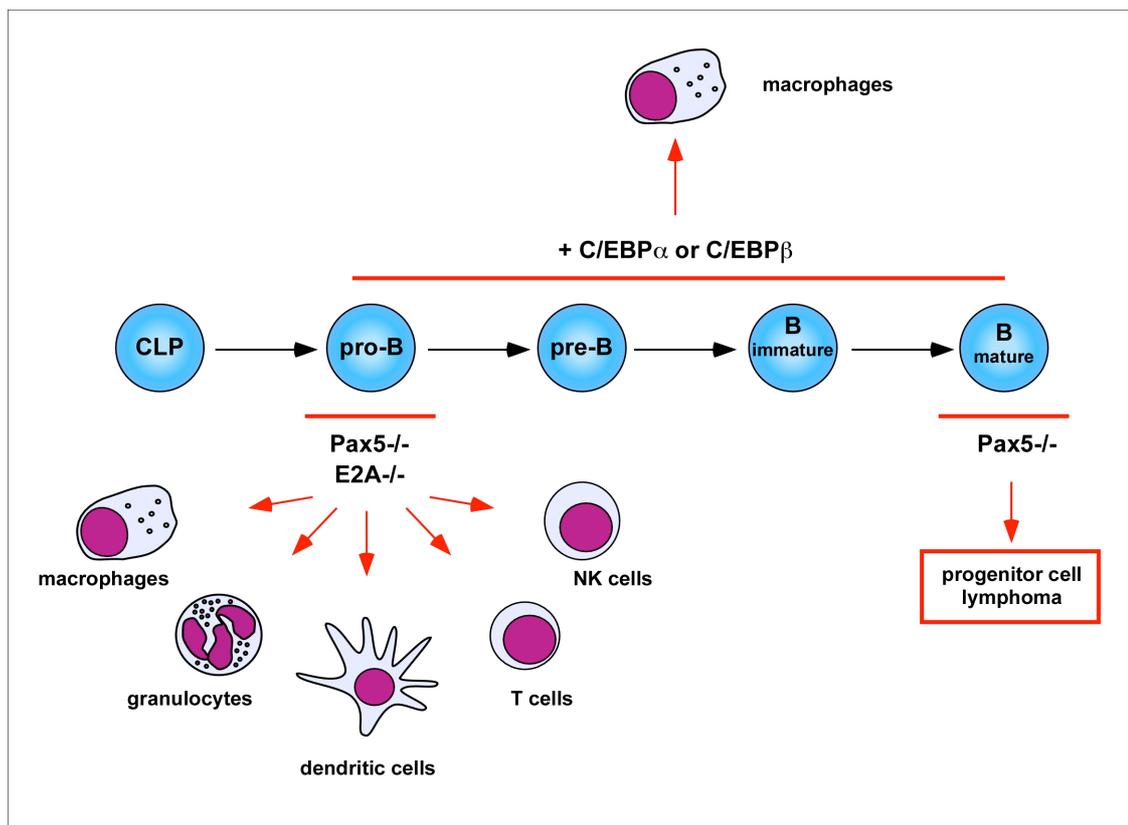
Die gezielte Inaktivierung oder Überexpression von Transkriptionsfaktoren im Mausmodell zeigte ihre entscheidende Bedeutung für die Etablierung und Aufrechterhaltung eines Linien-spezifischen Expressionsprogramms. Zusätzlich offenbarten diese Analysen aber auch eine überraschende zelluläre Plastizität lymphatischer Zellen, sobald die Aktivität dieser Faktoren gestört wird (Abb. 2). So führt die Inaktivierung von Pax5 in der frühen oder späten B-Zell-Entwicklung zu einem Verlust des B-Zell-Phänotyps. Pax5-defiziente B-Zellen zeigen ein Entwicklungspotential, das mit dem undifferenzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen vergleichbar ist, d. h. sie können unter entsprechenden Bedingungen in verschiedenste Zellreihen differenzieren, unter anderem in Granulozyten, Monozyten, NK- und T-Zellen (Horcher et al., 2001; Mikkola et al., 2002; Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999). Darüber hinaus führt die Expression myeloischer Transkriptionsfaktoren wie C/EBP $\alpha$  und GATA-Faktoren in Pax5-defizienten pro-B-Zellen zu einer Transdifferenzierung in die myeloische Richtung (Heavey et al., 2003). Auf molekularer Ebene geht diese zelluläre Plastizität nach Pax5 *knockout* mit dem Verlust der Expression B-Zell-assoziiierter Gene und der Aktivierung B-Zell-fremder Gene einher, wozu z. B. *Csf1r*, *Mpo*, *Gata1*, *Perforin* und *pre-T $\alpha$*  zählen (Nutt et al., 1999). Dieses Muster lässt sich durch die duale Aktivität von Pax5 als transkriptioneller Aktivator einerseits und transkriptioneller Repressor andererseits erklären (Cobaleda et al., 2007b). Bemerkenswerterweise haben nachfolgende Untersuchungen zu E2A und EBF1 gezeigt, dass das Auftreten eines pluri- oder multipotenten Differenzierungspotentials nach Verlust eines Linien-typischen Transkriptionsfaktors nicht auf Pax5 beschränkt ist, sondern ein wiederkehrendes Prinzip darstellt. In E2A-defizienten Vorläuferzellen des Knochenmarks findet sich eine gleichzeitige Expression von Genen, die normalerweise mit verschiedenen hämatopoetischen Differenzierungsrichtungen assoziiert sind, wie z. B. *Tcf1* und *Gata3* für T-Zellen, *Gata1* und *Epor* (*EPO-Rezeptor*) für erythroide Zellen sowie *Csf1r* (*M-CSF-Rezeptor*) und *Csf3r* (*G-CSF-Rezeptor*) für myeloische Zellen (Ikawa et al., 2004). Dieses Expressionsmuster ähnelt dem früher pluri- oder multipotenter Progenitorzellen (*multilineage priming*) (Enver und Greaves, 1998). Dies entspricht der Beobachtung, dass E2A $^{-/-}$  Zellen experimentell tatsächlich pluripotente Eigenschaften besitzen, d. h. sie können zu erythroiden, myeloischen und dendritischen Zellen sowie NK- und T-Zellen ausreifen (Ikawa et al., 2004). Ebenso zeigen EBF1 *knockout* Zellen sowohl ein myeloisches als auch ein lymphatisches Entwicklungspotential (Pongubala et al., 2008; Zhang et al., 2003). Die Wiederherstellung der EBF1-Aktivität induziert eine Differenzierung in die B-Zell-Reihe, während gleichzeitig das myeloische Potential unterdrückt wird, vermutlich durch eine

Inhibition der myeloischen Faktoren C/EBP $\alpha$  und PU.1 (Pongubala et al., 2008). Ein besonders ausgeprägtes Beispiel für die hohe zelluläre Plastizität innerhalb des hämatopoetischen Systems ist die Beobachtung, dass murine B-Lymphozyten des Knochenmarks oder der Milz – d. h. B-Zellen, die bereits als voll differenziert gelten – nach ektopter Expression von Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie in Zellen transdifferenzieren, die phänotypische und sogar funktionelle Merkmale von Makrophagen aufweisen (Xie et al., 2004). Sehr ähnliche Beobachtungen treffen auch für das T-Zell-System zu: frühe thymische Progenitoren können durch ektope Expression und entsprechende Stimulation von Zytokinrezeptoren, z. B. GM-CSF-Rezeptor oder IL-2-Rezeptor  $\beta$ , in eine granulozytäre/monozytäre Differenzierungsrichtung gelenkt werden (Iwasaki-Arai et al., 2003; King et al., 2002). Selbst T-Zellen, die bereits weiter in der T-Zell-Entwicklung vorangeschritten sind (*double-negative 3/4*, DN3/4), können unter dem Einfluss von C/EBP-Faktoren oder PU.1 noch in Makrophagen bzw. dendritische Zellen umgewandelt werden (Laiosa et al., 2006b).

Diese Beobachtungen widersprechen der früheren Ansicht, dass zelluläre Differenzierung einen linearen, unumkehrbaren Prozess darstellt. Inwieweit derartige Vorgänge jenseits experimenteller Systeme eine Rolle spielen, ist nicht abschließend geklärt. Es zeichnet sich jedoch in zunehmendem Maße ab, dass insbesondere im Rahmen der Leukämie- und Lymphomentstehung vergleichbare Mechanismen eine wesentliche Bedeutung besitzen (siehe unten). Zusammenfassend betrachtet ist die hämatopoetische Differenzierung ein äußerst dynamischer Prozess, der sowohl eine Aktivierung Linien-spezifischer Gene als auch eine Repression Linien-fremder Gene erfordert. Dies geht einher mit einem graduellen Verlust alternativer Entwicklungsmöglichkeiten und einer zunehmenden Festlegung auf ein bestimmtes zelluläres Schicksal (*lineage specification and commitment*). Hervorzuheben ist, dass die Stabilität des Phänotyps differenzierter hämatopoetischer Zellen weiterhin von der Aktivität Linien-assoziiierter Transkriptionsfaktoren abhängig bleibt und es bei Störungen dieser Faktoren zu einer fehlerhaften Expression Linien-fremder Gene kommt – ein Prozess, der letztendlich bis zu einer kompletten zellulären Transdifferenzierung bzw. Reprogrammierung führen kann (Cobaleda und Busslinger, 2008; Laiosa et al., 2006a).

Eine entscheidende Erkenntnis dieser Analysen war, dass Veränderungen in der physiologischen Aktivität von Transkriptionsfaktoren an der malignen Entartung lymphatischer Zellen beteiligt sind. Eine ektope Expression von Pax5 in multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen der Maus interferiert mit der normalen lymphatischen Entwicklung und hat die Entstehung unreifer T-lymphoblastischer Lymphome zur Folge (Souabni et al., 2007). Eine konditionale Deletion von Pax5 in reifen B-Lymphozyten führt nicht nur wie oben beschrieben zum Verlust des B-Zell-Phänotyps, sondern darüber hinaus

auch zur Entwicklung aggressiver Lymphome (Cobaleda et al., 2007a). Ähnliches gilt für E2A *knockout* Mäuse: Ein Verlust von E2A geht zusätzlich zu einer Störung der B- und T-Zell-Differenzierung mit dem Auftreten von T-Zell-Lymphomen einher (Bain et al., 1997). Wird der E2A-Antagonist TAL1/SCL, der eine wichtige Rolle bei akuten lymphatischen T-Zell-Leukämien spielt, in einem heterozygoten genetischen Hintergrund für E2A exprimiert (d. h. in E2A<sup>+/-</sup> Zellen), führt dies zu einer deutlichen Beschleunigung der TAL1-vermittelten Tumorentstehung (O'Neil et al., 2004).



**Abb. 2. Zelluläre Plastizität und Transdifferenzierung von B-Zellen.** Schematisch dargestellt ist die Beobachtung, dass experimentelle Veränderungen in der Aktivität von Linien-spezifischen Transkriptionsfaktoren zu einer erheblichen Störung des Differenzierungsprozesses führen. Bei einer Deletion der B-Zell-assoziierten Transkriptionsfaktoren Pax5 und E2A kommt es zu einem frühen Block in der B-Zell-Entwicklung. Die dabei entstehenden Pax5- oder E2A-defizienten Zellen sind durch ein Wiederauftreten eines multipotenten Entwicklungspotentials gekennzeichnet, das normalerweise auf dieser Stufe der Differenzierung bereits erloschen ist. Pax5 und E2A *knockout* Zellen können unter entsprechenden Bedingungen *in vitro* und/oder *in vivo* in andere hämatopoetische Zellreihen ausreifen. Für Pax5 ist gezeigt worden, dass dies auch bei einem Verlust von Pax5 in reifen, voll differenzierten B-Zellen gilt und mit der Entwicklung von Lymphomen einhergeht, die ihrem Genexpressionsprofil nach zu urteilen als Progenitor-Lymphome einzuordnen sind. Ebenso führt die ektopische Expression von Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie, die normalerweise eine zentrale Rolle in der myeloischen Differenzierung spielen, zu einer Transdifferenzierung von B-Zellen in Makrophagen. Referenzen siehe Text.

## Beobachtungen im humanen System

Inzwischen ist deutlich geworden, dass diese Beobachtungen im Maussystem auch eine große Relevanz für die Pathogenese humaner Leukämien und Lymphome besitzen. Bei akuten lymphatischen B-Zell-Leukämien (B-ALL) sind in einem hohen Prozentsatz Deletionen, Mutationen oder Translokationen von Genen zu beobachten, die für transkriptionelle Regulatoren der B-Zell-Differenzierung kodieren, so z. B. *PAX5*, *EBF1*, *E2A*, *E2-2*, *LEF1*, *IKFZ1* (*IKAROS*) und *IKFZ3* (*AIOLOS*) (Kuiper et al., 2007; Mullighan et al., 2007). Ein gemeinsames Prinzip dieser genetischen Aberrationen ist die verminderte Expression der entsprechenden Faktoren und/oder die Bildung von Varianten mit reduzierter oder veränderter transkriptioneller Aktivität. Veranschaulicht wird dies durch das Beispiel des *PAX5*-Gens, das in ca. 30% aller B-ALL-Fälle von Deletionen betroffen ist, die zumeist monoallelisch auftreten und entweder zu einem Verlust der *PAX5*-Expression vom betroffenen Allel oder zur Bildung trunkierter Proteinvarianten führen (Mullighan et al., 2007). Als weitere *PAX5*-Aberrationen finden sich Mutationen, die vorwiegend die DNA-Bindungsdomäne oder die Transaktivierungsdomäne betreffen, sowie Translokationen, bei denen *PAX5*-Fusionsproteine mit unterschiedlichen Partnern, wie z. B. *ETV6*, *FOXP1* oder *ZNF521*, entstehen. Folge dieser Defekte ist eine verminderte oder aberrante Funktion von *PAX5*, wie dies experimentell anhand von Reporterassays für *PAX5*-Zielgene, z. B. *CD19* und *mb1/Cd79a*, gezeigt werden konnte (Mullighan et al., 2007). Die exakten Mechanismen, durch die eine Inhibition der *PAX5*-Funktion zur Leukämieentstehung beiträgt, sind nicht geklärt. Auffallend ist, dass bei der B-ALL zusätzlich häufig Deletionen von Inhibitoren des Zellzyklus (z. B. *CDKN2A/INK4A-ARF*, *CDKN1B/p27* und *RB1*) zu beobachten sind, so dass hier ein Zusammenwirken zwischen dem Verlust Linien-spezifischer Transkriptionsfaktoren und gestörter Zellzykluskontrolle denkbar ist (Kuiper et al., 2007; Paulsson et al., 2008). Des Weiteren gibt es Hinweise für eine Interaktion mit klassischen rekurrenten Translokationen, wie z. B. im Fall BCR-ABL1-positiver Leukämien, bei denen in ca. 80% *IKAROS*- und in 50% *PAX5*-Deletionen zu finden sind (Mullighan et al., 2008). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass im Mausmodell eine Haploinsuffizienz von *Pax5* allein nicht zur Tumorinduktion ausreicht, aber im Zusammenwirken mit aktiviertem *Stat5* (wie es bei BCR-ABL1-positiven Fällen nachweisbar ist) eine sehr schnelle Leukämieentwicklung zur Folge hat (Heltemes-Harris et al., 2011). In der Summe weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass bereits geringe Veränderungen in der Gen-Dosis von Schlüsselfaktoren der B-Zell-Differenzierung zur Tumorentstehung beitragen, wahrscheinlich als Resultat einer Störung der Linien-spezifischen Genexpression in Kooperation mit zusätzlichen onkogenen Läsionen. Ähnliche Mechanismen sind bei den B-ALL-assoziierten Translokationen t(1;19) und t(17;19) zu erkennen, die zu einer Fusion der Transaktivierungsdomäne von *E2A* mit der DNA-Bindungsdomäne des HOX-Kofaktors *PBX1* (*E2A-PBX1*) bzw. des *bZIP*-

Transkriptionsfaktors HLF (E2A-HLF) führen (Inaba et al., 1992; Kamps et al., 1990). Durch die Translokationen wird einerseits ein *E2A*-Allel zerstört und dadurch die *E2A*-Dosis in leukämischen Zellen reduziert, andererseits entstehen Fusionsproteine mit veränderten DNA-Bindungs- und Transaktivierungseigenschaften, die – z. B. durch die Induktion von BMI1 und die daraus resultierende Repression von INK4A-ARF – eine transformierende Wirkung besitzen (O'Neil und Look, 2007; Smith et al., 2003).

Bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen existieren ebenfalls mehrere Defekte, die den Zusammenhang zwischen gestörter Differenzierung und Tumorentstehung verdeutlichen. Das *PAX5*-Gen ist bei diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (*diffuse large B cell lymphoma*, DLBCL) das Ziel einer aberranten somatischen Hypermutation (aSHM) während der Keimzentrumsreaktion, was zu Mutationen im Promotor und im 5'-Bereich der kodierenden Region führt (Pasqualucci et al., 2001; siehe auch 1.3). Zusätzlich prädisponiert der Mechanismus der aSHM zur Entstehung chromosomaler Translokationen in der betroffenen Region (Küppers, 2005). In der Tat ist *PAX5*, wenngleich in relativ niedriger Frequenz, bei verschiedenen Lymphomentitäten in Translokationen verwickelt, die den *PAX5*-Genlocus auf Chromosom 9p13 unter die Kontrolle des IgH-Locus auf 14q32 bringen und dadurch zu einer deregulierten *PAX5*-Aktivität führen (Busslinger et al., 1996; Iida et al., 1996; Poppe et al., 2005). Ein weiteres Beispiel für die Deregulation eines zentralen B-Zell-assoziierten transkriptionellen Regulators ist *E2A*, das im Burkitt-Lymphom aufgrund von inaktivierenden Mutationen des *E2A*-Antagonisten *ID3* sowie aktivierenden bzw. die Aktivität modulierenden Mutationen in der *E2A*-bHLH-Domäne eine verstärkte Aktivität aufweist (Richter et al., 2012; Schmitz et al., 2012). Die dadurch ausgelösten transkriptionellen Veränderungen bewirken eine erhöhte Aktivität des PI3-Kinase- und des BCR-Signalwegs sowie vermittelt über Cyclin D3 eine verstärkte Zellzyklusprogression (Schmitz et al., 2012). Bei diffusen großzelligen Lymphomen des Keimzentrums finden sich als charakteristisches Ereignis genetische Aberrationen, die das *BCL6*-Gen betreffen (Ye et al., 1993). *BCL6* ist ein transkriptioneller Repressor, der wesentliche Aspekte der Keimzentrumsreaktion kontrolliert und am Ende der Keimzentrumsreaktion wieder abgeschaltet wird (Klein und Dalla-Favera, 2008). Durch Mutationen und Translokationen in der regulatorischen Region des *BCL6*-Locus wird die Herunterregulation von *BCL6* inhibiert, woraus ein Block in der B-Zell-Differenzierung resultiert (Pasqualucci et al., 2003; Saito et al., 2007). Prinzipiell ähnliche Konsequenzen ergeben sich aus Mutationen und Deletionen des Transkriptionsfaktors *BLIMP1* (*PRDM1*), der ein essentieller Regulator der Plasmazell-Entwicklung ist. Bei diffusen großzelligen Lymphomen des ABC-Subtyps (*activated B cell-like DLBCL*) sind inaktivierende Veränderungen des *BLIMP1*-Gens nachweisbar, die den Übergang von Keimzentrums-B-Zellen in die terminale Differenzierung verhindern (Calado et al., 2010;

Mandelbaum et al., 2010; Pasqualucci et al., 2006). Für alle hier aufgeführten Beispiele ergibt sich als gemeinsame funktionelle Konsequenz, dass durch genetische Defekte die physiologische, d. h. Linien- und Stadien-spezifische Regulation des jeweiligen transkriptionellen Regulators aufgehoben wird, was zu einer Störung des normalen Differenzierungsprozesses führt und die Neigung zur malignen Entartung erhöht.

Ein auffallendes Merkmal bei akuten lymphatischen Leukämien der T-Zell-Reihe ist die Aktivierung von Onkogenen, die für bHLH-Proteine kodieren, wie z. B. *TAL1/SCL*, *TAL2*, *LYL1* und *BHLHB1* (Ferrando et al., 2002). *TAL1* ist in bis zu 60% aller T-ALLs als Folge von Translokationen, interstitiellen Deletionen, Mutationen oder Veränderungen vorgeschalteter Signalwege überexprimiert (O'Neil und Look, 2007). Die onkogene Wirkung der T-ALL-assoziierten bHLH-Faktoren wird vor allem darauf zurückgeführt, dass sie mit der normalen Funktion der Transkriptionsfaktoren E2A und HEB in der T-Zell-Entwicklung interferieren. *TAL1* bildet Heterodimere mit E2A oder HEB, wobei die daraus resultierenden Komplexe im Vergleich zu E2A-Homodimeren oder E2A/HEB-Heterodimeren veränderte transkriptionelle Eigenschaften besitzen, wie z. B. eine geringere Aktivierung von E-Box-Reporterkonstrukten oder die Rekrutierung von Korepressor- statt Koaktivator-komplexen (Hsu et al., 1994a; Hsu et al., 1994b; O'Neil und Look, 2007). Durch Genexpressionsanalysen lässt sich für *TAL1*- und *LYL1*-überexprimierende Leukämien jeweils eine Assoziation zu bestimmten Stadien der normalen T-Zell-Entwicklung erkennen, d. h. die funktionelle Inhibition von E2A und HEB scheint mit Störungen auf bestimmten Ebenen der T-Zell-Entwicklung assoziiert zu sein (Ferrando et al., 2002). Ein ähnliches molekulares Prinzip – d. h. die Blockade eines Linien-assoziierten Transkriptionsfaktors mit daraus resultierender Differenzierungsstörung – findet sich mit der Inhibition der E2A-Aktivität auch beim Hodgkin-Lymphom, wobei in diesem Fall die Auswirkungen auf den Phänotyp noch drastischer ausfallen als bei den oben beschriebenen Beispielen (Mathas/Janz et al., 2006; siehe eigene Arbeiten).

### **1.3 Die Keimzentrumsreaktion als Schlüsselereignis in der Lymphompathogenese**

Die Entstehung maligner B-Zell-Lymphome ist eng mit der physiologischen Differenzierung von B-Zellen verknüpft, da B-Lymphozyten während ihrer Reifung mehrere Stadien durchlaufen, die mit einer Modifikation ihres Genoms einhergehen. Durch die V(D)J-Rekombination der Immunglobulin (Ig)-Gene während der Entwicklung im Knochenmark erlangen B-Zellen die Fähigkeit zur Bildung von Immunglobulinen, die als Bestandteil des BCR auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Jung et al., 2006). Nach Antigenkontakt kommt es im Rahmen der Keimzentrumsreaktion zu einer starken Proliferation der B-Zellen,

zur somatischen Hypermutation (SHM) der variablen Region und zum Klassenwechsel der konstanten Region der Ig-Gene (*class switch recombination*; CSR) (Klein und Dalla-Favera, 2008). B-Lymphozyten, deren Ig als Folge der SHM eine höhere Affinität zum entsprechenden Antigen aufweisen (Affinitätsreifung), werden positiv selektiert, während eine niedrige Affinität oder der Verlust der BCR-Expression zur Apoptose führen (Rajewsky, 1996). Die Keimzentrumsreaktion umfasst also eine massive Expansion des aktivierten B-Zell-Klons in Kombination mit Mutationsvorgängen und Rekombinationen des Genoms – ein Prozess, der mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Anhäufung genetischer Aberrationen einhergeht und zur Entstehung maligner B-Zell-Lymphome prädisponiert. Das Schlüsselenzym sowohl für den physiologischen Prozess der Hypermutation und des Klassenwechsels als auch für das Auftreten onkogener Läsionen ist die *activation-induced cytidine deaminase* (AID) (Muramatsu et al., 2000; Okazaki et al., 2007). AID führt durch Desaminierung von Cytosin-Positionen Basen-Fehlpaarungen in die DNA ein. Dies ist der Ausgangspunkt einerseits für die Entstehung von Mutationen in den variablen Regionen der Ig-Gene im Zuge der SHM, andererseits für das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen mit anschließender Verknüpfung nicht-homologer DNA-Enden beim Klassenwechsel (Chaudhuri et al., 2007; Teng und Papavasiliou, 2007). Eine fehlgeleitete und/oder unzureichend korrigierte AID-Aktivität ist von zentraler Bedeutung für zwei wichtige Formen genetischer Aberrationen bei Keimzentrums-Lymphomen: onkogene Mutationen und chromosomale Translokationen (Klein und Dalla-Favera, 2008). Durch Sequenzierungsvergleiche zwischen Wildtyp und AID *knockout* Mäusen wurde deutlich, dass die AID-vermittelte Hypermutation nicht allein die variablen Regionen der Ig-Gene, sondern auch zahlreiche andere Gene betrifft, die in Keimzentrums-B-Zellen transkriptionell aktiv sind (Liu et al., 2008). Als Folge dieser fehlerhaften SHM können Mutationen in Genen mit onkogenem Potential entstehen, wie sie bei einem großen Teil aller DLBCL-Fälle nachweisbar sind, darunter in *BCL6*, *MYC*, *PIM1*, *RHOH*, *PAX5*, *SOCS1*, *CD79A* und *CD79B* (Gordon et al., 2003; Mottok et al., 2009; Pasqualucci et al., 1998; Pasqualucci et al., 2001). Entsprechend dem Muster der AID-Aktivität betreffen chromosomale Translokationen bei lymphatischen Malignomen, die sich vom Keimzentrum ableiten, häufig die Zielregionen der fehlerhaften SHM sowie die rearrangierten V(D)J-Segmente der Ig-Genloci oder die sog. *switch* Regionen der konstanten Abschnitte der IgH-Klassen, wodurch Proto-Onkogene unter den Einfluss regulatorischer Elemente der Ig-Gene geraten. Aus diesen Translokationen resultiert eine deregulierte Expression onkogener Faktoren, wie dies beispielweise für *BCL6*, *MYC*, *PAX5*, *FGFR3/MMSET* oder *MAF* gezeigt wurde (Klein und Dalla-Favera, 2008; Küppers, 2005).

