

Aus dem Experimental and Clinical Research Center (ECRC)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin und
des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin (MDC)

DISSERTATION

Identifizierung Pathogenese-relevanter Kandidatengene im
Hodgkin-Lymphom durch CRISPR/Cas9-basiertes
knockout-Screening

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Henrike Lisa Sczakiel

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 05.03.2021

Meiner Familie

VORWORT

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CRISPR/Cas9-System in unserem Labor etabliert. Hierbei wurden auch Vektoren generiert, die in Experimenten der Arbeit Schleussner et al. 2018 verwendet wurden. Eine detaillierte Beschreibung der eigenen Anteile an dieser Publikation ist der Anteilserklärung zu entnehmen, die am Ende dieser Arbeit zu finden ist.

Diese Arbeit selbst, also der genomweite CRISPR/Cas9-Screen im Hodgkin-Lymphom sowie alle folgenden Untersuchungen zu den aus diesem Screen hervorgegangenen Kandidatengenomen sind jedoch bisher unveröffentlicht. Ein Manuskript ist aktuell in Arbeit.

Berlin, 19.11.2019

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	S. 7
ZUSAMMENFASSUNG	S. 9
ABSTRACT	S. 10
1. EINLEITUNG	S. 11
1.1 Das Hodgkin-Lymphom.....	S. 11
1.1.1 Klinische Aspekte des Hodgkin-Lymphoms.....	S. 11
1.1.2 Biologie der B-Zelle.....	S. 13
1.1.3 Molekularbiologie des Hodgkin-Lymphoms.....	S. 15
1.1.3.1 Der zelluläre Ursprung des cHL.....	S. 15
1.1.3.2 Linienfremde Genexpression im cHL.....	S. 16
1.1.3.2.1 Die Rolle von ABF1 und ID2 im cHL.....	S. 17
1.1.3.3 Der NF-κB-Signalweg im cHL.....	S. 17
1.1.3.4 AP-1- und IRF-Transkriptionsfaktoren im cHL.....	S. 18
1.1.3.5 Weitere molekulare Defekte im cHL.....	S. 19
1.2 Zellzyklusregulatoren.....	S. 20
1.3 Das <i>kelch like ECH associated protein 1</i> (KEAP1).....	S. 22
1.4 Das CRISPR/Cas9-System.....	S. 24
1.4.1 Bakterielle CRISPR/Cas-Systeme.....	S. 24
1.4.2 Das CRISPR/Cas9-System als molekularbiologisches Werkzeug.....	S. 25
1.4.3 CRISPR/Cas9-basiertes <i>knockout</i> -Screening.....	S. 26
1.5 Herleitung der Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	S. 28
2. MATERIAL UND METHODEN	S. 29
2.1 Material.....	S. 29
2.1.1 Chemikalien.....	S. 29
2.1.2 Reagenzien.....	S. 30
2.1.3 Medien und Zellkulturzusätze.....	S. 30
2.1.3.1 RPMI-Standardmedium.....	S. 30
2.1.3.2 DMEM-Standardmedium.....	S. 31
2.1.3.3 Bakterienmedien.....	S. 31
2.1.4 Zelllinien.....	S. 31
2.1.5 Bakterienstämme.....	S. 32
2.1.6 Antikörper.....	S. 32
2.1.7 Enzyme.....	S. 33
2.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	S. 33
2.1.9 Plasmide.....	S. 34
2.1.10 Oligonukleotide.....	S. 34
2.1.10.1 Primer für Sequenzierungen.....	S. 35

2.1.10.2	Primer für Klonierungen.....	S. 35
2.1.10.3	Oligos für Klonierungen.....	S. 36
2.1.10.4	Oligos für sgRNAs.....	S. 36
2.1.10.5	Primer für CRISPR-Screen-Sequenzierung.....	S. 37
2.1.11	Kits.....	S. 38
2.1.12	Geräte.....	S. 38
2.1.13	Software.....	S. 39
2.1.14	Puffer.....	S. 39
2.1.14.1	Zellkultur.....	S. 39
2.1.14.2	RNA, DNA.....	S. 40
2.1.14.3	Proteine, Immunpräzipitation, Western Blot.....	S. 41
2.2	Methoden.....	S. 43
2.2.1	RNA, DNA.....	S. 43
2.2.1.1	Aufreinigung von RNA aus Zellpellets.....	S. 43
2.2.1.2	Reverse Transkription (RT).....	S. 43
2.2.1.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	S. 43
2.2.1.4	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	S. 44
2.2.1.5	Sanger-Sequenzierung.....	S. 44
2.2.2	Proteine.....	S. 44
2.2.2.1	Aufreinigung von Protein aus Zellpellets.....	S. 44
2.2.2.2	SDS-PAGE.....	S. 44
2.2.2.3	Western Blot (WB)	S. 45
2.2.3	Bakterienkultur.....	S. 45
2.2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA (pDNA) aus Bakterienkulturen – Mini.....	S. 46
2.2.3.2	Präparation von pDNA aus Bakterienkulturen mit NuceloBond® Xtra – Maxi / Midi.....	S. 46
2.2.4	Klonierungen.....	S. 46
2.2.4.1	Klonierungs-PCR.....	S. 46
2.2.4.2	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....	S. 47
2.2.4.3	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	S. 47
2.2.4.4	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	S. 48
2.2.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	S. 48
2.2.4.6	Transformation.....	S. 49
2.2.4.7	Kontrolle der Klonierung.....	S. 49
2.2.4.8	Klassisch klonierte Vektoren.....	S. 49
2.2.4.9	Klonierungen mit Hilfe einer Gibson-Assembly oder Overlap-Extension-PCR.....	S. 50
2.2.4.10	sgRNA-Klonierungen.....	S. 51
2.2.4.11	Klonierungen in pGEM®-T Easy.....	S. 51
2.2.5	Zellkultur.....	S. 53
2.2.5.1	Stammhaltung laufender Zellkultur.....	S. 52
2.2.5.2	Einfrieren und Auftauen eukaryoter Zellen.....	S. 52

2.2.5.3	Herstellung von Zellpellets zur Aufbreitung von DNA, RNA und Protein.....	S. 53
2.2.5.4	Puromycin-Selektions-Kurven.....	S. 53
2.2.5.5	Durchflusszytometrie.....	S. 54
2.2.5.6	Proliferationsanalysen mit ³ H-Thymidin.....	S. 54
2.2.5.7	Kompetitions-Assays.....	S. 54
2.2.6	Lentiviraler Gentransfer.....	S. 55
2.2.6.1	Transfektion von HEK293T/17 zur Virusproduktion und Ernte des virus-tragenden Überstandes.....	S. 55
2.2.6.2	Viruskonzentration durch Ultrazentrifugation.....	S. 56
2.2.6.3	Transduktion von Zielzelllinien mit lentiviralen Überständen...	S. 56
2.2.6.4	Virus-Titer-Bestimmung.....	S. 57
2.2.7	Analyse der <i>knockout</i> -Effizienz durch CRISPR/Cas9.....	S. 57
2.2.7.1	T7-Nuklease-Assay.....	S. 57
2.2.7.2	TIDE-Analysen.....	S. 59
2.2.8	CRISPR-Screens.....	S. 59
2.2.8.1	Präparation genomischer DNA aus humaner Zellkultur für CRISPR-Screens.....	S. 60
2.2.8.2	Auslesen der sgRNA-Sequenz und Präparation der Proben für die Hochdurchsatz-Sequenzierung.....	S. 60
2.2.8.3	Auswertung der Hochdurchsatz-Sequenzierung.....	S. 62
2.2.8.4	Klonierung der CRISPR-Bibliothek für den Bestätigungs-Screen.....	S. 62
2.2.9	Statistik.....	S. 63
3.	ERGEBNISSE	S. 64
3.1	Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in humanen Lymphomzelllinien.....	S. 64
3.1.1	Klonierung von CRISPR/Cas9- und Expressionsvektoren für die lentivirale Transduktion humaner Zielzelllinien.....	S. 64
3.1.1.1	Erstellung von Varianten des <i>lentiCRISPRv1</i> sowie <i>lentiCRISPRv2</i> mit fluoreszierenden Reportern.....	S. 64
3.1.1.2	Klonierung eines Zwei-Vektoren-Systems für die Generierung stabiler Cas9-exprimierender Zelllinien und anschließende sgRNA-Transduktion.....	S. 66
3.1.1.3	Klonierung eines Leervektors sowie hieraus resultierender Expressionsvektoren.....	S. 66
3.1.2	Test-Transduktionen der <i>lentiCRISPRv1</i> - und <i>lentiCRISPRv2</i> -Vektoren.....	S. 69
3.1.3	Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in Hodgkin-Zelllinien.....	S. 70
3.1.3.1	Analysen von CRISPR/Cas9-induzierten Mutationen der genomischen DNA und des <i>knockouts</i> von ABF1, ID2 und E2A.....	S. 70

3.1.3.2	Analyse der Proliferation und Viabilität von Hodgkin-Zellen unter CRISPR/Cas9-basiertem <i>knockdown</i> von ABF1, ID2 und E2A.....	S. 74
3.1.3.3	Etablierung von Kompetitions-Assays zur Untersuchung von cHL-Zellen nach CRISPR/Cas9-basiertem <i>knockdown</i> von ABF1, ID2 und E2A.....	S. 75
3.2	CRISPR/Cas9-Screening im Hodgkin-Lymphom.....	S. 77
3.2.1	Konzept und Grundprinzip des Screens.....	S. 77
3.2.2	Etablierung grundlegender Techniken.....	S. 77
3.2.3	Durchführung des genomweiten CRISPR-Screens.....	S. 80
3.2.4	Ergebnisse des genomweiten CRISPR-Screens.....	S. 82
3.2.4.1	Allgemeine Auswertung und Überblick.....	S. 82
3.2.4.2	Bestätigung zahlreicher bekannter Schlüsselfaktoren des cHL.....	S. 84
3.2.4.3	Identifizierung neuer potentieller Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms.....	S. 85
3.2.4.4	Expression der ermittelten Kandidatengene in Hodgkin-Zelllinien.....	S. 86
3.2.5	CRISPR/Cas9-Re-Screen zur Validierung potentieller Kandidatengene in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien.....	S. 87
3.2.5.1	Bestätigung zahlreicher bekannter Schlüsselfaktoren des cHL.....	S. 91
3.2.5.2	Bestätigung neuer potentieller Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms.....	S. 92
3.2.6	Kompetitions-Assays ausgewählter Kandidatengene.....	S. 92
3.2.7	Die Transkriptionsfaktoren IRF4, JUNB und BATF3 sind von zentraler Bedeutung für die Proliferation von cHL-Zellen.....	S. 97
3.2.8	Der Zellzyklusregulator CCND2 ist relevant und spezifisch für die Proliferation von Hodgkin-Zellen.....	S. 99
3.2.9	Die Zellzyklusregulatoren CCNA2 und CDC25A sind wichtig für das Wachstum von cHL-Zellen.....	S. 99
3.2.10	Insbesondere der alternative, nicht der klassische NF- κ B Signalweg wird in beiden CRISPR/Cas9-Screens als notwendig für das Überleben von cHL-Zellen identifiziert.....	S. 102
3.2.11	Die Methyltransferase HENMT1 ist ein neues Kandidatengen im cHL.....	S. 103
3.2.12	KEAP1 ist ein potentes neues Onkogen im cHL.....	S. 104
3.3	Klonierung von BATF- und BATF3-Expressionsvektoren sowie -sgRNAs.....	S. 106
3.3.1	Klonierung von sgRNAs gegen BATF und BATF3.....	S. 106
3.3.2	Klonierung von BATF- und BATF3-Expressionsvektoren.....	S. 106

4.	DISKUSSION.....	S. 108
4.1	Etablierung, Technik und Analyse der CRISPR/Cas9-Screens.....	S. 108
4.1.1	Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems: Generierung einer „ <i>tool box</i> “ von Vektoren für den effizienten <i>knockout</i> und anschließende funktionelle Analysen.....	S. 108
4.1.2	Etablierung der CRISPR/Cas9-Technologie anhand des <i>knockouts</i> von ABF1, ID2 und E2A.....	S. 110
4.1.3	Etablierung der Kontrolle eines effizienten CRISPR/Cas9 <i>knockouts</i>	S. 110
4.1.4	Etablierung von Kompetitions- und Proliferationsassays anhand des CRISPR/Cas9-vermittelten <i>knockouts</i> von ABF1, ID2 und E2A.....	S. 111
4.1.5	Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems und lentiviralen Transfers für genomweites <i>loss-of-function</i> Screening.....	S. 112
4.1.6	Technische Aspekte der CRISPR/Cas9-Screens.....	S. 115
4.1.7	Statistische Besonderheiten der CRISPR/Cas9-Screen Auswertung.....	S. 115
4.1.8	Betrachtung der Effizienz von sgRNAs.....	S. 116
4.1.9	Einfluss der Proliferationsgeschwindigkeit einer Zelllinie auf die Ergebnisse des CRISPR-Screens.....	S. 118
4.1.10	Validierung der CRISPR-Screen Resultate in Kompetitions-Assays.....	S. 119
4.2	Tumorbiologische Ergebnisse der CRISPR/Cas9-Screens und weitere Untersuchungen der Kandidatengene im cHL.....	S. 120
4.2.1	Genomweiter CRISPR/Cas9-Screen und Re-Screen identifizieren zahlreiche potente Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms.....	S. 120
4.2.2	Der NF- κ B Signalweg im cHL: bekannter onkogener Treiber und neue Erkenntnisse.....	S. 120
4.2.3	Der JAK/STAT-Signalweg in cHL und CRISPR-Screens.....	S. 121
4.2.4	AP-1 Transkriptionsfaktoren in cHL und CRISPR-Screens.....	S. 122
4.2.5	IRF4 ist ein sehr starkes Kandidatengen der CRISPR-Screens und notwendig für das Überleben von Hodgkin-Zellen.....	S. 123
4.2.6	Die Zellzyklusregulatoren CCND2, CCNA2 und CDC25A in cHL und CRISPR-Screens: Palbociclib als mögliche zielgerichtete Therapie im Hodgkin-Lymphom.....	S. 124
4.2.7	CRISPR/Cas9-basiertes <i>knockout</i> -Screening identifiziert neue Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms.....	S. 125
4.2.7.1	Die Methyltransferase HENMT1 als neues Kandidatengen im cHL.....	S. 125
4.2.7.2	KEAP1 als potentes neues Kandidatengen im cHL.....	S. 126

4.3 Zusammenfassende Beurteilung der CRISPR/Cas9-Screens im Hodgkin-Lymphom.....	S. 127
LITERATURVERZEICHNIS.....	S. 130
ANHANG.....	S. 142
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	S. 174
CURRICULUM VITAE.....	S. 175
PUBLIKATIONSLISTE.....	S. 177
DANKSAGUNG.....	S. 178

ABKÜRZUNGEN

ABC	<i>Activated B Cell like</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zell Rezeptor (<i>B Cell Receptor</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
BrdU	Bromodeoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementäre DNA
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom (<i>classical Hodgkin lymphoma</i>)
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	crisprRNA
ddH ₂ O	RNase und DNase freies Wasser
DLBCL	Diffus großzelliges B Zell Lymphom (<i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBFP	Enhanced Blue Fluorescent Reporter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Reporter
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz Aktivierte Zell Sortierung
FKS	Fötale Kälberserum
fwd	<i>forward</i> / vorwärts
GCB	<i>Germinal Center B cell like</i>
gDNA	genomische DNA
GeCKO	<i>Genome Scale CRISPR Knock Out</i>
ggf.	gegebenenfalls
HEBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HL	Hodgkin-Lymphom
HRP	Horseradish Peroxidase
HSL	High Salt Lysis
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRB	Isothermal Reaction Buffer
kb	Kilobasenpaare
lac	Lactose

LB	Lysogeny Broth (Medium)
MACS	Magnetische Zell Separation
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NP40	Nonidet P40
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pDNA	Plasmid-DNA
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propium-Iodid
PNK	Polynukleotid Kinase
pSK	pBlue-Skript
resp.	respektive
rev	<i>reverse</i> / rückwärts
rpm	<i>rounds per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Reverse Transkription
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth (Medium)
TBE	Tris Borat EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TENS	Tris EDTA NaCl SDS
tracrRNA	<i>transactivating-crisprRNA</i>
UV	ultraviolett
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

ZUSAMMENFASSUNG

Das klassische Hodgkin-Lymphom (*classical Hodgkin lymphoma*, cHL) ist eine häufige lymphatische Neoplasie der B-Zell-Reihe, deren molekulare Pathogenese in den letzten Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung war. Trotz zahlreicher Erkenntnisse, wie u.a. der Beschreibung der Rolle des NF- κ B- und JAK/STAT-Signalwegs sowie von AP-1- und IRF-Transkriptionsfaktoren, ist die Frage nach den letztendlich tumorbiologisch entscheidenden molekularen Treibern des cHL bis heute nur unzureichend beantwortet. Um in einem unvoreingenommenen Ansatz nach diesen Treibern zu suchen, wurde in dieser Arbeit ein genomweiter *loss-of-function* Screen in Hodgkin- und Kontrollzelllinien durchgeführt. Hierfür wurde das CRISPR/Cas9-System etabliert und verwendet, mit dem ein gezielter *knockout* von Zielgenen erreicht werden kann. Nach zunächst genomweisem *knockout*-Screening erfolgte ein unabhängiger Bestätigungs-Screen anhand einer individuellen, selbst erstellten sgRNA-Bibliothek der ermittelten potentiellen Kandidatengene. Durch diese beiden sequentiellen CRISPR/Cas9-basierten *knockout*-Screens konnten zahlreiche bereits beschriebene Gene für die Pathogenese des cHL unabhängig identifiziert und bestätigt werden, was gleichzeitig die Validität des gewählten experimentellen Ansatzes sowie der CRISPR-Screens selbst demonstriert. Unter den so bestätigten Genen befinden sich zahlreiche Faktoren des NF- κ B- und JAK/STAT-Signalwegs, die AP-1-Transkriptionsfaktoren JUNB und BATF3, der IRF-Transkriptionsfaktor IRF4 sowie u.a. der Zellzyklusregulator Cyclin D2. Darüber hinaus konnten mehrere neue Kandidatengene identifiziert werden, darunter bspw. weitere Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren, Faktoren der DNA-Reparatur und epigenetische Modifikatoren. Im Anschluss an die beiden CRISPR-Screens erfolgte die weitere Validierung ausgewählter Kandidatengene anhand von Kompetitions-Assays, in denen die Mehrzahl dieser Kandidatengene bestätigt werden konnte. Weitere funktionelle Untersuchungen unter Einsatz molekularer Inhibitoren konnten die Rolle von Cyclin D2 und weiterer Zellzyklusregulatoren für die Proliferation von Hodgkin-Zellen demonstrieren. Schließlich konnten ausgewählte neue Kandidatengene für die Pathogenese des cHL verifiziert werden; darunter KEAP1, das als ein Substratadapterprotein eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes fungiert und eine zentrale Rolle in der Regulation der zellulären Antwort auf oxidativen Stress einnimmt.

ABSTRACT

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) is a common lymphoid malignancy that is derived from B cells. The pathogenesis of cHL has been studied intensively over the past decades and a number of deregulated signalling cascades (NF- κ B, JAK/STAT) as well as transcription factor networks (AP-1, IRFs) could be identified. However, the question of the central and specific molecular mechanisms that drive the disease and their relative contribution still remains unanswered. To address this question by an unbiased approach, we performed genome-wide loss of function screening in Hodgkin and control cell lines. To this end, we applied a CRISPR/Cas9-based knockout approach which allows for a targeted knockout of genes on a genomic scale. Our genome-wide CRISPR/Cas9 knockout screen identified most of the so far known key factors of cHL pathogenesis, such as numerous members of the NF- κ B signaling pathway and JAK/STAT signaling pathways, the AP-1 family transcription factors JUNB and BATF3 and the IRF transcription factor IRF4 as well as cell cycle regulators such as Cyclin D2; i.e. our screen provides the first unbiased and genomic view of functionally relevant factors in cHL tumorbiology. The identification of these previously described factors also served as a strong validation for the chosen approach and our screening results. Moreover, several new potential candidate genes for the pathogenesis of cHL could be discovered, including additional transcription factors and cell cycle regulators, epigenetic modifiers as well as genes involved in DNA repair. To confirm our results obtained by genome-wide CRISPR/Cas9 screening, we designed and generated a targeted re-screen library and performed a second independent CRISPR/Cas9 screen. By these means, most of the known candidate genes as well as several new candidate genes could be validated. Following their identification by CRISPR/Cas9 screening, selected candidate genes were analyzed on a single candidate level by competition assays. Here, most of the selected candidate genes could be validated independently. Further functional studies applying molecular inhibitors of cell cycle regulators demonstrated the important role of these regulators for the proliferation of Hodgkin lymphoma cells. Finally, also selected novel candidate genes for the pathogenesis of cHL could be verified. Among those is KEAP1 that serves as a substrate adaptor protein of an E3 ubiquitin ligase complex and is a key regulator of the cellular response to oxidative stress.

1. EINLEITUNG

1.1 Das Hodgkin-Lymphom

1.1.1 Klinische Aspekte des Hodgkin-Lymphoms

Das Hodgkin Lymphom (HL) ist eine lymphatische Neoplasie, die ihren Ursprung in der B-Zell-Reihe hat (Kanzler et al., 1996a) und histologisch durch große mono- oder multinukleäre Zellen charakterisiert ist, die als Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) Zellen bezeichnet werden (Reed, 1902; Sternberg, 1898). Mit einer Inzidenz von 3/100.000 pro Jahr ist das HL eines der häufigsten Lymphome. Eine Besonderheit des HL ist dabei sein Auftreten in zwei Altersgipfeln: zwischen 20 bis 30 sowie über 60 Lebensjahren (Thomas et al., 2002). Klinisch präsentiert sich das HL mit einer indolenten Lymphknotenvergrößerung, häufig zervikal, sowie ggf. einer B-Symptomatik bestehend aus Fieber $>38^{\circ}\text{C}$ und/oder Gewichtsverlust von $>10\%$ des Körpergewichts in 6 Monaten und/oder Nachtschweiß. Ferner kann Juckreiz bestehen oder ein durch Alkoholgenuss induzierter Lymphknotenschmerz auftreten, der pathognomonisch für das HL ist. Bei mediastinalem Befall kann es darüber hinaus zu großen Mediastinaltumoren und einer damit einhergehenden Symptomatik kommen (Engert and Skoetz, 2013).

Die histopathologische Einordnung des HL erfolgt nach der WHO-Klassifikation zunächst in das deutlich seltenere noduläre lymphozytenprädominante HL (NLPHL), das nur ca. 7% der Fälle ausmacht, sowie das klassische HL (93%, *classical Hodgkin lymphoma*, cHL), das sich wiederum in vier Subtypen gliedern lässt (Swerdlow et al., 2017):

- | | | |
|------|-----------------------------|-----------|
| I. | Nodulär-sklerosierende Form | (ca. 60%) |
| II. | Gemischtzellige Form | (ca. 30%) |
| III. | Lymphozytenreiche Form | (ca. 5%) |
| IV. | Lymphozytenarme Form | (< 1%) |

Die Stadieneinteilung der Erkrankung erfolgt nach der (Cotswolds modifizierten) Ann Arbor-Klassifikation in vier Stadien (Tab.1) (Carbone et al., 1971; Diehl et al., 2004). Die Standardtherapie des cHL erfolgt durch eine Chemotherapie, ggf. in Kombination mit einer nachfolgenden Bestrahlung (*combined modality treatment*). In limitierten Stadien

(I-II) erfolgt die Chemotherapie dabei meist nach dem ABVD-Schema (Adriamycin + Bleomycin + Vinblastin + Dacarbazin), während in fortgeschrittenen Stadien zumindest in Deutschland vorzugsweise nach dem intensiveren BEACOPP-Schema (Bleomycin + Etoposid + Adriamycin + Cyclophosphamid + Oncovin (Vincristin) + Procarbazin + Prednison) behandelt wird. Bei refraktärem Verlauf oder in der Rezidivsituation kommen aggressivere Chemotherapieprotokolle bis hin zu einer myeloablativen Hochdosis-Chemotherapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation zum Einsatz (Engert and Skoetz, 2013). Zusätzlich ist auch die Therapie des cHL geprägt von der zunehmenden Erprobung und Zulassung neuer, zielgerichteter Therapien. So wird bereits, v.a. in fortgeschrittenen Stadien und im Rezidiv bzw. bei erhöhtem Rezidivrisiko, der Antikörper Brentuximab erfolgreich angewendet, der das Spindelgift Vedotin mit einem gegen das beinahe selektiv auf HRS-Zellen exprimierte CD30 gerichteten Antikörper verbindet. Darüberhinaus ist im Rahmen von Studien die Therapie mit den immunmodulierenden anti-PD1-Antikörpern Nivolumab und Pembrolizumab möglich (Alperovich and Younes, 2016; Younes et al., 2017).

Unter Standardtherapie besitzt das cHL eine sehr gute Prognose mit einem progressionsfreien Überleben von >90% in limitierten, >80% in fortgeschrittenen Stadien bei Therapie nach eskalierendem BEACOPP-Protokoll bzw. >70% bei Therapie mit ABVD (Engert et al., 2009, 2010). Dem primär guten Ansprechen auf die Chemo- und ggf. Strahlentherapie steht jedoch das vergleichsweise hohe Risiko von Kardio- und Pulmotoxizität, insbesondere bei zusätzlicher Strahlentherapie, oder Sekundärneoplasien entgegen (Dores et al., 2002; Hodgson, 2011). Ein Risiko, das umso schwerer wiegt, da ein großer Teil der Patienten in jungen Jahren erkrankt. Daher gilt heute als generelles Ziel der Therapie beim cHL, eine möglichst hohe Antitumoraktivität bei möglichst geringer Toxizität zu erzielen. Es wird versucht, dieses Ziel bspw. durch die individuelle Therapiesteuerung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zu erreichen, wodurch das Ansprechen auf die applizierte Chemotherapie beurteilt werden kann. Zusätzlich ist und bleibt die Erarbeitung neuer zielgerichteter Therapien ohne schwerwiegende Nebenwirkungen und Folgen gerade ein wichtiges Ziel. Für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist es unerlässlich, die Pathogenese des cHL weiter zu ergründen und die molekularen Treiber der Erkrankung zu identifizieren, die so als gezielte Angriffspunkte für neue Therapien dienen können.

Stadium		Kriterien
I		Befall eines einzelnen Lymphknotens oder eines einzigen lokalisierten extranodalen Herdes
II		Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells oder lokalisierte extranodale Herde und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
III		Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells oder lokalisierte extranodale Herde auf beiden Seiten des Zwerchfells
IV		Disseminierter Befalle eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten
Zusätze	A	ohne B-Symptomatik
	B	mit B-Symptomatik
	E	extranodaler Befall
	S	Milzbefall
Risiko-faktoren		großer Mediastinaltumor (>1/3 des Thoraxdurchmessers) extranodaler Befall hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit Befall von ≥ 3 Lymphknotenarealen

Tab. 1.1 Stadieneinteilung des HL nach der Ann-Arbor-Klassifikation. (Carbone et al., 1971)

1.1.2 Biologie der B-Zelle

Über lymphoide Vorläuferzellen reifen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen in mehreren genau definierten Entwicklungsstufen naive B-Zellen heran. Während dieser Schritte wird auch der B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) ausgebildet, der aus je zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht. Grundlage für die Ausbildung des BCR ist die Rekombination unabhängiger Gensegmente, so dass ein zufälliger, einzigartiger, spezifischer BCR entsteht. Dabei wird in der pro-B-Zelle zunächst die schwere Kette gebildet, in deren Genlocus drei Gruppen von Gensegmenten umgelagert werden, die als V-, D- und J-Segmente bezeichnet werden. Zu Beginn wird ein einzelnes D_H-Segment mit einem J_H-Segment verknüpft. Anschließend wird das entstandene DJ-Segment mit einem V_H-Segment verbunden. Wird diese sogenannte VDJ-Rekombination erfolgreich durchgeführt und resultiert in einer funktionalen schweren Kette, reift die pro-B-Zelle weiter zur prä-B-Zelle, die nun einen ersten prä-BCR exprimiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Rekombination für die leichte Kette, indem sich je ein V_L- und J_L-Segment des κ - oder λ -Locus verbinden (Blom and Spits, 2006; Ghia et al., 1996; Küppers et al., 1999).

So entsteht nun die unreife B-Zelle, die einen vollständig funktionalen BCR exprimiert und zunächst eine negative Selektion durchläuft, in der solche B-Zellen, deren BCR Autoantigene erkennt, in die Apoptose geleitet werden. Trifft die nun reife, aber noch naive B-Zelle nach dem Verlassen des Knochenmarks auf ihrer Zirkulation durch Blut-

und Lymphsystem in einem lymphatischen Organ auf ein zu ihrem BCR passendes Antigen, kommt es bei entsprechender Hilfe durch T-Zellen und dendritischen Zellen zur sogenannten Keimzentrumsreaktion. Diese Reaktion ist durch eine sehr starke Proliferation der B-Zellen gekennzeichnet und bildet die Grundlage für eine weitere Reifung und Modifikation des BCR. Es erfolgt durch eine genetische Umlagerung ein Ig-Klassenwechsel hin zu den Effektorclassen IgA, IgG und IgE. Darüberhinaus wird durch somatische Hypermutation, d.h. die Einführung von Mutationen in die variable Region der Ig-Gene und anschließende Selektion, eine höhere Spezifität des BCR für sein Antigen erreicht. Einerseits führt die Keimzentrumsreaktion so zu besonders hochspezifischen B-Zellen und somit zu einer hochleistungsfähigen Immunantwort auf Pathogene (Basso and Dalla-Favera, 2015; Klein and Dalla-Favera, 2008). Auf der anderen Seite ist die Keimzentrums-B-Zelle durch die hohe Proliferationsrate in Kombination mit genetischer Rekombination und somatischer Mutation besonders anfällig für eine maligne Entartung (Küppers, 2005).

Die oben beschriebenen Entwicklungsschritte von der pro-B-Zelle zur reifen B-Zelle werden entscheidend durch die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren zu bestimmten Zeitpunkten gesteuert. Dabei sind die Transkriptionsfaktoren E2A, EBF1 und PAX5 für die Etablierung und Fixierung des B-Zell-typischen Expressionsprogramms in allen Entwicklungsstadien von der pro-B-Zelle bis zur reifen B-Zelle maßgeblich verantwortlich (Lin and Grosschedl, 1995; Rolink et al., 1999; Zhuang et al., 1994). Im pro-B-Zell-Stadium ist darüber hinaus der Transkriptionsfaktor PU.1 relevant, während ab der prä-B-Zelle ferner OCT2 eine bedeutende Rolle für die weitere Entwicklung zukommt (Corcoran et al., 1993; DeKoter and Singh, 2000).

Wird der BCR der reifen B-Zelle durch ein entsprechendes Antigen stimuliert, übernehmen zahlreiche Signalwege die intrazelluläre Signalübertragung und führen zur Proliferation der B-Zelle. Zu diesen zählt allen voran der NF- κ B-Signalweg, aber auch bspw. der JAK/STAT- und PI3K/Akt-Signalweg. (Limon and Fruman, 2012; Malin et al., 2010; Matthias and Rolink, 2005)

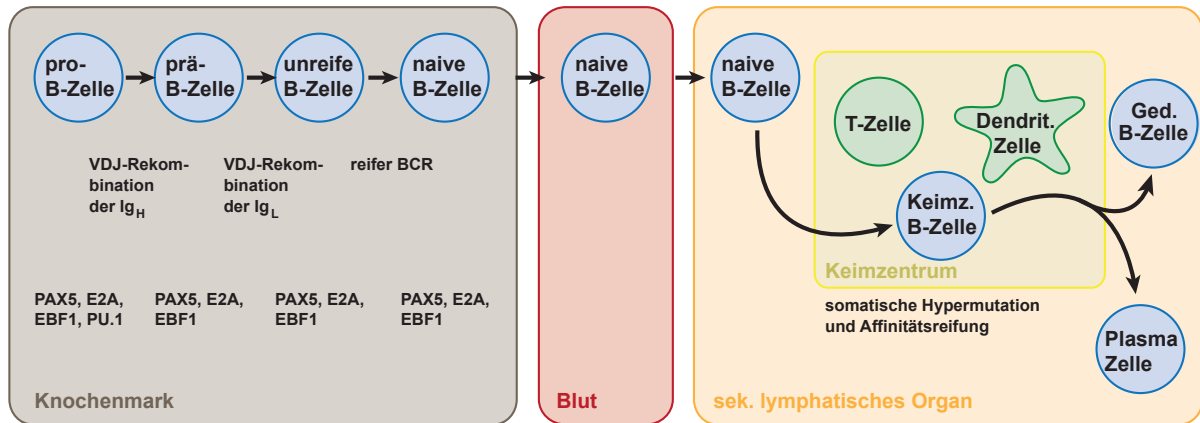


Abb. 1.1 B-Zell-Entwicklung und -Reifung. Entwicklung der naiven B-Zelle im Knochenmark: Entscheidende Schritte der Entwicklung und Entstehung des B-Zell-Rezeptors sowie jeweils vorrangige Transkriptionsfaktoren. Somatische Hypermutation und Affinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors (BCR) in sekundären lymphatischen Organen (v.a. Lymphknoten, Milz) unter Ausbildung einer Keimzentrumsreaktion. (Keimz. = Keimzentrum; Ged. = Gedächtnis)

1.1.3 Molekularbiologie des Hodgkin-Lymphoms

Wie bereits beschrieben lässt sich das HL histopathologisch in zwei Subtypen einteilen: das häufige klassische HL (cHL) sowie das deutlich seltenere NLPHL. Diese Arbeit konzentriert sich auf das klassische HL, vor allem wegen dessen starker Prädominanz, aber auch, da es für das seltene NLPHL bisher keine geeigneten Zelllinien-Modelle gibt.

1.1.3.1 Der zelluläre Ursprung des cHL

Das klassische Hodgkin-Lymphom ist eine Erkrankung maligne transformierter Keimzentrums-B-Zellen. Nachdem Thomas Hodgkin 1832 erstmals eine Zusammenstellung von Fällen mit charakteristischen Merkmalen einer Erkrankung der Lymphknoten und Milz publizierte, was heute als Erstbeschreibung des cHL gilt, konnten Carl Sternberg und Dorothy Reed 1898 bzw. 1902 die später nach ihnen benannten Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen als typisches histopathologisches Merkmal der von Hodgkin beschriebenen Erkrankung identifizieren (Hodgkin, 1832; Reed, 1902; Sternberg, 1898). Die Suche nach dem zellulären Ursprung des cHL erwies sich allerdings als sehr schwierig und langwierig. Erschwert wurde dies u.a. auch durch das Fehlen eines eindeutigen Profils von Oberflächenmarkern auf den HRS-Zellen (s.u.) sowie die Tatsache, dass die HRS-Zellen als die eigentliche maligne Zellpopulation nur etwa 1% der Tumormasse des cHL ausmachen, während das übrige Bild geprägt wird

von einem gemischten nicht-malignen Begleitinfiltrat, das vor allem T-Zellen, Monozyten/Makrophagen sowie Fibroblasten enthält (Küppers, 2009). Erst knapp 100 Jahre später konnte so schließlich der zelluläre Ursprung des cHL sicher festgestellt werden: 1994 zeigten Küppers et al., dass in HRS-Zellen die variable Region des Genlocus für die schwere Kette des BCR rekombiniert und somatisch hypermutiert ist und identifizierten damit die Keimzentrums-B-Zelle als Ausgangspunkt der HRS-Zellen (Küppers et al., 1994). Dabei entstehen die HRS-Zellen aus Keimzentrums-B-Zellen, die das Keimzentrum fehlerhaft durchlaufen haben, wobei die Expression eines funktionsfähigen BCR verloren gegangen ist, insbesondere durch sog. *crippling mutations* der Ig-Gene, durch die das Leseraster zerstört wird (Kanzler et al., 1996a). Dies ist besonders bemerkenswert, da der Verlust ihres BCR normalerweise nicht mit dem Überleben einer B-Zelle vereinbar ist (Lam et al., 1997).

1.1.3.2 Linienfremde Genexpression im cHL

Ein weiterer Grund für die komplizierte Eruierung des zellulären Ursprungs des cHL liegt in den ausgeprägten Veränderungen der Genexpression in den HRS-Zellen. Nahezu sämtliche B-Zell-assoziierten Gene werden in diesen nicht oder nur sehr gering exprimiert, während zeitgleich die Expression linienfremder Gene, die physiologisch vor allem in T- oder myeloischen Zellen exprimiert werden, hochreguliert ist. Insgesamt betrachtet haben die HRS-Zellen einen großen Teil des B-Zell-typischen Genexpressionsprogramms herunterreguliert oder gar verloren. Beispiele hierfür sind zahlreiche Komponente des BCR-Signalwegs (Ig-Gene, CD79A/B, SYK), CD20 (Küppers et al., 2003; Schwering et al., 2003) oder die B-Zell-assoziierten Transkriptionsfaktoren PU1, BOB.1 und OCT2 (Jundt et al., 2002a; Re et al., 2001; Torlakovic et al., 2001). Ein anderer wichtiger Transkriptionsfaktor für das B-Zell-Genexpressionsprogramm, E2A, wird durch die hohe Expression zweier Antagonisten, ABF1 und ID2, in seiner transkriptionellen Aktivität verändert bzw. inhibiert, wodurch direkt die Expression linienfremder Gene, wie bspw. des CSF1R, induziert wird (Mathas et al., 2006). Darüber hinaus ist der Transkriptionsfaktor NOTCH1 linienfremd im cHL hoch exprimiert (Jundt et al., 2002b).

1.1.3.2.1 Die Rolle von ABF1 und ID2 im cHL

Verantwortlich für die Reprogrammierung des Transkriptionsfaktornetzwerkes in HRS-Zellen sind zu bedeutenden Teilen die beiden Proteine *inhibitor of DNA binding 2* (ID2) und *activated B cell factor 1* (ABF1; auch *musculin* MSC) (Mathas et al., 2006; Renné et al., 2006). Wie der bereits beschriebene, für das Transkriptionsprogramm der B-Zell-Reihe relevante Transkriptionsfaktor E2A ist ABF1 ein *basic helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktor. Während die DNA-Bindung über die basische Domäne stattfindet, ist die Helix-Loop-Helix Domäne für die Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen HLH-Proteinen verantwortlich. So interagiert ABF1 u.a. mit E2A, wobei ABF1-E2A Heterodimere dann nicht mehr an ursprüngliche E2A-E2A Homodimer DNA-Bindungsstellen binden oder statt einer aktivierenden eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von E2A-Zielgenen entfalten (Massari et al., 1998). ID2 ist ein HLH-Protein ohne basische Domäne, sodass ID2 zwar Heterodimere mit u.a. E2A bilden kann, diese jedoch keine Fähigkeit zur DNA-Bindung besitzen. Über eine Inhibition der DNA-Bindung verursacht ID2 so einen Funktionsverlust von E2A und trägt gemeinsam mit ABF1 über diese Antagonisierung der E2A-Aktivität zum Verlust der Expression B-Zelllinien typischer Gene und der Expression linienfremder Gene im cHL bei. ID2 wird physiologisch u.a. hoch exprimiert in myeloischen Zellen, dendritischen Zellen, NK-Zellen oder bestimmten T-Zell-Subpopulationen (Ishiguro et al., 1996; Rivera and Murre, 2001).

1.1.3.3 Der NF- κ B-Signalweg im cHL

Der NF- κ B-Signalweg nimmt eine zentrale Rolle für die Proliferation und das Überleben von Hodgkin-Zellen ein. Während er physiologisch in B-Zellen nur intermittierend auf spezifische Reize, wie bspw. die Stimulation des BCR, hin aktiviert wird, ist der NF- κ B-Signalweg in HRS-Zellen konstitutiv aktiv und unabhängig vom BCR, welcher in HRS-Zellen wie bereits beschrieben nicht mehr exprimiert oder nicht funktionell ist (Bargou et al., 1996; Emmerich et al., 1999; Hinz et al., 2001; Krappmann et al., 1999; Mathas et al., 2005).

Der NF- κ B-Signalweg führt über zwei Wege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Expression seiner Zielgene (Sen and Baltimore, 1986; Staudt et al., 1986). Im klassischen NF- κ B-Signalweg, werden durch die Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren wie dem BCR, CD40 oder BAFF die Kinasen IKK α , β und γ durch Phosphorylierung aktiviert und inhibieren dann ihrerseits die NF- κ B-Inhibitoren I κ B α und

I κ B ϵ . Hierdurch werden RelA(p65)- und cRel-NF- κ B1(p50) Heterodimere freigesetzt und können nun in den Zellkern translozieren, wo sie als Transkriptionsfaktoren die Expression zahlreicher Zielgene induzieren. Unter diesen befinden sich u.a. die Transkriptionsfaktoren IRF4 und MYC, zahlreiche Interleukine und Chemokine wie IL-6, CCL3, CCL4 und Lymphotoxin α (LTA) sowie STAT5A. Im alternativen NF- κ B-Signalweg induziert NIK die Phosphorylierung von IKK α , das dann wiederum nach Prozessierung von NF- κ B2 zu p52 RelB-p52 Heterodimere und p52-Homodimere aktiviert (Bonizzi and Karin, 2004; Hinz et al., 2002; Jost and Ruland, 2007; Kaileh and Sen, 2012).

Im cHL ist der NF- κ B-Signalweg hingegen konstitutiv aktiv, wobei unterschiedliche Mechanismen zur Aktivierung beitragen können. Hierzu zählen die permanente Signalübertragung durch das EBV-Protein LMP1, den CD30-, CD40 oder RANK-Rezeptor, inaktivierende Mutationen der NF- κ B-Inhibitoren I κ B α und I κ B ϵ oder genomische Amplifikationen, v.a. von cRel in ca. 50% der Fälle (Barth et al., 2003; Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 2003; Fiumara et al., 2001; Jungnickel et al., 2000; Kilger et al., 1998; Martín-Subero et al., 2002). Zusätzlich konnte ein autokriner Mechanismus identifiziert werden, bei dem von HRS-Zellen sezerniertes LTA wiederum auf die Tumorzellen zurückwirkt und zur Aktivierung des klassischen und alternativen NF- κ B-Signalwegs führt (Von Hoff et al., 2019).

1.1.3.4 AP-1- und IRF-Transkriptionsfaktoren im cHL

Das AP-1-Transkriptionsfaktornetzwerk wird gebildet aus Homo- und Heterodimeren von Mitgliedern der Familie der Jun-, Fos- und ATF-Proteine. Zahlreiche AP-1-Faktoren sind in HRS-Zellen hoch exprimiert und aktiv, darunter bspw. die Jun-Transkriptionsfaktoren JUNB und c-JUN sowie die *activating transcription factors* (ATF) ATF3 und BATF3 (Janz et al., 2006; Mathas et al., 2002). Zudem trägt auch der konstitutiv aktive NF- κ B-Signalweg zu der hohen Aktivität der AP-1-Faktoren in HRS-Zellen bei. Durch die hohe Aktivität der AP-1-Faktoren werden im cHL zahlreiche wichtige Zielgene wie bspw. Cyclin D2, CCR7, CD30, Galectin-1, PD-L1 oder MYC reguliert (Green et al., 2012; Juszczynski et al., 2007; Lollies et al., 2018; Mathas et al., 2002).