Im Hinblick auf die Tumorgenetik des klassischen Hodgkin-Lymphoms (*classical Hodgkin lymphoma*, cHL), das sich ebenfalls von Keimzentrums-B-Zellen ableitet (siehe 1.4), fallen

allerdings mehrere Besonderheiten auf. Im Gegensatz zu B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, die häufig durch charakteristische Translokationen gekennzeichnet sind, wurde beim cHL eine derartige genetische Leitläsion bisher nicht nachgewiesen. Zwar konnten durch eine detaillierte Analyse der Ig-Loci in einem Teil der cHL-Fälle Bruchpunkte und ihre Fusionspartner identifiziert werden, doch ergab sich dabei kein konsistentes Muster (Martin-Subero et al., 2006). Vielmehr zeichnet sich das cHL durch einen ungewöhnlich komplexen Karyotyp sowie häufige segmentale chromosomale Aberrationen aus, bei denen bestimmte chromosomale Regionen mehrfach in andere Bereiche des Genoms integriert sind (MacLeod et al., 2000). Dies führt zu einer Amplifikation der betroffenen Regionen mit einer Dosiserhöhung der entsprechenden Gene, wie dies z. B. für *REL* und *JAK2* gezeigt wurde (Joos et al., 2003; Martin-Subero et al., 2003). Obwohl sich auch für das cHL vermuten lässt, dass die genomische Instabilität im Laufe einer fehlerhaften Keimzentrumsreaktion ihren Anfang nimmt, ist der genaue Zusammenhang noch unklar.

## 1.4 Das Hodgkin-Lymphom

### Einteilung und Histopathologie

Das Hodgkin-Lymphom, erstmalig beschrieben von Thomas Hodgkin im Jahr 1832 (Hodgkin, 1832), besitzt einzigartige histologische, molekulare und klinische Eigenschaften, weshalb es innerhalb der Klassifikation maligner Lymphome von allen anderen Lymphomformen abgegrenzt wurde (Hodgkin- versus Non-Hodgkin-Lymphome, NHL). Histologisch ist das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) durch große einkernige Hodgkin- und mehrkernige Reed-Sternberg-Zellen charakterisiert, die die maligne Zellpopulation des Tumors bilden (Stein et al., 2008). Die Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen machen zahlenmäßig nur einen geringen Anteil innerhalb des Gewebes befallener Lymphknoten aus und sind eingebettet in ein Infiltrat nicht-maligner entzündlicher Zellen, zu denen T-Zellen, B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Eosinophile und Neutrophile gehören. Basierend auf der zellulären Zusammensetzung werden vier histologische Subtypen unterschieden: nodulär-sklerosierend, gemischtzellig, lymphozytenreich und lymphozytenarm. Diese Formen unterscheiden sich hinsichtlich klinischer Merkmale (z. B. Altersgipfel und Lokalisation) sowie ihrer Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus, weisen aber prinzipiell die gleichen immunphänotypischen und molekulargenetischen Charakteristika auf. Hierzu zählen u. a. die Expression von CD30 und CD15 sowie der Verlust des B-Zell-Phänotyps (siehe unten) (Stein et al., 2008). Vom cHL abgegrenzt wird das noduläre Lymphozyten-prädominante HL (*nodular lymphocyte predominant HL*, NLPHL), das durch lymphozytische und/oder histiozytische Zellen (L&H-Zellen) gekennzeichnet ist, die morphologische Ähnlichkeit zu

HRS-Zellen besitzen können. Allerdings zeigt das NLPHL im Allgemeinen keine CD30 und CD15 Expression, während Marker der B-Zell-Differenzierung nachweisbar sind (Nogová et al., 2006; Poppema et al., 2008).

#### Der zelluläre Ursprung der Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen

Als eine besondere Schwierigkeit erwies sich die genaue Charakterisierung des zellulären Ursprungs der HRS-Zellen. Dies beruhte vor allem auf zwei Faktoren: einerseits der geringen Anzahl von HRS-Zellen im betroffenen Gewebe, wodurch konventionelle molekularbiologische Analysen nicht möglich waren, und andererseits auf dem außergewöhnlichen Phänotyp, der keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Zellreihe zuließ. HRS-Zellen zeigen ein inkonsistentes und variierendes Expressionsmuster von Markern, die mit gänzlich verschiedenen Differenzierungsrichtungen der Hämatopoese assoziiert sind, beispielsweise mit dendritischen Zellen (CCL17/TARC), Granulozyten und Makrophagen (CD15, CSF1, CSF1-Rezeptor), B-Zellen (PAX5, IRF4) sowie T-Zellen (CD3, CD4, Perforin, Granzym B) (Küppers, 2009). Ein Durchbruch gelang erst durch die Isolierung von HRS-Zellen aus dem umgebenden Gewebe mittels Mikromanipulation und die anschließende genomische Analyse ihrer Ig-Gene auf Einzelzell-Ebene. In der überwältigenden Zahl der Fälle zeigte sich ein klonales V(D)J-Rearrangement der Ig-Gene mit einer hohen Zahl somatischer Mutationen in den variablen Regionen, d. h. HRS-Zellen besitzen die molekulargenetische Signatur von Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums-B-Zellen (Kanzler et al., 1996; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 2000). Das Mutationsmuster weist dabei teilweise auf eine initiale Antigen-Selektion hin, was nur bei reifen aktivierten B-Zellen mit funktioneller BCR-Expression stattfinden kann (Kanzler et al., 1996; Marafioti et al., 2000). Als weiteres Merkmal einer abgelaufenen Keimzentrumsreaktion ist bei Hodgkin-Zelllinien ein Klassenwechsel der konstanten Region der Ig-Gene nachweisbar (Irsch et al., 2001). In primären HRS-Zellen finden sich bei einem Teil der Fälle ebenfalls Hinweise auf einen Klassenwechsel und chromosomale Translokationen, die den IgH-Genlocus betreffen (Martin-Subero et al., 2006). Ein zusätzliches Argument für eine B-Zell-Abstammung der HRS-Zellen liefern sog. *composite lymphomas*, bei denen das cHL entweder gleichzeitig oder nacheinander in Kombination mit einem reifen B-NHL auftritt und sich beide Lymphome vom gleichen malignen Zellklon ableiten. Dies ist erkennbar an einem identischen V(D)J-Rearrangement in beiden Lymphomen und gleichen sowie zusätzlich unterschiedlichen somatischen Mutationen in den variablen Ig-Regionen (Bräuninger et al., 1999; Marafioti et al., 1999). Bei einem geringen Prozentsatz von cHL-Fällen ist anstelle einer Umlagerung der Ig-Gene ein Rearrangement der T-Zell-Rezeptor-Gene nachweisbar, so dass eine Herkunft von T-Zellen angenommen werden muss (Müschen et al., 2000; Seitz et al., 2000). Hervorzuheben ist, dass auch

innerhalb der Gruppe der Hodgkin-Fälle mit positivem Nachweis von T-Zell-Markern die große Mehrheit keinen T-Zell-, sondern einen B-Zell-Ursprung besitzt, so dass die Expression von T-Zell-Faktoren bei diesen Tumoren als Linien-fremd anzusehen ist.

In ungefähr 25% aller cHL-Fälle sind innerhalb der korrekt V(D)J-rekombinierten Ig-Gene somatische Mutationen oder Deletionen zu erkennen, die die Expression eines funktionsfähigen Ig und damit die Präsentation eines BCR verhindern (*crippling mutations*) (Kanzler et al., 1996; Marafioti et al., 2000). Auch in den übrigen Fällen ist durch verschiedene Mechanismen (siehe unten) die Bildung von Ig bzw. des BCR gestört. Unter physiologischen Bedingungen werden Keimzentrums-B-Zellen, die keinen BCR exprimieren, unweigerlich durch Apoptose eliminiert. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Rettung von BCR-negativen, prä-apoptotischen B-Zellen des Keimzentrums durch transformierende Ereignisse ein zentraler Schritt in der Pathogenese des cHL sein muss (Küppers und Rajewsky, 1998).

Im Gegensatz zum cHL verweisen die Charakteristika des NLPHL eindeutiger auf eine Abstammung der L&H-Zellen von B-Zellen. Dem entspricht genetisch der Nachweis eines klonalen Rearrangements der Ig-Gene mit den Zeichen einer anhaltenden somatischen Hypermutation (Bräuninger et al., 1997; Marafioti et al., 1997) und phänotypisch die Expression von B-Zell-Markern, wie z. B. CD20, CD79A, BCL6, AID und Ig (Carbone et al., 1998; Greiner et al., 2005; Poppema et al., 2008). Genexpressionsprofile sprechen dabei für eine Beziehung zu B-Zellen, die sich im Übergang von Keimzentrums- zu Gedächtnis-B-Zellen befinden (Brune et al., 2008).

#### Das Epstein-Barr-Virus in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Als ein transformierender Faktor von HRS-Zellen wird das Epstein-Barr-Virus (EBV) diskutiert, das in bis zu 50% aller cHL-Fälle nachweisbar ist (Kapatai und Murray, 2007; Küppers, 2009). In EBV-positiven HRS-Zellen werden die EBV-Gene EBNA1, das für den Erhalt des viralen Genoms erforderlich ist, sowie LMP1 und LMP2A exprimiert (*latency II*) (Deacon et al., 1993). LMP1 (*latent membrane protein 1*) zeigt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu Oberflächenproteinen der TNF-Rezeptor-Familie und simuliert viele Funktionen des CD40-Rezeptors, der für die Aktivierung von B-Zellen sowie die Ausbildung der Keimzentrumsreaktion essentiell ist (Eliopoulos und Young, 2001). LMP2A ist ein Membranprotein, das ein Immun-Tyrosin-Aktivierungsmotiv (ITAM) mit Homologie zu dem des Antigenrezeptors in B- und T-Zellen besitzt (Fruehling und Longnecker, 1997). LMP2A kann Signale vermitteln, die denen eines aktivierten BCR ähneln. Die Expression von LMP2A im Mausmodell führt dazu, dass physiologische Kontrollpunkte der B-Zell-Entwicklung umgangen werden, BCR-negative B-Zellen in der Peripherie erscheinen und das Überleben BCR-negativer Keimzentrums-B-Zellen möglich wird (Caldwell et al., 1998;

Casola et al., 2004). Die Infektion von humanen B-Zellen mit EBV *in vitro* schützt BCR-negative B-Zellen vor Apoptose und ermöglicht ein klonales Auswachsen BCR-negativer lymphoblastoider Zelllinien (Bechtel et al., 2005; Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005). Daher ist denkbar, dass EBV durch die CD40-Rezeptor- bzw. BCR-ähnlichen Wirkungen von LMP1 und LMP2A zumindest initial zum Überleben von B-Zellen beiträgt, die während der Keimzentrumsreaktion ihre BCR-Expression verlieren, und damit einen entscheidenden Schritt zur Entartung leistet. Ein Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und cHL wird auch durch epidemiologische Studien unterstützt, die ein erhöhtes Risiko für EBV-positive cHL-Fälle nach einer Erkrankung an infektiöser Mononukleose zeigen (Hjalgrim et al., 2003; Hjalgrim et al., 2007).

#### Molekulare Grundlagen des malignen Wachstums der HRS-Zellen

HRS-Zellen weisen vielfältige funktionelle und genetische Aberrationen auf, die eine verstärkte Proliferation und Apoptoseresistenz bewirken. Ein besonderes Kennzeichen ist die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Bargou et al., 1996). Normalerweise wird NF- $\kappa$ B in unstimulierten Zellen durch Bindung an inhibitorische Proteine, *inhibitors of NF- $\kappa$ B* (I $\kappa$ B), im Zytoplasma zurückgehalten und dadurch inaktiviert. Externe Stimuli führen zur Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes, der I $\kappa$ B-Proteine phosphoryliert, wodurch ihr proteosomaler Abbau und die Freisetzung von NF- $\kappa$ B induziert wird (Vallabhapurapu und Karin, 2009). Im cHL bestehen auf mehreren Ebenen dieses Signalwegs Veränderungen. Der IKK-Komplex ist in HRS-Zellen konstitutiv aktiv (Krappmann et al., 1999), wobei die Ursachen der Aktivierung heterogen sein dürften. Diskutiert wird eine Liganden-abhängige oder -unabhängige Aktivierung durch die Rezeptoren CD30, CD40 und RANK (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*) sowie – in EBV-positiven Fällen – durch LMP1 (Annunziata et al., 2000; Fiumara et al., 2001; Horie et al., 2002). Besonders auffallend sind Mutationen und Deletionen des *TNFAIP3/A20*-Gens, die in etwa 30-40% aller Fälle nachweisbar sind (Kato et al., 2009; Schmitz et al., 2009). Sie führen zum Ausfall des NF- $\kappa$ B-Inhibitors A20, der eine zentrale Rolle bei der Begrenzung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung besitzt (Wertz et al., 2004). Als weitere rekurrente genetische Läsionen finden sich Mutationen und Deletionen in *NFKBIA* und *NFKBIE*, die für die NF- $\kappa$ B-Inhibitoren I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. I $\kappa$ B $\epsilon$  kodieren, sowie genomische Amplifikationen von *REL* und *BCL3*, wodurch die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität verstärkt und modifiziert wird (Emmerich et al., 1999; Emmerich et al., 2003; Joos et al., 2002; Jungnickel et al., 2000; Mathas et al., 2005). NF- $\kappa$ B spielt durch die Induktion von Zielgenen eine herausragende Rolle für mehrere Aspekte der Tumorbilogie des cHL: (1) für die Proliferation, vermittelt z. B. über Cyclin D2, STAT5 und IL-13, (2) für die Apoptoseresistenz, zurückzuführen u. a. auf BCL-XL, A1/Bfl-1, cIAP2 und FLIP, sowie (3) für die Bildung von Zytokinen und Chemokinen, z. B. Lymphotoxin  $\alpha$ , TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , CX3CL1,

MDC/CCL22 und IL-6 (Bargou et al., 1997; Hinz et al., 2002; Mathas et al., 2004). Es ist allerdings anzumerken, dass eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht spezifisch für das cHL ist, sondern bei mehreren lymphatischen Neoplasien gefunden werden kann, so z. B. beim ABC-Subtyp des DLBCL (Compagno et al., 2009; Lenz et al., 2008), beim primären mediastinalen B-Zell-Lymphom (Lam et al., 2005; Rosenwald et al., 2003), beim Multiplen Myelom (Annunziata et al., 2007; Keats et al., 2007) und beim Marginalzonen-Lymphom (Novak et al., 2009). Dies bedeutet, dass in HRS-Zellen zusätzliche Veränderungen vorliegen müssen, die erst in ihrer Gesamtheit zum charakteristischen Phänotyp des cHL führen.

Eine zweite stark deregulierte Signaltransduktionskaskade in HRS-Zellen ist der JAK/STAT-Signalweg. Als eine rekurrente genetische Veränderung wird im cHL die Amplifikation der chromosomalen Region 9p23-p24 beobachtet, in der sich der *JAK2*-Genlocus befindet (Joos et al., 2000). Zusätzlich sind Mutationen des JAK-Inhibitors *SOCS1* (*suppressor of cytokine signaling 1*) nachweisbar, wobei eine signifikante Assoziation zwischen Mutationen in *SOCS1* und der nukleären Akkumulation von phosphoryliertem STAT5 beschrieben wurde (Weniger et al., 2006). Hier zeichnet sich eine Quervernetzung zwischen dem JAK/STAT- und dem NF- $\kappa$ B-Signalweg ab, da sowohl die Expression als auch die DNA-Bindungsaktivität von STAT5 ebenfalls durch NF- $\kappa$ B positiv reguliert werden (Hinz et al., 2002). Die funktionelle Bedeutung von STAT5 wird dadurch unterstrichen, dass die Expression einer konstitutiv aktiven STAT5-Variante in primären humanen B-Zellen zur Immortalisierung führt und einen Hodgkin-ähnlichen Phänotyp induziert (Scheeren et al., 2008). Darüber hinaus sind HRS-Zellen durch eine hohe Aktivität von STAT3 und STAT6 gekennzeichnet, die eine verstärkte Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose vermitteln (Holtick et al., 2005; Kube et al., 2001; Skinnider et al., 2002). Zur Aktivierung scheinen dabei zusätzlich zu den genetischen Veränderungen autokrine und/oder parakrine Mechanismen beizutragen, so z. B. durch IL-13 für STAT6 sowie IL-21 für STAT3 und STAT5 (Lamprecht et al., 2008; Rui et al., 2010; Scheeren et al., 2008; Skinnider et al., 2002).

Eine dritte herausragende Gruppe transkriptioneller Regulatoren mit hoher Aktivität im cHL sind Faktoren der AP1- und ATF/CREB-Familie. HRS-Zellen zeigen eine starke Expression der AP1-Faktoren cJUN und JUNB (Mathas et al., 2002). Die AP1-Aktivität treibt die Tumorzellproliferation und induziert – teilweise in Kooperation mit NF- $\kappa$ B – die Expression von Cyclin D2, MET und CCR7. Ein wichtiges AP1-Zielgen ist das immunregulatorische Glycan-bindende Protein Galectin-1, dessen Expression zu einem Überwiegen von TH2-Zellen und regulatorischen T-Zellen im Microenvironment des cHL und damit zur Unterdrückung der Immunantwort gegen den Tumor beiträgt (Juszczynski et al., 2007). Die AP1-Aktivität wird vermutlich zusätzlich verstärkt und modifiziert durch die Überexpression

des ATF/CREB-Faktors ATF3, der mit AP1-Proteinen interagieren kann (Hsu et al., 1992) und das Überleben von HRS-Zellen fördert (Janz et al., 2006b; siehe eigene Arbeiten 2.2). Zusammengefasst ist das cHL gekennzeichnet durch eine hohe Aktivität mehrerer Transkriptionsfaktor-Familien, insbesondere NF- $\kappa$ B, STAT, AP1 und ATF/CREB, die als Schlüsselregulatoren des malignen Wachstums wirken. Eine wesentliche Aufgabe der Zukunft wird sein, das Zusammenspiel dieser und weiterer Signalwege (siehe unten) genauer zu charakterisieren, um zu einem übergreifenden Konzept für die Pathogenese des cHL zu kommen.

#### Der Verlust des B-Zell-Phänotyps beim klassischen Hodgkin-Lymphom

Besonders auffällig ist, dass HRS-Zellen trotz ihrer genetisch nachweisbaren Abstammung von B-Zellen den größten Teil des B-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms verloren haben. Dies bezieht sich nicht nur auf den Verlust der Ig-Expression, sondern auch auf weitere Komponenten des BCR und BCR-assoziierte Signalmoleküle, darunter Ig- $\alpha$ /CD79A, Ig- $\beta$ /CD79B, BLNK, LCK, BLK und LYN (Schwering et al., 2003; Tiacci et al., 2012). Zusätzlich exprimieren HRS-Zellen – in unterschiedlichem Ausmaß – Gene, die als typische Marker für andere Differenzierungsrichtungen innerhalb der Hämatopoese gelten (siehe oben; van den Berg et al., 1999; Atayar et al., 2005; Asano et al., 2006; Mathas/Janz et al., 2006). Dies deutet auf eine schwerwiegende Störung des transkriptionellen Programms von HRS-Zellen hin und bildet einen deutlichen Kontrast zu anderen B-Zell-Neoplasien, bei denen ganz überwiegend der B-Zell-Phänotyp erhalten bleibt und sogar weiterhin Stadienspezifische Charakteristika ihrer Ursprungszellen erkennbar sind wie z. B. beim DLBCL oder folliculären Lymphom (Alizadeh et al., 2000; Harris et al., 2008). Als mögliche Ursachen für die Differenzierungsstörung von HRS-Zellen sind mehrere Mechanismen beschrieben worden. Sequenzanalysen der variablen Region der Ig-Gene haben Mutationen gezeigt, die zu Stopp-Codons oder Verschiebungen des Leserasters führen und dadurch die Ig-Expression an sich verhindern (Kanzler et al., 1996; Marafioti et al., 2000). Da auch in den Fällen, in denen keine derartigen Mutationen nachweisbar sind, ein Verlust der Ig-Expression besteht, müssen weitere Veränderungen in regulatorischen Regionen und/oder funktionelle Ursachen postuliert werden. Tatsächlich fehlt in HRS-Zellen die Expression mehrerer Faktoren, die normalerweise an der Transkription der Ig-Loci beteiligt sind, wie z. B. OCT2, BOB.1/OBF1 und SPI1/PU.1 (Hertel et al., 2002; Jundt et al., 2002b; Re et al., 2001; Stein et al., 2001). Inzwischen ist deutlich geworden, dass im cHL nicht nur ein selektiver Defekt der Ig-Transkription, sondern eine generelle, grundlegende Störung des B-Zell-spezifischen Differenzierungsprogramms besteht. Untersuchungen zur Expression und Funktion der Transkriptionsfaktoren E2A, EBF1 und PAX5, die als die zentralen Regulatoren der B-Zell-Entwicklung gelten, zeigten, dass in HRS-Zellen die für B-Zellen charakteristische E2A-

Aktivität durch die Überexpression der E2A-Antagonisten ID2 und ABF1 blockiert ist (Küppers et al., 2003; Mathas/Janz et al., 2006; Renné et al., 2006). Die ektope Expression von ID2 und/oder ABF1 führt in Non-Hodgkin-Zelllinien zur Suppression B-Zell-spezifischer Gene, u. a. von *CD19*, *POU2F2/OCT2*, *CD79A*, *EBF1* und *AICDA*. Zusätzlich ist der Verlust der E2A-Funktion in HRS-Zellen an der aberranten Aktivierung B-Zell-fremder Gene beteiligt, einschließlich der Expression der T-Zell-Transkriptionsfaktoren GATA3 und TCF1 sowie des Rezeptors für CSF1 (Mathas/Janz et al., 2006). Eine weitere Störung der B-Zell-Differenzierung könnte auf der Ebene des Transkriptionsfaktors EBF1 bestehen, der in Hodgkin-Zelllinien im Vergleich zu Keimzentrums-B-Zellen und Non-Hodgkin-Zelllinien eine verminderte Expression zeigt und dessen ektope Expression in Hodgkin-Zelllinien zur Induktion von B-Zell-assoziierten Genen führt (Bohle et al., 2013). Im Hinblick auf den hohen Prozentsatz an EBV-positiven Hodgkin-Fällen ist bedeutsam, dass LMP2A die Expression B-Zell-typischer Transkriptionsfaktoren inhibiert. Dies gilt insbesondere für E2A, dessen Aktivität zusätzlich durch die LMP2A-abhängige Induktion der E2A-Antagonisten ID2 und SCL reduziert wird (Portis und Longnecker, 2003). Genexpressionsanalysen haben gezeigt, dass LMP2A oder LMP1 in B-Zellen transkriptionelle Veränderungen bewirken, die denen im cHL ähneln (Portis et al., 2003; Vockerodt et al., 2008). Als weiterer Mechanismus wurden in HRS-Zellen epigenetische Modifikationen im Bereich B-Zell-spezifischer Gene identifiziert, die mit einer transkriptionell inaktiven Chromatinstruktur assoziiert sind. Hierzu gehört eine verstärkte Methylierung von Histon 3 an Lysin 9-Positionen (H3K9me) im IgH-Genlocus (Ushmorov et al., 2004) sowie eine DNA-Hypermethylierung der Gene für *CD19*, *CD79A*, *CD79B*, *PU.1*, *POU2AF1/BOB.1*, *POU2F2/OCT2* und *SYK* (Ammerpohl et al., 2012; Ushmorov et al., 2006). Durch die Behandlung von Hodgkin-Zelllinien mit Inhibitoren der DNA-Methylierung (5-aza-dC) und Histon-Acetylierung (Trichostatin A) ist es experimentell möglich, die Expression von B-Zell-spezifischen Genen partiell wieder zu reaktivieren (Ushmorov et al., 2006; Ushmorov et al., 2004), doch sind diese Effekte relativ schwach ausgeprägt und führen – genomweit betrachtet – nicht zu einer Wiederherstellung des B-Zell-Phänotyps (Ehlers et al., 2008). Überraschenderweise induziert aber eine derartige Behandlung in B-Non-Hodgkin-Zelllinien ein Genexpressionsprofil mit Ähnlichkeiten zum cHL (Ehlers et al., 2008). Diese Beobachtungen deuten auf eine Störung der epigenetischen Kontrolle in der Pathogenese des cHL hin. Unterstützt wird diese Annahme durch Arbeiten unserer eigenen Gruppe, die sich mit den Ursachen für die Linien-fremde Expression des Makrophagen-spezifischen CSF1-Rezeptors (CSF1R/c-FMS) im cHL beschäftigten (Lamprecht et al., 2010). In HRS-Zellen verläuft die Aktivierung nicht über die typischen Promotorelemente des *CSF1R*-Gens, sondern über ein 5'-liegendes endogenes repetitives DNA-Element, das zu den *long terminal repeats* (LTRs) der MaLR-Familie gehört. Grundlage ist ein Verlust der epigenetischen Kontrolle, die zumindest teilweise auf eine fehlende

Expression des Korepressors CBFA2T3 (ETO2) zurückzuführen ist. Bemerkenswerterweise scheint dieser Defekt nicht auf dieses eine Element beschränkt zu sein, sondern mit einer ausgedehnten De-Repression zahlreicher repetitiver Sequenzen im Hodgkin-Genom einherzugehen (Lamprecht et al., 2010).

Die Expression B-Zell-fremder Gene in HRS-Zellen kann zusätzlich durch extrinsische und intrinsische Faktoren verstärkt werden, die normalerweise die zelluläre Differenzierung in andere Richtungen lenken. HRS-Zellen sind gekennzeichnet durch eine hohe NOTCH-Aktivität (Jundt et al., 2008; Jundt et al., 2002a; Köchert et al., 2011), die eigentlich einen Schlüsselfaktor für die T-Zell-Differenzierung darstellt (Radtke et al., 2010). Die Inaktivierung von Notch1 in der Maus blockiert die T-Zell-Lymphopoese (Radtke et al., 1999), während die Expression einer aktiven Notch1-Variante (*intracellular Notch1*, Notch1C) in Knochenmarkzellen die Differenzierung von T-Zellen auf Kosten der B-Zell-Entwicklung verstärkt (Pui et al., 1999). Zudem besitzt NOTCH1 ein starkes onkogenes Potential, wie es insbesondere durch das häufige Auftreten aktivierender NOTCH1-Mutationen in T-ALLs verdeutlicht wird (Weng et al., 2004). Die NOTCH-Aktivität im cHL beruht auf mehreren Veränderungen, wozu eine hohe NOTCH1- und NOTCH2-Expression, der Verlust des NOTCH-Inhibitors DELTEX1 und die Überexpression des aktivierenden Kofaktors MAML2 gehören. Dies führt einerseits zu einer verstärkten Proliferation und Apoptoseresistenz von HRS-Zellen (Jundt et al., 2002a; Köchert et al., 2011) sowie andererseits zu einer Suppression B-Zell-typischer und Aktivierung B-Zell-fremder Gene (Jundt et al., 2008).