Zusätzlich zu den AP-1-Faktoren sind auch wichtige Transkriptionsfaktoren der *interferon regulatory factor* (IRF) Familie, IRF4 und IRF5, hoch exprimiert im cHL. Neben ihrer eigenständigen transkriptionellen Aktivität besteht dabei auch ein

Zusammenwirken von AP-1- und IRF-Transkriptionsfaktoren (Aldinucci et al., 2011; Kreher et al., 2014; Valsami et al., 2007).

1.1.3.5 Weitere molekulare Defekte im cHL

Neben dem NF- κ B-Signalweg ist im cHL insbesondere auch der JAK-STAT-Signalweg regelhaft dereguliert. Über diesen Signalweg wirken vor allem zahlreiche der für die Pathogenese des cHL zentralen Zytokine, die sowohl aus den HRS-Zellen selbst als auch aus dem *Microenvironment* des Tumors stammen. Bei Stimulation des JAK-STAT-Signalweges werden durch JAK-Proteine STAT-Proteine phosphoryliert, die daraufhin dimerisieren und in den Zellkern translozieren, wo sie ihre Wirkung als Transkriptionsfaktoren entfalten (Joos et al., 2000; Weniger et al., 2006). Die Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs wird durch die Häufigkeit unterstrichen, mit der Komponenten dieser Signalkaskade im cHL von genetischen Veränderungen betroffen sind, wie z.B. Mutationen im JAK-Inhibitor SOCS-1 und in STAT6 sowie Amplifikationen der genomischen Region 9p24, auf der JAK2 lokalisiert ist (Rui et al., 2010; Spina et al., 2018; Weniger et al., 2006).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch der PI3K-AKT-Signalweg relevant für das Überleben von HRS-Zellen ist. Ein aktiver ERK-Signalweg inhibiert außerdem die Apoptose in HRS-Zellen. Beide Signalwege werden vermutlich ebenfalls über die Rezeptoren CD30, CD40 und RANK aktiviert (Dutton et al., 2005; Georgakis et al., 2006; Zheng et al., 2003).

Schließlich sind für die Proliferation der HRS-Zellen auch direkte Veränderungen in Zellzyklusregulatoren verantwortlich. So ist bspw. das Cyclin D2 (CCND2) - u.a. durch die konstitutive NF- κ B-Aktivität - stark exprimiert in HRS-Zellen und steuert deren Transition von der G1- zur S-Phase (Bai et al., 2004).

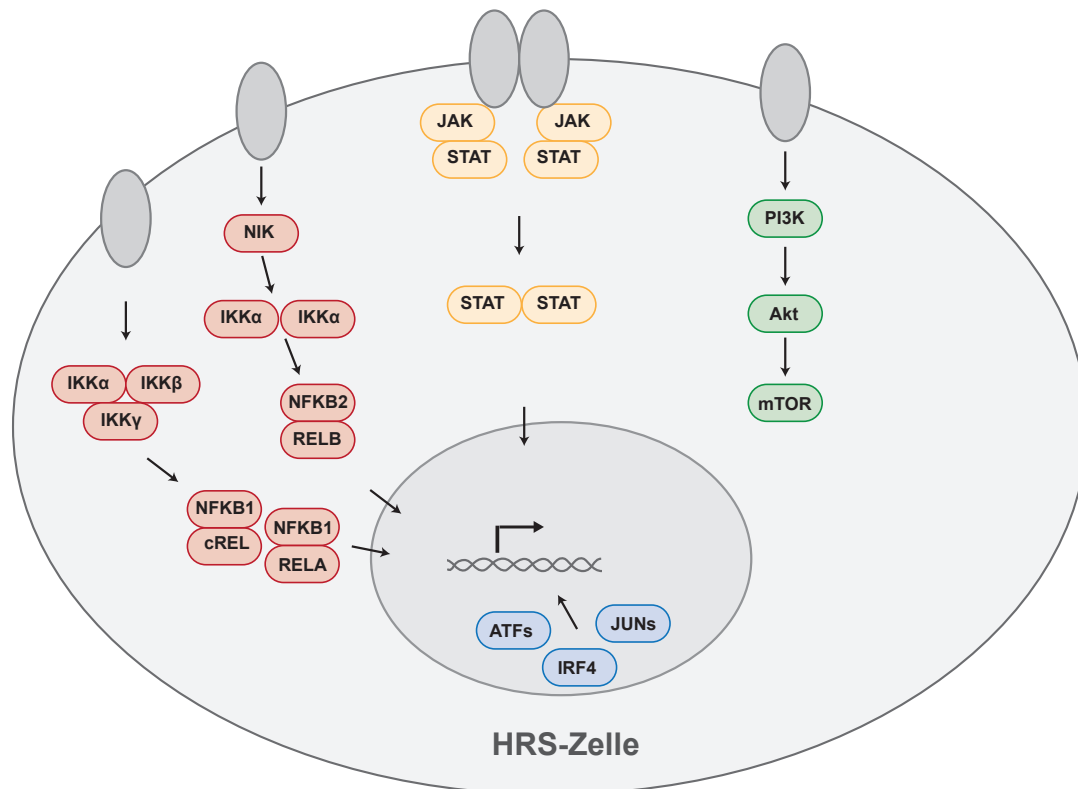


Abb. 1.2 Deregulierte Signalwege und Transkriptionsfaktoren im cHL: rot: NF-κB-Signalweg, gelb: JAK-STAT-Signalweg, grün: PI3K-Akt-Signalweg; blau: ATF- und IRF-Transkriptionsfaktoren.

1.2 Zellzyklusregulatoren

Der Zustand jeder Zelle variiert zwischen Phasen der Ruhe und der Teilung. Innerhalb dieses Zyklus der Zelle lassen sich dabei folgende Phasen unterscheiden: G1, S, G2 und M (Mitose). Während letzterer findet die eigentliche Teilung der Zelle statt, die sich nochmals in Prophase, Prometaphase, Metaphase, frühe Anaphase, späte Anaphase und Telophase unterteilen lässt. In der sich anschließenden G1-Phase werden zunächst wieder Zytoplasma und Zellorganellen vermehrt; der Chromosomensatz ist vollständig, jedoch liegt von jedem Chromosom nur eine Chromatide vor. Zellen, die sich nicht weiter teilen (sollen), gehen von der G1- zur G0-Phase über. Weiter im Zellzyklus voranschreitende Zellen treten nach der G1- in die S-Phase ein, in der nun die DNA verdoppelt wird und am Ende derer jedes Chromosom wieder aus zwei Chromatiden besteht. In der sich nun anschließenden G2-Phase wird die Zelle dann bereits wieder auf die nächste Mitose vorbereitet. Da bei der Zellteilung schwerwiegende Fehler wie Chromosomenfehlverteilungen oder DNA-Schäden

auftreten können, kommt der Kontrolle des Zellzyklus eine besondere Bedeutung zu. Kontrollpunkte liegen am Übergang der G2-Phase zur Mitose, am Übergang der Mitose in die G1-Phase sowie am Übergang der G1- zur S-Phase. Diese werden u.a. durch die im Folgenden beschriebenen Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen kontrolliert. (Cooper, 2000; Smith and Martin, 1973)

Cyclin D2 reguliert in B-Zellen gemeinsam mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin dependant kinase*, CDK) 4 bzw. 6 die Transition von der G1 zur S-Phase (Solvason et al., 1996; Tanguay and Chiles, 1996).

Zwar nicht für Cyclin D2 selbst, aber für CDK4/6 wurden potente Inhibitoren entwickelt und bereits in die Klinik gebracht (Fry et al., 2004; Toogood et al., 2005). So ist der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib bereits zugelassen für die Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Mammakarzinoms (de Groot et al., 2017). Eine weitere Entität, für die der Einsatz von Palbociclib intensiv im Rahmen klinischer Studien getestet wird, ist das Mantelzelllymphom, für das die t(11;14) Translokation, die Cyclin D1 unter die Kontrolle des starken IgH-Enhancers bringt und so dessen Expression steigert, charakteristisch ist (Leonard et al., 2012; Marzec et al., 2006).

Cyclin A2 und die Zellzyklus assoziierte Phosphatase CDC25A (*cell division cycle 25A*) vermitteln gemeinsam mit der zyklinabhängigen Kinase CDK2 den Zellzyklusprogress durch die S-Phase. CDC25A trägt durch Dephosphorylierung zur Aktivierung von CDK2 bei und wird selbst wiederum bei Vorliegen von DNA-Schäden abgebaut, wodurch der Zellzyklusprogress von Zellen mit genomischen Schäden verhindert. Wie auch im Falle von CCND2 und CDK4/6 kann die in diesem Regelkreis wirkenden Kinase CDK2 durch spezifische Inhibitoren ausgeschaltet werden (Jinno et al., 1994; Pagano et al., 1992; Pines and Hunter, 1990).

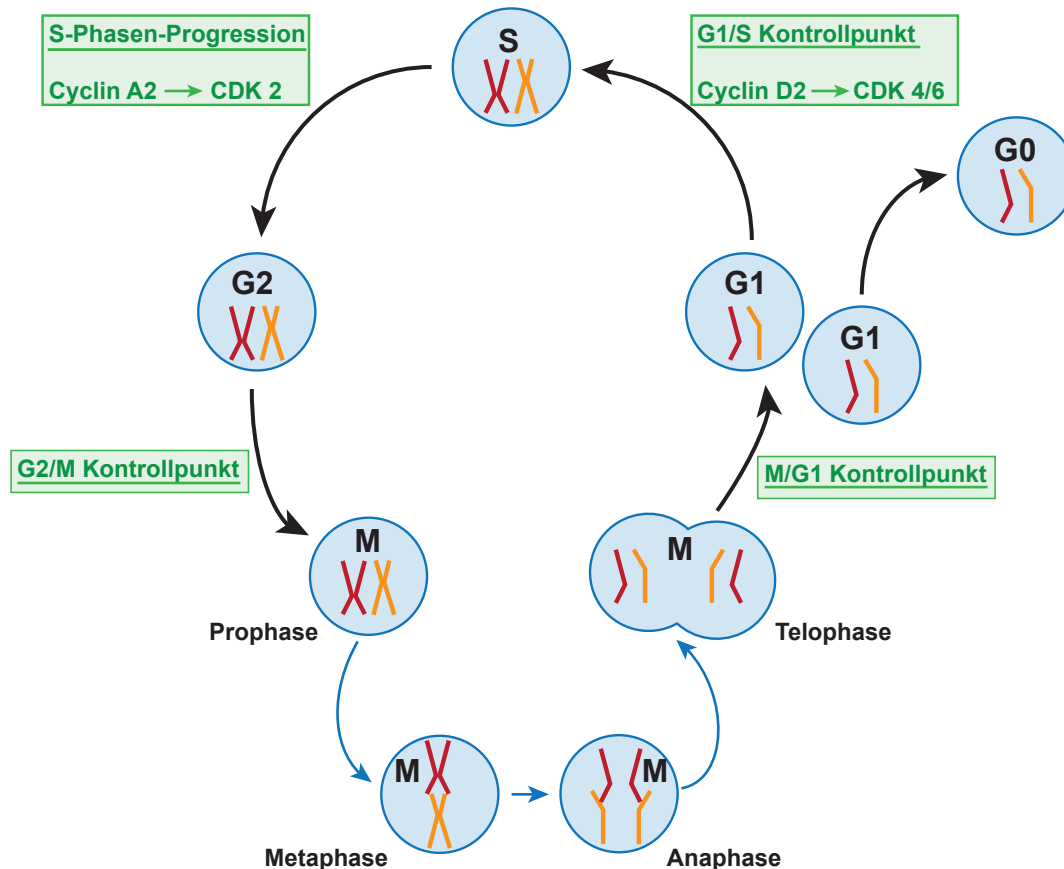


Abb. 1.3 Zellzyklus und Zellzyklusregulation. (Erläuterung siehe oben, Kapitel 1.2)

1.3 Das kelch like ECH associated protein 1 (KEAP1)

KEAP1 fungiert als Substrat-Adapter-Protein eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der das RING-Protein CUL3 sowie die Ubiquitin-Ligase RBX1 enthält. Dabei besitzt KEAP1 drei funktionelle Domänen: Eine N-terminale BTB-Domäne, über die es CUL3 bindet und selbst dimerisiert, eine *intervening region* (IVR) und eine C-terminale Kelch-Domäne, über die das Substrat gebunden wird. Über die Bindung an definierte Zielproteine vermittelt KEAP1 so die Substratspezifität dieses E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes und damit eine gezielte Ubiquitinierung und folgende proteasomale Degradierung entsprechender Proteine. Das am besten beschriebene Substrat des KEAP1-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist der Transkriptionsfaktor NRF2, auf den im Folgenden genauer eingegangen wird. (Jaramillo and Zhang, 2013; Zhang et al., 2004)

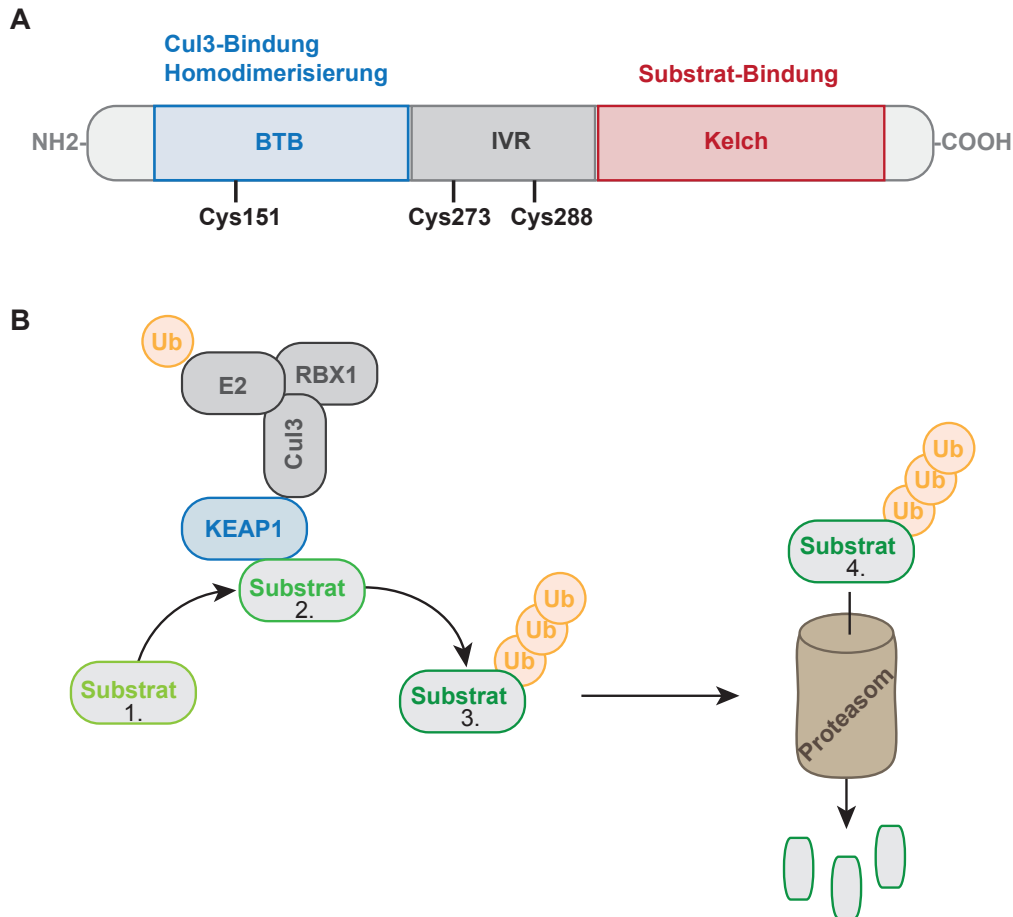


Abb. 1.4 KEAP1 **A** Aufbau des KEAP1-Proteins: Die N-terminale BTB-Domäne bindet Cul3 und KEAP1 selbst (Homodimerisierung). Die C-terminale Kelch-Domäne ist verantwortlich für die Substrat-Bindung. **B** KEAP1 vermittelt die Substratspezifität eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der neben KEAP1 aus Cul3, einer E2-Ligase und RBX1 besteht. Durch diesen Komplex polyubiquitinierte Proteine werden anschließend proteasomal degradiert.

Die KEAP1-NRF2-Achse ist der wichtigste Signalweg für die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress und der zentrale Regulator für den Redox-Status der Zelle. Unter basalen Bedingungen, d.h. Zuständen mit einem geringen Grad an oxidativem Stress, ist KEAP1 aktiv und bindet an NRF2, wodurch dieses für den proteasomalen Abbau markiert wird. Unter steigendem oxidativem Stress werden Cystein-Reste an KEAP1 oxidiert, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt. Hierdurch wird NRF2 nicht mehr durch KEAP1 gebunden und freies NRF2 kann in den Nucleus translozieren, wo es zusammen mit kleinen Proteinen der MAF-Familie (*small MAFs*) an *anti-oxidant response elements* (ARE) bindet und die Expression anti-oxidativer Gene induziert. Unter diesen NRF2-Zielgenen befinden sich Thioredoxine, Enzyme des Glutathion-Systems, die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Enzyme des Pentose-

Phosphat-Weges (Transketolase, Transaldolase); d.h. NRF2 induziert eine starke und koordinierte zytoprotektive Antwort. (Dinkova-Kostova et al., 2002; Jaramillo and Zhang, 2013; Zhang et al., 2004)

Für einige solide Tumore, insbesondere das Bronchialkarzinom, ist der Verlust von KEAP1 durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen und die damit einhergehende konstitutive NRF2-Aktivierung als bedeutender Mechanismus für die onkogene Transformation beschrieben worden, die u.a. auch eine erhöhte Chemo- und Radioresistenz vermittelt (Lau et al., 2008; Singh et al., 2008).

1.4 Das CRISPR/Cas9-System

1.4.1 Bakterielle CRISPR/Cas-Systeme

Das CRISPR/Cas-System (CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; Cas: *CRISPR-associated protein*) ist ein bakterielles Immunsystem, das fremde Nukleotid-Sequenzen erkennt und gezielt zerstört. Inzwischen wurden zahlreiche unterschiedliche CRISPR/Cas-Systeme in verschiedenen Bakterienstämmen beschrieben. Im Folgenden beziehe ich mich auf das in *Streptococcus pyogenes* vorkommende CRISPR/Cas9-System, das die Grundlage für die molekularbiologische CRISPR/Cas-Technologie bildet. Durch das CRISPR/Cas9-System werden 20 Basen lange Bruchstücke eindringender fremder Nukleotid-Sequenzen, so genannte *protospacer*, in das eigene bakterielle Genom in die CRISPR-Loci eingebaut. Dort liegen sie zwischen den eigentlichen CRISPR-*repeats* und werden von hier mit einem Teil des nachfolgenden *repeats* gemeinsam als *crisprRNA* (crRNA) abgelesen. Diese crRNA hybridisiert mit einer zweiten RNA, der *transactivating-crisprRNA* (tracrRNA), um so gemeinsam die Nuklease Cas9 an die Zielsequenz zu führen. Dort verursacht die Cas9 einen Doppelstrangbruch zwischen dem 17. und 18. Basenpaar der *protospacer*-Sequenz. Um die Zerstörung des in den eigenen CRISPR-locus integrierten *protospacers* zu verhindern, muss für die Aktivierung der Cas9 neben dem eigentlichen *protospacer* ein angrenzendes *protospacer adjacent motif* (PAM) erkannt werden, das aus drei Basen gebildet wird. Dieses unterscheidet sich zwischen den verschiedenen CRISPR/Cas-Systemen und lautet für das CRISPR/Cas9-System NGG. Hierdurch wird darüber hinaus allgemein die Spezifität des Systems weiter erhöht. (Doudna and Charpentier, 2014; Sander and Joung, 2014; Sorek et al., 2013)

1.4.2 Das CRISPR/Cas9-System als molekularbiologisches Werkzeug

Die Tatsache, dass das CRISPR/Cas9-System gezielt Doppelstrangbrüche in DNA einführt, kann als molekularbiologisches Werkzeug für die spezifische Modifikation des Genoms, insbesondere zum gezielten *knockout* von Genen genutzt werden. Über eine crRNA, die den zur Zielsequenz komplementären *protospacer* enthält, kann die Cas9 zum Zielgen gesteuert werden. Infolge des dort dann eingeführten Doppelstrangbruchs kommt es bei der anschließenden Reparatur zu Deletionen, Insertionen und Substitutionen und damit in einem hohen Prozentsatz zu Leserasterverschiebungen, woraus schließlich ein funktioneller *knockout* des Zielgenes resultiert. Um die praktische Anwendbarkeit zu verbessern, wurden die crRNA und die tracrRNA zu einer gemeinsamen *single-guideRNA* (sgRNA) fusioniert. Alle von mir verwendeten und erstellten Plasmide beruhen dabei auf einem Konstrukt, bei dem über zwei Schnittstellen eines Restriktionsenzymes der passende 20 Basen lange *protospacer* in die sgRNA-Sequenz gesetzt werden kann. (Cong et al., 2013; Doudna and Charpentier, 2014)

Eine Übersicht zur Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems als molekularbiologisches Werkzeug ist in Abb. 1.5 dargestellt.

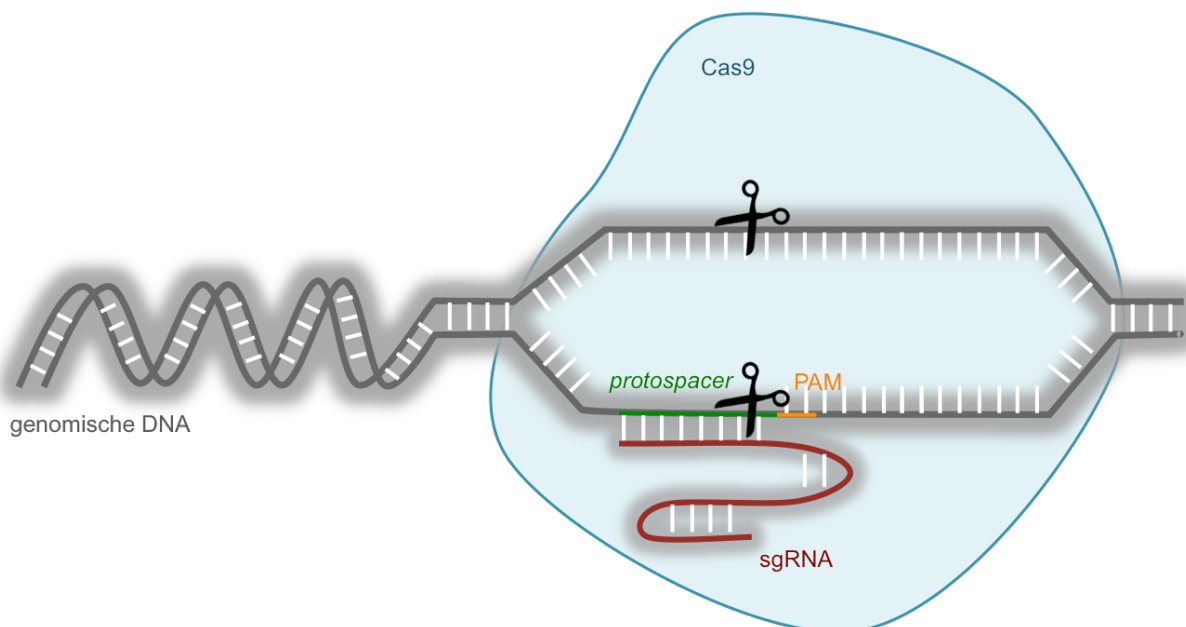


Abb. 1.5 Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems. Eine zum 20bp langen *protospacer* der genomischen DNA kompatible sgRNA führt die Nuklease Cas9 an das jeweilige Zielgen. Dort erzeugt diese einen Doppelstrangbruch in der genomischen DNA zwischen dem zweiten und dritten Basenpaar 5' des PAM.

1.4.3 CRISPR/Cas9-basiertes *knockout*-Screening

Um unvoreingenommen und über eine Vielzahl von Genen – bis hin zum gesamten Genom – funktionell nach für eine bestimmte Fragestellung relevanten Genen zu suchen, wurden schon lange vor der CRISPR/Cas9-Ära verschiedene Screening-Ansätze entwickelt. So wurden für die Analyse der funktionellen Konsequenzen eines Genverlustes vor allem RNA-Interferenz (RNAi) basierte Verfahren angewendet. RNAi stört die Expression des jeweiligen Zielgenes auf mRNA-Ebene und resultiert so in einem relativen *knockdown* der Genexpression (Bernards et al., 2006). Gegenüber RNAi-basierten Verfahren besitzen die nun möglichen CRISPR/Cas9-basierten *knockout*-Screening-Verfahren eine höhere Spezifität für das jeweilige Zielgen, also weniger sog. *off-target* Effekte auf andere Gene, sowie vor allem eine höhere Effizienz. Durch den irreversiblen *knockout* des Zielgens schon auf genomischer Ebene ist der Expressionsverlust gegenüber shRNAs nicht nur stärker ausgeprägt, sondern bleibt auch über die Zeit stabil, was Screening-Verfahren über einen langen Zeitraum erst ermöglicht. (Adamson et al., 2012; Schultz et al., 2011; Shalem et al., 2014; Wang et al., 2014)

Das molekularbiologische Grundprinzip eines jeden *knockout*-Screens ist Folgendes: Vom Zeitpunkt der Transduktion an werden über den Beobachtungszeitraum hinweg solche sgRNAs, die ein überlebens- oder proliferationsrelevantes Gen zum Ziel haben, in der Repräsentation aller sgRNAs abnehmen oder ganz verschwinden. SgRNAs, die hingegen einen Tumorsuppressorgen zum Ziel haben, werden über die Zeit in ihrem Anteil an der Gesamtmenge der sgRNAs zunehmen. Die hieraus resultierenden Veränderungen in der quantitativen Zusammensetzung des sgRNA-Pools können zu definierten Endpunkten durch Hochdurchsatz-Sequenzierung ausgelesen und hieraus für die jeweilige Zelllinie relevante Kandidatengene ermittelt werden. Dieses Grundprinzip wird in der Abbildung 1.6 für die sog. GeCKO-Bibliothek verdeutlicht, die als eine der ersten genomweiten Bibliotheken für funktionelles *knockout*-Screening publiziert wurde und deren verbesserte Nachfolgeversion auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam. (Shalem et al., 2014, 2015; Wang et al., 2014)

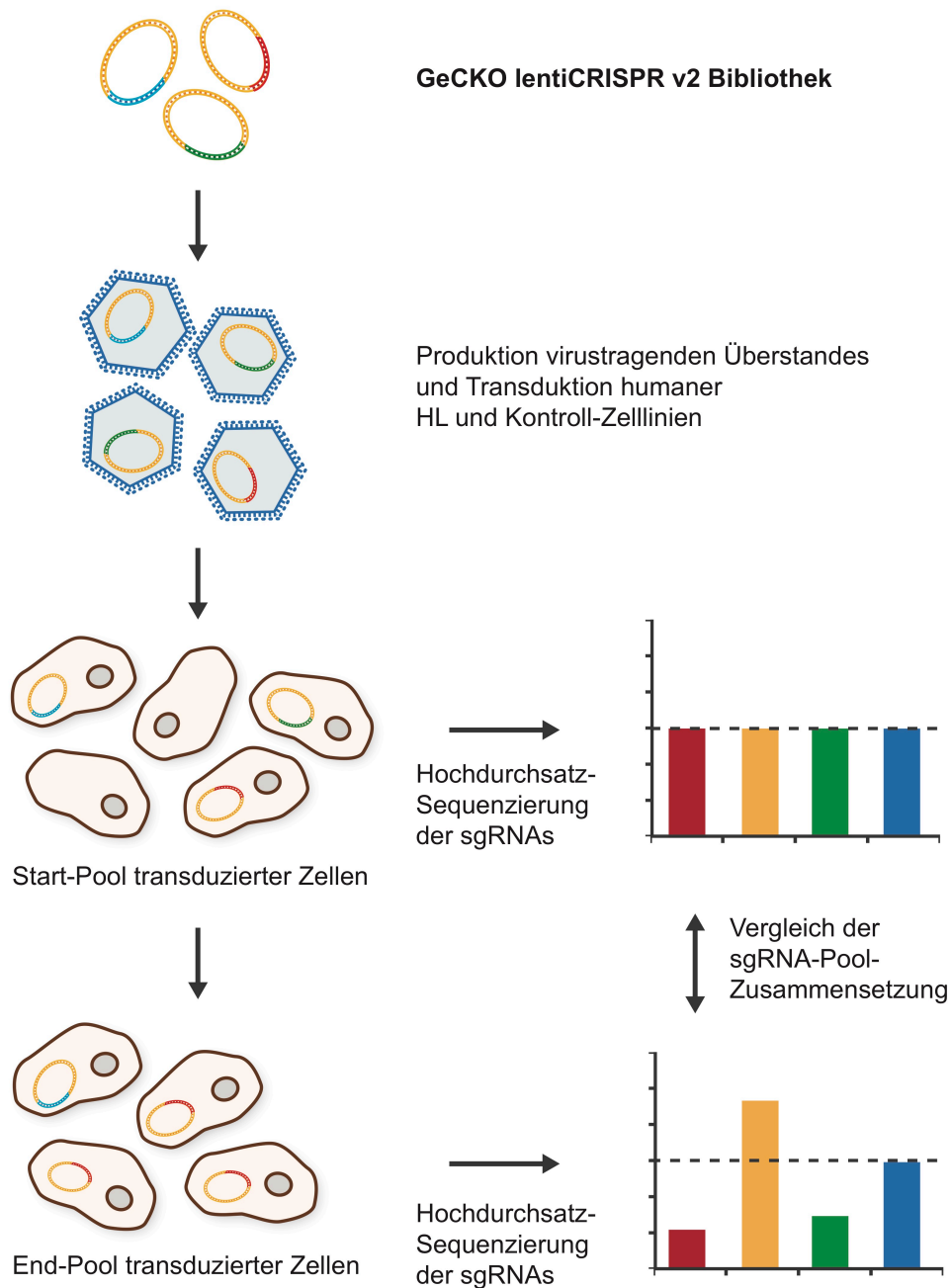


Abb. 1.6. CRISPR/Cas9 *knockout*-Screening. Die GeCKO-Bibliothek wird durch lentivirale Transduktion in die Zielzellen eingebracht. Der Pool transduzierter Zellen wird über die Zeit hinweg beobachtet. Über die Entnahme von Zellpellets am Start- und Endzeitpunkt des Screens werden die sgRNA-Sequenzen und ihre relative Häufigkeit innerhalb des sgRNA-Pools über Hochdurchsatzsequenzierung ausgelesen. Der Vergleich der sgRNA-Pool-Zusammensetzung am Start- und Endzeitpunkt lässt auf potentielle onkogene (sgRNAs depletiert) und tumorsuppressive (sgRNAs angereichert) Kandidatengene schließen.

1.6 Herleitung der Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Nachdem vor über 20 Jahren die Abstammung des Hodgkin-Lymphoms von B-Zellen gezeigt werden konnte, wurden auf molekularer Ebene zahlreiche deregulierte Signaltransduktions- (NF- κ B, JAK/STAT) und Transkriptionsfaktornetzwerke (AP-1, IRF) entdeckt und in ihrer Bedeutung für das cHL untersucht. Alle diese Veränderungen sind jedoch für sich genommen nicht spezifisch für das cHL, sondern auch bei anderen Malignomen, einschließlich Lymphomen, anzutreffen. Trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht gelungen, den oder die zentralen, für die Tumorbilogie des cHL spezifischen molekularen Mechanismen zu identifizieren bzw. die letztendlich funktionellen molekularen Treiber der Pathogenese zu identifizieren. Um unabhängig von den bisherigen Untersuchungen in einem sog. „*discovery-driven*“ Ansatz solche funktionellen Treiber des cHL zu ermitteln, wurde ein genomweiter *loss-of-function* Screen durchgeführt. Dabei ermöglicht die Wahl des CRISPR/Cas9-Systems zur Durchführung dieses Screens gegenüber bisher etablierten shRNA-basierten Screens eine höhere Effizienz sowie einen *knockout* bereits auf genomischer Ebene.

Da mit dieser Arbeit erstmalig ein genomweiter CRISPR/Cas9-basierter *knockout*-Screen im Hodgkin-Lymphom durchgeführt wurde, galt es zunächst das CRISPR/Cas9-System selbst sowie spezifische Screen-Bedingungen und spätere Einzelgen-Analysen zu etablieren. Im Anschluss konnten dann der genomweite CRISPR/Cas9-Screen sowie der auf diesen folgende Bestätigungsscreen durchgeführt werden. Mit diesen sollte untersucht werden, ob und welche bereits bekannten Pathogenese-Faktoren des cHL in diesen CRISPR-Screens zuverlässig identifiziert werden konnten, um die Frage nach der funktionellen Relevanz der bekannten Faktoren in einem unabhängigen und neuartigen genomischen Verfahren – auch im Vergleich untereinander – untersuchen zu können. Darüberhinaus sollten neue Kandidatengene ermittelt werden, die für das Überleben und Wachstum der Hodgkin-Zellen relevant sind.

Die Betrachtung aller Ergebnisse soll schließlich dazu dienen können, solche Faktoren und Signalwege zu identifizieren, die als besonders geeignete Angriffspunkte für eine gezielte Inhibition in Frage kommen um so neue Therapieoptionen für das Hodgkin-Lymphom zu ermöglichen. Dass es derer weiterhin dringend bedarf, steht in Anbetracht der Akut- und Langzeittoxizitäten der bisherigen Standardtherapien einerseits sowie eines immer noch relevanten Anteils an primärem und sekundärem Therapieversagen andererseits außer Zweifel.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Katalog-Nr.
Acrylamid 40 %	Roth, Deutschland	A515
Agarose	Biozym, Deutschland	840004
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Deutschland	9592
Ampicillin	Roth, Deutschland	K029
Bacto™ Agar	BD, USA	214010
Bacto™ Trypton	BD, USA	211705
Bacto™-Yeast Extract	BD, USA	288620
β-Mercaptoethanol	Roth, Deutschland	4277
Borsäure	Roth, Deutschland	5935
Bovines Serum Albumin	Sigma, USA	3803
Bromphenolblau	Sigma, USA	B0126
Chloroquin	Sigma, USA	C6628
Cresol Rot Natrium Salz	Sigma, USA	114480
D(+)-Saccharose	Roth, Deutschland	4621
DTT	Roth, Deutschland	6908
EDTA	Roth, Deutschland	8040
EGTA	Roth, Deutschland	3052
Ethanol	Roth, Deutschland	9065
Ethidiumbromid	Roth, Deutschland	HP47
Glycerin	Roth, Deutschland	3783
HEPES	Roth, Deutschland	HN77
IPTG, dioxanfrei	Roth, Deutschland	2816
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Deutschland	6752
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Deutschland	6781
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Fluka, Schweiz	21079
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, USA	M3634
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma, USA	M1880
Methanol	Th. Geyer, Deutschland	1437.2511
Methylenblau	Roth, Deutschland	A514
Natriumacetat	Roth, Deutschland	6779
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Deutschland	3957
Natriumcitrat	Roth, Deutschland	4088
Natriumfluorid (NaF)	Roth, Deutschland	2618
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Deutschland	8655
Natriumorthovanadat	Roth, Deutschland	0735
Nonidet P40 (NP40)	Roche , Schweiz	11754599001
Polyethylenglykol 8000 (PEG-8000)	Roth, Deutschland	0263
Ponceau S	Roth, Deutschland	5938
Propium-Iodid (PI)	Sigma, USA	P4170
Salzsäure 37 % (HCl)	Roth, Deutschland	9277
SDS	Roth, Deutschland	CN30
TEMED	Roth, Deutschland	UN2372
Tris	Roth, Deutschland	5429
Triton-X	Roth, Deutschland	3051
Tween20	Roth, Deutschland	9127
X-β-Gal	Roth, Deutschland	2315

2.1.2 Reagenzien

Substanz	Hersteller	Katalog-Nr.
1 kb plus DNA ladder	Life Technologies, USA	10787-018
cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Schweiz	4693159001
dNTP Set, 100 mM	ThermoFisher Scientific, USA	R0182
GeneRuler™ 1kb DNA ladder	Fermentas, USA	SM0313
GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder	Fermentas, USA	SM0313
Microsint™-O	PerkinElmer, USA	6013611
Nuclease-Free Water (ddH ₂ O)	Invitrogen, USA	AM9937
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, USA	32106
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, USA	26619
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Biorad, USA	500-0006
QuickExtract™ DNA Extraction Solution	Epicentre, USA	QE0905T
Random Primers	Invitrogen, USA	48190011
RNasin® Plus	Promega, USA	N261B
Skim Milk Powder	Sigma, USA	70166

2.1.3 Medien und Zellkulturzusätze

Substanz	Hersteller	Katalog-Nr.
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, USA	A3803
DMEM	Gibco, USA	11960
DMSO	Roth, Deutschland	4720
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Deutschland	S0115 (LOT 1247B)
Gentamycin	Lonza, Schweiz	17-519Z
GlutaMAX™, 100x	Gibco, USA	35050
Natrium-Pyruvat, 100mM	Gibco, USA	11360
KO3861	Selleckchem, USA	S8100
Palbociclib	Selleckchem, USA	S1116
Penicillin/Streptomycin (10'000 U/ml Penicillin 10'000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, USA	15140
PBS pH 7,2	Gibco, USA	20012
PBS, Powder	Gibco, USA	21600
Puromycin	Sigma, USA	P8833
RPMI 1640	Gibco, USA	72400
Trypsin-EDTA	Gibco, USA	15400
3[H]-Thymidin	PerkinElmer / NEN, USA	NET027250- UC

2.1.3.1 RPMI-Standardmedium

Endkonzentration	Substanz
10 %	FKS (bei 56°C für 30 min Hitze-inaktiviert)
100 U/ml / 100µg/ml	Penicillin/Streptomycin
1 mM	Natrium-Pyruvat <i>in RPMI</i>

2.1.3.2 DMEM-Standardmedium

Endkonzentration	Substanz
10 %	FKS (bei 56°C für 30 min Hitze-inaktiviert)
100 U/ml / 100µg/ml	Penicillin/Streptomycin
1 mM	Natrium-Pyruvat
1x	GlutaMAX™
	<i>in DMEM</i>

2.1.3.3 Bakterienmedien

LB-Medium

Endkonzentration	Substanz
10 g/l	Bacto™ Tryptone
5 g/l	Bacto™ Yeast Extract
10 g/l	NaCl

LB-Agar für Platten

Endkonzentration	Substanz
10 g/l	Bacto™ Tryptone
5 g/l	Bacto™ Yeast Extract
10 g/l	NaCl
15 g/l	Bacto™ Agar

SOC-Medium

Endkonzentration	Substanz
20 g/l	Bacto™ Tryptone
5 g/l	Bacto™ Yeast Extract
10mM	NaCl
2,5mM	KCl
10mM	MgCl ₂
10mM	MgSO ₄
20mM	Glukose

2.1.4 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Entität
HEK293T/17	human	Transformierte embryonale Nierenzelllinie
NIH3T3	mouse	Embryo Fibroblasten
L428	human	Hodgkin Lymphom
L1236	human	Hodgkin Lymphom
KM-H2	human	Hodgkin Lymphom
L591	human	Hodgkin Lymphom
HDLM-2	human	Hodgkin Lymphom
L540	human	Hodgkin Lymphom
L540Cy	human	Hodgkin Lymphom
UHO-1	human	Hodgkin Lymphom
Reh	human	Akut lymphoblastische prä-B-Zell Leukämie

BJAB	human	Burkitt Lymphom
Namalwa	human	Burkitt Lymphom
BL-60	human	Burkitt Lymphom
SU-DHL-4	human	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
SU-DHL-6	human	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
Oci-Ly-1	human	Diffus großzelliges B-Zell Lymphom
Mino	human	Mantelzelllymphom

2.1.5 Bakterienstämme

Stamm	Hersteller	Katalog-Nr.
E. coli XL1-Blue	Stratagene / Agilent, USA	50-125-058
One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli	Invitrogen, USA	C7373-03
E. cloni 10G Elite Duo Electrocompetent Cells	Lucigen, USA	60052

2.1.6 Antikörper

Spezifität	Istotyp	Hersteller	Katalog-Nr.
ABF1 (MSC)	Ziege IgG, polyklonal	Santa Cruz, USA	sc-9555
β-Aktin	Maus IgG2a, monoklonal	Sigma, USA	A2228
BATF3	Schaf IgG, polyklonal	R&D, USA	AF7437
c-Myc	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-40
Cyclin A	Maus IgG2a, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-271682
Cyclin D2	Maus IgG2b, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-376676
E2A	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-416
Flag M2	Maus IgG1, monoklonal	Sigma, USA	F1804
HA-Tag	Kaninchen IgG, monoklonal	Cell Signaling, USA	#3724
HENMT1	Kaninchen IgG, polyklonal	abcam, USA	ab121991
ID2	Kaninchen IgG, polyklonal	Santa Cruz, USA	sc-489
IKKα	Maus IgG2b, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-7606
IKKβ	Maus IgG2a, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-8014
IKKγ	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-166398
IRF4	Ziege IgG, polyklonal	Santa Cruz, USA	sc-6059
Jun B	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-8051
KEAP1	Maus IgG2b, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-365626
NFκB p50	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-8414
NFκB p52	Maus IgG2a, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-7386
NFκB p65	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-8008
RelB	Maus IgG1, monoklonal	Santa Cruz, USA	sc-48366
IgG-HRP			
Kaninchen	Ziege	Promega, USA	W401B
Maus	Ziege	Promega, USA	W402B
Schaf	Esel IgG, polyklonal	R&D, USA	HAF016
Ziege	Esel IgG, polyklonal	Santa Cruz, USA	sc-2020

2.1.7 Enzyme

Enzym	Hersteller	Katalog-Nr.
DreamTaq DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific, USA	EP0702
InviTaq DNA Polymerase	Stratec, Deutschland	3020100300
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific, USA	F530S
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, USA	M0491S
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	ThermoFisher Scientific, USA	EF0654
Plasmid-Safe™ ATP-dependent DNase	Epicentre / Lucigen, USA	E3101K
T4 DNA Ligase	ThermoFisher Scientific, USA	EL0014
T4 Polynukleotide Kinase (PNK)	ThermoFisher Scientific, USA	EK0032
T5 Exonuklease	New England BioLabs, USA	M0363S
T7 Endonuklease	New England BioLabs, USA	M0302S
Taq-DNA-Ligase	New England BioLabs, USA	M0208S
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, USA	18064014
RNase A	Sigma, USA	R6513
Restriktionsenzyme		
Agel (BshTI)	ThermoFisher Scientific, USA	ER1461
BamHI	ThermoFisher Scientific, USA	ER0051
BamHI (FastDigest)	ThermoFisher Scientific, USA	FD0055
BsmBI (Esp3I)	ThermoFisher Scientific, USA	ER0452
DpnI	ThermoFisher Scientific, USA	ER1701
EcoRI	ThermoFisher Scientific, USA	ER0271
EcoRI (FastDigest)	ThermoFisher Scientific, USA	FD0275
MluI (FastDigest)	ThermoFisher Scientific, USA	FD0564
NheI	ThermoFisher Scientific, USA	ER0975
NheI (Fast Digest)	ThermoFisher Scientific, USA	FD0974
Pacl (FastDigest)	ThermoFisher Scientific, USA	FD2204
PmeI (MssI)	ThermoFisher Scientific, USA	ER1341
PmeI (MssI) (FastDigest)	ThermoFisher Scientific, USA	FD1344
XbaI	ThermoFisher Scientific, USA	ER0681