## **1.5 Das Multiple Myelom**

### Genetische Veränderungen in der Pathogenese des Multiplen Myeloms

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung, die sich von terminal differenzierten, Antikörper-produzierenden B-Zellen ableitet. Basierend auf zytogenetischen Untersuchungen, vergleichender Genom-Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, CGH) und Genexpressionsprofilen konnten charakteristische Muster molekularer Veränderungen beim MM identifiziert werden, die verschiedene Pathogenesewege widerspiegeln. In Bezug auf chromosomale Veränderungen wird das MM grundsätzlich in hyperdiploide und nicht-hyperdiploide Fälle unterteilt (Smadja et al., 1998). Der Karyotyp hyperdiploider Tumoren weist zwischen 48 und 74 Chromosomen auf und ist von einem Zugewinn insbesondere der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 in unterschiedlichen Kombinationen gekennzeichnet. Gegenübergestellt wird die nicht-hyperdiploide Form mit hypodiploiden, pseudodiploiden und tetradiploiden Karyotypen. Hyperdiploide Myelome machen etwa 50% aller Fälle aus und sind mit einer besseren Prognose vergesellschaftet

(Smadja et al., 2001). Charakteristisch für nicht-hyperdiploide Tumoren ist ihre enge Assoziation (> 85%) mit spezifischen Translokationen, die die Ig-Loci betreffen, während derartige Veränderungen bei hyperdiploiden Fällen seltener (< 30%) auftreten (Fonseca et al., 2003). Diese Translokationen entstehen durch einen fehlgeleiteten Klassenwechsel und/oder eine aberrante somatische Hypermutation im Verlauf der Keimzentrumsreaktion und werden als frühe genetische Veränderungen in der Pathogenese des MM angesehen. Sie werden daher auch als sog. primäre Translokationen von sekundären chromosomalen Aberrationen abgegrenzt (Bergsagel und Kuehl, 2001). Formal lassen sich bei den primären Translokationen drei Gruppen unterscheiden, bei denen jeweils ein Mitglied einer bestimmten Gruppe von Onkogenen unter die Kontrolle eines Ig-Enhancers, zumeist vom Locus der schweren Ketten auf Chromosom 14q32, gerät (Kuehl und Bergsagel, 2002). Zur ersten Gruppe gehören Translokationen, durch die verschiedene Mitglieder der Cyclin D-Familie dereguliert werden: *Cyclin D1* (11q13; ca. 15%), *Cyclin D2* (12p13; < 1%) und *Cyclin D3* (6p21; ca. 2%). Im zweiten Fall handelt es sich um Gene, die für Transkriptionsfaktoren der MAF-Familie kodieren: *cMAF* (16q23; ca. 5%), *MAFB* (21q12; ca. 2%) und *MAFA* (8q24; < 1%). Die dritte Gruppe betrifft zwei Gene, die auf 4p16 lokalisiert sind: einerseits *MMSET*, das für eine Histonmethyltransferase kodiert, und andererseits das Gen für den *fibroblast growth factor receptor 3* (*FGFR3*). In diesem Fall führt die Translokation in der Mehrzahl der Fälle zur gleichzeitigen Deregulation beider Gene, wobei *MMSET* vom der(4) Chromosom und *FGFR3* vom der(14) Chromosom aus durch regulatorische Ig-Elemente aktiviert werden (Tonon, 2007). Interessanterweise sind fast alle Myelomfälle trotz ihres relativ niedrigen Proliferationsindex durch eine Überexpression eines der drei Mitglieder der Cyclin D-Familie gekennzeichnet. Dies gilt auch für Myelome, bei denen keine Translokation von D-Cyclinen oder MAF-Transkriptionsfaktoren, die Cyclin D2 als Zielgen induzieren, vorliegt (Bergsagel et al., 2005). Die Deregulation von Cyclin D-Proteinen gehört damit zu den häufigsten Aberrationen beim MM. Das Muster der Cyclin D-Überexpression wurde gemeinsam mit den primären Translokationen als Grundlage einer molekularen Klassifikation des MM vorgeschlagen (Bergsagel und Kuehl, 2005; Fonseca et al., 2009).

Die Tumorphagenese wird als ein fortschreitender Prozess betrachtet, der mit einer Anhäufung genetischer Defekte einhergeht. Beim MM existieren zahlreiche genomische Veränderungen, die als Ausdruck einer solchen Progression gelten. Hierzu zählen z. B. Aberrationen des Chromosoms 1 (1p Deletionen und 1q Amplifikationen), Verluste des Chromosoms 13 (Monosomie oder interstitielle Deletionen) oder Deletionen im Bereich 17q13, die das Tumorsuppressorprotein p53 betreffen (Tonon, 2007). Als sekundäre Veränderungen werden ebenfalls Aberrationen des *MYC*-Locus angesehen. Im Gegensatz zu anderen B-Zell-Neoplasien, die durch *MYC* Translokationen charakterisiert sind, ist das Muster der Veränderungen im MM jedoch heterogener. Nur ein Teil der Myelomfälle zeigt

den klassischen Typ einer reziproken Translokation mit den Ig-Loci der schweren oder leichten Ketten. Häufiger handelt es sich um komplexe Translokationen mit teilweise nicht charakterisierten genomischen Regionen sowie um Amplifikationen, Inversionen oder Insertionen (Avet-Loiseau et al., 2001; Shou et al., 2000). Zusätzlich ist beim MM eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs nachweisbar. Myelomzellen zeigen zu einem großen Teil eine verstärkte Akkumulation von NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren im Kern sowie eine hohe Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen. Darüber hinaus sind sie empfindlich gegenüber einer pharmakologischen Hemmung des IKK-Komplexes oder Proteasom-Inhibitoren (Annunziata et al., 2007; Hideshima et al., 2002; Hideshima et al., 2006). Dies korreliert mit der verstärkten Expression und/oder mit aktivierenden genetischen Veränderungen (Translokationen, Amplifikationen) positiver Regulatoren des kanonischen und nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs, u. a. *NIK*, *NFKB1* (p105), *NFKB2* (p100) und *CD40*. Alternativ oder zusätzlich finden sich Deletionen oder inaktivierende Mutationen in mehreren NF- $\kappa$ B-Inhibitoren, wie beispielsweise in *TRAF3* und *CYLD* (Annunziata et al., 2007; Demchenko et al., 2010; Keats et al., 2007). Obwohl die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Veränderungen relativ gering ist, führen sie in ihrer Summe sowie in Kombination mit externen NF- $\kappa$ B-induzierenden Signalen des Microenvironments letztendlich bei einem hohen Anteil aller Myelomfälle zu einer verstärkten NF- $\kappa$ B-Aktivität. Damit zeigen sich Parallelen zu anderen B-Zell-Neoplasien, wie z. B. dem cHL oder dem ABC-Subtyp des DLBCL, in denen ebenfalls zahlreiche unterschiedliche Aberrationen zur Induktion dieses Signalwegs beitragen (Compagno et al., 2009; Kato et al., 2009; Lenz et al., 2008). Dies verdeutlicht eindrucksvoll den starken positiven Selektionsdruck für die Akkumulation von aktivierenden NF- $\kappa$ B Veränderungen, der während der malignen Transformation lymphatischer Zellen besteht.

#### Das Knochenmark-Microenvironment als zentraler Faktor für das maligne Wachstum von Myelomzellen

In den vergangenen Jahren ist immer klarer geworden, dass das Tumorwachstum nicht isoliert als Zell-autonomes Geschehen betrachtet werden kann, sondern dass zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und ihrer Umgebung bestehen (Dave et al., 2004; Steidl et al., 2010). Das MM ist ein besonders ausgeprägtes Beispiel für diesen Aspekt der Tumorbilogie. Der neoplastische Zellklon ist bei dieser Erkrankung in erster Linie im Knochenmark lokalisiert. Dies ist Ausdruck der engen wechselseitigen Beziehungen zwischen den malignen Plasmazellen und dem Microenvironment des Knochenmarks, woraus wichtige Wachstums- und Überlebenssignale für Myelomzellen resultieren. Vermittelt werden diese Effekte einerseits durch lösliche Faktoren und andererseits durch die direkte Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix oder akzessorischen Zellen,

einschließlich Stromazellen, Endothelzellen, Osteoblasten und Osteoklasten (Hideshima et al., 2007).

Zu den Faktoren, die von Zellen des Knochenmarks gebildet werden und das Wachstum und Überleben von Myelomzellen fördern, zählen u. a. IL-6, IL-15, IL-21, TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) und MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ) (Mitsiades et al., 2007). Durch die Adhäsion von Myelomzellen an Stromazellen des Knochenmarks, vermittelt z. B. über ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) oder VLA4 (*very late antigen 4*), kann die Expression dieser Faktoren zusätzlich gesteigert werden, wodurch autokrine und parakrine Proliferations- und Überlebenssignale verstärkt werden. So führt die Interaktion von Myelomzellen mit Knochenmarkstroma zur vermehrten Produktion von IL-6 durch Stromazellen, das wiederum als Wachstums- und Resistenzfaktor auf die Myelomzellen zurückwirkt (Chauhan et al., 1996; Uchiyama et al., 1993). Zusätzlich kann IL-6 in Myelomzellen die Bildung verschiedener Faktoren, z. B. VEGF und bFGF (*basic fibroblast growth factor*), induzieren, wodurch weitere biologische Prozesse angestoßen werden, wie z. B. die Neubildung von Gefäßen (Bisping et al., 2003; Dankbar et al., 2000). Die beschriebenen Wechselwirkungen sind auch wesentlich an der Ausbildung eines Zytostatika-resistenten Phänotyps beteiligt. Myelomzellen können durch die Kokultur mit Stromazellen des Knochenmarks vor der apoptotischen Wirkung zytotoxischer Substanzen, wie z. B. Dexamethason, geschützt werden, wobei der protektive Effekt wiederum sowohl durch lösliche Faktoren als auch über Oberflächenmoleküle vermittelt wird. Darüber hinaus bewirkt die Bindung der Myelomzellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix, z. B. die  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Adhäsion an Fibronectin, eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und eine verstärkte Resistenz gegenüber zytostatischen Substanzen (*cell adhesion-mediated drug resistance*, CAM-DR) (Damiano et al., 1999; Landowski et al., 2003).

Als Resultat der vielfältigen Interaktionen zwischen Tumor und Microenvironment kommt es in Myelomzellen zur Aktivierung mehrerer mitogen und anti-apoptotisch wirkender Signaltransduktionswege. Besonders hervorzuheben sind der JAK/STAT3-, der RAS/MAPK-, der PI3K/AKT- und der NF- $\kappa$ B-Signalweg, wobei zahlreiche Quervernetzungen mit ähnlichen zellbiologischen Konsequenzen bestehen. Der JAK/STAT-Signalweg wird typischerweise über Zytokine wie IL-6, IL-15 oder IL-21 induziert. Dies hat, vermittelt über die Phosphorylierung und Aktivierung von Januskinasen, die Phosphorylierung, Dimerisierung und nukleäre Translokation von STAT-Faktoren zur Folge, wobei im MM in erster Linie STAT3 aktiviert wird. Die Aktivierung des JAK/STAT-Weges führt über die Induktion der anti-apoptotischen Proteine BCL-XL und MCL1 zu erhöhter Apoptoseresistenz (Catlett-Falcone et al., 1999; Puthier et al., 1999). Der RAS/MAPK-Signalweg kann in malignen Plasmazellen durch verschiedene Faktoren, wie z. B. IL-6, IGF-1, VEGF, TNF $\alpha$ , IL-21 und SDF-1 stimuliert

werden. Dabei kommt es unter Beteiligung zwischengeschalteter Kinasen (RAF1, MEK) zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (Ogata et al., 1997). Durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt ERK die Induktion von Zielgenen, die essentiell für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus sind. Neben den genannten Faktoren können RAS-Mutationen zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen führen. Beim MM sind in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium in bis zu 50% aller Fälle aktivierende *KRAS*- oder *NRAS*-Mutationen zu finden (Chapman et al., 2011; Chng et al., 2008). Durch mehrere Faktoren des Knochenmarks, insbesondere IL-6 und IGF-1, kann der PI3K/AKT-Signalweg in Myelomzellen induziert werden (Tu et al., 2000). Die anti-apoptotische Wirkung dieses Signalweges beruht u. a. auf der Phosphorylierung und Inaktivierung des Pro-Apoptose-Proteins BAD, der Inhibition der katalytischen Aktivität von Caspase 9 und der Inaktivierung der pro-apoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie (Hideshima et al., 2001). Des Weiteren bewirkt AKT eine verstärkte Progression durch den Zellzyklus. Dies resultiert einerseits aus dem verzögerten Abbau von Cyclin D1, vermittelt durch die Inhibition der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), und andererseits aus einer verminderten Expression oder Aktivität von Inhibitoren des Zellzyklus, wie z. B. CDKN1A (WAF1/p21) und CDKN1B (KIP1/p27) (Hideshima et al., 2001). Die Überexpression von konstitutiv aktiven AKT-Konstrukten führt bei Myelomzellen zu verstärkter Proliferation und Resistenz gegenüber Dexamethason-induzierter Apoptose (Hsu et al., 2002), während eine Hemmung des IGF-1-Rezeptors oder der nachgeschalteten PI3-Kinase durch pharmakologische Inhibitoren oder dominant-negative Konstrukte die proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Effekte von IGF-1 und IL-6 blockiert (Mitsiades et al., 2004; Tu et al., 2000).

## 2. Originalarbeiten zum Habilitationsthema

### 2.1 Inhibition der E2A-Aktivität als molekularer Mechanismus der gestörten Differenzierung lymphatischer Zellen

Mathas, S.\*, **Janz, M.\***, Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., Jöhrens, K., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B. (2006). Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nature Immunology* 7, 207-215. \*contributed equally (<http://dx.doi.org/10.1038/ni1285>)

Lietz, A., **Janz, M.**, Sigvardsson, M., Jundt, F., Dörken, B., Mathas, S. (2007). Loss of bHLH transcription factor E2A activity in primary effusion lymphoma (PEL) confers resistance to apoptosis. *British Journal of Haematology* 137, 342-348. (<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06583.x>)

Mathas, S., Kreher, S., Meaburn, K. J., Jöhrens, K., Lamprecht, B., Assaf, C., Sterry, W., Kadin, M. E., Daibata, M., Joos, S., Hummel, M., Stein, H., **Janz, M.**, Anagnostopoulos, I., Schröck, E., Misteli, T., Dörken, B. (2009). Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 5831-5836. (<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0900912106>)

Zu den eigentümlichsten Merkmalen der HRS-Zellen im cHL gehört das variable und inkonsistente Expressionsmuster von Markern, die mit unterschiedlichen Differenzierungsrichtungen der Hämatopoese assoziiert sind. Ziel unserer Arbeiten war und ist es, die molekularen Ursachen und die tumorbiologischen Konsequenzen dieser ausgeprägten Differenzierungsstörung zu verstehen. Ausgehend vom offensichtlichen Widerspruch zwischen dem genetischen Nachweis einer B-Zell-Abstammung und dem weitgehenden Verlust des B-Zell-Phänotyps analysierten wir in HRS-Zellen die Expression und Aktivität der Transkriptionsfaktoren E2A, EBF1 und PAX5, die die physiologische B-Zell-Entwicklung kontrollieren. Als zentrale Beobachtung zeigte sich, dass die DNA-Bindungsaktivität des bHLH-Faktors E2A in Hodgkin-Zelllinien grundlegende Unterschiede zum Bindungsverhalten in allen anderen B-Zelllinien aufweist (Mathas/Janz et al., 2006). Die genaue Charakterisierung dieses Befundes ergab, dass die Achse der B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren in HRS-Zellen auf der Ebene von E2A durch die Expression der E2A-Antagonisten ID2 und ABF1 funktionell gestört ist. ID-Proteine sind HLH-Proteine, die keine

basische Region für die Bindung an DNA besitzen und dadurch nach Interaktion mit bHLH-Faktoren deren transkriptionelle Aktivität blockieren. ABF1 ist ein bHLH-Protein, das Heterodimere mit E-Proteinen bilden kann, im Unterschied zu diesen allerdings nach Bindung an die DNA als starker Repressor fungiert (weitere Details zu HLH- bzw. bHLH-Faktoren siehe 1.1). In der Tat besteht im cHL die DNA-Bindungsaktivität von E2A nicht mehr aus den für B-Zellen charakteristischen E47-Homodimeren, sondern ist vollständig durch E47/ABF1-Heterodimere ersetzt. Durch die gemeinsame Expression von ID2 und ABF1 ist es experimentell möglich, die Aktivität von E47-Homodimeren fast vollständig zu blockieren und eine DNA-Bindungsaktivität zu generieren, die der in Hodgkin-Zellen entspricht. Die Transfektion von B-Zelllinien mit ID2 und/oder ABF1 führt zu einer Unterdrückung B-Zell-spezifischer Gene, wie wir für *CD19*, *CD79A*, *OCT2*, *EBF1* und *AICDA* zeigen konnten. Zusätzlich erlaubt der Verlust der E47-Homodimer-Aktivität in Hodgkin-Zelllinien die Expression von Genen, die normalerweise in B-Zellen nicht abgelesen werden. Beispiele hierfür sind die T-Zell-typischen Transkriptionsfaktoren TCF1 und GATA3 sowie der Makrophagen-spezifische Rezeptor für CSF1 (CSF1R). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Störung der E2A-Aktivität sowohl am Expressionsverlust B-Zell-typischer Gene als auch an der Induktion B-Zell-fremder Gene in HRS-Zellen beteiligt ist und damit einen wichtigen molekularen Mechanismus für den außergewöhnlichen Phänotyp des cHL darstellt. Zudem veranschaulichen diese Beobachtungen, dass humane lymphatische Zellen unter bestimmten Bedingungen eine erstaunliche zelluläre Plastizität aufweisen können – eine Eigenschaft, wie sie vorher fast ausschließlich im Mausmodell beschrieben worden war (Janz et al., 2006a).

Interessanterweise sind hier Parallelen zum HHV8-assoziierten primären Effusionslymphom (PEL) zu erkennen. Dieses Lymphom leitet sich von B-Lymphozyten ab, die die molekulare Signatur einer abgelaufenen Keimzentrumsreaktion aufweisen und in ihrem Phänotyp Gemeinsamkeiten zu Immunoblasten und Plasmazellen besitzen (Jenner et al., 2003; Klein et al., 2003; Matolcsy et al., 1998). In Analogie zum cHL zeigte sich, dass PEL-Zelllinien ebenfalls durch eine veränderte E2A-Aktivität gekennzeichnet sind (Lietz et al., 2007). Dies ist auf ein vermindertes E2A-Expressionsniveau bei gleichzeitiger Expression von ID2 und ABF1 zurückzuführen, wodurch das Verhältnis zwischen E2A und seinen Antagonisten verschoben und die Bildung von B-Zell-typischen E2A-Homodimeren gehemmt wird. Funktionell führt die Wiederherstellung der E2A-Aktivität in PEL-Zelllinien zu einer verstärkten Apoptose, was auf eine Wirkung von E2A als Tumorsuppressor hinweist (Lietz et al., 2007).

Eine dritte Lymphomentität, die sich durch eine Überexpression von ID2 und ABF1 auszeichnet, ist das anaplastische großzellige Lymphom (*anaplastic large cell lymphoma*, ALCL). Basierend auf dem Nachweis eines Rearrangements der T-Zell-Rezeptor-Gene kann

das ALCL der Gruppe der T-Zell-Lymphome zugeordnet werden (Foss et al., 1996). Trotz der Abstammung von T-Zellen zeigen sich mehrere auffallende Gemeinsamkeiten mit dem cHL. Immunphänotypisch ist das ALCL einerseits durch die Färbung für CD30, andererseits – sozusagen spiegelbildlich zum Verlust des B-Zell-Phänotyps bei HRS-Zellen – durch eine fehlende Expression T-Zell-typischer Moleküle charakterisiert. In einem hohen Prozentsatz ist es nicht möglich, den TCR $\beta$  und TCR-assoziierte Moleküle, z. B. CD3 und ZAP70, oder klassische T-Zell-Marker wie CD5, CD4 oder CD8 nachzuweisen (Stein et al., 2000). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass in ALCL-Zelllinien die für T-Zellen typische DNA-Bindungsaktivität von E2A/HEB-Heterodimeren verloren gegangen ist (Mathas et al., 2009). Dies korreliert mit einer erhöhten Expression von ID2, die u. a. auf Amplifikationen des genomischen ID2-Locus zurückzuführen ist. Experimentell führt die Überexpression von ID2 in Zelllinien, die sich von T-Zell-Leukämien ableiten und ein erhaltenes T-Zell-Markerprofil aufweisen, zu einer teilweisen Suppression T-Zell-typischer Faktoren. Das ALCL kann zusätzlich anhand des Vorliegens oder Fehlens von Translokationen, die zu einer deregulierten Aktivität der *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) auf Chromosom 2p23 führen, in ALK-positive und ALK-negative Fälle unterteilt werden (Chiarle et al., 2008; Medeiros und Elenitoba-Johnson, 2007). Als besonderes Merkmal konnte bei ALK-negativen Beispielen eine Überexpression von ABF1 identifiziert werden, die sich – soweit bisher zu beurteilen – nur auf diese Untergruppe beschränkt und in dieser ALCL-Form eine mit dem cHL vergleichbare E-Box-DNA-Bindungsaktivität zur Folge hat (Mathas et al., 2009).

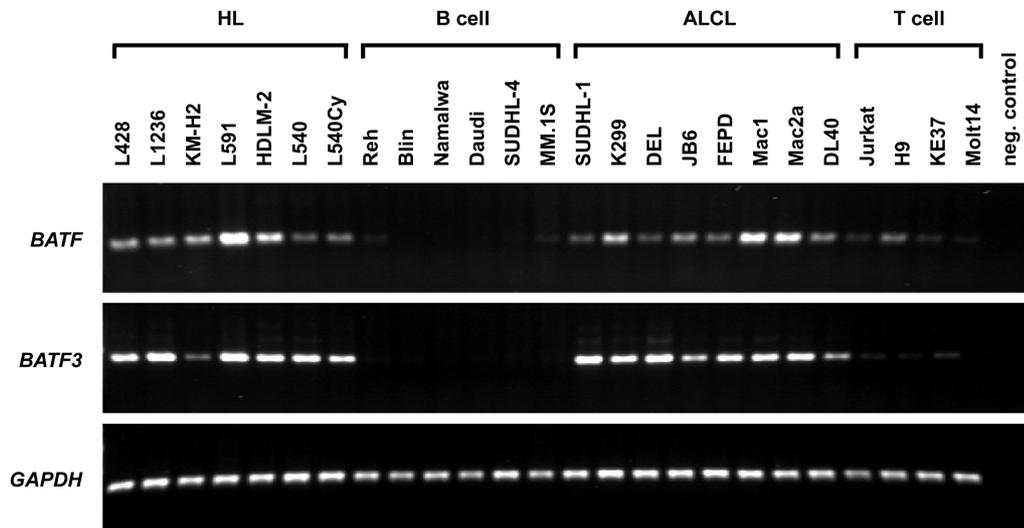
## 2.2 ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

**Janz, M.,** Hummel, M., Truss, M., Wollert-Wulf, B., Mathas, S., Jöhrens, K., Hagemeyer, C., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B., Bargou, R. C. (2006). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 107, 2536-2539. (<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-07-2694>)

Um einen Einblick in die spezifischen transkriptionellen Veränderungen von HRS-Zellen zu gewinnen, haben wir von Hodgkin- sowie von Non-Hodgkin-Zelllinien, die unterschiedliche lymphatische Neoplasien bzw. Reifungsstufen der B-Zell-Differenzierung repräsentieren, Microarray-basierte Genexpressionsprofile erstellt (Janz et al., 2006b). Auffallend war, dass mehrere Transkriptionsfaktoren der ATF/CREB-Familie eine starke Überexpression in Hodgkin-Zelllinien zeigten, einschließlich ATF3, BATF und BATF3 (*activating transcription factor*, ATF; *cyclic AMP response element binding protein*, CREB) (Janz et al., 2006b und unveröffentlichte Ergebnisse, Abb. 3). ATF/CREB-Faktoren gehören strukturell zur Gruppe der *basic region leucine zipper* (bZIP)-Proteine, wobei die basische Region für die DNA-Bindung und das Leucin-Zipper-Motiv für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. ATF/CREB-Proteine binden als Homodimere oder Heterodimere spezifisch an Zielsequenzen der DNA. Durch Interaktionen untereinander sowie mit anderen bZIP-Faktoren der C/EBP-, MAF- und AP1-Familie sind zahlreiche Kombinationen möglich, die je nach Zusammensetzung der Komplexe und Promotorkontext als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription wirken (Chen et al., 1994; Hsu et al., 1992; Hsu et al., 1991). Funktionell sind die Mitglieder der ATF/CREB-Familie an der Antwort auf vielfältige extra- und intrazelluläre Stimuli beteiligt, wie z. B. Proliferations- und Stresssignale oder genotoxische Schädigung (Hai et al., 1999; Thompson et al., 2009). Zusätzlich wirken sie an der Regulation der Entzündungsantwort und der Differenzierung im hämatopoetischen System mit (Gilchrist et al., 2006; Schraml et al., 2009).