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Katalog-Nr.
Amersham™ Protran™ 0,45µm NC	GE, Großbritannien	10600003
BackSeal-96/384 (für Unifilter®-Platte)	Perkin/Elmer, USA	6005199
CL-Xposure™ Film	Thermo Scientific, USA	34089
High Sensitivity DNA Kit	Agilent, USA	5067-4626
High Sensitivity DNA Reagents	Agilent, USA	5067-4627
Thinwall Ultra-Clear™ Tube	BeckmannCoulter, Deutschland	344058
TopSeal-A Plus (für Unifilter®-Platte)	Perkin/Elmer, USA	6050185
Unifilter® GF/C™, 96-well Mikroplatte	Perkin/Elmer, USA	6005174
Whatman™ Grade 3MM Chr Blotting Paper	GE, Großbritannien	3030-917

2.1.9 Plasmide

Plasmid	Hersteller / Ursprung	Katalog-Nr.
<i>GeCKOv1</i>	Feng Zhang via addgene, USA	-
<i>GeCKO v2</i>	Feng Zhang via addgene, USA	1000000048
<i>lentiCRISPRv1</i>	Feng Zhang via addgene, USA	49535
<i>lentiCRISPRv2</i>	Feng Zhang via addgene, USA	52961
<i>pBlueScript SK (-)</i>	Stratagene	-
<i>pEGFP-N3</i>	Clontech, USA	-
<i>pGEM®-T Easy</i>	Promega, USA	A1360
<i>pLJM1-EGFP</i>	David Sabatini via addgene, USA	19319
<i>pCMV-VSV-G</i>	Bob Weinberg via addgene, USA	8454
<i>psPAX2</i>	Didier Trono via addgene, USA	12260
<i>MIB (MSCV-IRES2-EBFP)</i>	AG F. Rosenberg, MDC Berlin	-
<i>pFU-luc-2A-mCherry</i>	AG M. Lipp, MDC Berlin	-
<i>pcDNA-BATF</i>	AG Janz/Mathas, MDC Berlin	-
<i>pcDNA-BATF3</i>	AG Janz/Mathas, MDC Berlin	-
<i>lentiCRISPRv1-EGFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv1</i>	
<i>lentiCRISPRv2-EGFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2</i>	
<i>lentiCRISPRv2-BFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2</i>	
<i>lentiCRISPRv2-mcherry</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2</i>	
<i>lentiCRISPRv2-EGFP-Cas9only</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-EGFP</i>	
<i>lentiCRISPRv2-BFP-sgRNAonly</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-EBFP</i>	
<i>lentiCRISPRv2-mcherry</i> -sgRNAonly	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-mcherry</i>	
<i>lentiCRISPRv2-EGFP-emptyvector</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-EGFP</i>	
<i>lentiCRISPRv2-BFP-emptyvector</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-BFP</i>	
<i>lentiCRISPRv2-mcherry</i> -emptyvector	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-mcherry</i>	
<i>lenti-Irf4-BFP (mouse)</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-BFP</i> -emptyvector	
<i>lenti-BATF-EGFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-EGFP</i> -emptyvector	
<i>lenti-BATF-BFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-BFP</i> -emptyvector	
<i>lenti-BATF3-EGFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-EGFP</i> -emptyvector	
<i>lenti-BATF3-BFP</i>	diese Arbeit, modifiziert von <i>lentiCRISPRv2-BFP</i> -emptyvector	

2.1.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, aus denen die sgRNAs des Re-Screens entstanden, wurden durch die biomers GmbH synthetisiert und in ddH₂O zu 100µmol gelöst in Platten geliefert. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide der Re-Screen *library* sind dem Anhang zu entnehmen.

Alle weiteren Oligonukleotide wurden synthetisiert durch die BioTeZ Berlin-Buch GmbH und nach Erhalt mit ddH₂O zu einem 100 µmolaren Stock angesetzt. Für Primer wurden

darüber hinaus ausgehend von diesen Stocks 10 µmolare Racemate des forward und reverse Primers erstellt.

2.1.10.1 Primer für Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
EGFP-lentiCRISPR_v2 fwd	CAC AAA GAA GGC TGG ACA GG
EGFP-lentiCRISPR_v2 rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG CT
EGFP-lentiCRISPR_v2 rev II	GGA AAG GAC AGT GGG AGT GG
hCas9-EGFP seq1 fwd	GCA ACA GAC ATA CAA ACT AAA G
hCas9-EGFP seq1 rev	ATG TGC GCT CTG CCC ACT GA
sgRNAonly seqHS24 fwd	GGC ACC GAG TCG GTG CTTT
sgRNAonly seqHS24 rev	GGT TGA TTG TCG ACT TAA CGCG
lentiEmptyVector fwd	GAG AAC CGT ATA TAA GTG CAG
lentiEmptyVector rev	CGG TCC AGG ATT CTC TTC GAC
pSK (Gibson) fwd	CAG TCA CGA CGT TGT AAA ACG
pSK (Gibson) rev	GTG AGT TAG CTC ACT CAT TAG G
U6-promotor fwd	ACT ATC ATA TGC TTA CCG TAA C

2.1.10.2 Primer für Klonierungen

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
EGFP fwd (+P2A)	AC GCTAGC GGC AGC GGC GCC ACC AAC TTC AGC CTG CTG AAG CAG GCC GGC GAC GTG GAG GAG AAC CCC GGC CCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG
EGFP rev	AC ACGCGT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG AGT GAT CCC GGC GGC
pBlueScript fwd [Gibson]	GTTT AAAC AAC ATA CGA GCC GGA AGC ATA AA
pBlueScript rev [Gibson]	C GAC ATC TCC GGC TTG TTT CAG CAG AGA GAA GTT TGT TGC GCC GGA TCC CCC GGT ACC CAA TTC GCC CTA TAG T
EGFP fwd [Gibson]	CT TCT CTC TGC TGA AAC AAG CCG GAG ATG TCG AAG AGA ATC CTG GAC CG ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA
EGFP rev [Gibson]	GTC GAC TTA ACG CGT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CA
WPRE fwd [Gibson]	GAG CTG TAC AAG TAA ACG CGT TAA ACG CGT TAA GTC GAC AAT CA
WPRE rev [Gibson]	TTT ATG CTT CCG GCT CGT ATG TT GTTTAAAC GGG CCC TGC TAG AGA TTT TC
Irf4 AgeI fwd (mouse)	AC ACCGGT GCCACC ATG AAC TTG GAG ACG GGC
Irf4 XbaI rev (mouse)	AC TCTAGA CTC TTG GAT GGA AGA ATG ACG
BATF AgeI fwd	AC ACCGGT GCCACC ATG GAC TAC AAG GAT GA
BATF XbaI rev	AC TCTAGA GGG CTG GAA GCG CGG GGA GCT
BATF3 AgeI fwd	AC ACCGGT GCCGCCACC ATG TCG CAA
BATF3 XbaI rev	AC TCTAGA TCG GGG CAA GCA GCC GGC CAC

2.1.10.3 Oligos für Klonierungen

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
Insert Cas9 +	CCGG T GTT GTA AAT GAG CAC ACA G
Insert Cas9 -	GATC C TGT GTG CTC ATT TAC AAC A
Insert sgRNA +	GTT GTA AAT GAG CAC ACA AAA G
Insert sgRNA -	AATTC TTT TGT GTG CTC ATT TAC AAC AT
Insert BamHI +	CTAG C GGATCC GTT GTA TCTAGA A
Insert Xba -	GATC T TCTAGA TAC AAC GGATCC G

2.1.10.4 Oligos für sgRNAs

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
sgABF1-1 fwd	CACC GGA GCT TCG GGG GCT GCA GC
sgABF1-1 rev	AAAC GCT GCA GCC CCC GAA GCT CC
sgABF1-2 fwd	CACC GGG GCT GCA GCG GGA GTA CC
sgABF1-2 rev	AAAC GGT ACT CCC GCT GCA GCC CC
sgABF1-3 fwd	CACC GAG GAG GAG CGC TGC GCT CT
sgABF1-3 rev	AAAC AGA GCG CAG CGC TCC TCC TC
sgABF1-4 fwd	CACC GCA GCG CGG AAG GCT GCA AG
sgABF1-4 rev	AAAC CTT GCA GCC TTC CGC GCT GC
sgBATF-1 fwd	CACC GAC AGA ACG CGG CTC TAC GCA
sgBATF-1 rev	AAAC TGC GTA GAG CCG CGT TCT GTC
sgBATF-2 fwd	CACC GGA CTC TAC CTG TTT GCC AGG
sgBATF-2 rev	AAAC CCT GGC AAA CAG GTA GAG TCC
sgBATF-3 fwd	CACC GCC TCT GTC GGC TCT TCT GGG
sgBATF-3 rev	AAAC CCC AGA AGA GCC GAC AGA GGC
sgE2A-1 fwd	CACC GAC CAC AGC TGG CAG CTC CG
sgE2A-1 rev	AAAC CGG AGC TGG CAG CTG TGG TC
sgE2A-2 fwd	CACC GCA GCC CAA GAA GGT CCG GA
sgE2A-2 rev	AAAC TCC GGA CCT TCT TGG GCT GC
sgE2A-3 fwd	CACC GAT AGA AGA CCA CCT GGA CG
sgE2A-3 rev	AAAC CGT CCA GGT GGT CTT CTA TC
sgE2A-4 fwd	CACC GCT AGG GCG AGC AGG TGC CA
sgE2A-4 rev	AAAC TGG CAC CTG CTC GCC CTA GC
sgID2-1 fwd	CACC GTT TTT CCT AAC GGA CCT CA
sgID2-1 rev	AAAC TGA GGT CCG TTA GGA AAA AC
sgID2-2 fwd	CACC GTC CAC AGG GGT TTT GCT CC
sgID2-2 rev	AAAC GGA GCA AAA CCC CTG TGG AC
sgID2-3 fwd	CACC GCT CAT CGG GTC GTC CAC AG
sgID2-3 rev	AAAC CTG TGG ACG ACC CGA TGA GC
sgID2-4 fwd	CACC GGC TCA TCG GGT CGT CCA CA
sgID2-4 rev	AAAC TGT GGA CGA CCC GAT GAG CC
<i>non-targeting-1 fwd</i>	CACC ACG GAG GCT AAG CGT CGC AA
<i>non-targeting-1 rev</i>	AAAC TTG CGA CGC TTA GCC TCC GT
<i>non-targeting-2 fwd</i>	CACC CGC TTC CGC GGC CCG TTC AA
<i>non-targeting-2 rev</i>	AAAC TTG AAC GGG CCG CGG AAG CG
<i>non-targeting-3 fwd</i>	CACC ATC GTT TCC GCT TAA CGG CG
<i>non-targeting-3 rev</i>	AAAC CGC CGT TAA GCG GAA ACG AT
<i>non-targeting-4 fwd</i>	CACC GTA GGC GCG CCG CTC TCT AC
<i>non-targeting-4 rev</i>	AAAC GTA GAG AGC GGC GCG CCT AC

2.1.10.5 Primer für CRISPR-Screen-Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
sgRNA fwd I	AAT GGA CTA TCA TAT GCT TAC CGT AAC TTG AAA GTA TTT CG
sgRNA rev I (v2)	TCT ACT ATT CTT TCC CCT GCA CTGT tgt ggg cga tgt gcg ctc tg
(1) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>I</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(2) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>AT</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(3) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>GAT</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(4) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>CGA T</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(5) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>TCG AT</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(6) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>ATC GAT</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(7) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>GAT CGA T</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(8) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>CGA TCG AT</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(9) illumina fwd p5	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATCT <u>ACG ATC GAT</u> tct tgt gga aag gac gaa aca ccg
(a) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT GCC AAT GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act att ctt tcc cct gca ctgt
(b) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CTT GTA GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act att ctt tcc cct gca ctgt
(c) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT GTG AAA GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act att ctt tcc cct gca ctgt
(d) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACA GTG GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act att ctt tcc cct gca ctgt
(e) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ATG TCA GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act att ctt tcc cct gca ctgt
(f) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CGA TGT GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act att ctt tcc cct gca ctgt
(g) illumina rev p7	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT TGA CCA GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act

(h) illumina rev p7	att ctt tcc cct gca ctgt CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CAG ATC GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act
(i) illumina rev p7	att ctt tcc cct gca ctgt CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CCG TCC GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATCT tct act
illumina-p5_forw	ATG ATA CGG CGA CCA CCG AG
illumina-p5_forw_II (3' of stagger)	TCT TGT GGA AAG GAC GAA ACA C
illumina-p7_rev (5' of index)	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CG

2.1.11 Kits

Kit	Hersteller	Katalog-Nr.
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen, USA	13343
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two	Stratec, Deutschland	101040300
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Deutschland	740414
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Deutschland	740410
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, USA	12163
RNeasy Mini Kit	Qiagen, USA	74106
Zymoclean™ Gel DNA Recovery	Zymo Research, USA	D4007

2.1.12 Geräte

Gerät	Hersteller	Katalog-Nr.
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, USA	G2939BA
Avanti J-26 XP, Zentrifuge	BeckmanCoulter, USA	393124
BDK-SK 1200, Sicherheitswerkbank Kl. II	BDK / neoLab®, Deutschland	83 99 51200
Bio Doc Analyze System T5	Biometra, Deutschland	-
Blue Marine™ 200, Agarose-Gel-Kammer	Serva Electrophoresis, Deutschland	BM-200.01
C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad, Großbritannien	1851148
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Deutschland	5811000420
CURIX 60, Entwicklermaschine	Agfa, Belgien	-
DU® 640 Spectrophotometer	BeckmanCoulter, USA	-
DS-11 FX+ Spektrophotometer	DeNovix / Biozym, Deutschland	31DS-11FX
Duomax 1030, Plattformschüttler	Heidolph, Deutschland	543-32205-00
FACS Aria™ Fusion	BD, USA	656700
FACS Canto™ II	BD, USA	338962
FACS LSRFortessa™	BD, USA	649225
FiveEasy pH meter F20	Mettler Toledo, USA	30266658
Heraeus™ BB6220, Inkubator	ThermoFisher Scientific, USA	51007413
Heraeus™ FunctionLine B6, Inkubator	ThermoFisher Scientific, USA	50042301
Heraeus™ Multifuge™ X3 FR	ThermoFisher Scientific, USA	75004536
Heraeus™ Pico™ 17, Tischzentrifuge	ThermoFisher Scientific, USA	75002410
HiSeq® 2500	Illumina®, USA	SY-401-9001
Inkubations- / Inaktivierungsbad	GFL®, Deutschland	1003
JA-14, Fixed Angle Rotor	BeckmanCoulter, USA	339247
Mikrowelle KOR-6305	Daewoo, Südkorea	-
Minigel-Twin G-42	Biometra, Deutschland	010-130
MiSeq®	Illumina®, USA	SY-410-1003
Multigel G44	Biometra, Deutschland	010-230
Multitron 2 Standard, Inkubationsschüttler	InforsHT, Schweiz	-

Novotron 50, Inkubationsschüttler	InforsHT, Schweiz	-
Optima™ L-60, Ultrazentrifuge	BeckmanCoulter, USA	-
PowerPac™ 300	Bio-Rad, Großbritannien	-
PS 304 II minipac	Apelex, Frankreich	-
RCT basic, Magnetrührer	IKA, Deutschland	3810000
Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbank II	ThermoFisher Scientific, USA	51026638
Sartorius Universal, Feinwaage	Sartorius, Deutschland	U4600P
Standard Power Pack Biometra P25	Biometra, Deutschland	846-040-800
SW 28 Ti Rotor, Swinging Bucket	BeckmanCoulter, USA	342204
ThermoMixer® compact	Eppendorf, Deutschland	-
ThermoStat® plus	Eppendorf, Deutschland	-
TopCount NXT	Perkin/Elmer, USA	-
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Großbritannien	1703940
Unifilter-96, Cell Harvester	Perkin/Elmer, USA	C961961
Unimax 1010, Plattformschüttler	Heidolph, Deutschland	543-12310-00
Variolab Mobilien W90, Werkbank	Waldner, Deutschland	-
Vortex-Genie2™	neoLab®, Deutschland	7-0092

2.1.13 Software

Software	Hersteller
4peaks 1.7.2	Nucleobytes, Niederlande
Adobe Illustrator CS5.1	Adobe Systems, USA
ApE, a plasmid editor 2.0.45	M. Wayne Davis, University of Utah, USA
BD FACSDiva™ software	BD, USA
FlowJo 10.0.8r1	BD, USA
GraphPad Prism 6.00	GraphPad Software Inc, USA
Microsoft Excel 2011 14.7.7	Microsoft, USA
Microsoft PowerPoint 2011 14.7.7	Microsoft, USA
Microsoft Word 2011 14.7.7	Microsoft, USA
R 3.4.3	R Core Team / Gnu Project
RStudio 1.1.423	RStudio Inc / Gnu Project
SnapGene Viewer 4.1.4	GSL Biotech LLC, USA

2.1.14 Puffer

2.1.14.1 Zellkultur

MACS-Puffer

Endkonzentration	Substanz
2 mM	EDTA
0,5 %	BSA
	in 1x PBS pH 7,2

2x HEBS

Endkonzentration	Substanz
50mM	HEPES
280mM	NaCl
1,5mM	Na ₂ HPO ₄

2.1.14.2 RNA, DNA

TE

Endkonzentration	Substanz
10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA pH 8,0

TENS

Endkonzentration	Substanz
10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA pH 8,0
0,1 N	NaOH
0,5 %	SDS

TBE

Endkonzentration	Substanz
0,1 M	Tris
0,1 M	Borsäure
2,5 mM	EDTA

10x Rot Ladepuffer

Endkonzentration	Substanz
1mM	Cresol Rot Natrium-Salz
1,75 mM	Sucrose

5x IRB Gibson-Assembly-Puffer

Endkonzentration	Substanz
500 mM	Tris-HCl pH 7,5
50 mM	MgCl ₂
1 mM	dNTPs
50 mM	DTT
5 mM	NAD
25 %	PEG-8000

2.1.14.3 Proteine, Immunpräzipitation, Western Blot

1x High-Salt-Lysis-Puffer (HSL)

Endkonzentration	Substanz
20mM	HEPES, pH 7.9
350mM	NaCl
1mM	MgCl ₂
0.5mM	EDTA
0.1mM	EGTA
0.02%	NP40
1mM	DTT
2mM	Na-Orthovanadate
1mM	NaF
+ 1 Tablette / 5ml	cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail

4x Lämmli-Puffer

Endkonzentration	Substanz
200mM	Tris-HCl pH 6,8
40%	Glycerol
16%	SDS
20%	β-Mercaptoethanol
0,02%	Bromphenol-Blau

SDS-PAGE-Trenngel

Endkonzentration	Substanz
375mM	Tris-HCl pH 8,8
0,1%	SDS
0,1%	APS
0,05%	TEMED
8-15%	Acrylamid

SDS-PAGE-Sammelgel

Endkonzentration	Substanz
125mM	Tris-HCl pH 6,8
0,1%	SDS
0,1%	APS
0,05%	TEMED
5%	Acrylamid

1x Laufpuffer

Endkonzentration	Substanz
50mM	Tris
500mM	Glycin
0,2%	SDS

1x Blotpuffer

Endkonzentration	Substanz
48mM	Tris
39mM	Glycin
0,036%	SDS
20%	Methanol

1x TBS-T

Endkonzentration	Substanz
20mM	Tris-HCl pH 7,5
135mM	NaCl
0,01%	Triton-X

2.2 Methoden

2.2.1 RNA und DNA

2.2.1.1 Aufreinigung von RNA aus Zellpellets

RNA wurde mithilfe des *RNeasy Mini Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und dabei zusätzlich ebenfalls nach Protokoll des Herstellers eine DNase-Behandlung durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch am *DS-11 FX+ Spektrophotometer*.

2.2.1.2 Reverse Transkription (RT)

Jeweils 1 µg isolierte RNA wurde in 10,5 µl Gesamtvolumen aufgenommen. Zu diesem wurden anschließend je 4 µl *5xFirst-Strand-Buffer*, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10mM dNTPs, 0,5 µl *RNasin® Plus* und 2 µl *Random Primer* hinzugefügt und die so komplettierten Ansätze für 10 min bei 70°C inkubiert. Zur Umschreibung in complementäre DNA (cDNA) wurden nun jeweils 1 µl *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* sowie 0,3 µl *RNasin® Plus* hinzugegeben und zunächst für 10 min bei Raumtemperatur, gefolgt von 50 min bei 42°C und schließlich 5 min bei 95°C inkubiert.

2.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Für PCR auf cDNA, bzw. auf genomischer DNA (gDNA), wurde je Probe der folgende 50 µl Ansatz erstellt:

<u>Menge</u>	<u>Substanz</u>
5 µl	10x DreamTaq™ Puffer
5 µl	10x Rot Ladepuffer
1 µl	10mM dNTPs
1 µl	je 10 µM Primer forward und reverse
0,25 µl	DreamTaq™ DNA Polymerase
50 ng	cDNA, resp. genomische DNA
	ddH ₂ O auf 50 µl

Anschließend wurde im *C1000 Touch™ Thermal Cycler* folgendes für die *DreamTaq™ DNA Polymerase* optimiertes Programm gefahren:

<u>Initiale Denaturierung</u>	95°C	5 min	} 30 - 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	15 s	
Hybridisierung	58-62°C	15 - 30 s	
<u>Elongation</u>	72°C	1 min / 1kb	
Terminale Elongation	72°C	5 min	

2.2.1.4 Agarose-Gel-Elektrophorese

Für DNA-Fragmente von 0,5 bis 5 kb Länge wurden 1%-ige, für kleinere Fragmente höher resp. für größere Fragmente niedriger konzentrierte Gele gegossen. Für ein 1%-iges Gel wurde 1g Agarose in 100ml TBE in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt und anschließend mit 5 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Nach kurzem Abkühlen wurden Gele gegossen und nach ihrem Erkalten mit TBE-Puffer überschichtet und anschließend mit den jeweiligen Proben und dem entsprechenden beladen. Eine Spannung von 80 bis 120 V wurde so lange angelegt bis die Lauffront der Proben in Abhängigkeit von der erwarteten Bandengröße etwa 2/3 des Geles passiert hatte. Die Visualisierung der Gele erfolgte mittels des *Bio Doc Analyze System T5*.

2.2.1.5 Sanger-Sequenzierung

Sanger-Sequenzierungen von Einzelproben wurden durchgeführt durch die *LGC Genomics GmbH* und die erhaltenen Ergebnisse mithilfe von *4peaks* und *ApE* analysiert.

2.2.2 Proteine

2.2.2.1 Aufreinigung von Protein aus Zellpellets

Aufgetaute Zellpellets wurden je nach Zellzahl in 30 - 100 µl 1xHSL aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 14 000 rpm, 4°C zentrifugiert und der proteintragende Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Protein-Konzentration wurde jeweils nach Messung einer Standardkurve mit 2-10 µg/ml BSA photometrisch bestimmt. Hierzu wurden je 2 µl Probe in eine mit 1 ml *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (1:5 in H₂O) befüllte Küvette pipettiert, in dieser gemischt und nach 5 min Inkubation gemessen.

2.2.2.2 SDS-PAGE

Für SDS-Polyacrylamid-Gele wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei entsprechenden Glasplatten gegossen und mit 1 ml H₂O überschichtet. Sobald dieses fest war, wurde das H₂O mit einem Filterpapier abgenommen und das 1 cm hohe Sammelgel darüber gegossen, in dieses wurde sofort der jeweilige Kamm mit den entsprechenden Geltaschen gesetzt. Nachdem auch das Sammelgel ausgehärtet war, wurde der Kamm herausgenommen und die Taschen mit 1xLaufpuffer gespült. Das fertige Gel wurde in eine *Biometra* Gel-Kammer gesetzt, mit den Protein-Proben und je

5 µl *PageRuler™ Plus Prestained Marker* geladen und mit 1xLaufpuffer bei 80 – 120 V gefahren. Für die Proteinproben wurden jeweils 10 - 30 µg Protein mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl gebracht und anschließend 4 µl 4xLämmli-Ladepuffer hinzugegeben. Diese Proben wurden für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf das entsprechende SDS-Polyacrylamid-Gel geladen.

2.2.2.3 Western Blot (WB)

Gelaufene SDS-Polyacrylamid-Gele wurden abgebaut und von unten nach oben in folgender Reihe in einer *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* geschichtet: 5 Blatt *Whatman™ Grade 3MM Chr Blotting Paper*, 1 Blatt *Amersham™ Protran™ 0,45µm NC* Membran, SDS-Polyacrylamidgel, 5 Blatt *Whatman™ Grade 3MM Chr Blotting Paper*. Anschließend wurde je nach Größe des Zielproteins für 35 - 50 min bei 20 V geblottet, der Blot abgebaut und die nun proteintragende Membran in Ponceau-Lösung gefärbt. Hiernach wurde die Membran mit 5% *Milk Powder* in TBS-T 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf dem *Unimax* Plattformschüttler geblockt und dann mit 2 - 8 µg primärem Antikörper in 10 ml 5% *Milk Powder* in TBS-T über Nacht bei 4°C oder für 1 - 2 h bei Raumtemperatur auf dem *Unimax* Plattformschüttler inkubiert. Anschließend wurde 3x für jeweils 10 min in 1% *Milk Powder* in TBS-T auf dem *Duomax* Plattformschüttler gewaschen, mit 1 - 4 µg des entsprechenden sekundären, HRP-gekoppelten Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert auf dem *Unimax* Plattformschüttler und erneut 3x für jeweils 10 min in 1% *Milk Powder* in TBS-T auf dem *Duomax* Plattformschüttler gewaschen. Zuletzt wurde die so behandelte Membran für 1 min unter Schwenken in 4 ml *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* inkubiert, hiermit ein *CL-Xposure™ Film* für 10 s - 1 h belichtet und in der *CURIX 60* Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.3 Bakterienkultur

Zur Transformation wurden im eigenen Labor hergestellte chemisch kompetente *XL-1 Blue* verwendet. LB-Amp-Platten wurden aus mit 1 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Agar gegossen. Transformationen wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Große, einzeln wachsende Kolonien wurden mit einem Zahnstocher von der Platte gepickt und hiermit circa 4 ml LB-Amp-Medium (1 µg/ml Ampicillin) für Minis angeimpft. Maxis wurden aus gleichermaßen entstandenen

Vorkulturen angeimpft. Beide wurden bei 37°C und 180 rpm über Nacht im *Novotron 50* oder *Multitron 2 Standard* Inkubationsschüttler inkubiert.

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA (pDNA) aus Bakterienkulturen – Mini

„*Real Fast Mini Preps*“ nach S. Finkbeiner, *Gladstone Institutes* (Finkbeiner)

Circa 1,5 ml Übernacht-Bakterienkultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 5 min bei 3.000 rpm in der *Heraeus™ Pico™ 17* Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wobei ein Rest von etwa 50 bis 100 µl im Reaktionsgefäß verblieb. 300 µl TENS-Puffer wurden hinzugefügt und bis zur vollständigen Resuspension des Pellets auf dem *Vortex* gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 150 µl 3M Natrium-Acetat pH 5,2 hinzugegeben und kurz gemischt. Anschließend wurde für 6 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine neues mit 700 µl auf -20°C vorgekühltem 100%-Ethanol befülltes Reaktionsgefäß überführt und abermals für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit ebenfalls auf -20°C vorgekühltem 70%-Ethanol gewaschen sowie für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Raumluft getrocknet. Die Resuspension erfolgte nach vollständigem Trocknen in 100 µl H₂O, versetzt mit 1 µl RNase A.

Die Präparation von Plasmid-DNA mit Hilfe des *Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits* erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.2.3.2 Präparation von pDNA aus Bakterienkulturen mit NucleoBond® Xtra – Maxi / Midi

Je 250 (Midi) - 500 (Maxi) ml Übernacht-Kultur wurden in der *Avanti J-26 XP* Zentrifuge für 10 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Aus den Pellets erfolgte die Präparation der pDNA mit dem *NucleoBond® Xtra Midi / Maxi Kit* nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4 Klonierungen

2.2.4.1 Klonierungs-PCR

Zu klonierende Inserts wurden mittels spezifischer Primer PCR-amplifiziert. Um Lesefehler zu minimieren wurde die *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* oder *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* verwendet. Pro Ansatz wurden in ein 100 µl fassendes PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

Menge	Substanz
10 µl	5x Puffer der jeweiligen DNA Polymerase
5 µl	10x Rot Ladepuffer
1 µl	10mM dNTPs
1 µl	je 10µM Primer fwd und rev
0,5 µl	Q5® / <i>Phusion High-Fidelity</i> DNA Polymerase
50 ng	cDNA resp. pDNA
	ddH ₂ O auf 50 µl

Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße in den *C1000 Touch™ Thermal Cycler* gesetzt und in diesem folgendes für die *Q5® / Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase optimiertes Programm gefahren:

<u>Initiale Denaturierung</u>	98°C	30 sec - 2 min	} 30 - 40 Zyklen
Denaturierung	98°C	8 s	
Hybridisierung	60°C	15 - 30 s	
<u>Elongation</u>	72°C	30 s / 1kb	
Terminale Elongation	72°C	2 - 10 min	

Zuletzt wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese gemäß dem oben beschriebenen Procedere durchgeführt.

2.2.4.2 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Banden der Zielgröße wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht, mittels eines Skalpellens ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgte mit Hilfe des *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.4.3 Verdau mit Restriktionsenzymen

Für den Verdau mit Restriktionsenzymen wurden Proben folgendermaßen angesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert:

Menge	Substanz
10 %	10x Rot Ladepuffer
10 %	Puffer des jeweiligen Restriktionsenzym
10 %	Restriktionsenzym
1 - 3 µg	DNA

Für Doppelverdau wurden die jeweils genauen Empfehlungen des Herstellers befolgt (DoubleDigest Calculator, Thermo Scientific, am 18.10.19). Zusätzlich wurde nur der Ziel-Vektor, nicht jedoch das Insert, anschließend für 30 min bei 37°C durch *FastAP-*

Behandlung dephosphoryliert. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurden die Ansätze in ein Agarose-Gel geladen, unter ultraviolettem (UV) Licht visualisiert und schließlich ggf. die DNA der benötigten Banden aus dem Gel aufgereinigt.

2.2.4.4 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um eine nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen entstandene Lücke in einem Vektor ohne Ligation eines neuen kodierenden DNA-Fragments nur zu schließen, wurden kurze Oligonukleotide erstellt, die den durch die Behandlung mit den jeweils verwendeten Restriktionsenzymen entstandenen Überhang füllen und zwischen beiden Schnittstellen eine Spanne von 6 bp einbringen. Diese wurden für den jeweiligen Sinn- und Gegensinn-Strang passend erstellt. Präparation und Sequenzen der Oligonukleotide sind in Kapitel 2.1.10.3 dargestellt. Um das Sinn- mit seinem passenden Gegensinn-Oligonukleotid zu hybridisieren, wurde folgende Reaktion angesetzt und anschließend folgendermaßen im C1000 Touch™ Thermal Cycler inkubiert:

Menge	Substanz
1 µl	Oligo + (Sinn)
1 µl	Oligo - (Gegensinn)
1 µl	10x T4 Ligase Puffer
0.5 µl	T4 PNK
6.5 µl	ddH ₂ O

Temperatur	Inkubationsdauer
37°C	30 min
95°C	5 min

Herunterkühlen auf 25°C mit -5°C/min

2.2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden insgesamt 50 ng aufgereinigte, geschnittene DNA-Fragmente in äquimolaren Teilen gemischt und mit Hilfe der T4 DNA Ligase entweder für 1 h bei Raumtemperatur (Quick-Ligase-Puffer) oder über Nacht bei 16°C (Standard-Ligase-Puffer) inkubiert. Für die Ligation hybridisierter Oligonukleotide wurden diese zunächst 1:100 in H₂O verdünnt und hiervon 1 µl wie beschrieben in 50 ng des entsprechenden verdauten Zielvektors ligiert.

2.2.4.6 Transformation

1 - 2 µl des Ligationsansatzes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Kompetente Zellen wurden von -80°C auf Eis aufgetaut, jeweils 25 - 50 µl von diesen zu jedem 1,5 ml Reaktionsgefäß hinzugeben und in diesem durch Rühren mit der Pipettenspitze mit dem Ligationsansatz vermengt. Die entstandene Mischung wurde für 20 min auf Eis inkubiert, für 40 s bei 42°C Hitze-geschockt und anschließend nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 450 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Proben für 1 h bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Schließlich wurden je nach zu erwartender Effizienz 50 µl des Ansatzes bis hin zum gesamten Ansatz auf LB-Amp-Platten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4.7 Kontrolle der Klonierung

Von aus der Transformation über Nacht gewachsenen Kolonien wurden Mini-Kulturen à 3 - 5 ml angeimpft und aus diesen wie oben beschrieben pDNA gewonnen. Diese wurde mit den zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen verdaut und in einer Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft, ob der jeweilige Klon in Fragmente der korrekten Anzahl und Größe aufgespalten wurde. Im Kontroll-Verdau korrekte Klone wurden anschließend mit den in Kapitel 2.1.10.1 aufgeführten Sequenzierungs-Primern zur Sanger-Sequenzierung an die *Igc genomics GmbH* übergeben. Aus jeweils einem in der Sanger-Sequenzierung korrekten Klon wurde dann eine Midi, bzw. Maxi-Kultur angesetzt, aus dieser pDNA präpariert und für die weiteren Experimente eingesetzt.

2.2.4.8 Klassisch klonierte Vektoren

Gemäß dem oben beschriebenen Procedere wurden folgende Vektoren erstellt:

Vektor	Primer / Oligos	PCR auf	Ligation in	Schnittstellen
lentiCRISPRv1 -EGFP	EGFP (+P2A)	pEGFP-N3	lentiCRISPRv1	NheI / MluI
lentiCRISPRv2 -EGFP-Cas9only	Insert Cas9 +/-	hybridisierte Oligos	lentiCRISPRv2 -EGFP	AgeI / XbaI
lentiCRISPRv2 -EGFP-sgRNAonly	Insert sgRNA +/-	hybridisierte Oligos	lentiCRISPRv2 -EGFP	EcoRI / PacI
lentiCRISPRv2 -EBFP-sgRNAonly	Insert sgRNA +/-	hybridisierte Oligos	lentiCRISPRv2 -EBFP	EcoRI / PacI
lentiCRISPRv2 -mcherry-sgRNAonly	Insert sgRNA +/-	hybridisierte Oligos	lentiCRISPRv2 -mcherry	EcoRI / PacI
lentiEmptyVector -EGFP	Insert BamHI + Insert XbaI -	hybridisierte Oligos	lentiCRISPRv2 -EGFP-sgRNAonly	BamHI / XbaI
lentiEmptyVector -EBFP	Insert BamHI + Insert XbaI -	hybridisierte Oligos	lentiCRISPRv2 -EBFP-sgRNAonly	BamHI / XbaI

lentiIrf4-EBFP (mouse)	Irf4 Agel fwd Irf4 Xbal rev	cDNA (Abl)	lentiEmptyVector -EBFP	Agel / Xbal
lentiBATF-EGFP (mouse)	BATF Agel fwd BATF Xbal rev	pcDNA -BATF	lentiEmptyVector -EGFP	Agel / Xbal
lentiBATF3-EGFP	BATF3 Agel fwd BATF3 Xbal rev	pcDNA -BATF3	lentiEmptyVector -EGFP	Agel / Xbal

2.2.4.9 Klonierungen mit Hilfe einer Gibson-Assembly oder Overlap-Extension-PCR

Um die Puromycin-Resistenz aus dem original lentiCRISPRv2 Vektor mit einem fluoreszierenden Reporter (EGFP, EBFP, bzw. mcherry) zu ersetzen, wurde zunächst ein die in lentiCRISPRv2 vorhandenen Schnittstellen BamHI und PmeI umspannendes und statt der Puromycin-Resistenz den entsprechenden fluoreszierenden Reporter tragendes Fragment in den Vektor pSK(-) gesetzt. Hierfür wurden über eine PCR folgende drei sich jeweils um 30 bp überlappende Fragmente generiert:

Fragment	Primer / Oligos	PCR auf	Schnittstellen
pSK	pSK-BamHI-P2A fwd pSK-BamHI-P2A rev	pSK(-)	BamHI
P2A-EGFP	P2A-EGFP-WPRE fwd P2A-EGFP-WPRE rev	pEGFP-N3	
P2A-EBFP	P2A-EGFP-WPRE fwd P2A-EGFP-WPRE rev	MIB (MSCV-IRES2-EBFP)	
P2A-mcherry	P2A-EGFP-WPRE fwd P2A-EGFP-WPRE rev	pFU-luc-2A-mCherry	
EGFP-WPRE	EGFP-WPRE-PmeI fwd EGFP-WPRE-PmeI rev	lentiCRISPRv2	PmeI

Zur Elimination der eingesetzten Plasmid-DNA wurden die entstandenen PCR-Fragmente wurden über Nacht mit DpnI verdaut und anschließend wie bereits beschrieben über eine Agarose-Gel-Elektrophorese aufgereinigt und durch eine *Gibson Assembly* wie folgt ligiert (Gibson, 2009):

Menge	Substanz
4 µl	5x IRB
2 µl	Taq-Ligase
1 µl	10x T4 Ligase Puffer
0,4 µl	Exonuklease, 1:50 in ihrem Puffer verdünnt
0,2 µl	Phusion High-Fidelity Polymerase
Temperatur	Inkubationsdauer
50°C	1h

Da die Sequenzen der drei verschiedenen klonierten fluoreszierenden Reporter in den für die Primer genutzten Abschnitten identisch sind, konnte das P2A-EGFP-WPRE-Primerpaar nicht nur für die Amplifikation von EGFP sondern auch von EBFP und mcherry genutzt werden. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde anschließend das in pSK so zusammengesetzte Fragment über die Schnittstellen BamHI und PmeI in einer klassischen Klonierung gemäß dem oben beschriebenen Procedere in lentiCRISPRv2 gesetzt.

2.2.4.10 sgRNA-Klonierungen

SgRNAs wurden mit CrispRGold entworfen und an der von Le Cong et al. publizierten Strategie orientierend kloniert (Chu et al., 2016; Cong et al., 2013). Dazu wurden die sgRNA-Oligos wie bereits oben für die Insert-Oligos beschrieben hybridisiert und über BsmBI in lentiCRISPRv2-EGFP, -EBFP oder mcherry kloniert. Hierfür wurde der entsprechende lentiCRISPR-Vektor wie folgt aufbereitet und über eine Agarose-Gel-Elektrophorese aufgereinigt:

Menge	Substanz
5 µg	lentiCRISPRv2-EGFP/EBFP/mcherry
3 µl	BsmBI
3 µl	FastAP
6 µl	10x Tango Puffer
0,6 µl	100mM DTT
	ddH ₂ O auf 60 µl

Schließlich wurden die fertigen sgRNAs 1:200 in H₂O verdünnt in jeweils 50 ng des aufgereinigten lentiCRISPRv2-Vektors ligiert.

2.2.4.11 Klonierungen in *pGEM®-T Easy*

PCR-Amplifikation, Gel-Elektrophorese und Gel-Aufreinigung erfolgten wie für die klassische Klonierung beschrieben. Um mit den 3'-T-Überhängen des *pGEM®-T Easy* Vektors ligiert werden zu können, müssen die Inserts mit einem 3'-A-Überhang versehen werden. Für einen 10 µl Ansatz wurden hierzu pipettiert und anschließend für 30 min bei 70°C inkubiert:

Menge	Substanz
5 µl	eluierte DNA
1 µl	10x NH ₄ -Puffer

1,1 µl	25 mM MgCl ₂
2 µl	10 mM dATP
1 µl	<i>InviTaq DNA Polymerase</i>

Die Ligation erfolgte unter der gleichen Berechnung wie bei der klassischen Klonierung unter Einsatz der zusammen mit dem *pGEM®-T Easy* Vektor von *Promega* zur Verfügung gestellten Reagenzien (2x Ligase Puffer, T4-DNA-Ligase). Auch die Transformation wurde wie für die klassische Klonierung beschrieben vollzogen. Da der *pGEM®-T Easy* Vektor das lac-Operon exprimiert, wurde hier zur Differenzierung zwischen Klonen mit gegen solche ohne erfolgreich ligiertes Insert zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion angewandt. Hierzu wurden vor der Transformation jeweils 40 µl X-β-Gal (20 mg/ml) sowie 40 µl IPTG (0,1 M) auf den LB-Amp-Platten ausplattiert.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Stammhaltung laufender Zellkultur

Alle Suspensionszelllinien wurden mit einer Dichte von 1 - 5 x 10⁵ Zellen / ml in RPMI-Standardmedium bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten und alle 2 bis 3 Tage dünn gesetzt sowie mit frischem Medium versehen.

Die adhärenzte Zelllinie HEK293T/17 wurde mit einer Dichte von 1 - 5 x 10⁵ Zellen / ml in DMEM-Standardmedium bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten und alle 2 bis 3 Tage mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, ausgedünnt und mit frischem Medium versehen.

2.2.5.2 Einfrieren und Auftauen eukaryoter Zellen

Pro Pellet wurden 1 x 10⁷ Zellen aus möglichst junger laufender Kultur abgenommen und einmal mit 1xPBS gewaschen, d.h. 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet in frischem 1xPBS wiederaufgenommen und nochmals 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wurde in für jedes Reaktionsgefäß jeweils 1 ml vorgekühltem FKS + 10 % DMSO resuspendiert und dieser Mix auf die entsprechende Anzahl an Kryo-Reaktionsgefäße verteilt. Diese wurden in einem Isopropanol-Ständer über Nacht langsam bei -80°C abgekühlt und am nächsten Morgen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen wurde die aus dem flüssigen Stickstoff entnommenen Zellen langsam bei Raumtemperatur angetaut und unverzüglich in 10 ml der jeweiligen Zelllinie entsprechendem Medium aufgenommen, für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der

Überstand abgegossen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in eine mit vorgewärmtem Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

2.2.5.3 Herstellung von Zellpellets zur Aufbreitung von DNA, RNA und Protein

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf Eis resp. bei 4°C durchgeführt. Pro Pellet wurden etwa 1×10^7 Zellen aus laufender Kultur abgenommen und für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet einmal in kaltem 1xPBS gewaschen, anschließend wieder in kaltem 1xPBS aufgenommen und auf die entsprechende Anzahl 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Diese wurden für 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand komplett abgenommen. Das verbleibende Pellet wurde über flüssigen Stickstoff bei -80°C eingefroren.

2.2.5.4 Puromycin-Selektions-Kurven

Zu untersuchende Zellen wurden aus laufender Kultur entnommen und auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen / ml eingestellt. Diese wurden zu je 5 ml pro *well* auf 6-*well*-Platten ausgesetzt. Jedes *well* erhielt eine Konzentration einer Konzentrationsreihe an Puromycin, die zunächst den Bereich von 0,5 µg/ml bis 2,0 µg/ml sowie eine Kontrolle ohne Puromycin abdeckte. Die Viabilität jedes *well*s wurde für etwa 7 bis 9 Tage täglich mit Hilfe einer PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt und aus den gewonnen Ergebnissen Kaplan-Meyer-Kurven generiert. Als optimale Puromycin-Konzentration wurde die niedrigste Konzentration gewählt, bei der am Ende des Untersuchungszeitraumes keine lebenden Zellen mehr zu detektieren waren. Wo nötig, wurde basierend auf diesen Ergebnissen eine zweite Puromycin-Selektions-Kurve angelegt, die nun einen kleineren Bereich um den vermuteten Zielwert abdeckte.