In unseren Array-Analysen gehörte ATF3 zu den am stärksten differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren. Wir konnten durch Untersuchungen an Zelllinien sowie durch immunhistochemische Färbungen von primärem Tumormaterial verschiedener Lymphomentitäten bestätigen, dass ATF3 in nahezu allen Beispielen des cHL hoch exprimiert ist, während es in anderen Lymphomen nicht oder nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden kann. Eine interessante Ausnahme bildet das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL), bei dem in ca. 70% der Fälle eine Expression von ATF3 beobachtet wird (Janz et al., 2006b). Dies ist ein weiteres Beispiel für die ausgeprägten molekularen Parallelen zwischen diesen beiden Lymphomtypen, wozu beispielsweise auch

die hohe Expression von AP1-Faktoren oder E2A-Anatgonisten gehört (Mathas et al., 2009). Nach *knockdown* von ATF3 durch RNA-Interferenz zeigte sich eine Reduktion der Proliferationsrate und eine beträchtlich eingeschränkte Viabilität von Hodgkin-Zelllinien, was die tumorbiologische Bedeutung der ATF3-Expression verdeutlicht (Janz et al., 2006b).



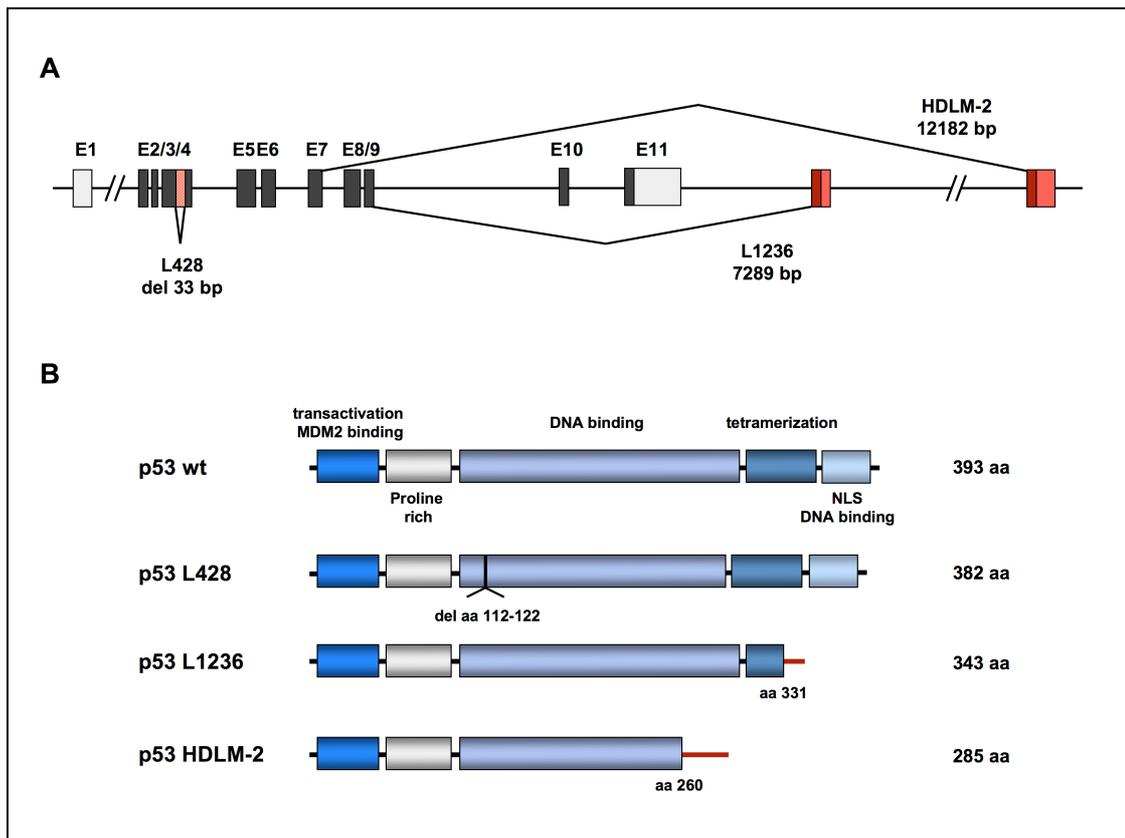
**Abb. 3. Expressionsmuster der ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren BATF und BATF3 in lymphatischen Neoplasien.** RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression der ATF/CREB-Faktoren *BATF* und *BATF3* in Zelllinien, die sich von Lymphomen und Leukämien unterschiedlicher Differenzierungsrichtungen und -stadien ableiten. HL, Hodgkin-Lymphom: L428, L1236, KM-H2, L591 (B-Zell-Abstammung), HDLM-2, L540, L540Cy (T-Zell-Abstammung); B cell: Reh, Blin (prä-B-ALL), Daudi, Namalwa (Burkitt-Lymphom), SUDHL-4 (*germinal center B cell-like DLBCL*), MM.1S (Multiples Myelom); ALCL, *anaplastic large cell lymphoma*: SUDHL-1, K299, DEL, JB6 (*anaplastic lymphoma kinase (ALK)*-positiv), FEPD, Mac1, Mac2a, DL40 (ALK-negativ); T cell: Jurkat, H9, KE37, Molt14 (T-ALL). *GAPDH* mRNA wurde als interne Kontrolle amplifiziert.

### 2.3 Analyse p53-abhängiger und p53-unabhängiger Apoptosewege im Hodgkin-Lymphom

**Janz, M.,** Stühmer, T., Vassilev, L. T., Bargou, R. C. (2007). Pharmacologic activation of p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Leukemia* 21, 772-779. (<http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404565>)

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein zentraler Integrationspunkt für die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden und die inadäquate Aktivierung von Onkogenen, wodurch p53 eine entscheidende Barriere gegen die maligne Transformation darstellt. Zusätzlich ist der p53-Status von Tumorzellen ein maßgeblicher Parameter, durch den die Wirksamkeit genotoxischer Zytostatika beeinflusst wird (Levine und Oren, 2009). Um die funktionelle Aktivität von p53 im cHL zu analysieren, haben wir Hodgkin-Zelllinien mit dem MDM2-Antagonisten Nutlin-3 behandelt. Diese Substanz blockiert die Interaktion von MDM2 mit p53 und führt damit zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53, vorausgesetzt dass es als Wildtyp-Protein vorliegt (Vassilev et al., 2004). Von sechs getesteten Hodgkin-Zelllinien sprachen nur drei auf eine Nutlin-Behandlung mit einer Induktion von p53-Zielgenen (*MDM2*, *p21*) und nachfolgender Apoptose an, was auf p53-Defekte in den übrigen Zelllinien hinwies (Janz et al., 2007). Dieser Befund war überraschend, da im cHL bisher nur selten p53-Mutationen beschrieben worden waren (Küpper et al., 2001; Maggio et al., 2001; Montesinos-Rongen et al., 1999). Eine genaue Analyse ergab, dass in den Nutlin-resistenten Zelllinien Deletionen von p53 vorliegen. Wir konnten – in Übereinstimmung mit Feuerborn et al. (2006) und Drakos et al. (2007) – zeigen, dass es sich dabei um Veränderungen handelt, die zu einem teilweisen Verlust der DNA-Bindungsdomäne und/oder der Tetramerisierungsdomäne und damit vermutlich zur transkriptionellen Inaktivierung führen. Strukturell liegen diesen Veränderungen genomische Deletionen zugrunde, die eine Größe zwischen 33 und maximal 12 000 Basenpaaren aufweisen und zu fehlerhaften Splice-Produkten der *p53* mRNA führen (Abb. 4). Dieses Muster der p53-Inaktivierung ist ungewöhnlich, da bei anderen Tumorentitäten ganz überwiegend Punktmutationen als Ursache vorliegen (IARC TP53 Datenbank; <http://p53.iarc.fr>). Wir betrachten dies als einen weiteren Hinweis dafür, dass die Mechanismen der genomischen Instabilität im cHL von denen in anderen Lymphomen abweichen. Die p53-Deletionen in Hodgkin-Zelllinien wären mit den üblicherweise angewandten Verfahren für den Nachweis von p53-Mutationen, bei dem eine PCR-Amplifikation der Exone 5 bis 8 durchgeführt wird, nur teilweise detektiert worden. Insofern besteht die Möglichkeit, dass die Häufigkeit von p53-Veränderungen im cHL bisher unterschätzt wurde.

Im Hinblick auf die Bedeutung von p53 für das Ansprechen auf DNA-schädigende Chemotherapeutika konnten wir beobachten, dass eine Kombination des MDM2-Antagonisten Nutlin-3 mit Vincristin, Doxorubicin oder Etoposid im Vergleich zu einer Einzelbehandlung eine deutlich stärkere Apoptoseinduktion bei Hodgkin-Zelllinien mit p53-Wildtyp bewirkt. Um zu testen, inwieweit der p53-Status auch die Reaktion auf nicht-genotoxische Substanzen beeinflusst, haben wir die Effekte einer pharmakologischen Blockade des Hitzeschock-Proteins HSP90 durch Geldanamycin untersucht. HSP90 ist ein Chaperon-Molekül, das für die Stabilisierung von Signaltransduktionsmolekülen notwendig ist und die Weiterleitung onkogener Signale in Tumorzellen fördert (Trepel et al., 2010). Im cHL wird HSP90 für die Biosynthese der IKK-Komponenten  $\alpha$  und  $\beta$  sowie die konstitutive IKK-Aktivierung benötigt (Broemer et al., 2004), weshalb es in Anbetracht der Schlüsselrolle von NF- $\kappa$ B für die Proliferation, Apoptoseresistenz und Zytokin-Produktion von HRS-Zellen eine vielversprechende Zielstruktur darstellt. Wir konnten beobachten, dass eine Behandlung von Hodgkin-Zelllinien mit Geldanamycin zur Apoptose führt, wobei sich eine Korrelation mit dem Mutationsstatus der I $\kappa$ B-Proteine abzeichnete. Zelllinien mit intakten I $\kappa$ B-Faktoren waren durch eine höhere Apoptoserate gekennzeichnet, vermutlich da es in diesen Fällen nach einer Hemmung der IKK-Aktivität zur Akkumulation von I $\kappa$ B-Proteinen und zur Retention von NF- $\kappa$ B im Zytoplasma kommt, was bei mutierten I $\kappa$ B-Faktoren nicht möglich ist. Obwohl durch die HSP90-Inhibition wahrscheinlich mehrere Signalwege in ihrer Wirkung beeinträchtigt werden (wie z. B. zusätzlich die JAK-STAT-Signalübertragung; Schoof et al., 2009), spricht für einen besonders engen Zusammenhang zwischen HSP90-induzierter Zytotoxizität und NF- $\kappa$ B-Blockade, dass die Wirkung von Geldanamycin durch die ektopre Expression der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 (RelA) erheblich abgeschwächt werden kann. Bemerkenswert ist, dass einerseits p53-deletierte Hodgkin-Zelllinien gegenüber einer Inhibition des NF- $\kappa$ B-Signalwegs empfindlich bleiben und andererseits Hodgkin-Zelllinien mit I $\kappa$ B-Mutationen noch auf eine Nutlin-Behandlung ansprechen. Dies weist darauf hin, dass die Apoptoseinduktion durch p53-Aktivierung und NF- $\kappa$ B-Inhibition offenbar voneinander unabhängig vermittelt werden und als einander ergänzende therapeutische Strategien dienen könnten.



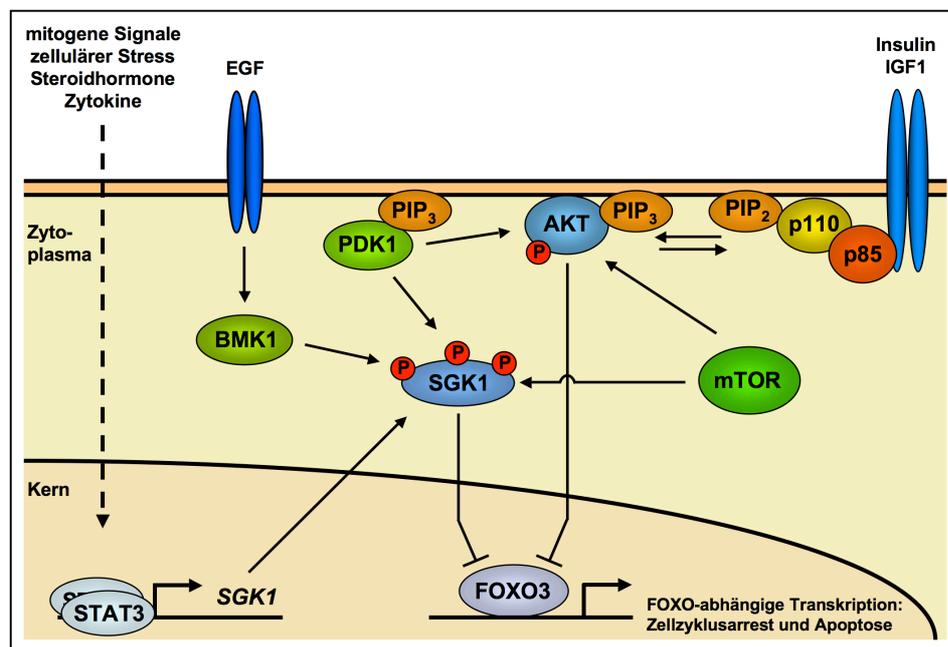
**Abb. 4. Deletionen des *p53*-Gens im cHL.** (A) Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des *p53*-Gens sowie der *p53*-Deletionen in den Hodgkin-Zelllinien L428, L1236 und HDLM-2. In L428-Zellen liegt eine interne Deletion von 33 Basenpaaren im Exon 4 vor. Bei den Zelllinien L1236 und HDLM-2 führen die Deletionen jeweils zu einem aberranten Splicing mit Sequenzen aus dem 3'-Bereich des *p53*-Gens. (B) Auswirkungen der *p53*-Deletionen auf Proteinebene. In der Zelllinie L428 bleibt das Leseraster erhalten. Die Deletion der Aminosäuren 112 bis 122 betrifft den N-terminalen Bereich der *p53*-DNA-Bindungsdomäne. In L1236-Zellen entsteht ein C-terminal trunkiertes Protein, bei dem Anteile der Tetramerisierungsdomäne deletiert sind. In HDLM-2-Zellen betrifft der Verlust Teile der DNA-Bindungsdomäne und den C-Terminus.

## 2.4 Wachstums- und Überlebenssignale beim Multiplen Myelom

Fagerli, U.-M., Ullrich, K., Stühmer, T., Holien, T., Köchert, K., Holt, R. U., Bruland, O., Chatterjee, M., Nogai, H., Lenz, G., Shaughnessy, J. D., Mathas, S., Sundan, A., Bargou, R. C., Dörken, B., Børset, M., **Janz, M.** (2011). Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a prominent target gene of the transcriptional response to cytokines in multiple myeloma and supports the growth of myeloma cells. *Oncogene* 30, 3198-3206. (<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.79>)

Maligne Plasmazellen erhalten durch Zytokine des Knochenmarks und unmittelbare Wechselwirkungen mit den Zellen des Tumor-Microenvironments essentielle Proliferations- und Überlebenssignale. Die Anzahl der beschriebenen Faktoren und Mechanismen ist in den vergangenen Jahren sehr stark angewachsen, so dass es schwer fällt, den Beitrag einzelner Signalwege innerhalb dieses Netzwerks und damit auch ihre potentielle Bedeutung für therapeutische Interventionen abzuschätzen (Hideshima et al., 2007). Wir haben in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Magne Børset (Norwegian University of Science and Technology, St. Olavs University Hospital, Trondheim, Norwegen) die Frage untersucht, ob sich durch die Testung verschiedener Stimulationsbedingungen eine begrenzte Zahl von Genen identifizieren lässt, die wiederkehrend induziert werden, d. h. Gene, die eine zentrale Stellung in der zellulären Antwort von Myelomzellen auf externe Signale besitzen. Hierfür wurden Genexpressionsprofile von Myelomzelllinien erstellt, die mit ausgewählten Zytokinen stimuliert oder mit Stromazellen des Knochenmarks kokultiviert wurden. Als ein besonders stark induziertes Gen erwies sich unter allen experimentellen Bedingungen *SGK1* (*serum/glucocorticoid-regulated kinase 1*), das für eine Serin/Threonin-Kinase kodiert (Fagerli et al., 2011). SGK1 weist eine hohe Homologie zur AKT-Kinase auf und ist wie AKT Teil des Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase Signalwegs (Park et al., 1999) (Abb. 5). Im Gegensatz zu den meisten anderen Kinasen, die konstitutiv exprimiert und in erster Linie posttranslational durch Phosphorylierung reguliert werden, unterliegt SGK1 zusätzlich einer ausgeprägten transkriptionellen Regulation und wird durch externe Signale wie Zytokine oder zellulären Stress induziert (Leong et al., 2003; Webster et al., 1993). Wir konnten zeigen, dass SGK1 in Myelomzellen schnell und stark durch Wachstums- und Überlebenssignale des Knochenmarks hochreguliert wird, wie z. B. durch IL-6, IL-15, IL-21 und TNF $\alpha$  sowie primäre Stromazellen. Diese Induktion verläuft über den JAK/STAT3-Signaltransduktionsweg, für den bereits eine herausragende Rolle beim Multiplen Myelom beschrieben wurde (Catlett-Falcone et al., 1999; Mitsiades et al., 2007). Die funktionelle Bedeutung von SGK1 wird dadurch verdeutlicht, dass eine Inhibition der SGK1-Expression durch RNA-Interferenz zu einer verminderten Proliferation und Viabilität von Myelomzelllinien

führt. Genexpressionsanalysen nach *knockdown* von SGK1 zeigten, dass eine verminderte SGK1-Expression auf molekularer Ebene mit einer Induktion von Zellzyklus-inhibierenden Faktoren (CDKN1A/p21, CDKN1B/p27 und CDKN2D/p19) und einer Abnahme von positiven Regulatoren der Zellproliferation (CDK6 und RBL2/p130) einhergeht (Fagerli et al., 2011). Zusammengefasst weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass SGK1 eine funktionelle Schnittstelle zwischen der transkriptionellen Antwort auf externe Stimuli und intrazellulären Phosphorylierungskaskaden bildet, d. h. dass SGK1 nach seiner Induktion in seiner Eigenschaft als Kinase die zelluläre Antwort von Myelomzellen auf Wachstumssignale zusätzlich verstärkt. Damit stellt SGK1 ein interessantes potentielles Zielmolekül für eine pharmakologische Inhibition beim Multiplen Myelom dar.



**Abb. 5. Stellung der Serin/Threonin-Kinase SGK1 innerhalb intrazellulärer Signalwege.** Die Expression des SGK1-Gens wird durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli induziert. Im Zusammenhang mit dem MM gehören hierzu beispielsweise die Zytokine IL-6, IL-15 und IL-21, wobei die Induktion – zumindest im Fall von IL-6 – über STAT3 verläuft. Die Kinaseaktivität des SGK1 Proteins selbst wird durch Phosphorylierung aktiviert, die in Abhängigkeit vom jeweiligen zellulären System über unterschiedliche Signalwege vermittelt werden kann: z. B. (a) durch BMK1/ERK5 nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (Hayashi et al., 2001), (b) durch PDK1 im Zuge einer Aktivierung der PI3-Kinase (Biondi et al., 2001) und (c) durch den mTOR-Multiproteinkomplex (mTORC1 und/oder mTORC2) (Garcia-Martinez und Alessi, 2008; Hong et al., 2008). Zu den Substraten von SGK1 gehört u. a. der Transkriptionsfaktor FOXO3, der die Expression von Genen aktiviert, die Zellzyklusarrest und Apoptose neigen verstärken (wie z. B. p27 und BIM). Die Phosphorylierung von FOXO3 fördert durch die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen den Export von FOXO3 aus dem Kern und führt dadurch zu einer Inhibition der FOXO3-abhängigen Transkription. SGK1 und AKT können gleiche und unterschiedliche Positionen in FOXO3 phosphorylieren, d. h. sich gegenseitig in ihrer Wirkung ergänzen und verstärken (Brunet et al., 2001).

### **3. Diskussion**

Schwerpunkt der hier beschriebenen Arbeiten ist die molekulare Pathogenese reifer B-Zell-Neoplasien. Obwohl sich ein großer Teil der Projekte in erster Linie auf das cHL bezieht, beschränkt sich das Interesse unserer Arbeitsgruppe nicht auf krankheitsspezifische Veränderungen, sondern gilt darüber hinaus allgemeinen Prinzipien der onkogenen Transformation im lymphatischen System. Dabei hat sich das cHL – trotz seiner einmaligen Stellung innerhalb der Klassifikation der Lymphome – als hervorragendes Modellsystem erwiesen. Beispiele sind die konstitutive NF- $\kappa$ B- und NOTCH-Aktivierung, die Induktion von Transkriptionsfaktoren der AP1/ATF-Familie sowie die funktionelle Hemmung der E2A-Aktivität in HRS-Zellen. In allen Fällen sind zahlreiche Parallelen in anderen B- und T-Zell-Malignomen zu erkennen, wodurch die am cHL gewonnenen Erkenntnisse in einem sehr viel breiteren Kontext stehen und eine direkte Bedeutung auch für die Pathogenese anderer Entitäten haben.

#### **3.1 Veränderungen der Aktivität des Transkriptionsfaktors E2A als Mechanismus der malignen Transformation lymphatischer Zellen**

Hauptthema meiner wissenschaftlichen Arbeit sind die Ursachen und Konsequenzen einer veränderten Aktivität von Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Lymphomentstehung. Exemplarisch wird dies durch unsere Untersuchungen zu B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren im cHL verdeutlicht (siehe Originalarbeiten 2.1; Mathas/Janz et al., 2006; Janz et al., 2006a). Als zentrales Ergebnis konnten wir in diesen Analysen eine funktionelle Blockade auf der Ebene des Transkriptionsfaktors E2A identifizieren. In HRS-Zellen wird die E2A-Aktivität durch die Expression der HLH-Proteine ID2 und ABF1 gehemmt. Dies hat weitreichende Konsequenzen für den Phänotyp und die Tumorbilogie des cHL. Die E2A-Inhibition trägt wesentlich zum Verlust der B-Zell-spezifischen Genexpression sowie zur fehlerhaften Expression B-Zell-fremder Gene bei, d. h. sie ist ein Schlüsselereignis für die Differenzierungsstörung der HRS-Zellen. Im weiteren Verlauf unserer Arbeiten wurde deutlich, dass sich derartige funktionelle E2A-Veränderungen nicht auf das cHL beschränken, sondern bei weiteren B- und T-Zell-Neoplasien anzutreffen sind. Dies gilt beispielsweise für das zumeist von Post-Keimzentrums-B-Zellen ausgehende primäre Effusionslymphom (PEL), das durch einen weitgehenden Verlust der E2A-Homodimer-Aktivität gekennzeichnet ist, bedingt durch eine verminderte Expression von E2A bei gleichzeitiger Hochregulation der Antagonisten ID2 und ABF1 (Lietz et al., 2007). Während als zellbiologische Konsequenz der E2A-Inhibition beim PEL eine erhöhte

Apoptoseresistenz gezeigt werden konnte (Lietz et al., 2007), ist der Einfluss auf den Phänotyp der Tumorzellen nicht so klar zu definieren wie beim cHL. Zwar ist das PEL ähnlich wie das cHL durch einen Verlust von B-Zell-Markern gekennzeichnet, allerdings ist nicht sicher abzugrenzen, inwieweit diese Veränderungen auf eine teilweise abgelaufene terminale B-Zell-Differenzierung oder aber eine abnorme Aktivität B-Zell-assoziiierter Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sind (Arguello et al., 2003; Jenner et al., 2003; Klein et al., 2003). Als weiterer Unterschied lässt sich im PEL keine mit dem cHL vergleichbare Induktion B-Zell-fremder Gene beobachten, was mit der wesentlich schwächeren Expression von ID2 und ABF1 in PEL-Zellen in Zusammenhang stehen könnte (Lietz et al., 2007). Als Beispiel für eine abnorme E-Box-Aktivität bei T-Zell-Lymphomen konnte das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) identifiziert werden (Mathas et al., 2009). In dieser Entität ist die normalerweise in T-Zellen aus E2A/HEB-Heterodimeren bestehende DNA-Bindungsaktivität verloren gegangen, wobei dies ebenfalls wesentlich auf eine Überexpression von ID2 und/oder ABF1 zurückzuführen ist. Bemerkenswert ist, dass unsere zellbiologischen Untersuchungen darauf hinweisen, dass die Inhibition der E-Protein-Aktivität ähnlich wie beim cHL zu tiefgreifenden Veränderungen des Phänotyps führt, d. h. in diesem Fall zum Verlust von T-Zell-assoziierten Faktoren. Des Weiteren konnte in neueren Arbeiten unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe beim Sézary-Syndrom, einer aggressiven Form kutaner T-Zell-Lymphome, eine rekurrente monoallelische Deletion des *E2A*-Gens identifiziert werden, wobei die reduzierte E2A-Aktivität durch Deregulation von CDK6, MYC und Komponenten des RAS-Signalwegs zu einer verstärkten Zellzyklusprogression führt (Steininger et al., 2011). Ähnliche molekulare Prinzipien sind darüber hinaus auch bereits bei akuten lymphatischen Leukämien beschrieben worden: Hierzu zählt der Verlust eines funktionsfähigen E2A-Allels im Zuge der t(1;19) oder t(17;19) Translokation bei der B-ALL sowie die E2A-Inhibition durch Deregulation verschiedener bHLH-Faktoren bei der T-ALL (Aspland et al., 2001; O'Neil und Look, 2007; siehe auch 1.2).

Gemeinsame Folge der oben beschriebenen Veränderungen ist ein partieller oder vollständiger Verlust der physiologischen E2A-Aktivität, was auf eine Funktion von E2A als Tumorsuppressor hindeutet. Diese Annahme wird durch Untersuchungen der E2A-Funktion im Mausmodell unterstützt: E2A-defiziente Mäuse entwickeln aggressiv wachsende Lymphome, die immunphänotypisch als unreife T-Zell-Lymphome eingeordnet werden können (Bain et al., 1997). Wird der E2A-Verlust durch ektope Expression in den Lymphomzellen wieder ausgeglichen, kommt es zur Apoptoseinduktion (Engel und Murre, 1999). Ein entscheidender Punkt in Bezug auf die Lymphomentstehung ist die Mitwirkung von E-Proteinen an wichtigen Kontrollpunkten der T-Zell-Entwicklung: Physiologischerweise verzögert E2A die lymphozytäre Proliferation, bis nach erfolgreicher Rekombination und Präsentation des prä-TCR bzw. des TCR $\alpha\beta$  die E2A-Aktivität durch Rezeptor-vermittelte

Signale reduziert wird und die Zellen in die nächste Phase der Differenzierung eintreten können (Bain et al., 2001). Dementsprechend ist bei einer E2A-Defizienz schon im Vorfeld der Lymphomentwicklung eine stärkere Zellzyklusprogression der T-Zellen zu beobachten (Engel und Murre, 2004). E2A-defiziente Zellen können zudem die Kontrollpunkte der T-Zell-Differenzierung trotz unvollständiger Reifung durchlaufen, d. h. es kommt zur Expansion von Zellen mit fehlender Expression des prä-TCR oder TCR $\alpha\beta$  (Engel et al., 2001; Jones und Zhuang, 2007). Die negative Wirkung von E2A auf die Proliferation wird molekular vor allem auf die Repression des Zellzyklusregulators Cdk6 (*cyclin-dependent kinase 6*) und die daraus resultierende Inhibition der Retinoblastom-Protein (Rb)-E2F-Achse zurückgeführt (Schwartz et al., 2006). Ein besonderes Merkmal der Lymphome in E2A-defizienten Mäusen ist zudem die fast durchgehend zu beobachtende Aktivierung des Myc-Onkogens, was auf eine entsprechende Kooperation in der Lymphompathogenese hinweist (Bain et al., 1997). Zusätzlich wurde beschrieben, dass bei E2A-defizienten Lymphomen in der Maus aktivierende Mutationen in Notch1 auftreten, die das maligne Wachstum fördern und als zusätzlicher Schritt in der Tumorentstehung angesehen werden (Reschly et al., 2006). Während ein möglicher Zusammenhang zwischen E2A und MYC im cHL bisher nicht genauer untersucht wurde, lassen sich im Hinblick auf den E2A-Verlust und die Notch-Aktivierung deutliche Parallelen zur Situation in HRS-Zellen erkennen (Jundt et al., 2002a; Köchert et al., 2011).

Inzwischen ist klar geworden, dass nicht nur ein E2A-Verlust, sondern auch eine erhöhte E2A-Aktivität an der Lymphomentstehung beteiligt sein kann. Eine solche Situation findet sich beim humanen Burkitt-Lymphom (BL), das sich von B-Zellen des Keimzentrums ableitet. Das BL ist in einem hohen Prozentsatz durch inaktivierende Mutationen des E2A-Antagonisten ID3 charakterisiert, allein oder in Kombination mit E2A-Mutationen, die die Funktion von E2A verstärken (Richter et al., 2012; Schmitz et al., 2012). Aus diesem Mutationsmuster resultiert daher, im Gegensatz zum cHL, eine gesteigerte E2A-Wirkung, die funktionell zu einer verstärkten Zellzyklusprogression, einer erhöhten Expression von Komponenten des BCR-Komplexes und zu einer Aktivierung des PI3-Kinase-Signalwegs führt (Schmitz et al., 2012). Die Entitäten BL und cHL repräsentieren somit die beiden extremen Varianten einer Störung der E2A-Funktion. In der Zusammenschau verdeutlichen diese Beobachtungen, dass Abweichungen von der physiologischen E2A-Aktivität – sozusagen in beide Richtungen – zur onkogenen Transformation prädisponieren und ein wiederkehrendes Prinzip in der Pathogenese lymphatischer Tumoren darstellen.

### 3.2 Zelluläre Plastizität und Reprogrammierung in der Pathogenese lymphatischer Neoplasien

Die Differenzierungsstörung beim cHL und – etwas geringer ausgeprägt – beim PEL oder ALCL geht weit über das hinaus, was bei anderen Lymphomen oder Leukämien zu beobachten ist. In den meisten Fällen ist die Tumorentstehung im lymphatischen System mit einem Block der Differenzierung verbunden, wobei bis zu einem gewissen Grad Gemeinsamkeiten zwischen der malignen Zellpopulation und den entsprechenden physiologischen Reifungsstufen erhalten bleiben. Eine solche Korrelation ist beim cHL nicht mehr möglich. Die Abweichungen vom B-Zell-Phänotyp haben bei HRS-Zellen solche Ausmaße erreicht, dass man teilweise von einer zellulären Reprogrammierung bzw. Transdifferenzierung sprechen kann. Diese Begriffe wurden ursprünglich für Beobachtungen im Mausmodell geprägt, um die hohe zelluläre Plastizität lymphatischer Zellen nach einer experimentellen Modulation der Aktivität von Linien-spezifischen Transkriptionsfaktoren zu beschreiben. Prominentestes Beispiel ist der *knockout* von Pax5 in B-Zellen, der eine vollständige Umdifferenzierung in Zellen anderer hämatopoetischer Reihen erlaubt (Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999). Die Deletion von Pax5 in reifen B-Zellen führt zu einer Entdifferenzierung zu frühen, nicht Linien-gebundenen Vorläuferzellen, die dann wiederum in andere Reihen (z. B. T-Zellen) ausreifen können und als Zeichen ihrer B-Zell-Abstammung rearrangierte Ig-Gene aufweisen. Bemerkenswerterweise geht dieser Prozess mit der Entwicklung von Lymphomen einher, wobei diese Tumore einen Verlust von B-Zell-Markern zeigen und anhand ihres Genexpressionsprofils als Progenitor-Lymphome eingeordnet werden müssen (Cobaleda et al., 2007a). Ähnliche Veränderungen im Sinne eines erneuten Auftretens multipotenter Eigenschaften finden sich auch bei B-Vorläuferzellen nach *knockout* von E2A, was im Hinblick auf unsere Arbeiten von besonderer Relevanz ist (Ikawa et al., 2004). In der Tat zeigen sich auffällige Gemeinsamkeiten in der Genexpression zwischen E2A-defizienten Zellen im Maussystem und HRS-Zellen. In beiden Fällen findet sich eine verminderte Bildung von B-Zell-Markern, u. a. CD79A/mb-1, CD79B/B29, I $\mu$  und EBF1, sowie eine Expression von B-Zell-fremden Faktoren, wie z. B. TCF1, GATA3, CSF1- und EPO-Rezeptor (Ikawa et al., 2004; Mathas/Janz et al., 2006; Lamprecht et al., 2010). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass es in der Pathogenese des cHL in Analogie zu den beschriebenen Mausmodellen zu einer Instabilität des B-Zell-spezifischen Expressionsprogramms gekommen ist, was sowohl zum Verlust des B-Zell-Phänotyps als auch zur Aktivierung B-Zell-fremder Faktoren und Signalwege geführt hat.

Als alternative Erklärung für den Phänotyp der HRS-Zellen wurde wiederholt eine plasmazelluläre Differenzierung diskutiert, da in der terminalen B-Zell-Entwicklung physiologischerweise zahlreiche typische B-Zell-Marker herunterreguliert werden. Der

Übergang von Keimzentrums-B-Zellen zu Plasmazellen wird durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren kontrolliert, zu dessen Schlüsselkomponenten PAX5, BCL6, IRF4 und BLIMP1 gehören (Nutt et al., 2011). PAX5 und BCL6 sind wesentlich für die Ausprägung des Genexpressionsprogramms von B-Zellen bzw. von Keimzentrums-B-Zellen verantwortlich, während IRF4 und BLIMP1 die Etablierung des Plasmazell-spezifischen Genprofils kontrollieren, wobei sich diese beiden Gruppen von Faktoren gegenseitig antagonistisch beeinflussen. So führt z. B. die Induktion von BLIMP1 zur Suppression zahlreicher B-Zell-assoziiierter Gene, wie *BCL6*, *PAX5*, *ID3*, *CD79A*, *BTK*, *SYK*, *SPIB* und *AICDA*, ein Effekt, der teilweise indirekt auf die Repression von *PAX5* zurückzuführen ist (Shaffer et al., 2002). In Bezug auf diese zentralen Transkriptionsfaktoren zeigt das cHL insofern eine ungewöhnliche Konstellation, als in HRS-Zellen eine gleichzeitige Expression von PAX5 und IRF4 besteht, während BCL6 und BLIMP1 jeweils bei einem Teil der Fälle nachweisbar sind, d. h. es liegt eine Situation vor, die keine klare Zuordnung zu Keimzentrums-B-Zellen oder Plasmazellen erlaubt, aber eindeutig gegen eine vollständige terminale Differenzierung der HRS-Zellen spricht (Buettner et al., 2005; Falini et al., 2000; Foss et al., 1999). Diese Beobachtung wird unterstützt durch genomweite Analysen des Genexpressionsprofils von primären HRS-Zellen im Vergleich zu Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen: HRS-Zellen zeigen einen Verlust des für Keimzentrums-B-Zellen charakteristischen Genexpressionsprofils, ohne dass jedoch signifikant Plasmazell-assoziierte Gene hochreguliert worden sind (Tiacci et al., 2012). Eine ähnliche Situation scheint auch auf der Ebene epigenetischer Modifikationen zu bestehen, da nur geringe Überlappungen im Muster der Histon H3-Acetylierung des Genoms von HL- und Myelomzelllinien bestehen (Seitz et al., 2011). In der Summe sprechen diese Daten gegen eine terminale Differenzierung der HRS-Zellen als Ursache der Auslöschung des B-Zell-assoziierten Genprofils. Nicht ausgeschlossen werden kann allerdings eine sogenannte abortive Plasmazelldifferenzierung, d. h. ein Szenario, bei dem der Phänotyp der HRS-Zellen eine unvollständig abgelaufene Differenzierung in Richtung Plasmazellen widerspiegelt, bei der das Keimzentrumsprogramm bereits weitgehend erloschen ist, ohne dass ein Eintritt in die normale terminale Differenzierung stattgefunden hat (Buettner et al., 2005). Es ist bisher aber weder möglich gewesen, ein physiologisches Stadium zu definieren, das diesem Zustand entsprechen würde, noch könnte dadurch die ausgedehnte Expression B-Zell-fremder Gene erklärt werden. Dies deutet darauf hin, dass das besondere Genprofil von HRS-Zellen weniger durch ein spezifisches Differenzierungsstadium als vielmehr durch Transformations-assoziierte Ereignisse bestimmt wird, die zu einem Block in der B-Zell-Entwicklung bei gleichzeitig gesteigerter zellulärer Plastizität geführt haben.

### 3.3 Der Verlust des B-Zell-Phänotyps und des B-Zell-Rezeptors in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Die Expression eines funktionsfähigen Antigenrezeptors ist die Voraussetzung für das Überleben und die Expansion normaler B-Zellen (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997). In ähnlicher Form scheint diese Aussage auch für einen erheblichen Teil aller malignen B-Zell-Neoplasien zu gelten. Bei den meisten Lymphomentitäten ist, zusammen mit weiteren Merkmalen der B-Zell-Differenzierung, die Expression des BCR weiterhin nachweisbar. Es existieren mehrere Hinweise darauf, dass auch in malignen B-Zellen ein positiver Selektionsdruck für die Präsentation eines Antigenrezeptors besteht: Lymphom-assoziierte Translokationen, an denen die Ig-Loci beteiligt sind, betreffen fast immer das nicht-produktiv rearrangierte Allel, so dass dadurch die Bildung eines BCR nicht beeinträchtigt wird (Küppers und Dalla-Favera, 2001). Zudem zeigen mehrere B-Zell-Lymphome eine anhaltende somatische Hypermutation der variablen Region der Ig-Gene, wie z. B. das folliculäre Lymphom (FL) oder der *germinal center B cell-like* (GCB)-Subtyp des DLBCL. Obwohl durch die fortgesetzte Einführung von Mutationen ein substantielles Risiko für eine Inaktivierung der Ig-Gene besteht, bleibt auch bei diesen Entitäten die Expression des Antigenrezeptors erhalten (Küppers, 2005). Ein weiteres Argument für eine aktive Rolle BCR-assoziiierter Signale in der Lymphompathogenese ergibt sich aus Beobachtungen beim ABC-Subtyp des DLBCL: Experimentell ist das Überleben dieser Lymphomzellen abhängig von der Expression des Antigenrezeptors und BCR-assoziiierter Signaltransduktionsmoleküle. Darüber hinaus finden sich Mutationen im Immunrezeptor-Tyrosinkinase-Motiv (ITAM) der BCR-Untereinheiten CD79A und CD79B, die zu einer verstärkten Oberflächenexpression des BCR führen (Davis et al., 2010). Daraus resultiert im Zusammenspiel mit weiteren Mutationen eine Aktivierung BCR-abhängiger Signalwege, insbesondere von NF- $\kappa$ B, die als *chronic active BCR signaling* bezeichnet wird (Staudt, 2010). Eine ähnliche, wenngleich nicht identische Konstellation findet sich im BL, das ebenfalls eine Abhängigkeit von BCR-vermittelten Signalen zeigt (Schmitz et al., 2012). Ein wichtiger Mechanismus ist dabei die durch E2A vermittelte Verstärkung BCR-induzierter Signale, wobei in diesem Fall eine erhöhte Aktivität des PI3-Kinase-Signalwegs im Vordergrund steht, was Ähnlichkeiten zur Signalübertragung in ruhenden reifen B-Zellen und damit zum sogenannten *tonic BCR signaling* aufweist (Srinivasan et al., 2009).

Diese Befunde stehen in starkem Kontrast zur Situation im cHL, wo es zu einem kompletten Verlust der Expression des BCR und BCR-assoziiierter Signalmoleküle gekommen ist (Schwering et al., 2003), d. h. ein grundlegendes Prinzip der Hodgkin-Pathogenese muss die Aktivierung molekularer Mechanismen sein, die es BCR-negativen B-Lymphozyten erlauben zu überleben und zu expandieren (Küppers, 2009; Küppers und Rajewsky, 1998). Im Fall

EBV-positiver cHL-Fälle ist es denkbar, dass der Verlust des Antigenrezeptors durch BCR-äquivalente Signalkaskaden kompensiert wird. Das EBV-kodierte Membranprotein LMP2A kann Funktionen des BCR simulieren und BCR-defiziente Keimzentrums-B-Zellen vor Apoptose schützen, wodurch sie von physiologischen Überlebenssignalen unabhängig werden (Bechtel et al., 2005; Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005). Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung, dass eine positive Korrelation zwischen dem Vorliegen von inaktivierenden Mutationen der Ig-Gene und dem Nachweis von EBV in HRS-Zellen besteht (Bräuninger et al., 2006). Betrachtet man die komplexen Veränderungen des Hodgkin-Phänotyps in ihrer Gesamtheit, ergibt sich allerdings ein Bild, dass über die Rettung BCR-negativer Vorläuferzellen durch BCR-ähnliche Signale hinausgeht: In diesem Szenario durchbricht die zelluläre Reprogrammierung der HRS-Zellen die Abhängigkeit von BCR-vermittelten Stimuli und ermöglicht durch die Induktion B-Linien-fremder Gene die Nutzung alternativer Überlebenssignalwege (Janz et al., 2006a). Beispiele für derartige Wachstumssignale, die B-Zellen ansonsten nicht oder nur eingeschränkt zur Verfügung stehen und erst im Laufe der Hodgkin-Pathogenese aktiviert werden, sind die Expression der Rezeptoren für RANK-Ligand (*receptor activator of nuclear factor-kappa B*), IL-13 oder CSF1 (*colony stimulating factor 1*) (Fiumara et al., 2001; Lamprecht et al., 2010; Skinnider et al., 2001). Der CSF1-Rezeptor, der zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) gehört, wird normalerweise nur in myeloischen Zellen exprimiert und ist ein zentraler Faktor für das Wachstum und die Differenzierung von Monozyten und Makrophagen (Pixley und Stanley, 2004). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in HRS-Zellen eine hohe Expression sowohl des CSF1-Rezeptors als auch seines Liganden CSF1 besteht und dass die konstitutive CSF1R-Aktivierung für das Überleben von Hodgkin-Zellen notwendig ist (Lamprecht et al., 2010). Über den CSF1R hinaus existieren noch weitere Beispiele für eine Überexpression von RTK in HRS-Zellen, darunter PDGFRA, DDR2, EPHB1, RON, TRKA und TRKB (Renné et al., 2005). Für diese Rezeptoren wurde außerdem gezeigt, dass sie gehäuft in EBV-negativen Hodgkin-Fällen exprimiert werden, was zu der Überlegung geführt hat, dass eine hohe RTK-Aktivität zumindest teilweise die Funktion von EBV in HRS-Zellen ersetzen könnte (Renné et al., 2007). Diese Befunde lassen vermuten, dass die pharmakologische Hemmung von RTK beim cHL als therapeutisches Prinzip nutzbar sein könnte. In der Tat konnten wir zeigen, dass eine Behandlung von Hodgkin-Zelllinien mit dem Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib Apoptose induziert und die Empfindlichkeit gegenüber konventionellen Zytostatika erhöht (Ullrich et al., 2011). Nur unvollständig verstanden ist die funktionelle Bedeutung T-Zell-assoziiierter Transkriptionsfaktoren im cHL, einschließlich TCF1, GATA3 und T-BET (Mathas/Janz et al., 2006). TCF1 ist beispielsweise Bestandteil des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs, der insbesondere für die proliferative Expansion in der frühen T-Zell-Entwicklung essentiell ist (Rothenberg und Taghon, 2005), während

seine Rolle im cHL experimentell noch nicht untersucht wurde. Für GATA3 konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor die Expression der typischerweise im cHL exprimierten Faktoren IL-5, IL-13 und STAT4 induziert (Stanelle et al., 2010). Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass B-Zell-fremde Transkriptionsfaktoren in HRS-Zellen T-Zell- und NK-Zell-assoziierte Zytokin-Systeme aktivieren können, die normalerweise von B-Zellen nicht genutzt werden. Wir haben als Beispiel für diesen Mechanismus in neueren Arbeiten eine Überexpression der IL-15-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowie des Liganden IL-15 im cHL identifiziert (unveröffentlichte Ergebnisse), die eigentlich von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von NK-Zellen und CD8-positiven Gedächtnis-T-Zellen sind (Kennedy et al., 2000; Lodolce et al., 1998).

Die Existenz EBV-positiver und EBV-negativer Hodgkin-Fälle weist auf Unterschiede in der Pathogenese dieser Subtypen hin. Allerdings muss es sich dabei nicht um einander ausschließende Mechanismen handeln. Vielmehr könnten diese Pathogenesewege starke Gemeinsamkeiten aufweisen, was letztendlich in einen gemeinsamen Phänotyp einmündet. Beispielsweise ist beschrieben worden, dass eine Infektion mit EBV die Expression von ABF1 und ID2 induziert (Massari et al., 1998; Portis et al., 2003) und LMP1 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B- und AP1-Faktoren bewirkt (Eliopoulos und Young, 1998; Laherty et al., 1992), so dass auf unterschiedlichen Wegen gleiche Charakteristika des Hodgkin-Phänotyps entstehen könnten. Diese Annahme wird durch genomweite Expressionsanalysen von primären HRS-Zellen gestützt, bei denen nur geringe Unterschiede im Expressionsprofil EBV-positiver und EBV-negativer Hodgkin-Fälle beobachtet wurden (Tiacci et al., 2012).

### **3.4 ATF/CREB-Transkriptionsfaktoren in der Tumorbilogie des klassischen Hodgkin-Lymphoms und des anaplastischen großzelligen Lymphoms**

Zusätzlich zum ungewöhnlichen Expressionsmuster hämatopoetischer Marker ist das zweite herausragende Merkmal der HRS-Zellen ihr hoher Aktivierungszustand. Dies geht einher mit der Expression von Aktivierungsmarkern und einer ausgeprägten Zytokin-Produktion, was sich morphologisch durch das Umgebungsinfiltrat und klinisch durch die B-Symptomatik manifestiert. Ein wesentlicher Teil dieses Phänotyps dürfte auf die hohe konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität und die Induktion von NF- $\kappa$ B-Zielgenen, wie z. B. Lymphotoxin  $\alpha$ , TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  und IL-6, zurückzuführen sein (Hinz et al., 2002). HRS-Zellen sind allerdings noch durch zwei weitere Gruppen von Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet, die typischerweise mit einer starken zellulären Aktivierung in Verbindung gebracht werden: AP1- und ATF/CREB-Proteine. Beide Gruppen gehören zu den bZIP-Proteinen und werden aufgrund ihrer engen Verwandtschaft und zahlreichen Interaktionen gelegentlich zu einer Klasse

zusammengefasst (Hess et al., 2004). Die konstitutive AP1-Aktivität in HRS-Zellen wird von cJUN, JUNB und JUND gebildet, während aus der ATF/CREB-Familie die Faktoren BATF, BATF3 und ATF3 hoch exprimiert werden (Janz et al., 2006b; Küppers et al., 2003; Mathas et al., 2002 und siehe 2.2). Bemerkenswerterweise findet sich in den Tumorzellen des ALCL, das sich von T-Zellen ableitet, eine sehr ähnliche molekulare Konstellation: auch hier besteht eine starke konstitutive AP1-Aktivität, die sich vorwiegend aus FRA2- und JUNB-Proteinen zusammensetzt, in Kombination mit einer hohen Expression aller ebenfalls in HRS-Zellen überexprimierten ATF-Faktoren (Janz et al., 2006b; Mathas et al., 2009 und unveröffentlichte Ergebnisse).

Wir konnten erstmals die selektive Expression von ATF3 in Zellen des cHL und des ALCL demonstrieren und eine Beteiligung von ATF3 am Wachstum und Überleben von HRS-Zellen nachweisen (Janz et al., 2006b). Die Ursachen der ATF3-Aktivierung sowie die genauen Mechanismen der ATF3-Wirkung sind noch unklar, doch gibt es eine Reihe interessanter Ansatzpunkte: ATF3 wird durch mitogene Stimuli induziert, vor allem über den JNK- oder MAPK-Signalweg und die damit einhergehende Bindung von cJUN/ATF2-Komplexen am ATF3-Promotor (Cai et al., 2000; Hai et al., 1999). Darüber hinaus ist ATF3 sowohl ein Zielgen von MYC als auch gleichzeitig ein wichtiger Vermittler der proliferationsfördernden Funktionen von MYC (Tamura et al., 2005). Im Hinblick auf die gemeinsame Expression von ATF3 mit JUN-Proteinen im cHL und ALCL ist hervorzuheben, dass die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren, vermittelt über die Induktion von HSP27 und die Aktivierung der Proteinkinase AKT, in neuronalen Zellen stark anti-apoptotisch wirken kann (Nakagomi et al., 2003). Ein weiteres Beispiel für die Zusammenarbeit von ATF- und AP1-Faktoren ist die gemeinsam vermittelte Expression des Zytokins RANTES in monozytären Zellen, das ebenfalls stark in HRS-Zellen exprimiert wird (Boehlk et al., 2000; Fischer et al., 2003). Zusätzlich kann ATF3 direkt oder indirekt mit NF- $\kappa$ B interagieren, wobei sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen beschrieben wurden (Gilchrist et al., 2006; Kaszubska et al., 1993). Inwieweit die aufgeführten zellbiologischen Funktionen von ATF3 auf das cHL und das ALCL übertragen werden können, ist zurzeit noch unklar. Perspektivisch wird es von besonderem Interesse sein, die Interaktionen der ATF/CREB-Faktoren untereinander sowie mit Mitgliedern der AP1- und NF- $\kappa$ B-Familie zu charakterisieren und die daraus resultierenden Effekte für die Proliferation, die Apoptoseresistenz und den aktivierten Phänotyp von lymphatischen Tumorzellen zu bestimmen.

### 3.5 Neue therapeutische Ansätze für die Behandlung lymphatischer Malignome

Die Therapiemöglichkeiten für das cHL haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte durch die Einführung und Weiterentwicklung von Polychemotherapie und Bestrahlung erheblich verbessert. In kontrollierten klinischen Studien können heute komplette Remissions- und Heilungsraten von über 80% erzielt werden (Evens et al., 2008). Trotz der beachtlichen Erfolge bleiben zwei grundlegende Probleme bestehen: (1) Es existiert weiterhin eine Gruppe von Patienten, bei denen es zu einem therapierefraktären Verlauf oder zu einem Rezidiv der Erkrankung kommt. Dies betrifft nicht nur vor allem die fortgeschrittenen Stadien, sondern auch Hodgkin-Fälle im Alter von über 60 Jahren (Halbsguth et al., 2011; Mender und Friedberg, 2009). (2) Die bisherigen Behandlungsstrategien für das cHL sind mit einer nicht unerheblichen Langzeittoxizität verbunden. Dazu zählt insbesondere ein erhöhtes Risiko für sekundäre Malignome, einschließlich akuter myeloischer Leukämien und solider Tumoren (Dores et al., 2002; Hodgson et al., 2007; Schonfeld et al., 2006). Darüber hinaus finden sich gehäuft kardiovaskuläre Erkrankungen (Aleman et al., 2007), Schilddrüsenfunktionsstörungen (Illes et al., 2003) und Infertilität (Behringer et al., 2013). Diese Probleme bekommen eine besondere Relevanz durch die Tatsache, dass das cHL in einem hohen Prozentsatz junge Patienten betrifft. Neue therapeutische Ansätze müssen daher darauf abzielen, sowohl wirksame Substanzen bzw. Behandlungsschemata für refraktäre oder rezidierte cHL-Fälle zu identifizieren als auch die Toxizität bisheriger Strategien zu reduzieren.

Mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung derartiger Therapiekonzepte sind der Einsatz von Antikörpern gegen Zielstrukturen auf HRS-Zellen, die Blockade zentraler intrazellulärer Signalwege sowie die Hemmung von Interaktionen zwischen Tumorzellen und Microenvironment (Boll et al., 2010; Younes, 2009). Im Hinblick auf die Beeinflussung Zell-intrinsischer Mechanismen des Tumorwachstums haben wir verschiedene Strategien getestet: zum einen die pharmakologisch induzierte Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch den MDM2-Inhibitor Nutlin-3, zum anderen die Inhibition des Hitzeschock-Proteins HSP90, das für die Aktivität mehrerer intrazellulärer Signalwege, insbesondere des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, essentiell ist (Janz et al., 2007). Unsere Untersuchungen mit Nutlin-3 zeigten, dass Hodgkin-Zelllinien mit Wildtyp-p53 auf eine Induktion von p53 mit Apoptose ansprechen und dass die Verwendung von Nutlin-3 eine Dosisreduktion konventioneller Zytostatika *in vitro* ermöglicht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine nicht-genotoxische Aktivierung des p53-Signalwegs prinzipiell ein zusätzliches therapeutisches Prinzip darstellen könnte, um den Einsatz genotoxisch wirkender Substanzen zu verringern. Zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings die klinische Anwendbarkeit noch nicht abzuschätzen, nicht zuletzt im Hinblick auf die mögliche Toxizität einer generalisierten p53-Aktivierung im Organismus, insbesondere

bei Kombination mit konventioneller Chemotherapie (Check et al., 2011). Zusätzlich ist zu beachten, dass die Untersuchungen unserer und anderer Gruppen darauf hingewiesen haben, dass Veränderungen im *p53*-Gen beim cHL – zumindest in fortgeschrittenen Stadien, von denen sich die etablierten Zelllinien-Modelle ableiten – doch häufiger sein könnten als in früheren Arbeiten angenommen wurde (Drakos et al., 2007; Feuerborn et al., 2006; Janz et al., 2007). Diese Befunde in Kombination mit dem ungewöhnlichen Muster der *p53*-Inaktivierung (Deletionen statt Punktmutationen) und der ausgeprägten genetischen Instabilität im cHL zeigen, dass weitere grundlegende Untersuchungen zur Funktion des *p53*-Systems in HRS-Zellen notwendig sein werden.

Da ein breites Spektrum von lymphatischen Neoplasien durch eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung charakterisiert ist, stellt die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs einen vieldiskutierten Ansatz zur Behandlung dieser Entitäten dar. Die experimentellen Daten zur NF- $\kappa$ B-Inhibition beim cHL unterstützen eine prinzipielle Anwendbarkeit dieses therapeutischen Prinzips. Beispiele für getestete Substanzen sind Arsen (Mathas et al., 2003), Bortezomib (Zheng et al., 2004), Geldanamycin (Broemer et al., 2004; Janz et al., 2007), DHMEQ (Watanabe et al., 2007), Curcumin (Mackenzie et al., 2008b), Procyanidin B2 (Mackenzie et al., 2008a) sowie der HSP90-Inhibitor BIIB021 (Boll et al., 2009), die alle, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, das Überleben und/oder das Wachstum von Hodgkin-Zelllinien hemmen. Allerdings scheint die Situation *in vivo* komplexer zu sein als durch Untersuchungen *in vitro* zu erwarten ist. Diese Problematik wird verdeutlicht durch die unterschiedliche klinische Wirksamkeit des Proteasom-Inhibitors Bortezomib beim cHL und MM. Für Bortezomib wird postuliert, dass seine Effekte teilweise auf einem verzögerten proteosomalen Abbau und einer Stabilisierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B beruhen (Palombella et al., 1998). Obwohl bei beiden Entitäten eine konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung beschrieben wurde (Annunziata et al., 2007; Bargou et al., 1997; Keats et al., 2007), spricht das MM auf Bortezomib gut an, während beim cHL in den bisherigen Studien keine oder allenfalls eine minimale Wirksamkeit beobachtet wurde (Trelle et al., 2007; Younes et al., 2006). Eine solche Diskrepanz kann theoretisch auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein: auf Unterschiede im Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Wirkung (unterschiedlich beeinflussbare Ursachen und Folgen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung), auf Unterschiede in der Interaktion verschiedener Signalwege (Kompensationsmöglichkeiten durch andere Überlebenssignale) oder auf ein unvollständiges Verständnis der Wirkmechanismen der eingesetzten Substanzen (zusätzliche, bisher unerkannt oder unterschätzt gebliebene Wirkungen auf andere zelluläre Zielstrukturen). In der Tat ist deutlich geworden, dass die außergewöhnliche Wirksamkeit von Proteasom-Inhibitoren beim MM vermutlich nicht in erster Linie auf eine NF- $\kappa$ B-Inhibition, sondern auf die starke Akkumulation fehlerhaft gefalteter Proteine und die damit verbundene Auslösung einer endoplasmatischen Stressantwort zurückzuführen ist –

ein Mechanismus, für den Myelomzellen aufgrund ihrer hohen Ig-Produktion besonders anfällig sind und der beim cHL in dieser Form nicht existiert (Obeng et al., 2006). Zusätzlich ist gerade beim cHL, das durch eine starke Aktivierung mehrerer mitogener und anti-apoptotischer Signalwege sowie zahlreiche Interaktionen mit dem Microenvironment charakterisiert ist, sehr gut denkbar, dass bei Anwendung einer einzelnen Substanz und der prädominanten Hemmung einer Signalkaskade, z. B. von NF- $\kappa$ B, alternative Signale als Kompensationsmechanismen greifen können. Letztendlich unterstreichen diese Beobachtungen, dass eine sehr genaue Kenntnis der molekularen Tumorphogenese sowie der Wirkmechanismen eingesetzter Inhibitoren eine entscheidende Voraussetzung für die rationale und erfolgreiche Entwicklung gezielter therapeutischer Strategien bildet, wenn man über das Prinzip von „Versuch und Irrtum“ hinauskommen möchte.

Im Hinblick auf die molekulare Pathogenese des MM und daraus ableitbare neue Behandlungsmöglichkeiten haben wir als Ausgangspunkt unserer Arbeiten die Beobachtung genutzt, dass Myelomzellen in besonderem Maße von Wachstums- und Überlebenssignalen des Microenvironments abhängig sind. Basierend auf Expressionsdaten, die nach Stimulation von Myelomzellen mit wichtigen Zytokinen des Knochenmarkmilieus gewonnen wurden, konnten wir eine umschriebene Gruppe von Genen identifizieren, die konsistent unter allen Bedingungen induziert wurden und für die dementsprechend eine zentrale Rolle in der Antwort maligner Plasmazellen auf externe Signale angenommen werden kann. Die zugrunde liegende Überlegung war dabei, dass es für therapeutische Interventionen effektiver sein könnte, direkt diese Schlüsselfaktoren zu beeinflussen als einzelne Zytokine oder redundant aktivierbare Signalwege zu inhibieren. Unter den identifizierten Kandidatengen stach die Serin/Threonin-Kinase SGK1 hervor, die mitogen und anti-apoptotisch wirken kann und Bestandteil des PI3-Kinase/AKT-Signalwegs ist, für den bereits eine herausgehobene Bedeutung für das maligne Wachstum von Plasmazellen beschrieben worden war (Catlett-Falcone et al., 1999; Mitsiades et al., 2007). Unsere zell- und molekularbiologischen Arbeiten zeigten, dass die Ausschaltung von SGK1 durch RNA-Interferenz zu einer Hemmung der Proliferation und des Überlebens von Myelomzellen führt, wobei dies mit einer verminderten Expression von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4, CDK6) bzw. einer vermehrten Expression von Zellzyklusinhibitoren (CDKN1A/p21, CDKN1B/p27) korrelierte (Fagerli et al., 2011). Weiterführende Arbeiten werden zeigen, ob eine Inhibition von SGK1 durch pharmakologische Substanzen in der Tat als therapeutisches Prinzip beim MM in Frage kommt.

### 3.6 Ausblick: Mausmodelle für die Analyse onkogener Defekte *in vivo*

Trotz erheblicher Fortschritte ist die Komplexität der Lymphomentstehung, insbesondere das Zusammenwirken einzelner molekularer Defekte *in vivo*, weiterhin nur unvollständig verstanden. Daher wird ein Hauptthema meiner weiteren Arbeit die Generierung von Mausmodellen sein, in denen zentrale Schritte der Lymphompathogenese *in vivo* nachvollzogen werden können. In diesen Modellen sollen definierte molekulare Defekte im Hinblick auf ihre Bedeutung für Proliferation, Apoptoseresistenz und Störung der zellulären Differenzierung charakterisiert werden, wobei insbesondere die Interaktion verschiedener Signalwege und Transkriptionsfaktoren im Verlauf der malignen Transformation analysiert werden soll. Mittel- und langfristig sollen dadurch verbesserte, klinisch stärker relevante Modelle humaner Lymphome entwickelt werden, um die Identifizierung und Charakterisierung von Zielstrukturen für therapeutische Ansätze zu ermöglichen. Für das cHL sind diese Überlegungen besonders bedeutsam, da funktionelle Untersuchungen an primären Tumorzellen aufgrund ihrer geringen Anzahl im betroffenen Gewebe nicht durchführbar sind (und – soweit absehbar – auch in Zukunft sehr problematisch bleiben dürften). Die Arbeiten an transgenen Mausmodellen wurden bereits als Kooperation mit dem Labor von Prof. Klaus Rajewsky am Immune Disease Institute in Boston begonnen und werden jetzt, nach dem Wechsel seiner Arbeitsgruppe an das Max-Delbrück-Centrum in Berlin-Buch, in enger räumlicher und inhaltlicher Zusammenarbeit weitergeführt. Experimentell nutzen wir transgene Techniken, durch die Lymphom-relevante Gene gezielt in definierten Entwicklungsstadien lymphatischer Zellen der Maus aktiviert werden können. Dafür werden cDNAs für Lymphom-assoziierte Faktoren durch homologe Rekombination in das Genom der Maus eingebracht, wobei eine vorgeschaltete, von LoxP-Motiven flankierte Stopp-Sequenz durch Cre-vermittelte Rekombination nach Kreuzung mit ausgewählten Cre-Mausstämmen entfernt wird (z. B. spezifische Aktivierung in B-Zellen mit CD19-Cre, in Keimzentrum-B-Zellen mit  $\text{C}\gamma 1$ -Cre oder in T-Zellen mit CD4-Cre) (Casola et al., 2006; Lee et al., 2001; Rickert et al., 1997). Im Hinblick auf das cHL sind für die maligne Proliferation und den aktivierten Phänotyp insbesondere der NF- $\kappa$ B-Signalweg, die Mitglieder der AP1- und ATF/CREB-Familie und die EBV-Faktoren LMP1/LMP2A von Interesse, während für die Frage nach der gestörten Differenzierung und Reprogrammierung vor allem die E2A-Antagonisten ID2 und ABF1 sowie NOTCH relevant sind. Die Austestung der genannten Faktoren einzeln und in Kombination wird es erlauben, sich systematisch einem Tumormodell für das cHL anzunähern. Durch diesen experimentellen Ansatz kann der Prozess der Tumorentstehung detailliert *in vivo* untersucht werden: Welche Faktoren sind entscheidend für die Zellzyklusprogression und Apoptoseresistenz? Welche molekularen Mechanismen steuern die Differenzierungsstörung von HRS-Zellen und welche funktionellen

Konsequenzen resultieren aus dem Verlust des B-Zell-Programms bzw. der Induktion B-Zell-fremder Gene? Welche zusätzlichen genetischen und epigenetischen Veränderungen sind im Verlauf der Tumorentstehung notwendig für die vollständige Ausbildung und Progression des malignen Phänotyps? Die *in vivo* Modelle werden die Grundlage für eingehende zell- und molekularbiologische Untersuchungen bilden, einschließlich der Analyse von Signalwegen, Transkriptionsfaktoraktivitäten, genetischen und epigenetischen Defekten sowie für die Testung pharmakologischer Substanzen. Da ein großer Teil der oben genannten molekularen Defekte nicht nur beim cHL, sondern auch bei anderen Lymphomen oder Leukämien auftritt (erinnert sei an die konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivierung beim DLBCL und MM, die Überexpression von AP1/ATF-Faktoren beim ALCL sowie die reduzierte oder veränderte E2A-Aktivität beim PEL, ALCL, Sézary-Syndrom und B- und T-ALLs), können wir ihre Relevanz für die Lymphom- bzw. Leukämiepathogenese auch in einem breiteren Kontext und in unterschiedlichen Modellsystemen untersuchen. Dies wird dazu beitragen, sowohl gemeinsame Prinzipien als auch krankheitsspezifische Unterschiede in der Pathogenese lymphatischer Neoplasien zu erkennen.

## 4. Zusammenfassung

Thema der hier beschriebenen Arbeiten ist die molekulare Pathogenese reifer B-Zell-Neoplasien. Den Schwerpunkt bilden Untersuchungen zu den Ursachen und Konsequenzen einer veränderten Aktivität von Transkriptionsfaktoren im Zuge der malignen Transformation. Ein großer Teil der Untersuchungen wurde am klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) durchgeführt, das aufgrund seiner vielseitigen molekularen Veränderungen ein ausgezeichnetes Modellsystem für die grundsätzliche Analyse onkogener Veränderungen im lymphatischen System darstellt. Dies gilt insbesondere für die Frage nach dem Zusammenhang zwischen gestörter Differenzierung und Lymphomentstehung. In offensichtlichem Widerspruch zu ihrer genetisch nachweisbaren Abstammung von Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums-B-Lymphozyten zeigen Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen einen weitgehenden Verlust des B-Zell-Phänotyps, einschließlich des B-Zell-Rezeptors und nachgeschalteter Signalkomponenten (Kanzler et al., 1996; Schwering et al., 2003). Darüber hinaus exprimieren HRS-Zellen eine Vielzahl von Markern anderer hämatopoetischer Differenzierungsrichtungen, so dass sich in der Summe ein Expressionsprofil ergibt, das Merkmale einer teilweisen zellulären Reprogrammierung bzw. Transdifferenzierung der Tumorzellen besitzt (Küppers et al., 2012). Ausgehend von einer detaillierten Analyse B-Zell-assoziiierter Transkriptionsfaktoren in HRS-Zellen konnten wir als zentrale Ursache dieses Phänomens eine funktionelle Störung des E-Proteins E2A identifizieren, das eine essentielle Rolle in der physiologischen Entwicklung von B- und T-Lymphozyten spielt (Janz et al., 2006a; Mathas/Janz et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor E2A wird in HRS-Zellen durch die hohe Expression der antagonistisch wirkenden Faktoren ID2 und ABF1 blockiert. Während die DNA-Bindungsaktivität an E2A-Zielsequenzen in normalen B-Zellen von E2A-Homodimeren gebildet wird, weisen HRS-Zellen eine vollständig veränderte E-Protein-Aktivität in Form von E2A-ABF1-Heterodimeren auf. Dies führt einerseits zur Inhibition B-Zell-spezifischer Gene, wie z. B. *CD19*, *CD79A*, *OCT2*, *EBF1* und *AICDA*, und ist andererseits an der Induktion B-Zell-fremder Gene, u. a. der T-Zell-typischen Transkriptionsfaktoren TCF1 und GATA3 oder des Makrophagen-spezifischen CSF1-Rezeptors, beteiligt. Unsere Daten weisen darauf hin, dass unter speziellen Bedingungen im humanen System eine ähnliche zelluläre Plastizität auftreten kann, wie sie zuvor in Mausmodellen nach Deletion Linien-spezifischer Transkriptionsfaktoren beobachtet wurde. In der Maus ist dieses Phänomen exemplarisch für Pax5- und E2A-defiziente B-Vorläuferzellen beschrieben worden, in denen es zur Expression von Genen verschiedenster hämatopoetischer Differenzierungsrichtungen kommt, was mit dem Auftreten eines multipotenten Entwicklungspotentials korreliert und mit einer verstärkten malignen Entartung dieser Zellen einhergeht (Bain et al., 1997; Cobaleda et al., 2007a; Ikawa et al., 2004; Nutt et

al., 1999). Tumorbilologisch betrachtet, eröfönnen sich für HRS-Zellen aus der Abweichung vom B-Zell-typischen Expressionsprofil (*lineage infidelity*) alternative Wachstums- und Überlebenssignale, die normalen B-Zellen nicht zur Verfügung stehen und zum B-Zell-Rezeptor-unabhängigen Tumorwachstum beitragen (Janz et al., 2006a; Lamprecht et al., 2010; Ullrich et al., 2011). Weitere Arbeiten unserer Gruppe zeigten, dass eine funktionelle Hemmung der E2A-Aktivität nicht auf das cHL begrenzt ist, sondern auch bei anderen Lymphomen zu finden ist, die als gemeinsames Charakteristikum eine Abweichung vom normalen Linien-spezifischen Expressionsprogramm aufweisen. Dies gilt z. B. für das primäre Effusionslymphom (PEL), das sich von reifen B-Zellen ableitet, oder – als Beispiel im T-Zell-System – für das anaplastische großzellige Lymphom (*anaplastic large cell lymphoma*, ALCL) (Lietz et al., 2007; Mathas et al., 2009). Unsere Ergebnisse ergänzen Befunde, die eine E2A-Inhibition bei der T-ALL, eine E2A-Beteiligung an der t(1;19) oder t(17;19) Translokation bei der B-ALL sowie eine verstärkte E2A-Funktion beim Burkitt-Lymphom beschrieben haben (O'Neil und Look, 2007; O'Neil et al., 2004; Schmitz et al., 2012; Richter et al., 2012). In ihrer Gesamtheit zeigen diese Beobachtungen, dass Abweichungen von der physiologischen E2A-Aktivität eng mit der malignen Transformation lymphatischer Zellen verbunden sind und ein wiederkehrendes, häufiges Prinzip in der Pathogenese lymphatischer Tumoren darstellen.

Neben Störungen des Differenzierungsprozesses bilden unkontrollierte Proliferations- und Überlebenssignale ein weiteres Hauptmerkmal der onkogenen Transformation. Bezogen auf die Pathogenese des cHL spielen dabei insbesondere der NF- $\kappa$ B-, AP1- und JAK/STAT-Signalweg eine herausgehobene Rolle (Küppers, 2009). Wir konnten mit der Familie der ATF/CREB-Faktoren eine zusätzliche Gruppe von Transkriptionsfaktoren identifizieren, die sowohl beim cHL als auch beim ALCL stark exprimiert werden. Hierzu zählen nicht nur wie bereits von uns publiziert ATF3 (Janz et al., 2006b), sondern auch BATF und BATF3 (Janz, unveröffentlichte Ergebnisse). Besonderes Interesse kommt diesen Proteinen durch ihre Interaktionen mit AP1-Faktoren zu. Die Analyse dieser Wechselwirkungen wird ein Thema zukünftiger Arbeiten sein wird, um die daraus resultierenden Effekte für das Wachstum, die Apoptoseresistenz und den aktivierten Phänotyp von lymphatischen Tumorzellen zu bestimmen.

Mittel- und langfristiges Ziel unserer Arbeiten ist es, die Grundlagen für neue Therapieformen zu entwickeln. Dabei besteht beim cHL die besondere Herausforderung darin, einerseits Behandlungsstrategien für therapieresistente oder rezidierte Fälle zu entwickeln sowie andererseits die Toxizität bestehender Therapieschemata zu senken. Unsere Arbeiten zielen darauf ab, molekulare Defekte im cHL als Ansatzpunkte für neue Therapien zu identifizieren. Experimentelle Beispiele hierfür sind die Inhibition von molekularen Chaperonen wie HSP90 mit der daraus resultierenden Hemmung intrazellulärer Signalwege, insbesondere der NF-

$\kappa$ B-Signaltransduktion, sowie die pharmakologische Beeinflussung der p53-Antwort (Janz et al., 2007). Im Hinblick auf das Multiple Myelom konzentrieren sich unsere Untersuchungen auf intrazelluläre Signale, die aus der Interaktion zwischen malignen Plasmazellen und dem Tumor-Microenvironment resultieren. In diesem Zusammenhang konnten wir die durch zahlreiche Wachstumsfaktoren des Knochenmarks induzierte Serin/Threonin-Kinase SGK1 identifizieren, die wichtige Wachstumssignale für Myelomzellen vermittelt und daher ein vielversprechendes Kandidatengenen für eine pharmakologische Intervention darstellt (Fagerli et al., 2011).

## 5. Literaturverzeichnis

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., Jacobsen, S. E. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.

Agata, Y., Tamaki, N., Sakamoto, S., Ikawa, T., Masuda, K., Kawamoto, H., Murre, C. (2007). Regulation of T cell receptor beta gene rearrangements and allelic exclusion by the helix-loop-helix protein, E47. *Immunity* 27, 871-884.

Aleman, B. M., van den Belt-Dusebout, A. W., De Bruin, M. L., van 't Veer, M. B., Baaijens, M. H., de Boer, J. P., Hart, A. A., Klokman, W. J., Kuenen, M. A., Ouwens, G. M., Bartelink, H., van Leeuwen, F. E. (2007). Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood* 109, 1878-1886.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.

Ammerpohl, O., Haake, A., Pellissery, S., Giefing, M., Richter, J., Balint, B., Kulis, M., Le, J., Bibikova, M., Drexler, H. G., Seifert, M., Shaknovic, R., Korn, B., Küppers, R., Martin-Subero, J. I., Siebert, R. (2012). Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. *Leukemia* 26, 185-188.

Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., Dave, S., Hurt, E. M., Tan, B., Zhao, H., Stephens, O., Santra, M., Williams, D. R., Dang, L., Barlogie, B., Shaughnessy, J. D., Jr., Kuehl, W. M., Staudt, L. M. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115-130.

Annunziata, C. M., Safiran, Y. J., Irving, S. G., Kasid, U. N., Cossman, J. (2000). Hodgkin disease: pharmacologic intervention of the CD40-NF kappa B pathway by a protease inhibitor. *Blood* 96, 2841-2848.

Arguello, M., Sgarbanti, M., Hernandez, E., Mamane, Y., Sharma, S., Servant, M., Lin, R., Hiscott, J. (2003). Disruption of the B-cell specific transcriptional program in HHV-8 associated primary effusion lymphoma cell lines. *Oncogene* 22, 964-973.

Asano, N., Oshiro, A., Matsuo, K., Kagami, Y., Ishida, F., Suzuki, R., Kinoshita, T., Shimoyama, Y., Tamaru, J., Yoshino, T., Kitamura, K., Fukutani, H., Morishima, Y., Nakamura, S. (2006). Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol* 24, 4626-4633.

Aspland, S. E., Bendall, H. H., Murre, C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* 20, 5708-5717.

Atayar, C., Poppema, S., Blokzijl, T., Harms, G., Boot, M., van den Berg, A. (2005). Expression of the T-cell transcription factors, GATA-3 and T-bet, in the neoplastic cells of Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol* 166, 127-134.

Avet-Loiseau, H., Gerson, F., Magrangeas, F., Minvielle, S., Harousseau, J. L., Bataille, R. (2001). Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 98, 3082-3086.

Bain, G., Cravatt, C. B., Loomans, C., Alberola-Ila, J., Hedrick, S. M., Murre, C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* 2, 165-171.

- Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Volland, J. R., Sharp, L. L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., Murre, C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-4791.
- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.
- Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C., Dörken, B. (1997). Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100, 2961-2969.
- Bargou, R. C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M. Y., Bommert, K., Royer, H. D., Scheidereit, C., Dörken, B. (1996). High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 87, 4340-4347.
- Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C., Küppers, R. (2005). Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* 106, 4345-4350.
- Behringer, K., Mueller, H., Goergen, H., Thielen, I., Eibl, A. D., Stumpf, V., Wessels, C., Wiehlputz, M., Rosenbrock, J., Halbsguth, T., Reiners, K. S., Schober, T., Renno, J. H., von Wolff, M., van der Ven, K., Kuehr, M., Fuchs, M., Diehl, V., Engert, A., Borchmann, P. (2013). Gonadal Function and Fertility in Survivors After Hodgkin Lymphoma Treatment Within the German Hodgkin Study Group HD13 to HD15 Trials. *J Clin Oncol* 31, 231-239.
- Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. (2001). Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5611-5622.
- Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. (2005). Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 23, 6333-6338.
- Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., Shaughnessy, J., Jr. (2005). Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* 106, 296-303.
- Biondi, R. M., Kieloch, A., Currie, R. A., Deak, M., Alessi, D. R. (2001). The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J* 20, 4380-4390.
- Bisping, G., Leo, R., Wenning, D., Dankbar, B., Padro, T., Kropff, M., Scheffold, C., Kroger, M., Mesters, R. M., Berdel, W. E., Kienast, J. (2003). Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood* 101, 2775-2783.
- Boehlk, S., Fessele, S., Mojaat, A., Miyamoto, N. G., Werner, T., Nelson, E. L., Schlondorff, D., Nelson, P. J. (2000). ATF and Jun transcription factors, acting through an Ets/CRE promoter module, mediate lipopolysaccharide inducibility of the chemokine RANTES in monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur J Immunol* 30, 1102-1112.
- Bohle, V., Döring, C., Hansmann, M. L., Küppers, R. (2013). Role of early B-cell factor 1 (EBF1) in Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 27, 671-679.
- Boll, B., Borchmann, P., Diehl, V. (2010). Emerging drugs for Hodgkin's lymphoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 15, 585-595.
- Boll, B., Eltaib, F., Reiners, K. S., von Tresckow, B., Tawadros, S., Simhadri, V. R., Burrows, F. J., Lundgren, K., Hansen, H. P., Engert, A., von Strandmann, E. P. (2009). Heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 (CNF2024) depletes NF-kappaB and sensitizes Hodgkin's lymphoma cells for natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 15, 5108-5116.