Für die im Screen verwendeten Zelllinien ergaben sich dabei folgende Puromycin-Konzentrationen:

L428	0,8	µg/ml
L1236	0,5	µg/ml
BJAB	0,6	µg/ml
SU-DHL-4	0,4	µg/ml

2.2.5.5 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen wurden am *BD FACS Canto™ II* oder *FACS LSRFortessa™* vorgenommen und mit Hilfe dessen Software (*FACSDiva™*) oder *FlowJo* ausgewertet. Hierfür wurden $1 \times 10^5 - 10^6$ Zellen aus der zu untersuchenden Zellkultur entnommen und in ein mit 3 ml 1xPBS befülltes 5 ml FACS-Röhrchen gegeben. Dieses wurde für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das entstandene Pellet in 1xPBS wiederaufgenommen. Für die Darstellung toter Zellen wurde das Pellet in 0,8 µg/ml PI in 1xPBS resuspendiert.

2.2.5.6 Proliferationsanalysen mit ³H-Thymidin

Für Proliferationsanalysen mit ³H-Thymidin wurden je 4×10^4 Zellen in 200 µl in ein *well* einer 96-*well*-Platte gegeben. ³H-Thymidin wurde 1:20 in RPMI-Standardmedium verdünnt. Anschließend wurden zu jedem *well* 20 µl 1:20 verdünntes ³H-Thymidin hinzugegeben und die Zellen mit diesem 16h (über Nacht) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die 96-*well*-Platte bei -20°C durchgefroren, um die Zellen aufzuschließen. Nach dem Auftauen der Platte wurde diese mit Hilfe des *Unifilter-96 Cell Harvester* auf eine *Unifilter* Mikroplatte geerntet. Auf dieser wurde nach Trocknung jedes *well* mit 10 µl *Microscint™-O* versehen, die Platte mit einem *TopSeal* und *BackSeal* verschlossen und schließlich die inkorporierte ³H-Aktivität am *TopCount NXT* gemessen.

2.2.5.7 Kompetitions-Assays

Für die Durchführung von Kompetitions-Assays wurden die Hodgkin-Zelllinien L428, L1236 und UHO-1 sowie die B-NHL-Kontrollzelle BJAB jeweils entweder mit einem Pool aus den drei im Re-Screen verwendeten sgRNAs gegen das entsprechende Kandidatengen oder einem Pool aus sieben *non-targeting* sgRNAs transduziert. Dabei wurden die *knockout*-Konstrukte grün (*lentiCRISPRv2-EGFP*) und die *non-targeting* Kontrollen blau fluoreszierend gewählt (*lentiCRISPRv2-EBFP*). Nach lentiviraler Transduktion und durchflusszytometrischer Zellsortierung (für L428 und UHO-1; Methoden s.u.) wurde eine Mischpopulation aus *knockout*- (EGFP) und Kontrollzellen (EBFP) erstellt. Diese wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf ihr Verteilungsverhältnis untersucht. Die Veränderung dieses Verteilungsverhältnisses wurde zunächst für die *knockout*- und Kontrollprobe im

Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert berechnet. Anschließend wurde diese Veränderung der *knockout*-Probe in Relation zur Kontrollprobe gesetzt:

Quotient 1-A	$\frac{[(\% \text{ reporterpositive Zellen Tag X } \textit{knockout}) / (\% \text{ reporterpositive Zellen Tag 1 } \textit{knockout})]}{[(\% \text{ reporterpositive Zellen Tag X Kontrolle}) / (\% \text{ reporterpositive Zellen Tag 1 Kontrolle})]}$
Quotient 1-B	$\frac{[(\% \text{ reporterpositive Zellen Tag X Kontrolle}) / (\% \text{ reporterpositive Zellen Tag 1 Kontrolle})]}{[(\text{Quotient 1-A } \textit{knockout} \text{ Tag X}) / (\text{Quotient 1-B Kontrolle Tag X})]}$
End-Quotient	$[(\text{Quotient 1-A } \textit{knockout} \text{ Tag X}) / (\text{Quotient 1-B Kontrolle Tag X})]$

2.2.6 Lentiviraler Gentransfer

2.2.6.1 Transfektion von HEK293T/17 zur Virusproduktion und Ernte des virus-tragenden Überstandes

Am Tag vor der Transfektion wurden HEK293T/17 aus laufender Kultur entnommen und mit ca. 4×10^6 Zellen in 9 ml DMEM-Standardmedium so auf 10 cm Schalen ausgesetzt, dass sie am nächsten Morgen zu circa 70 - 80 % konfluieren. In einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 10 µg des Ziel-Plasmids und je 5 µg der lentiviralen Verpackungsplasmide pCMV-VSV-G und psPAX2 mit H₂O auf 450 µl aufgefüllt. Zu diesem DNA-Gemisch wurden nun jeweils 50 µl 2,5 M CaCl₂ hinzugegeben, auf dem *Vortex* gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde in 15 ml Polystyrene-Röhrchen je 500 µl 2xHEBS vorgelegt. Auf dem laufenden *Vortex* wurde nach verstrichener Inkubationszeit das DNA-CaCl₂-Gemisch in den HEBS Puffer eingetropt und anschließend für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde auf den 10 cm Platten das Medium zu je 9 ml DMEM-Standardmedium + 9 µl 25 µM Chloroquin gewechselt. Schließlich wurde der DNA-CaCl₂-Puffer-Mix tropfenweise unter ständigem Schwenken auf die Platten gegeben und diese für 48 h bei 37°C inkubiert, wobei nach den ersten 6 - 8 h das Medium auf DMEM-Standardmedium (ohne Chloroquin) zurückgewechselt wurde. Nach 48 h wurde das Medium mit einer 10 ml Spritze aspiriert und durch einen 45 µm Sterilfilter entweder in ein 15 ml Polypropylene-Röhrchen oder für folgende Ultrazentrifugation in ein 30 ml *Thinwall Ultra-Clear™* Reaktionsgefäß gegeben. Virus, das nicht weiter konzentriert wurde, wurde unverzüglich auf -80°C eingefroren.

2.2.6.2 Viruskonzentration durch Ultrazentrifugation

Die mit virustragendem Überstand befüllten *Thinwall Ultra-Clear™* Reaktionsgefäße wurden bis auf 10 mg genau austariert und anschließend in den zum Rotor gehörigen Hülsen in den *Beckmann SW28Ti* Rotor eingehängt. In diesem wurde in der *Optima™ L-60* Ultrazentrifuge für 2 h bei 24.000 rpm und 4°C im Vakuum zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und dessen Reste durch invertiertes Platzieren des Reaktionsgefäße auf einem Papiertuch entfernt. Für eine 100-fache Konzentration wurde das Pellet in 300 µl DMEM-Standardmedium + 1 % BSA wiederaufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert, um das Pellet vollständig zu lösen. Am nächsten Morgen wurde der konzentrierte Virusüberstand aller Reaktionsgefäße gemischt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.6.3 Transduktion von Zielzelllinien mit lentiviralen Überständen

Zu transduzierende Zellen wurden aus laufender Kultur entnommen und zu je 1,5 - 3 x 10⁶ Zellen pro *well* in 2 ml bei der Transduktion mit unkonzentriertem Virus, resp. in 4 ml bei der Transduktion mit konzentriertem Virus, in 6-*well*-Platten ausgesetzt und mit 2 - 3 ml Virusüberstand, resp. 10 - 50 µl bei konzentriertem Virus, versetzt. Anschließend wurden die Platten für 2 h bei 2.000 rpm und 32°C zentrifugiert und daraufhin unter den oben beschriebenen Standardbedingungen bei 37°C inkubiert. Für die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen mittels Puromycin, wurden die Zellen zwei Tage nach Transduktion gemeinsam mit einer nicht-transduzierten Kontrolle so lange mit der wie oben beschrieben ermittelten idealen Konzentration unter Puromycin-Selektionsdruck gesetzt, bis in der Kontrolle keine lebenden Zellen verblieben waren. Die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen bei fluoreszierendem Reporter (EGFP, EBFP oder mcherry) erfolgte mit Hilfe durchflusszytometrischer Zellsortierung am *FACS Aria™ Fusion* an Tag 4 - 6 nach Transduktion. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen zuvor in MACS-Puffer aufgenommen.

Für die initiale Titerbestimmung bei konzentriertem Virus wurden die Zielzellen mit einer Verdünnungsreihe von 10 µl über jeweils einen 10er-Potenz-Schritt bis 10⁻² µl konzentriertem Virus transduziert. In weiteren Transduktionen wurde das Virus-Volumen gewählt, dessen erzielte Multiplicity of Infection (MOI) am nächsten an ≤ 0,4 lag (entsprechend etwa 33% transduzierten Zellen). Für nicht-konzentriertes Virus wurden jeweils 2 ml Virusüberstand pro *well* eingesetzt.

2.2.6.4 Virus-Titer-Bestimmung

Die Transduktion mit einer MOI von $\leq 0,4$ ist elementar für die Durchführung der CRISPR-Screens, da bei einer MOI, die über dieser Zahl liegt, die Wahrscheinlichkeit für die Transduktion einer Zelle mit mehreren sgRNAs deutlich ansteigt und so die Ergebnisse für die Relevanz einzelner Gene verfälschen kann. Daher kommt der Bestimmung des biologischen Virus-Titers für jede Virus-Charge und Zelllinie eine wichtige Bedeutung zu.

Für die Titerbestimmung mithilfe der Puromycin-Selektion wurden die Zielzelllinien wie bereits beschrieben transduziert. Am Tag des Beginns der Puromycin-Selektion wurde jedes *well* transduzierter Zellen gezählt und anschließend auf zwei *wells* gesplittet, wovon eines belassen und das andere unter Puromycin-Selektionsdruck gesetzt wurde. Sobald in der nicht-transduzierten Kontrolle, die gleichermaßen unter Puromycin-Selektionsdruck gesetzt worden war, keine lebenden Zellen mehr verblieben waren, wurden die beiden Duplikat-*wells* der transduzierten Zellen gezählt und die Transduktionseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl des } wells \text{ unter Puromycin-Selektionsdruck}}{\text{Zellzahl des } wells \text{ ohne Puromycin-Selektionsdruck}} \times 100$$

Zur besseren Kontrolle der Transduktionseffizienz wurde die Transduktionseffizienz darüber hinaus durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde das Puromycin-Resistenz-Gen des erhaltenen lentiCRISPR-Vektors mittels klassischer Klonierung (für lentiCRISPRv1) resp. Gibson-Assembly (lentiCRISPRv2) durch EGFP ersetzt. Die Analyse der EGFP-Expression erfolgte dann an Tag 5 nach Transduktion am *BD FACS Canto™ II*. Dabei entspricht der Prozentsatz EGFP-positiver Zellen der Transduktionseffizienz.

2.2.7 Analyse der *knockout*-Effizienz durch CRISPR/Cas9

2.2.7.1 T7-Nuklease-Assay

Zunächst erfolgte die Aufreinigung genomischer DNA aus CRISPR/Cas9-modifizierten Zellen mit Hilfe von Quick Extract nach Angaben des Herstellers. Für die Durchführung von T7-Nuklease-Assays wurde zunächst ein etwa 1 bis 2 kb großes PCR-Fragment von der gewonnenen genomischen DNA amplifiziert, das den *protospacer* der jeweiligen sgRNA enthält und bei einer Aufspaltung des Fragments an der erwarteten sgRNA-Schnittstelle in zwei ungleich große Fragmente zerfällt. Dieses wurde über ein

Agarose-Gel aufgereinigt und in ddH₂O eluiert. 200ng dieses jeweiligen PCR-Produktes wurden nun mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 9µl gebracht und 1µl NEB Puffer 2 hinzugegeben. Anschließend erfolgte die DNA-Dimer-Formation, bei der nun entweder Homodimere aus unmodifizierten (also nicht durch CRISPR/Cas9 geschnittener und veränderter) DNA-Fragmenten oder Heterodimere aus unmodifizierten und modifizierten (oder auch zwei unterschiedlich modifizierten) DNA-Fragmenten entstehen, nach folgendem Protokoll:

<u>Denaturierung</u>	95°C	10 min
Abkühlen	95°C – 85°C	à -2°C/min
Halten	85°C	1 min
Abkühlen	85°C – 75°C	à -0,3°C/min
Halten	75°C	1 min
Abkühlen	75°C – 65°C	à -0,3°C/min
Halten	65°C	1 min
Abkühlen	65°C – 55°C	à -0,3°C/min
Halten	55°C	1 min
Abkühlen	55°C – 45°C	à -0,3°C/min
Halten	45°C	1 min
Abkühlen	45°C – 35°C	à -0,3°C/min
Halten	35°C	1 min
Abkühlen	35°C – 25°C	à -0,3°C/min
Halten	25°C	1 min

Anschließend wurde für jede Probe folgende Reaktion angesetzt und für 30min bei 37°C inkubiert:

<u>Menge</u>	<u>Substanz</u>
10 µl	DNA-Duplexe
0,5 µl	T7-Endonuklease
0,5 µl	NEB Puffer 2
4 µl	ddH ₂ O

Das so entstandene Gemisch aus durch die T7-Endonuklease geschnittenen Heterodimeren und ungeschnittenen Homodimeren wurde nun mit 3µl 10x rot Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromid-Agarosegel geladen, laufen gelassen und unter UV-Licht visualisiert. Die Analyse der CRISPR/Cas9-Modifikationseffizienz

erfolgte durch den Vergleich der Mengen geschnittener zu ungeschnittener DNA. Als Negativ-Kontrolle wurde jeweils eine *non-targeting* sgRNA transduzierte Probe mitgeführt (wird nicht geschnitten).

2.2.7.2 TIDE-Analysen

Die TIDE-Analysen erfolgten anhand des von Brinkman et al. veröffentlichten gleichnamigen Programmes (<https://tide.deskgen.com/>)(Brinkman et al., 2014). Hierfür wurden die für die T7-Nuklease-Assays erzeugten PCR-Fragmente nach Sanger sequenziert. Über die angegebene Internetseite wurden nun jeweils das entsprechende PCR-Fragment aus *non-targeting* Kontroll-Zellen und *knockout*-Zellen hochgeladen. Der TIDE Algorithmus vergleicht nun diese beiden Sequenzen. In erfolgreich durch CRISPR/Cas9 modifizierten Zellen ist es zu Insertionen und Deletionen und damit zu Leserasterverschiebungen gekommen, sodass ab der Schnittstelle ein Gemisch vieler verschiedener Sequenzen zu sehen ist. Dieses Gemisch kann durch den TIDE-Algorithmus wieder auf die unterschiedlichen zugrunde liegenden Insertionen und Deletionen zurückgerechnet und hieraus auf die CRISPR/Cas9-Effizienz geschlossen werden.

2.2.8 CRISPR-Screens

Für die beiden CRISPR-Screens wurden die beiden Hodgkin-Zelllinien L428 und L1236 sowie die beiden Kontroll-Zelllinien BJAB (Burkitt Lymphom) und SU-DHL-4 (Diffus großzelliges B-Zell Lymphom) frisch aufgetaut und zunächst wie oben beschrieben für jede Zielzelllinie der Titer der konzentrierten lentiviralen CRISPR-Bibliothek bestimmt. Der die lentivirale CRISPR-Bibliothek tragende Überstand wurde in einem einzigen Versuchsablauf parallel produziert, nach der Konzentration gepoolt und in Aliquots verteilt, um eine konstante Effizienz des viralen Überstands zu gewährleisten. Es erfolgte schließlich die Transduktion der Zielzelllinien in Proben à 1×10^8 Zellen dem jeweiligen Titer entsprechend so, dass eine MOI von $\leq 0,4$ erzielt wurde. Für jede Probe wurden hierfür jeweils 3×10^6 Zellen pro *well* in insgesamt 35 *wells* ausgesetzt und mit der entsprechenden Menge konzentrierten Virusüberstandes versetzt und in einem 36. *well* je untransduzierte Negativ-Kontrolle für die nachfolgende Puromycin-Selektion mitgeführt. Für jede Zelllinie wurden Duplikate als biologische Replikate angefertigt. Die Transduktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die Proben mit Puromycin

in der der jeweiligen Zelllinie entsprechenden Konzentration unter Selektionsdruck gesetzt. Um die Repräsentation der CRISPR-Bibliothek zu wahren, wurde in der folgenden Zellkultur beim Umsetzen der Zellen stets darauf geachtet, dass zu jedem Zeitpunkt des CRISPR-Screens für jede Probe eine Mindest-Zellzahl von 3×10^7 Zellen erhalten blieb. Als Auswertungsbasis der CRISPR-Screens diente die Veränderung der sgRNA-Repräsentation über die Zeit, die zunächst durch die Entnahme von Zellpellets zu den Zeitpunkten Tag 1 und 21 nach Transduktion für den GeCKO-Screen, bzw. an Tag 1, 14, 21 und 28 für den Bestätigungs-Screen erfasst wurde. Aus diesen wurde anschließend genomische DNA extrahiert, aus dieser die jeweils integrierte sgRNA-Sequenz über eine PCR ausgelesen und schließlich mit den für die Hochdurchsatz-Sequenzierung am *HiSeq 2500* benötigten *Illumina*®-Adaptoren versehen.

2.2.8.1 Präparation genomischer DNA aus humaner Zellkultur für CRISPR-Screens

Genomische DNA humaner Zelllinien wurde mit dem *Qiagen Blood & Cell Culture DNA Midi Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt und die DNA-Konzentration und -Reinheit photmetrisch am *DS-11 FX+* bestimmt.

2.2.8.2 Auslesen der sgRNA-Sequenz und Präparation der Proben für die Hochdurchsatz-Sequenzierung

Zunächst wurde die integrierte sgRNA-Sequenz durch eine PCR aus der genomischen DNA ausgelesen. Um die volle Repräsentation aller sgRNAs der CRISPR-Bibliotheken zu wahren, wurde diese dabei für jede Probe in 10 parallelen Reaktionen folgendermaßen durchgeführt:

Menge	Substanz
20 µl	5x Puffer der Q5-DNA-Polymerase
2 µl	10µM dNTPs
5 µl	10µM primer <i>sgRNA I (v2)</i>
1 µl	Q5-DNA-Polymerase
10 µg	genomische DNA
	H ₂ O auf 100µl

<u>Initiale Denaturierung</u>	98°C	30 sec	} 20 Zyklen
Denaturierung	98°C	8 s	
Hybridisierung	62°C	30 s	
<u>Elongation</u>	72°C	30 s	
Terminale Elongation	72°C	2 min	

Anschließend wurden die 10 Reaktionen jeder Probe gepoolt und aus diesen eine 2. PCR angesetzt, in der die für die Sequenzierung am HiSeq 2500 benötigten *Illumina*®-Adapter angehängt wurden. Mit dem fwd-Primer wurde zusätzlich ein 1-9 bp langer Stagger eingebracht, der die Qualität der Sequenzierung im *Illumina*®-System verbessert. Mit dem rev-Primer wurde ein 6 bp langer Index eingeführt, anhand dessen die Ergebnisse der parallelen Sequenzierung wieder ihren ursprünglichen Proben zugeordnet werden können. Wiederum zur Erhaltung der Repräsentation wurden hier für jede Probe 12 parallele Reaktionen wie folgt ausgeführt:

<u>Menge</u>	<u>Substanz</u>
20 µl	5x Puffer der Q5-DNA-Polymerase
2 µl	10µM dNTPs
5 µl	10µM primer (1)-(9) <i>illumina fwd p5</i> + (a)-(i) <i>illumina rev p7</i>
1 µl	Q5-DNA-Polymerase
5 µl	gepooltes PCR-Produkt aus der 1. PCR
	H ₂ O auf 100µl

<u>Initiale Denaturierung</u>	98°C	30 sec	} 13 Zyklen
Denaturierung	98°C	8 s	
Hybridisierung	65°C	30 s	
<u>Elongation</u>	72°C	30 s	
Abschluss-Elongation	72°C	2 min	

Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben über ein 1,7%-Agarose-Gel mit Hilfe des *ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kits*, gefolgt von einer Konzentrationsbestimmung am *DS-11 FX+* Spektrophotometer und einer Qualitäts-Analyse am *Bioanalyzer*. Für die Hochdurchsatz-Sequenzierung wurden die Proben an die entsprechende *Core Facility* des MDC übergeben. Hier erfolgte die Sequenzierung mit jeweils 4 (GeCKO-Screen), resp. 16 (Bestätigungs-Screen), Proben pro *lane*, sodass sich eine Sequenzierungs-

Tiefe ergab, bei der jede sgRNA-Sequenz rechnerisch 250x (GeCKO-Screen), bzw. > 1000x (Bestätigungs-Screen), ausgelesen wurde.

2.2.8.3 Auswertung der Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die sich aus der Sequenzierung ergebenden Rohdaten wurden zunächst normalisiert. Anschließend wurde die Veränderung des sgRNA-Pools jeder Probe von Tag 1 zu Tag 21 (GeCKO-Screen), bzw. zu den Tagen 14, 21 und 28 (Bestätigungs-Screen) als Quotient der normalisierten *read*-Zahlen berechnet. Nachdem solche sgRNAs ausgeschlossen wurden, die keinen biologischen Effekt, also keine Veränderung von Tag 1 zum jeweiligen späteren Zeitpunkt, aufwiesen, ausgeschlossen worden waren, wurden solche Gene für die weitere Analyse ausgewählt, für die mindestens 2 sgRNAs eine Depletion mit einem Quotienten ($Q1 = \frac{\text{sgRNA-read-Zahl Tag 21}}{\text{sgRNA-read-Zahl Tag 1}}$) von $< 0,6$ aufweisen konnten. Von diesen Genen wurden für das Hodgkin-Lymphom spezifische Gene ermittelt, indem das Verhältnis der Quotienten der sgRNA-Repräsentation zwischen der jeweiligen Hodgkin- und Kontrollzelllinie berechnet wurde ($Q2 = \frac{Q1 \text{ Hodgkin-Zelllinie}}{Q1 \text{ Kontrollzelllinie}}$). Als spezifisch wurden solche Gene klassifiziert, für die $Q2 \leq 0,5$ galt.