- Boos, M. D., Yokota, Y., Eberl, G., Kee, B. L. (2007). Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* **204**, 1119-1130.
- Bräuninger, A., Hansmann, M. L., Strickler, J. G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K., Küppers, R. (1999). Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **340**, 1239-1247.
- Bräuninger, A., Küppers, R., Strickler, J. G., Wacker, H. H., Rajewsky, K., Hansmann, M. L. (1997). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9337-9342.
- Bräuninger, A., Schmitz, R., Bechtel, D., Renné, C., Hansmann, M. L., Küppers, R. (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **118**, 1853-1861.
- Broemer, M., Krappmann, D., Scheidereit, C. (2004). Requirement of Hsp90 activity for I $\kappa$ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- $\kappa$ B activation. *Oncogene* **23**, 5378-5386.
- Brune, V., Tiacchi, E., Pfeil, I., Döring, C., Eckerle, S., van Noesel, C. J., Klapper, W., Falini, B., von Heydebreck, A., Metzler, D., Bräuninger, A., Hansmann, M. L., Küppers, R. (2008). Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med* **205**, 2251-2268.
- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., Greenberg, M. E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* **21**, 952-965.
- Buettner, M., Greiner, A., Avramidou, A., Jack, H. M., Niedobitek, G. (2005). Evidence of abortive plasma cell differentiation in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* **23**, 127-132.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* **22**, 55-79.
- Busslinger, M., Klix, N., Pfeffer, P., Graninger, P. G., Kozmik, Z. (1996). Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6129-6134.
- Cai, Y., Zhang, C., Nawa, T., Aso, T., Tanaka, M., Oshiro, S., Ichijo, H., Kitajima, S. (2000). Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and promoter response element. *Blood* **96**, 2140-2148.
- Calado, D. P., Zhang, B., Srinivasan, L., Sasaki, Y., Seagal, J., Unitt, C., Rodig, S., Kutok, J., Tarakhovskiy, A., Schmidt-Supprian, M., Rajewsky, K. (2010). Constitutive canonical NF- $\kappa$ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell* **18**, 580-589.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**, 405-411.
- Carbone, A., Gloghini, A., Gaidano, G., Franceschi, S., Capello, D., Drexler, H. G., Falini, B., Dalla-Favera, R. (1998). Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. *Blood* **92**, 2220-2228.
- Casola, S., Cattoretti, G., Uyttersprot, N., Koralov, S. B., Seagal, J., Hao, Z., Waisman, A., Egert, A., Ghitza, D., Rajewsky, K. (2006). Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 7396-7401.

- Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C., Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5, 317-327.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., Dalton, W. S., Jove, R. (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115.
- Chaganti, S., Bell, A. I., Pastor, N. B., Milner, A. E., Drayson, M., Gordon, J., Rickinson, A. B. (2005). Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* 106, 4249-4252.
- Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A. C., Harview, C. L., Brunet, J. P., Ahmann, G. J., Adli, M., Anderson, K. C., Ardlie, K. G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P. L., Bernstein, B. E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S. B., Hofmeister, C. C., Jagannath, S., Jakubowiak, A. J., Krishnan, A., Levy, J., Liefeld, T., Lonial, S., Mahan, S., Mfuko, B., Monti, S., Perkins, L. M., Onofrio, R., Pugh, T. J., Rajkumar, S. V., Ramos, A. H., Siegel, D. S., Sivachenko, A., Stewart, A. K., Trudel, S., Vij, R., Voet, D., Winckler, W., Zimmerman, T., Carpten, J., Trent, J., Hahn, W. C., Garraway, L. A., Meyerson, M., Lander, E. S., Getz, G., Golub, T. R. (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471, 467-472.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R. T., Datta, A., Manis, J., Alt, F. W. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv Immunol* 94, 157-214.
- Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T. A., Anderson, K. C. (1996). Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87, 1104-1112.
- Chen, B. P., Liang, G., Whelan, J., Hai, T. (1994). ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 269, 15819-15826.
- Cheek, C. F., Verma, C. S., Baselga, J., Lane, D. P. (2011). Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 25-37.
- Chiarle, R., Voena, C., Ambrogio, C., Piva, R., Inghirami, G. (2008). The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 11-23.
- Chng, W. J., Gonzalez-Paz, N., Price-Troska, T., Jacobus, S., Rajkumar, S. V., Oken, M. M., Kyle, R. A., Henderson, K. J., Van Wier, S., Greipp, P., Van Ness, B., Fonseca, R. (2008). Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Leukemia* 22, 2280-2284.
- Cobaleda, C., Busslinger, M. (2008). Developmental plasticity of lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20, 139-148.
- Cobaleda, C., Jochum, W., Busslinger, M. (2007a). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449, 473-477.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M. (2007b). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8, 463-470.
- Cochrane, S. W., Zhao, Y., Welner, R. S., Sun, X. H. (2009). Balance between Id and E proteins regulates myeloid-versus-lymphoid lineage decisions. *Blood* 113, 1016-1026.
- Compagno, M., Lim, W. K., Grunn, A., Nandula, S. V., Brahmachary, M., Shen, Q., Bertoni, F., Ponzoni, M., Scandurra, M., Califano, A., Bhagat, G., Chadburn, A., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L. (2009). Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459, 717-721.

- Damiano, J. S., Cress, A. E., Hazlehurst, L. A., Shtil, A. A., Dalton, W. S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667.
- Dankbar, B., Padro, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, W. E., Kienast, J. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95, 2630-2636.
- Dave, S. S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Rimsza, L. M., Grogan, T. M., Miller, T. P., LeBlanc, M., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Smeland, E. B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Connors, J. M., Lansdorp, P. M., Ouyang, Q., Lister, T. A., Davies, A. J., Norton, A. J., Müller-Hermelink, H. K., Ott, G., Campo, E., Montserrat, E., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Yang, L., Powell, J., Zhao, H., Goldschmidt, N., Chiorazzi, M., Staudt, L. M. (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 351, 2159-2169.
- Davis, R. E., Ngo, V. N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R. M., Romesser, P. B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., Xu, W., Shaffer, A. L., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Jiang, J. K., Thomas, C. J., Rosenwald, A., Ott, G., Müller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Johnson, N. A., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Wilson, W. H., Delabie, J., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Pierce, S. K., Staudt, L. M. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88-92.
- Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A. B., Young, L. S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 177, 339-349.
- Decker, T., Pasca di Magliano, M., McManus, S., Sun, Q., Bonifer, C., Tagoh, H., Busslinger, M. (2009). Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity* 30, 508-520.
- Demchenko, Y. N., Glebov, O. K., Zingone, A., Keats, J. J., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. (2010). Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood* 115, 3541-3552.
- Dias, S., Mansson, R., Gurbuxani, S., Sigvardsson, M., Kee, B. L. (2008). E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity* 29, 217-227.
- Dores, G. M., Metayer, C., Curtis, R. E., Lynch, C. F., Clarke, E. A., Glimelius, B., Storm, H., Pukkala, E., van Leeuwen, F. E., Holowaty, E. J., Andersson, M., Wiklund, T., Joensuu, T., van't Veer, M. B., Stovall, M., Gospodarowicz, M., Travis, L. B. (2002). Second malignant neoplasms among long-term survivors of Hodgkin's disease: a population-based evaluation over 25 years. *J Clin Oncol* 20, 3484-3494.
- Drakos, E., Thomaidis, A., Medeiros, L. J., Li, J., Leventaki, V., Konopleva, M., Andreeff, M., Rassidakis, G. Z. (2007). Inhibition of p53-murine double minute 2 interaction by nutlin-3A stabilizes p53 and induces cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 13, 3380-3387.
- Ehlers, A., Oker, E., Bentink, S., Lenze, D., Stein, H., Hummel, M. (2008). Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype. *Leukemia* 22, 835-841.
- Eliopoulos, A. G., Young, L. S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16, 1731-1742.
- Eliopoulos, A. G., Young, L. S. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* 11, 435-444.
- Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H. D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., Dörken, B. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of

- NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* **94**, 3129-3134.
- Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haeffker, A., Vry, M. S., Döhner, K., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B. (2003). Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* **201**, 413-420.
- Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R. R., Murre, C. (2001). Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* **194**, 733-745.
- Engel, I., Murre, C. (1999). Ectopic expression of E47 or E12 promotes the death of E2A-deficient lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 996-1001.
- Engel, I., Murre, C. (2004). E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J* **23**, 202-211.
- Enver, T., Greaves, M. (1998). Loops, lineage, and leukemia. *Cell* **94**, 9-12.
- Evens, A. M., Hutchings, M., Diehl, V. (2008). Treatment of Hodgkin lymphoma: the past, present, and future. *Nat Clin Pract Oncol* **5**, 543-556.
- Fagerli, U. M., Ullrich, K., Stühmer, T., Holien, T., Köchert, K., Holt, R. U., Bruland, O., Chatterjee, M., Nogai, H., Lenz, G., Shaughnessy, J. D., Jr., Mathas, S., Sundan, A., Bargou, R. C., Dörken, B., Børset, M., Janz, M. (2011). Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a prominent target gene of the transcriptional response to cytokines in multiple myeloma and supports the growth of myeloma cells. *Oncogene* **30**, 3198-3206.
- Falini, B., Fizzotti, M., Pucciarini, A., Bigerna, B., Marafioti, T., Gambacorta, M., Pacini, R., Alunni, C., Natali-Tanci, L., Ugolini, B., Sebastiani, C., Cattoretti, G., Pileri, S., Dalla-Favera, R., Stein, H. (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* **95**, 2084-2092.
- Ferrando, A. A., Neuberg, D. S., Staunton, J., Loh, M. L., Huard, C., Raimondi, S. C., Behm, F. G., Pui, C. H., Downing, J. R., Gilliland, D. G., Lander, E. S., Golub, T. R., Look, A. T. (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75-87.
- Feuerborn, A., Möritz, C., von Bonin, F., Döbelstein, M., Trümper, L., Stürzenhofecker, B., Kube, D. (2006). Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* **47**, 1932-1940.
- Fischer, M., Juremalm, M., Olsson, N., Backlin, C., Sundstrom, C., Nilsson, K., Enblad, G., Nilsson, G. (2003). Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue. *Int J Cancer* **107**, 197-201.
- Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A. M., Cabanillas, F., Aggarwal, B. B., Younes, A. (2001). Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood* **98**, 2784-2790.
- Fonseca, R., Bergsagel, P. L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A. K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W. M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B. G., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., Pilarski, L., Avet-Loiseau, H. (2009). International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* **23**, 2210-2221.
- Fonseca, R., Debes-Marun, C. S., Picken, E. B., Dewald, G. W., Bryant, S. C., Winkler, J. M., Blood, E., Oken, M. M., Santana-Davila, R., Gonzalez-Paz, N., Kyle, R. A., Gertz, M. A., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Greipp, P. R. (2003). The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* **102**, 2562-2567.

- Foss, H. D., Anagnostopoulos, I., Araujo, I., Assaf, C., Demel, G., Kummer, J. A., Hummel, M., Stein, H. (1996). Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 88, 4005-4011.
- Foss, H. D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Stein, H. (1999). Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* 94, 3108-3113.
- Fruehling, S., Longnecker, R. (1997). The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* 235, 241-251.
- Garcia-Martinez, J. M., Alessi, D. R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416, 375-385.
- Gilchrist, M., Thorsson, V., Li, B., Rust, A. G., Korb, M., Roach, J. C., Kennedy, K., Hai, T., Bolouri, H., Aderem, A. (2006). Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 441, 173-178.
- Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K. J., Yokota, Y., Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med* 198, 1427-1437.
- Gordon, M. S., Kanegai, C. M., Doerr, J. R., Wall, R. (2003). Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalph, CD79a). *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4126-4131.
- Greiner, A., Tobollik, S., Buettner, M., Jungnickel, B., Herrmann, K., Kremmer, E., Niedobitek, G. (2005). Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol* 205, 541-547.
- Hacker, C., Kirsch, R. D., Ju, X. S., Hieronymus, T., Gust, T. C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S. M., Rose-John, S., Yokota, Y., Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* 4, 380-386.
- Hai, T., Wolfgang, C. D., Marsee, D. K., Allen, A. E., Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 7, 321-335.
- Halbsguth, T. V., Boll, B., Borchmann, P., Diehl, V. (2011). The unique characteristics and management of patients over 60 years of age with classic Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malign Rep* 6, 164-171.
- Harris, N. L., Swerdlow, S. H., Jaffe, E. S., Ott, G., Nathwani, B. N., de Jong, D., Yoshino, T., Spagnolo, D. (2008). Follicular lymphoma. In *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J. W. Vardiman, eds. (Lyon, IARC), pp. 220-226.
- Hayashi, M., Tapping, R. I., Chao, T. H., Lo, J. F., King, C. C., Yang, Y., Lee, J. D. (2001). BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase. *J Biol Chem* 276, 8631-8634.
- Heavey, B., Charalambous, C., Cobaleda, C., Busslinger, M. (2003). Myeloid lineage switch of Pax5 mutant but not wild-type B cell progenitors by C/EBPalpha and GATA factors. *EMBO J* 22, 3887-3897.
- Heltemes-Harris, L. M., Willette, M. J., Ramsey, L. B., Qiu, Y. H., Neeley, E. S., Zhang, N., Thomas, D. A., Koeth, T., Baechler, E. C., Kornblau, S. M., Farrar, M. A. (2011). Ebf1 or Pax5 haploinsufficiency synergizes with STAT5 activation to initiate acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 208, 1135-1149.

- Hertel, C. B., Zhou, X. G., Hamilton-Dutoit, S. J., Junker, S. (2002). Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene* 21, 4908-4920.
- Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117, 5965-5973.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K. C. (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 277, 16639-16647.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P. G., Anderson, K. C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 7, 585-598.
- Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., Anderson, K. C. (2001). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5991-6000.
- Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Dang, L., Munshi, N., Richardson, P., Schenkein, D., Anderson, K. C. (2006). MLN120B, a novel I kappa B kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 5887-5894.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dörken, B., Zenke, M., Stein, H., Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* 196, 605-617.
- Hjalgrim, H., Askling, J., Rostgaard, K., Hamilton-Dutoit, S., Frisch, M., Zhang, J. S., Madsen, M., Rosdahl, N., Konradsen, H. B., Storm, H. H., Melbye, M. (2003). Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 349, 1324-1332.
- Hjalgrim, H., Smedby, K. E., Rostgaard, K., Molin, D., Hamilton-Dutoit, S., Chang, E. T., Ralfkiaer, E., Sundstrom, C., Adami, H. O., Glimelius, B., Melbye, M. (2007). Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 67, 2382-2388.
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions* 17, 69-97.
- Hodgson, D. C., Gilbert, E. S., Dores, G. M., Schonfeld, S. J., Lynch, C. F., Storm, H., Hall, P., Langmark, F., Pukkala, E., Andersson, M., Kaijser, M., Joensuu, H., Fossa, S. D., Travis, L. B. (2007). Long-term solid cancer risk among 5-year survivors of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 25, 1489-1497.
- Holtick, U., Vockerodt, M., Pinkert, D., Schoof, N., Stürzenhofecker, B., Kussebi, N., Lauber, K., Wesselborg, S., Löffler, D., Horn, F., Trümper, L., Kube, D. (2005). STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrophostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. *Leukemia* 19, 936-944.
- Hong, F., Larrea, M. D., Doughty, C., Kwiatkowski, D. J., Squillace, R., Slingerland, J. M. (2008). mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation. *Mol Cell* 30, 701-711.
- Horcher, M., Souabni, A., Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779-790.
- Horie, R., Watanabe, T., Morishita, Y., Ito, K., Ishida, T., Kanegae, Y., Saito, I., Higashihara, M., Mori, S., Kadin, M. E. (2002). Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 21, 2493-2503.

- Hsu, H. L., Huang, L., Tsan, J. T., Funk, W., Wright, W. E., Hu, J. S., Kingston, R. E., Baer, R. (1994a). Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* *14*, 1256-1265.
- Hsu, H. L., Wadman, I., Tsan, J. T., Baer, R. (1994b). Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 5947-5951.
- Hsu, J. C., Bravo, R., Taub, R. (1992). Interactions among LRF-1, JunB, c-Jun, and c-Fos define a regulatory program in the G1 phase of liver regeneration. *Mol Cell Biol* *12*, 4654-4665.
- Hsu, J. C., Laz, T., Mohn, K. L., Taub, R. (1991). Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci USA* *88*, 3511-3515.
- Hsu, J. H., Shi, Y., Hu, L., Fisher, M., Franke, T. F., Lichtenstein, A. (2002). Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses. *Oncogene* *21*, 1391-1400.
- Hsu, L. Y., Luring, J., Liang, H. E., Greenbaum, S., Cado, D., Zhuang, Y., Schlissel, M. S. (2003). A conserved transcriptional enhancer regulates RAG gene expression in developing B cells. *Immunity* *19*, 105-117.
- Iida, S., Rao, P. H., Nallasivam, P., Hibshoosh, H., Butler, M., Louie, D. C., Dyomin, V., Ohno, H., Chaganti, R. S., Dalla-Favera, R. (1996). The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene. *Blood* *88*, 4110-4117.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A. W., Murre, C. (2006). E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med* *203*, 1329-1342.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Wright, L. Y., Murre, C. (2004). Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity* *20*, 349-360.
- Illes, A., Biro, E., Miltenyi, Z., Keresztes, K., Varoczy, L., Andras, C., Sipka, S., Bako, G. (2003). Hypothyroidism and thyroiditis after therapy for Hodgkin's disease. *Acta Haematol* *109*, 11-17.
- Inaba, T., Roberts, W. M., Shapiro, L. H., Jolly, K. W., Raimondi, S. C., Smith, S. D., Look, A. T. (1992). Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science* *257*, 531-534.
- Irsch, J., Wolf, J., Tesch, H., Diehl, V., Radbruch, A., Staratschek-Jox, A. (2001). Class switch recombination was specifically targeted to immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's disease-derived cell lines. *Br J Haematol* *113*, 785-793.
- Iwasaki, H., Akashi, K. (2007). Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* *26*, 6687-6696.
- Iwasaki-Arai, J., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Watanabe, S., Akashi, K. (2003). Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J Exp Med* *197*, 1311-1322.
- Janz, M., Dörken, B., Mathas, S. (2006a). Reprogramming of B lymphoid cells in human lymphoma pathogenesis. *Cell Cycle* *5*, 1057-1061.
- Janz, M., Hummel, M., Truss, M., Wollert-Wulf, B., Mathas, S., Jöhrens, K., Hagemeier, C., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B., Bargou, R. C. (2006b). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* *107*, 2536-2539.
- Janz, M., Stühmer, T., Vassilev, L. T., Bargou, R. C. (2007). Pharmacologic activation of p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Leukemia* *21*, 772-779.

- Jenner, R. G., Maillard, K., Cattini, N., Weiss, R. A., Boshoff, C., Wooster, R., Kellam, P. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 10399-10404.
- Ji, M., Li, H., Suh, H. C., Klarmann, K. D., Yokota, Y., Keller, J. R. (2008). Id2 intrinsically regulates lymphoid and erythroid development via interaction with different target proteins. *Blood* *112*, 1068-1077.
- Jones, M. E., Zhuang, Y. (2007). Acquisition of a functional T cell receptor during T lymphocyte development is enforced by HEB and E2A transcription factors. *Immunity* *27*, 860-870.
- Joos, S., Granzow, M., Holtgreve-Grez, H., Siebert, R., Harder, L., Martin-Subero, J. I., Wolf, J., Adamowicz, M., Barth, T. F., Lichter, P., Jauch, A. (2003). Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer* *103*, 489-495.
- Joos, S., Küpper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Möller, P., Pfreundschuh, M., Trümper, L., Lichter, P. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* *60*, 549-552.
- Joos, S., Menz, C. K., Wrobel, G., Siebert, R., Gesk, S., Ohl, S., Mechttersheimer, G., Trümper, L., Möller, P., Lichter, P., Barth, T. F. (2002). Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* *99*, 1381-1387.
- Jundt, F., Acikgöz, O., Kwon, S. H., Schwarzer, R., Anagnostopoulos, I., Wiesner, B., Mathas, S., Hummel, M., Stein, H., Reichardt, H. M., Dörken, B. (2008). Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia* *22*, 1587-1594.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Mathas, S., Stein, H., Dörken, B. (2002a). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* *99*, 3398-3403.
- Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Schulze Pröbsting, K., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H., Dörken, B. (2002b). Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* *99*, 3060-3062.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F. W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* *24*, 541-570.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M. L., Rajewsky, K., Küppers, R. (2000). Clonal deleterious mutations in the I kappa B alpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* *191*, 395-402.
- Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S. J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J. L., Rabinovich, G. A., Shipp, M. A. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 13134-13139.
- Kamps, M. P., Murre, C., Sun, X. H., Baltimore, D. (1990). A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* *60*, 547-555.
- 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. *J Exp Med* *184*, 1495-1505.
- Kapatai, G., Murray, P. (2007). Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol* *60*, 1342-1349.

- Kaszubska, W., Hooft van Huijsduijnen, R., Ghersa, P., DeRaemy-Schenk, A. M., Chen, B. P., Hai, T., DeLamarter, J. F., Whelan, J. (1993). Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF-kappa B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol Cell Biol* **13**, 7180-7190.
- Kato, M., Sanada, M., Kato, I., Sato, Y., Takita, J., Takeuchi, K., Niwa, A., Chen, Y., Nakazaki, K., Nomoto, J., Asakura, Y., Muto, S., Tamura, A., Iio, M., Akatsuka, Y., Hayashi, Y., Mori, H., Igarashi, T., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, S., Ishikawa, Y., Okamoto, K., Tobinai, K., Nakagama, H., Nakahata, T., Yoshino, T., Kobayashi, Y., Ogawa, S. (2009). Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* **459**, 712-716.
- Keats, J. J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W. J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C. X., Sebag, M., Braggio, E., Henry, T., Zhu, Y. X., Fogle, H., Price-Troska, T., Ahmann, G., Mancini, C., Brents, L. A., Kumar, S., Greipp, P., Dispenzieri, A., Bryant, B., Mulligan, G., Bruhn, L., Barrett, M., Valdez, R., Trent, J., Stewart, A. K., Carpten, J., Bergsagel, P. L. (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**, 131-144.
- Kee, B. L. (2009). E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol* **9**, 175-184.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S., Peschon, J. J. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-780.
- King, A. G., Kondo, M., Scherer, D. C., Weissman, I. L. (2002). Lineage infidelity in myeloid cells with TCR gene rearrangement: a latent developmental potential of proT cells revealed by ectopic cytokine receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4508-4513.
- Klein, U., Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* **8**, 22-33.
- Klein, U., Ghoghini, A., Gaidano, G., Chadburn, A., Cesarman, E., Dalla-Favera, R., Carbone, A. (2003). Gene expression profile analysis of AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL) suggests a plasmablastic derivation and identifies PEL-specific transcripts. *Blood* **101**, 4115-4121.
- Köchert, K., Ullrich, K., Kreher, S., Aster, J. C., Kitagawa, M., Jöhrens, K., Anagnostopoulos, I., Jundt, F., Lamprecht, B., Zimmer-Strobl, U., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., Mathas, S. (2011). High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene* **30**, 1831-1840.
- Krappmann, D., Emmerich, F., Kordes, U., Scharschmidt, E., Dörken, B., Scheidereit, C. (1999). Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **18**, 943-953.
- Kraus, M., Alimzhanov, M. B., Rajewsky, N., Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* **117**, 787-800.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P. C., Diehl, V., Tesch, H. (2001). STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* **98**, 762-770.
- Kuehl, W. M., Bergsagel, P. L. (2002). Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* **2**, 175-187.
- Kuiper, R. P., Schoenmakers, E. F., van Reijmersdal, S. V., Hehir-Kwa, J. Y., van Kessel, A. G., van Leeuwen, F. N., Hoogerbrugge, P. M. (2007). High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* **21**, 1258-1266.
- Küpper, M., Joos, S., von Bonin, F., Daus, H., Pfreundschuh, M., Lichter, P., Trümper, L. (2001). MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells:

- results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. *Br J Haematol* 112, 768-775.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-262.
- Küppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 9, 15-27.
- Küppers, R., Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-5594.
- Küppers, R., Engert, A., Hansmann, M. L. (2012). Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 122, 3439-3447.
- Küppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Bräuninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Califano, A., Hansmann, M. L., Dalla-Favera, R. (2003). Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 111, 529-537.
- Küppers, R., Rajewsky, K. (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 16, 471-493.
- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., Hansmann, M. L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10962-10966.
- Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S., Busslinger, M. (2008). Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity* 28, 751-762.
- Laherty, C. D., Hu, H. M., Pipari, A. W., Wang, F., Dixit, V. M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267, 24157-24160.
- Laios, C. V., Stadtfeld, M., Graf, T. (2006a). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24, 705-738.
- Laios, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., Graf, T. (2006b). Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25, 731-744.
- Lam, K. P., Kuhn, R., Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Lam, L. T., Davis, R. E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottel, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., Staudt, L. M. (2005). Small molecule inhibitors of I $\kappa$ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11, 28-40.
- Lamprecht, B., Kreher, S., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., Mathas, S. (2008). Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3 $\alpha$ . *Blood* 112, 3339-3347.
- Lamprecht, B., Walter, K., Kreher, S., Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Köchert, K., Bouhlef, M. A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Jöhrens, K., Wurster, K. D., Callen, D. F., Harte, M. F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P. N., Siebert, R., Dörken, B., Bonifer, C., Mathas, S. (2010). Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med* 16, 571-579.
- Landowski, T. H., O'Leary, N. E., Agrawal, D., Dalton, W. S. (2003). Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF- $\kappa$ B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 22, 2417-2421.

- Lee, P. P., Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R., Wilson, C. B. (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763-774.
- Lenz, G., Davis, R. E., Ngo, V. N., Lam, L., George, T. C., Wright, G. W., Dave, S. S., Zhao, H., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H. K., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Fisher, R. I., Chan, W. C., Staudt, L. M. (2008). Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 319, 1676-1679.
- Leong, M. L., Maiyar, A. C., Kim, B., O'Keeffe, B. A., Firestone, G. L. (2003). Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 5871-5882.
- Levine, A. J., Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9, 749-758.
- Lietz, A., Janz, M., Sigvardsson, M., Jundt, F., Dörken, B., Mathas, S. (2007). Loss of bHLH transcription factor E2A activity in primary effusion lymphoma confers resistance to apoptosis. *Br J Haematol* 137, 342-348.
- Lin, Y. C., Jhunjhunwala, S., Benner, C., Heinz, S., Welinder, E., Mansson, R., Sigvardsson, M., Hagman, J., Espinoza, C. A., Dutkowski, J., Ideker, T., Glass, C. K., Murre, C. (2010). A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat Immunol* 11, 635-643.
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, C. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H., Schatz, D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S., Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669-676.
- Mackenzie, G. G., Adamo, A. M., Decker, N. P., Oteiza, P. I. (2008a). Dimeric procyanidin B2 inhibits constitutively active NF-kappaB in Hodgkin's lymphoma cells independently of the presence of I kappa B mutations. *Biochem Pharmacol* 75, 1461-1471.
- Mackenzie, G. G., Queisser, N., Wolfson, M. L., Fraga, C. G., Adamo, A. M., Oteiza, P. I. (2008b). Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-kappaB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *Int J Cancer* 123, 56-65.
- MacLeod, R. A., Spitzer, D., Bar-Am, I., Sylvester, J. E., Kaufmann, M., Wernich, A., Drexler, H. G. (2000). Karyotypic dissection of Hodgkin's disease cell lines reveals ectopic subtelomeres and ribosomal DNA at sites of multiple jumping translocations and genomic amplification. *Leukemia* 14, 1803-1814.
- Maggio, E. M., Stekelenburg, E., Van den Berg, A., Poppema, S. (2001). TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 94, 60-66.
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B., Hammerschmidt, W. (2005). Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339-4344.
- Mandelbaum, J., Bhagat, G., Tang, H., Mo, T., Brahmachary, M., Shen, Q., Chadburn, A., Rajewsky, K., Tarakhovskiy, A., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R. (2010). BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 18, 568-579.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P. G., Pileri, S., Stein, H. (1997). Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* 337, 453-458.

- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Huhn, D., Stein, H. (1999). Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J Clin Oncol* *17*, 3804-3809.
- Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H. D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T., Stein, H. (2000). Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* *95*, 1443-1450.
- Martin-Subero, J. I., Klapper, W., Sotnikova, A., Callet-Bauchu, E., Harder, L., Bastard, C., Schmitz, R., Grohmann, S., Höppner, J., Riemke, J., Barth, T. F., Berger, F., Bernd, H. W., Claviez, A., Gesk, S., Frank, G. A., Kaplanskaya, I. B., Möller, P., Parwaresch, R. M., Rüdiger, T., Stein, H., Küppers, R., Hansmann, M. L., Siebert, R. (2006). Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* *66*, 10332-10338.
- Martin-Subero, J. I., Knippschild, U., Harder, L., Barth, T. F., Riemke, J., Grohmann, S., Gesk, S., Höppner, J., Möller, P., Parwaresch, R. M., Siebert, R. (2003). Segmental chromosomal aberrations and centrosome amplifications: pathogenetic mechanisms in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma? *Leukemia* *17*, 2214-2219.
- Massari, M. E., Rivera, R. R., Volland, J. R., Quong, M. W., Breit, T. M., van Dongen, J. J., de Smit, O., Murre, C. (1998). Characterization of ABF-1, a novel basic helix-loop-helix transcription factor expressed in activated B lymphocytes. *Mol Cell Biol* *18*, 3130-3139.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J* *21*, 4104-4113.
- Mathas, S., Janz, M., Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., Jöhrens, K., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B. (2006). Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol* *7*, 207-215.
- Mathas, S., Jöhrens, K., Joos, S., Lietz, A., Hummel, F., Janz, M., Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Lichter, P., Stein, H., Scheidereit, C., Dörken, B. (2005). Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* *106*, 4287-4293.
- Mathas, S., Kreher, S., Meaburn, K. J., Jöhrens, K., Lamprecht, B., Assaf, C., Sterry, W., Kadin, M. E., Daibata, M., Joos, S., Hummel, M., Stein, H., Janz, M., Anagnostopoulos, I., Schröck, E., Misteli, T., Dörken, B. (2009). Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* *106*, 5831-5836.
- Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Jöhrens-Leder, K., Vornlocher, H. P., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B. (2004). c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* *199*, 1041-1052.
- Mathas, S., Lietz, A., Janz, M., Hinz, M., Jundt, F., Scheidereit, C., Bommert, K., Dörken, B. (2003). Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* *102*, 1028-1034.
- Matolcsy, A., Nador, R. G., Cesarman, E., Knowles, D. M. (1998). Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation. *Am J Pathol* *153*, 1609-1614.
- Medeiros, L. J., Elenitoba-Johnson, K. S. (2007). Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* *127*, 707-722.

- Mendler, J. H., Friedberg, J. W. (2009). Salvage therapy in Hodgkin's lymphoma. *Oncologist* 14, 425-432.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297, 110-113.
- Mitsiades, C. S., McMillin, D. W., Klippel, S., Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P. G., Munshi, N. C., Anderson, K. C. (2007). The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* 21, 1007-1034, vii-viii.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N. S., McMullan, C. J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Akiyama, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Joseph, M., Libermann, T. A., Garcia-Echeverria, C., Pearson, M. A., Hofmann, F., Anderson, K. C., Kung, A. L. (2004). Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell* 5, 221-230.
- Montesinos-Rongen, M., Roers, A., Küppers, R., Rajewsky, K., Hansmann, M. L. (1999). Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Blood* 94, 1755-1760.
- Mottok, A., Renné, C., Seifert, M., Oppermann, E., Bechstein, W., Hansmann, M. L., Küppers, R., Bräuninger, A. (2009). Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood* 114, 4503-4506.
- Mullighan, C. G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C. B., Coustan-Smith, E., Dalton, J. D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S. B., Su, X., Pui, C. H., Relling, M. V., Evans, W. E., Shurtleff, S. A., Downing, J. R. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446, 758-764.
- Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M., Pui, C. H., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., Downing, J. R. (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110-114.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Murre, C. (2005). Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol* 6, 1079-1086.
- Murre, C., McCaw, P. S., Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Müschen, M., Rajewsky, K., Bräuninger, A., Baur, A. S., Oudejans, J. J., Roers, A., Hansmann, M. L., Küppers, R. (2000). Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* 191, 387-394.
- Nakagomi, S., Suzuki, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. (2003). Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci* 23, 5187-5196.
- Nogová, L., Rudiger, T., Engert, A. (2006). Biology, clinical course and management of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 266-272.
- Novak, U., Rinaldi, A., Kwee, I., Nandula, S. V., Rancoita, P. M., Compagno, M., Cerri, M., Rossi, D., Murty, V. V., Zucca, E., Gaidano, G., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., Bhagat, G., Bertoni, F. (2009). The NF- $\kappa$ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* 113, 4918-4921.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-562.

- Nutt, S. L., Taubenheim, N., Hasbold, J., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D. (2011). The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol* 23, 341-349.
- O'Neil, J., Look, A. T. (2007). Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. *Oncogene* 26, 6838-6849.
- O'Neil, J., Shank, J., Cusson, N., Murre, C., Kelliher, M. (2004). TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell* 5, 587-596.
- Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Jr., Lee, K. P., Boise, L. H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4907-4916.
- Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S. P., Urashima, M., Schlossman, R. L., Anderson, K. C. (1997). IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159, 2212-2221.
- Okazaki, I. M., Kotani, A., Honjo, T. (2007). Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol* 94, 245-273.
- Palombella, V. J., Conner, E. M., Fuseler, J. W., Destree, A., Davis, J. M., Laroux, F. S., Wolf, R. E., Huang, J., Brand, S., Elliott, P. J., Lazarus, D., McCormack, T., Parent, L., Stein, R., Adams, J., Grisham, M. B. (1998). Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15671-15676.
- Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L., Hemmings, B. A. (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J* 18, 3024-3033.
- Pasqualucci, L., Compagno, M., Houldsworth, J., Monti, S., Grunn, A., Nandula, S. V., Aster, J. C., Murty, V. V., Shipp, M. A., Dalla-Favera, R. (2006). Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203, 311-317.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R. S., Dalla-Favera, R. (2003). Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101, 2914-2923.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11816-11821.
- 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. *Nature* 412, 341-346.
- Paulsson, K., Cazier, J. B., Macdougall, F., Stevens, J., Stasevich, I., Vrcelj, N., Chaplin, T., Lillington, D. M., Lister, T. A., Young, B. D. (2008). Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: Unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6708-6713.
- Pixley, F. J., Stanley, E. R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14, 628-638.
- Pongubala, J. M., Northrup, D. L., Lancki, D. W., Medina, K. L., Treiber, T., Bertolino, E., Thomas, M., Grosschedl, R., Allman, D., Singh, H. (2008). Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol* 9, 203-215.
- Poppe, B., De Paepe, P., Michaux, L., Dastugue, N., Bastard, C., Herens, C., Moreau, E., Cavazzini, F., Yigit, N., Van Limbergen, H., De Paepe, A., Praet, M., De Wolf-Peeters, C., Wlodarska, I., Speleman, F. (2005). PAX5/IGH rearrangement is a recurrent finding in a subset of aggressive B-NHL with complex chromosomal rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 218-223.

- Poppema, S., Delsol, G., Pileri, S. A., Stein, H., Swerdlow, S. H., Warnke, R. A., Jaffe, E. S. (2008). Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. In WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J. W. Vardiman, eds. (Lyon, IARC), pp. 323-325.
- Portis, T., Dyck, P., Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* *102*, 4166-4178.
- Portis, T., Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol* *77*, 105-114.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C., Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* *11*, 299-308.
- Puthier, D., Bataille, R., Amiot, M. (1999). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* *29*, 3945-3950.
- Quong, M. W., Harris, D. P., Swain, S. L., Murre, C. (1999). E2A activity is induced during B-cell activation to promote immunoglobulin class switch recombination. *EMBO J* *18*, 6307-6318.
- Quong, M. W., Massari, M. E., Zwart, R., Murre, C. (1993). A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* *13*, 792-800.
- Radtke, F., Fasnacht, N., Macdonald, H. R. (2010). Notch signaling in the immune system. *Immunity* *32*, 14-27.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* *381*, 751-758.
- Re, D., Müschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V., Wolf, J. (2001). Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* *61*, 2080-2084.
- Renné, C., Hinsch, N., Willenbrock, K., Fuchs, M., Klapper, W., Engert, A., Küppers, R., Hansmann, M. L., Bräuninger, A. (2007). The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* *120*, 2504-2509.
- Renné, C., Martin-Subero, J. I., Eickernjäger, M., Hansmann, M. L., Küppers, R., Siebert, R., Bräuninger, A. (2006). Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* *169*, 655-664.
- Renné, C., Willenbrock, K., Küppers, R., Hansmann, M. L., Bräuninger, A. (2005). Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* *105*, 4051-4059.
- Reschly, E. J., Spaulding, C., Vilimas, T., Graham, W. V., Brumbaugh, R. L., Aifantis, I., Pear, W. S., Kee, B. L. (2006). Notch1 promotes survival of E2A-deficient T cell lymphomas through pre-T cell receptor-dependent and -independent mechanisms. *Blood* *107*, 4115-4121.
- Richter, J., Schlesner, M., Hoffmann, S., Kreuz, M., Leich, E., Burkhardt, B., Rosolowski, M., Ammerpohl, O., Wagener, R., Bernhart, S. H., Lenze, D., Szczepanowski, M., Paulsen, M., Lipinski, S., Russell, R. B., Adam-Klages, S., Apic, G., Claviez, A., Hasenclever, D., Hovestadt, V., Hornig, N., Korb, J. O., Kube, D., Langenberger, D., Lawrenz, C., Lisfeld, J., Meyer, K., Picelli, S., Pischmarov, J., Radlwimmer, B., Rausch, T., Rohde, M., Schilhabel, M., Scholtysik, R., Spang, R., Trautmann, H., Zenz, T., Borkhardt, A., Drexler, H. G., Möller, P., Macleod, R. A., Pott, C., Schreiber, S., Trümper, L., Loeffler, M., Stadler, P. F., Lichter, P., Eils, R., Küppers, R., Hummel, M., Klapper, W., Rosenstiel, P., Rosenwald, A., Brors, B., Siebert, R. (2012). Recurrent mutation of the ID3 gene in

- Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44, 1316-1320.
- Rickert, R. C., Roes, J., Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1317-1318.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F., Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603-606.
- Rosenwald, A., Wright, G., Leroy, K., Yu, X., Gaulard, P., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., Zhao, T., Haioun, C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Smeland, E. B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Campo, E., Montserrat, E., Lopez-Guillermo, A., Ott, G., Müller-Hermelink, H. K., Connors, J. M., Braziel, R., Grogan, T. M., Fisher, R. I., Miller, T. P., LeBlanc, M., Chiorazzi, M., Zhao, H., Yang, L., Powell, J., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Staudt, L. M. (2003). Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 198, 851-862.
- Rothenberg, E. V., Moore, J. E., Yui, M. A. (2008). Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8, 9-21.
- Rothenberg, E. V., Taghon, T. (2005). Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 601-649.
- Rui, L., Emre, N. C., Kruhlak, M. J., Chung, H. J., Steidl, C., Slack, G., Wright, G. W., Lenz, G., Ngo, V. N., Shaffer, A. L., Xu, W., Zhao, H., Yang, Y., Lamy, L., Davis, R. E., Xiao, W., Powell, J., Maloney, D., Thomas, C. J., Möller, P., Rosenwald, A., Ott, G., Müller-Hermelink, H. K., Savage, K., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Gascoyne, R. D., Levens, D., Staudt, L. M. (2010). Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell* 18, 590-605.
- Rutherford, M. N., LeBrun, D. P. (1998). Restricted expression of E2A protein in primary human tissues correlates with proliferation and differentiation. *Am J Pathol* 153, 165-173.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P. M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 12, 280-292.
- Sawada, S., Littman, D. R. (1993). A heterodimer of HEB and an E12-related protein interacts with the CD4 enhancer and regulates its activity in T-cell lines. *Mol Cell Biol* 13, 5620-5628.
- Sayegh, C. E., Quong, M. W., Agata, Y., Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol* 4, 586-593.
- Scheeren, F. A., Diehl, S. A., Smit, L. A., Beaumont, T., Naspetti, M., Bende, R. J., Blom, B., Karube, K., Ohshima, K., van Noesel, C. J., Spits, H. (2008). IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 111, 4706-4715.
- Schmitz, R., Hansmann, M. L., Bohle, V., Martin-Subero, J. I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R., Küppers, R. (2009). TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 206, 981-989.
- Schmitz, R., Young, R. M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A. L., Hodson, D. J., Buras, E., Liu, X., Powell, J., Yang, Y., Xu, W., Zhao, H., Kohlhammer, H., Rosenwald, A., Kluijn, P., Müller-Hermelink, H. K., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Rimsza, L. M., Campo, E., Jaffe, E. S., Delabie, J., Smeland, E. B., Olgwang, M. D., Reynolds, S. J., Fisher, R. I., Braziel, R. M., Tubbs, R. R., Cook, J. R., Weisenburger, D. D., Chan, W. C., Pittaluga, S., Wilson, W., Waldmann, T. A., Rowe, M., Mbulaiteye, S. M., Rickinson, A. B., Staudt, L. M. (2012). Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116-120.

- Schonfeld, S. J., Gilbert, E. S., Dores, G. M., Lynch, C. F., Hodgson, D. C., Hall, P., Storm, H., Andersen, A., Pukkala, E., Holowaty, E., Kaijser, M., Andersson, M., Joensuu, H., Fossa, S. D., Allan, J. M., Travis, L. B. (2006). Acute myeloid leukemia following Hodgkin lymphoma: a population-based study of 35,511 patients. *J Natl Cancer Inst* **98**, 215-218.
- Schoof, N., von Bonin, F., Trümper, L., Kube, D. (2009). HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin lymphoma cells. *Cell Commun Signal* **7**, 17.
- Schraml, B. U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W. L., Smith, W. A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., Hatton, R. D., Stormo, G. D., Weaver, C. T., Russell, J. H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405-409.
- Schwartz, R., Engel, I., Fallahi-Sichani, M., Petrie, H. T., Murre, C. (2006). Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 9976-9981.
- Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M. L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., Küppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**, 1505-1512.
- Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C., Stein, H. (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* **95**, 3020-3024.
- Seitz, V., Thomas, P. E., Zimmermann, K., Paul, U., Ehlers, A., Joosten, M., Dimitrova, L., Lenze, D., Sommerfeld, A., Oker, E., Leser, U., Stein, H., Hummel, M. (2011). Classical Hodgkin's lymphoma shows epigenetic features of abortive plasma cell differentiation. *Haematologica* **96**, 863-870.
- Semerad, C. L., Mercer, E. M., Inlay, M. A., Weissman, I. L., Murre, C. (2009). E2A proteins maintain the hematopoietic stem cell pool and promote the maturation of myelolymphoid and myeloerythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 1930-1935.
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltnane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51-62.
- Shen, C. P., Kadesch, T. (1995). B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Mol Cell Biol* **15**, 4518-4524.
- Shou, Y., Martelli, M. L., Gabrea, A., Qi, Y., Brents, L. A., Roschke, A., Dewald, G., Kirsch, I. R., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. (2000). Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 228-233.
- Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trümper, L., Kapp, U., Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**, 618-626.
- Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Trümper, L. H., von Bonin, F., Kapp, U., Patterson, B., Snow, B. E., Mak, T. W. (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**, 250-255.
- Smadja, N. V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D., Fruchart, C. (2001). Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* **98**, 2229-2238.
- Smadja, N. V., Fruchart, C., Isnard, F., Louvet, C., Dutel, J. L., Cheron, N., Grange, M. J., Monconduit, M., Bastard, C. (1998). Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* **12**, 960-969.

- Smith, K. S., Chanda, S. K., Lingbeek, M., Ross, D. T., Botstein, D., van Lohuizen, M., Cleary, M. L. (2003). Bmi-1 regulation of INK4A-ARF is a downstream requirement for transformation of hematopoietic progenitors by E2a-Pbx1. *Mol Cell* *12*, 393-400.
- Souabni, A., Jochum, W., Busslinger, M. (2007). Oncogenic role of Pax5 in the T-lymphoid lineage upon ectopic expression from the immunoglobulin heavy-chain locus. *Blood* *109*, 281-289.
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., DePinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L., Rajewsky, K. (2009). PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* *139*, 573-586.
- Stanelle, J., Döring, C., Hansmann, M. L., Küppers, R. (2010). Mechanisms of aberrant GATA3 expression in classical Hodgkin lymphoma and its consequences for the cytokine profile of Hodgkin and Reed/Sternberg cells. *Blood* *116*, 4202-4211.
- Staudt, L. M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000109.
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., Bast, M. A., Rosenwald, A., Müller-Hermelink, H. K., Rimsza, L. M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R. M., Cook, J. R., Tubbs, R. R., Jaffe, E. S., Lenz, G., Connors, J. M., Staudt, L. M., Chan, W. C., Gascoyne, R. D. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* *362*, 875-885.
- Stein, H., Delsol, G., Pileri, S. A., Weiss, L. M., Poppema, S., Jaffe, E. S. (2008). Classical Hodgkin lymphoma. In *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, J. W. Vardiman, eds. (Lyon, IARC), pp. 326-334.
- Stein, H., Foss, H. D., Dürkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K., Pileri, S., Falini, B. (2000). CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* *96*, 3681-3695.
- Stein, H., Marafioti, T., Foss, H. D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G., Falini, B. (2001). Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood* *97*, 496-501.
- Steininger, A., Möbs, M., Ullmann, R., Köchert, K., Kreher, S., Lamprecht, B., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Richter, J., Beyer, M., Janz, M., Klemke, C. D., Stein, H., Dörken, B., Sterry, W., Schröck, E., Mathas, S., Assaf, C. (2011). Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *J Exp Med* *208*, 1585-1593.
- Tamura, K., Hua, B., Adachi, S., Guney, I., Kawachi, J., Morioka, M., Tamamori-Adachi, M., Tanaka, Y., Nakabeppu, Y., Sunamori, M., Sedivy, J. M., Kitajima, S. (2005). Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J* *24*, 2590-2601.
- Teng, G., Papavasiliou, F. N. (2007). Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* *41*, 107-120.
- Thompson, M. R., Xu, D., Williams, B. R. (2009). ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med* *87*, 1053-1060.
- Tiacci, E., Döring, C., Brune, V., van Noesel, C. J., Klapper, W., Mechtersheimer, G., Falini, B., Küppers, R., Hansmann, M. L. (2012). Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *120*, 4609-4620.
- Tonon, G. (2007). Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* *21*, 985-1006, vii.

- Trelle, S., Sezer, O., Naumann, R., Rummel, M., Keller, U., Engert, A., Borchmann, P. (2007). Bortezomib in combination with dexamethasone for patients with relapsed Hodgkin's lymphoma: results of a prematurely closed phase II study (NCT00148018). *Haematologica* 92, 568-569.
- Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 537-549.
- Tu, Y., Gardner, A., Lichtenstein, A. (2000). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* 60, 6763-6770.
- Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D., Anderson, K. C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82, 3712-3720.
- Ullrich, K., Wurster, K. D., Lamprecht, B., Köchert, K., Engert, A., Dörken, B., Janz, M., Mathas, S. (2011). BAY 43-9006/Sorafenib blocks CSF1R activity and induces apoptosis in various classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol* 155, 398-402.
- Ushmorov, A., Leithäuser, F., Sakk, O., Weinhäusel, A., Popov, S. W., Möller, P., Wirth, T. (2006). Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 2493-2500.
- Ushmorov, A., Ritz, O., Hummel, M., Leithäuser, F., Möller, P., Stein, H., Wirth, T. (2004). Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 104, 3326-3334.
- Vallabhapurapu, S., Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733.
- van den Berg, A., Visser, L., Poppema, S. (1999). High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 154, 1685-1691.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., Liu, E. A. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.
- Vockerodt, M., Morgan, S. L., Kuo, M., Wei, W., Chukwuma, M. B., Arrand, J. R., Kube, D., Gordon, J., Young, L. S., Woodman, C. B., Murray, P. G. (2008). The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol* 216, 83-92.
- Watanabe, M., Dewan, M. Z., Taira, M., Shoda, M., Honda, M., Sata, T., Higashihara, M., Kadin, M. E., Watanabe, T., Yamamoto, N., Umezawa, K., Horie, R. (2007). IkappaBalpha independent induction of NF-kappaB and its inhibition by DHMEQ in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Lab Invest* 87, 372-382.
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., Firestone, G. L. (1993). Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol* 13, 2031-2040.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T., Aster, J. C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269-271.
- Weniger, M. A., Melzner, I., Menz, C. K., Wegener, S., Bucur, A. J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T. F., Möller, P. (2006). Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* 25, 2679-2684.

- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V., Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* *430*, 694-699.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., Graf, T. (2004). Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* *117*, 663-676.
- Ye, B. H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D. M., Offit, K., Chaganti, R. S., Dalla-Favera, R. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* *262*, 747-750.
- Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., Gruss, P. (1999). Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* *397*, 702-706.
- Younes, A. (2009). Novel treatment strategies for patients with relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 507-519.
- Younes, A., Pro, B., Fayad, L. (2006). Experience with bortezomib for the treatment of patients with relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *107*, 1731-1732.
- Zhang, Z., Cotta, C. V., Stephan, R. P., deGuzman, C. G., Klug, C. A. (2003). Enforced expression of EBF in hematopoietic stem cells restricts lymphopoiesis to the B cell lineage. *EMBO J* *22*, 4759-4769.
- Zheng, B., Georgakis, G. V., Li, Y., Bharti, A., McConkey, D., Aggarwal, B. B., Younes, A. (2004). Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. *Clin Cancer Res* *10*, 3207-3215.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ABF1	<i>activated B cell factor 1</i>
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
ALCL	<i>anaplastic large cell lymphoma</i> , anaplastisches großzelliges Lymphom
ALL	akute lymphatische Leukämie
ATF	<i>activating transcription factor</i>
AP1	<i>activator protein 1</i>
BCR	<i>B cell receptor</i> , B-Zell-Rezeptor
bHLH	<i>basic helix-loop-helix domain</i> , basische Helix-Loop-Helix-Domäne
BL	Burkitt-Lymphom
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
cHL	<i>classical Hodgkin lymphoma</i> , klassisches Hodgkin-Lymphom
CSR	<i>class switch recombination</i>
DLBCL	<i>diffuse large B cell lymphoma</i> , diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom ABC DLBCL, <i>activated B cell-like DLBCL</i> GCB DLBCL, <i>germinal center B cell-like DLBCL</i>
EBF1	<i>early B cell factor 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
HEB	<i>HeLa E-box-binding factor</i>
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
ID	<i>inhibitor of DNA binding, inhibitor of differentiation</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LMP1/2A	<i>latent membrane protein 1/2A</i>
MM	Multiplies Myelom
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i> , natürliche Killer-Zellen
NLPHL	<i>nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma</i>
PEL	<i>primary effusion lymphoma</i>
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i> , Phosphoinositid-3 (PI3)-Kinase
PMBL	<i>primary mediastinal large B cell lymphoma</i>
SGK1	<i>serum/glucocorticoid-regulated kinase 1</i>
SHM	<i>somatic hypermutation</i> , somatische Hypermutation
TAL1	<i>T cell acute lymphocytic leukemia 1</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Dörken für die langjährige und hervorragende Unterstützung, für die sehr guten Entwicklungsmöglichkeiten in seiner Arbeitsgruppe und die zahlreichen Freiräume, die er mir eröffnet hat. Dr. Stephan Mathas danke ich für die enge und sehr gute Zusammenarbeit, die vielen anregenden Diskussionen und die freundschaftliche Atmosphäre während unserer gemeinsamen wissenschaftlichen Arbeit. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an Brigitte Wollert-Wulf, die mich durch ihre exzellenten experimentellen Fähigkeiten in der gesamten Zeit hervorragend unterstützt hat, wodurch die technische Umsetzung vieler Ideen überhaupt erst möglich wurde. Auch allen anderen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Labors gilt mein Dank für ihre methodischen oder wissenschaftlichen Anregungen, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Mitarbeit. Dazu gehören, ohne den Anspruch auf Vollständigkeit erheben zu können, Dr. Thorsten Stühmer, Dr. Manik Chatterjee, Dr. Kurt Bommert, Prof. Dr. Ralf Bargou, Prof. Dr. Suzanne Lentzsch, Franziska Hummel, Simone Lusatis, Ute Nitschke, Dr. Karl Köchert, Dr. Björn Lamprecht, Dr. Stephan Kreher, Dipl.-Biol. Katrin Ullrich, Dr. Friderike Blumenthal-Barby und Dipl.-Biol. Shuang Li. Für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Multiplen Myeloms möchte ich mich bei Prof. Dr. Magne Børset und Prof. Dr. Unn-Merete Fagerli bedanken. Ein herzlicher Dank geht darüber hinaus an Prof. Dr. Klaus Rajewsky für die großzügige und freundliche Aufnahme in seinem Labor, die intensiven wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen sowie die stets vertrauensvolle Zusammenarbeit. Mein Dank geht des Weiteren an Dr. Dinis Calado, der mich außerordentlich unterstützt hat bei der Einarbeitung in transgene Maustechniken und den ich als wertvollen Diskussionspartner kennengelernt habe.

## **8. Eidesstattliche Erklärung**

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 24. April 2013

Dr. med. Martin Janz