2.2.8.4 Klonierung der CRISPR-Bibliothek für den Bestätigungs-Screen

Die sgRNAs für den Bestätigungsscreen wurden ebenfalls mit CrispRGold entworfen, in 13 96-*well*-Platten synthetisiert und wie oben beschrieben jeweils einzeln hybridisiert (<http://crisprgold.mdc-berlin.de/>)(Chu et al., 2016). Anschließend wurden jeweils 96, bzw. 48 der verbleibenden 13. Platte, hybridisierte sgRNAs gepoolt und in 7 getrennten Reaktionen in wie oben beschrieben verdauten und aufbereiteten lentiCRISPRv2 ligiert. Alle Ligationen wurden nun wiederum gepoolt um die entstandene vollständige sgRNA-Bibliothek folgendermaßen in zwei parallelen Ansätzen in *E. coli* 10G Elite Duo elektrokompente Zellen transformiert: jeweils 2 µl des Ligations-Pools wurden auf Eis in 25 µl elektrokompenten Zellen gemischt und bei 10 µF, 600 Ω und 1800 V im *Gene Pulser™ Xcell* elektroporiert. Anschließend wurden sofort 975 µl SOC-Medium hinzugefügt und die Transformationen für 1 h bei 32°C im *Novotron 50* inkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend gemeinsam auf insgesamt 6 LB-amp-Platten wie bereits beschrieben ausplattiert und inkubiert. Am nächsten Tag wurden Pellets direkt von den Platten geerntet, gepoolt und über drei Säulen mit dem *Qiagen Plasmid DNA Maxi Kit* pDNA extrahiert. Zur Kontrolle wurden auf dieser wie oben beschrieben über eine 1.

und 2. PCR die sgRNA-Sequenz ausgelesen, auf dem *Illumina MiSeq* sequenziert und die Verteilung der sgRNAs auf Gleichverteilung geprüft.

2.2.9. Statistik

Die Auswahl der für die jeweilige Fragestellung angewendeten statistischen Tests erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBikE). Die statistische Analyse der Kompetitions-Assays geschah anhand eines zweiseitigen 1-Stichproben t-Tests gegen den Wert 1. Zur statistischen Bewertung von ³H-Thymidin-Proliferationsassays wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test angewendet. Die Statistik der in TIDE durchgeführten Analysen erfolgte nach dessen Algorithmus.

3. ERGEBNISSE

3.1 Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in humanen Lymphomzelllinien

3.1.1 Klonierung von CRISPR/Cas9- und Expressionsvektoren für die lentivirale Transduktion humaner Zielzelllinien

Als Ursprungsvektoren für die Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in humanen Lymphomzelllinien verwendeten wir die Vektoren *lentiCRISPRv1* und *lentiCRISPRv2*, die im Labor von Feng Zhang (MIT, Boston) entwickelt wurden (Cong et al., 2013; Sanjana et al., 2014). Diese Vektoren enthalten neben der Cas9 auch das konstante sgRNA-Grundgerüst. Die spezifische sgRNA-Sequenz kann über die Restriktionsschnittstelle *BsmBI* eingebracht werden (Abb. 3.1).

Ausgehend von den *lentiCRISPR*-Vektoren wurden mehrere Varianten für spezifische Anwendungen und experimentelle Fragestellungen generiert: Zur validen Kontrolle des erfolgreichen lentiviralen Gentransfers und der Transgenexpression eignet sich die Koexpression eines fluoreszierenden Reporterproteins, die mittels Durchflusszytometrie schnell, sicher und einfach bestimmt werden kann. Da die ursprünglichen *lentiCRISPR*-Vektoren jedoch über keinen fluoreszierenden Reporter verfügen, wurden diese zunächst entsprechend modifiziert. Außerdem wurde ein Zwei-Vektoren-System erstellt, mit dem eine getrennte Transduktion zunächst nur mit der Cas9 und anschließend mit einer spezifischen sgRNA ermöglicht wird. Schließlich wurde das Grundgerüst der so veränderten *lentiCRISPR*-Vektoren auch zur Herstellung eines lentiviralen Leervektors genutzt, der wiederum als Ausgangsvektor für die Herstellung hoch effizienter Expressionskonstrukte genutzt wurde.

3.1.1.1 Erstellung von Varianten des *lentiCRISPRv1* sowie *lentiCRISPRv2* mit fluoreszierenden Reportern

Um aus dem eine Puromycinresistenz tragenden ursprünglichen *lentiCRISPRv1*-Vektor eine Variante zu generieren, die ein fluoreszierendes Reportergen exprimiert, wurde mit Hilfe einer PCR auf *pEGFP-N3* ein P2A-EGFP Fragment erzeugt und über *NheI* und *MluI* in *lentiCRISPRv1* subkloniert, wodurch dort P2A-PuroR durch P2A-EGFP ersetzt

wurde. Die Verbindung über ein sog. selbstschneidendes 2A-Peptid erlaubt dabei die gleichzeitige Expression zweier unabhängiger Proteine von einem durchgehenden Leseraster (Ryan and Drew, 1994; Szymczak-Workman et al., 2012). Um in späteren Experimenten mehrere sgRNAs in eine Zelle zu transduzieren (z.B. für den gleichzeitigen Doppel-*knockout* zwei verschiedener Gene) oder Mischpopulationen unterschiedlich transduzierter Zellpopulationen zu untersuchen (z.B. für die unten beschriebenen Kompetitions-Assays), wurden drei Varianten des ursprünglichen *lentiCRISPRv2*-Vektors erstellt, von denen eine ein grün fluoreszierendes Reporterprotein (*enhanced green fluorescent protein, EGFP*) exprimiert, eine ein blaues (*enhanced blue fluorescent protein, EBFP*) und eine weitere ein rotes (*mCherry*). Die Klonierung dieser *lentiCRISPRv2*-Varianten erfolgte mit Hilfe einer *Gibson-Assembly*, bei der PCR-Produkte mit kompatiblen Überhängen ohne den Gebrauch von Restriktionsschnittstellen ligiert werden (Gibson, 2009). Hierfür erfolgte die PCR-Amplifikation folgender DNA-Fragmente (von den entsprechenden Plasmiden): pSK-*BamHI*-P2A (*pBlueScript*), P2A-EGFP/EBFP/mCherry (*pEGFP-N3* / AG F. Rosenbauer, MDC Berlin / AG M. Lipp, MDC Berlin), WPRE-*PmeI* (*lentiCRISPRv2*). Diese Fragmente wurden in der anschließenden *Gibson-Assembly* zu einem Plasmid verbunden, aus dem in einem zweiten Schritt das so entstandene *BamHI*-P2A-EGFP/EBFP/mcherry-WPRE-*PmeI* Konstrukt anschließend über *BamHI* und *PmeI* in *lentiCRISPRv2* umgesetzt wurde. Alle hierfür genutzten Primer sind im Kapitel 2.1.10.2 (Material und Methoden) zu finden. Die entstandenen Vektoren *lentiCRISPRv2-EGFP*, *lentiCRISPRv2-EBFP* und *lentiCRISPRv2-mCherry* sind, wie auch die Ursprungsvektoren *lentiCRISPRv1* und *lentiCRISPRv2*, in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

Nach positivem Kontrollverdau und Sanger-Sequenzierung wurde die Funktionsfähigkeit der entstandenen Vektoren durch Herstellung von Viren sowie durch anschließende Transduktion verschiedener vorwiegend lymphatischer Zelllinien und durchflusszytometrische Untersuchung auf Expression des entsprechenden Reporters überprüft. Es zeigte sich eine deutliche Population für den jeweiligen Reporter positiver Zellen nach Transduktion (siehe auch Abb. 3.2).

3.1.1.2 Klonierung eines Zwei-Vektoren-Systems für die Generierung stabiler Cas9-exprimierender Zelllinien und anschließende sgRNA-Transduktion

Um einen Vektor (*lentiCRISPRv2-Cas9only*) für die Generierung stabiler Cas9-exprimierender Zelllinien zu erhalten, bei dem zu einem späteren Zeitpunkt durch eine zweite unabhängige Transduktion die gewünschte sgRNA eingeführt werden kann, wurde in dem wie oben beschrieben erzeugten Vektor *lentiCRISPRv2-EGFP* der für den U6-Promotor sowie die sgRNA kodierende Bereich mit Hilfe eines kurzen Oligonukleotids über *PacI* und *EcoRI* entfernt.

Für die Erstellung eines zweiten nun ausschließlich die sgRNA exprimierenden Vektors (*lentiCRISPRv2-sgRNAonly*) wurde in den oben beschriebenen Vektoren *lentiCRISPRv2-EBFP* und *-mCherry* die Cas9 über *XbaI* und *BamHI* entfernt und die entstandene Lücke ebenfalls mithilfe eines kurzen Oligonukleotids *in frame* geschlossen.

Die Sequenz der jeweils verwendeten Oligonukleotide findet sich in Material und Methoden, Kapitel 2.1.10.3. Die entstandenen Vektoren wurden durch einen Kontrollverdau sowie Sanger-Sequenzierung überprüft.

3.1.1.3 Klonierung eines Leervektors sowie hieraus resultierender Expressionsvektoren

Als Ausgangsvektoren für die Generierung lentiviraler Expressionsvektoren wurden zunächst aus den einen fluoreszierenden Reporter tragenden *lentiCRISPRv2*-Konstrukten lentivirale Leervektoren erstellt, d.h. Vektoren, aus denen die Cas9- und sgRNA-Elemente entfernt wurden, um an Stelle der Cas9 cDNA-Konstrukte für die Überexpression von Kandidatengenen zu klonieren. Auf diese Weise entstanden lentivirale Expressionskonstrukte mit jeweils EGFP, EBFP oder mCherry als Reporter, um auch hier eine möglichst hohe Flexibilität für zellbiologische Experimente zu erhalten. Zunächst wurden aus den *lentiCRISPRv2-EGFP/EBFP/mCherry*-Konstrukten jeweils mit Hilfe eines kurzen Oligos über *PacI* und *EcoRI* der U6-Promotor und das sgRNA-Grundgerüst entfernt. Danach wurde mittels eines weiteren Oligos über *XbaI* und *BamHI* die Cas9 entfernt und die beiden Schnittstellen in ihrer Reihenfolge invertiert, d.h. es entstand ein Klonierungselement mit 5'-AgeI-BamHI-XbaI-3'. Die Sequenz der jeweiligen Oligonukleotide findet sich in Material und Methoden, Kapitel 2.1.10.3. Die Kontrolle der entstandenen Leervektoren erfolgte ebenfalls durch einen

Kontrollverdau und Sanger-Sequenzierung gefolgt von Durchflusszytometrie transfizierter resp. transduzierter Zielzellen.

Um schließlich Expressionsvektoren einzelner Zielgene (hier: *Irf4*, *BATF* und *BATF3*) zu klonieren, wurden die entsprechenden Sequenzen von der jeweiligen cDNA ausgehend unter Einführung der benötigten Schnittstellen amplifiziert und über *AgeI* und *XbaI* oder *BamHI* und *XbaI* in die Leervektoren eingebracht. Die hierfür verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.1.10.2 (Material und Methoden) aufgeführt.

Erläuterung zu Abb. 3.1 Schematische Darstellung der *lentiCRISPR*-Vektoren. Abgebildet sind auf den Originalversionen in weiß Bestandteile des lentiviralen Grundgerüsts sowie auf allen Vektoren farbig die relevanten Strukturen des CRISPR/Cas9-Systems. Fett eingezeichnet sind zudem relevante Schnittstellen von Restriktionsenzymen. **A** *lentiCRISPRv1* Originalversion und erstellte EGFP-exprimierende Variante (grau). **B** *lentiCRISPRv2* Originalversion und erstellte Varianten (schwarz) sowie Zwei-Vektoren-System (braun) und lentiviraler Leervektor (schwarz kursiv).

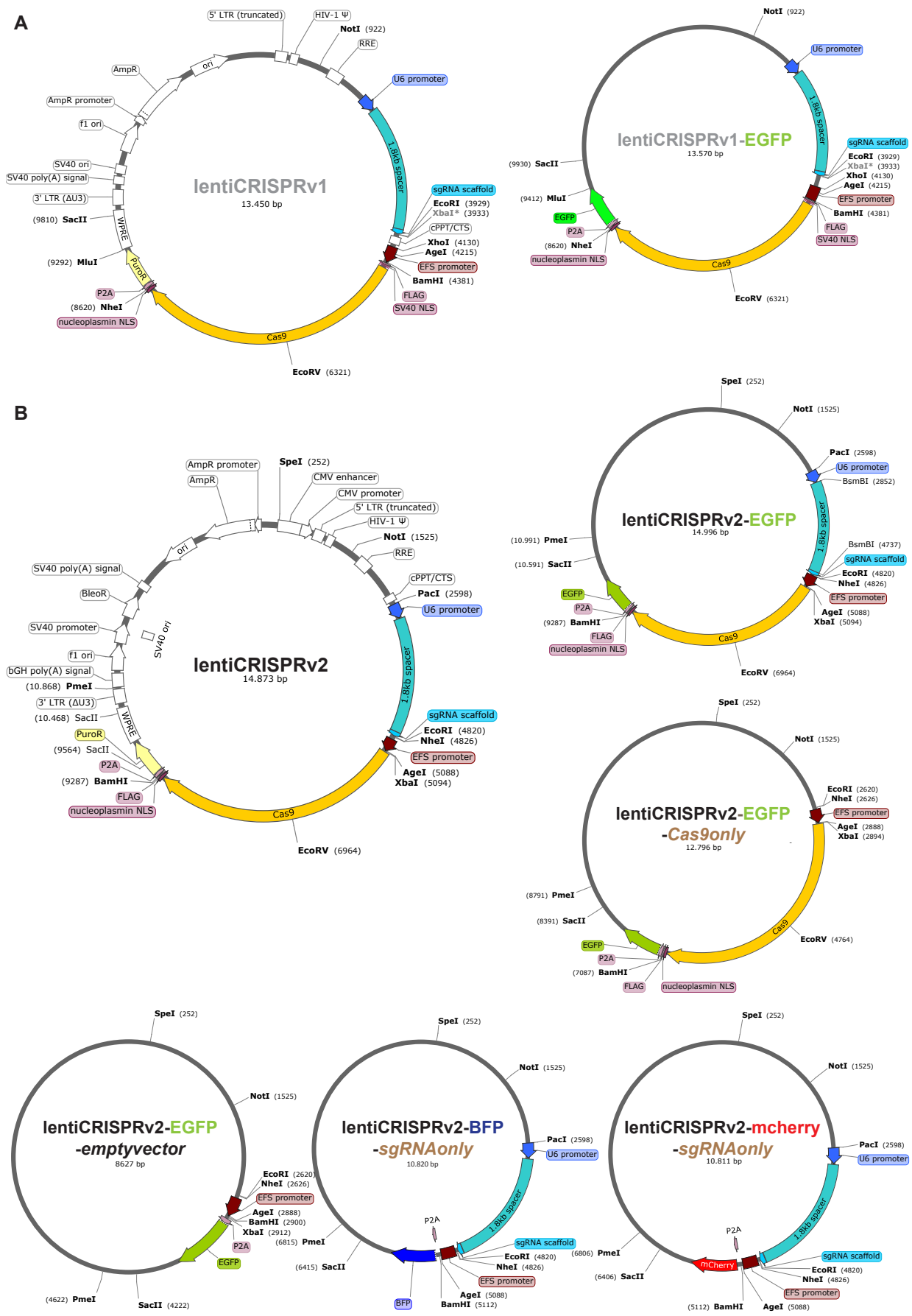


Abb. 3.1 (Erläuterung siehe vorherige Seite)

3.1.2 Test-Transduktionen der *lentiCRISPRv1*- und *lentiCRISPRv2*-Vektoren

In ersten Experimenten erfolgte zunächst der Vergleich des ursprünglichen *lentiCRISPRv1*-Vektors mit der nachfolgenden Generation (*lentiCRISPRv2*). Dazu wurden ausgewählte Test-Zelllinien mit den EGFP-Reporter exprimierenden Varianten der beiden *lentiCRISPR*-Vektoren transduziert und die erzielte Transduktionseffizienz verglichen. Dabei entspricht die Transduktionseffizienz dem Anteil der erreichten Reporter-positiven Population an der Gesamtpopulation, wie sie durchflusszytometrisch bestimmt werden kann. Es zeigte sich eine deutlich höhere Transduktionseffizienz der neueren *lentiCRISPRv2*-Variante für alle getesteten Zelllinien, sodass in allen folgenden Experimenten dieser Vektor und die von ihm abgeleiteten modifizierten Versionen (s.o.) eingesetzt wurden.

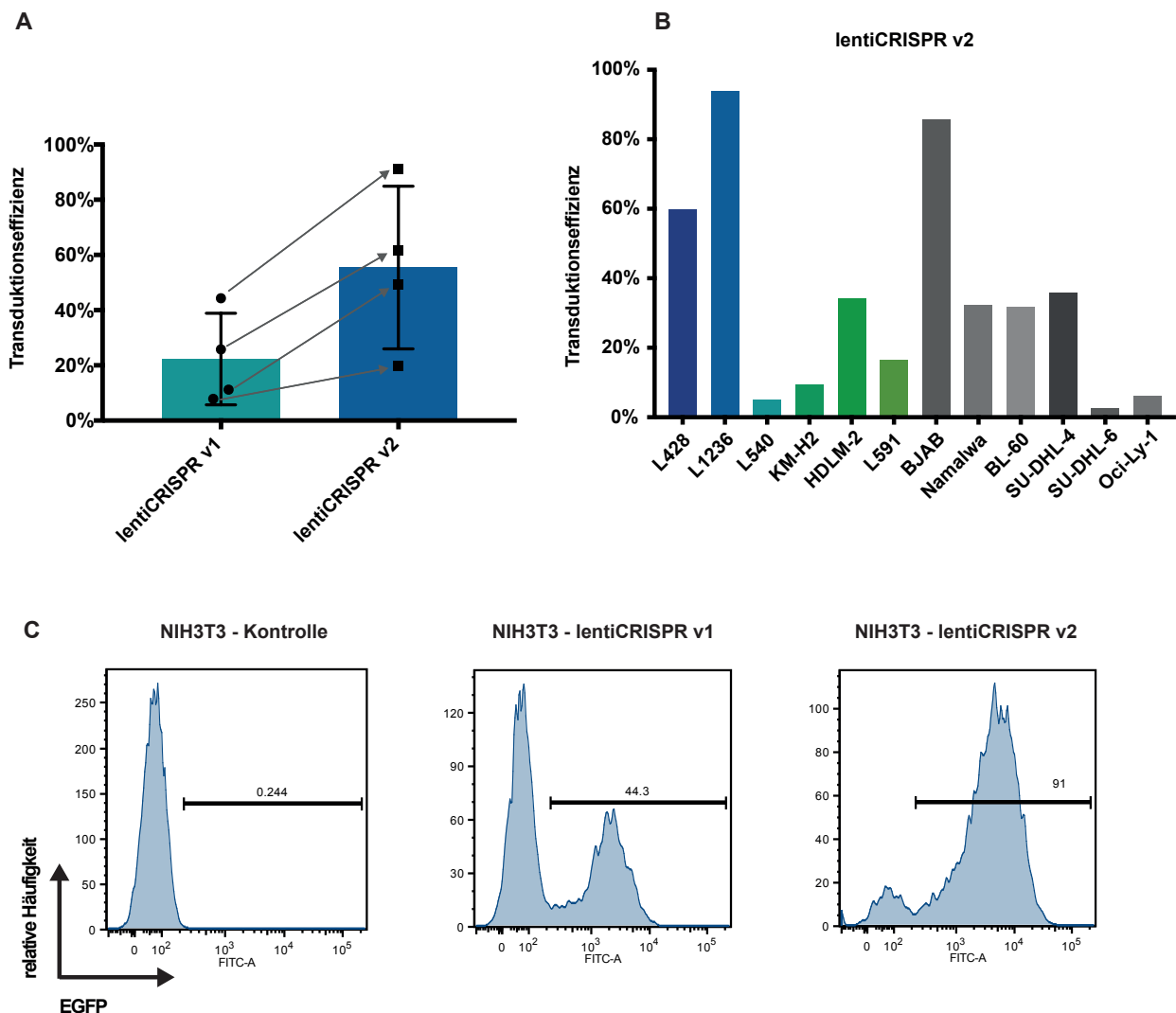


Abb. 3.2 (Erläuterung siehe folgende Seite)

Erläuterung zu Abb. 3.2 Test und Vergleich der *lentiCRISPR*-Vektoren Version 1 und 2 in der lentiviralen Transduktion ausgewählter, vorwiegend lymphatischer Zelllinien. **A** Erzielte Transduktionseffizienz mit *lentiCRISPRv1-EGFP* und *lentiCRISPRv2-EGFP* in vier Zelllinien (L428, L1236, NIH3T3, HEK293). Die Pfeile zeigen die Veränderung der Transduktionseffizienz jeder Zelllinie. **B** Transduktionseffizienz von *lentiCRISPRv2-EGFP* in einem breiten Probensatz an cHL- und B-NHL-Zelllinien. **C** Exemplarische durchflusszytometrische Darstellung der EGFP-Expression in NIH3T3 Fibroblasten nach Transduktion mit den beiden Varianten des *lentiCRISPR*-Vektors (Kontrolle: untransduzierte Zellen).

3.1.3 Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in Hodgkin-Zelllinien

Um das CRISPR/Cas9-System in unserem Labor zu etablieren und für die von uns verwendeten humanen Lymphomzelllinien zu optimieren, wurden exemplarisch *knockout* Versuche für die Transkriptionsfaktoren ABF1, ID2 und E2A durchgeführt, von denen unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt hat, dass sie entscheidend an der Ausprägung eines linienfremden Genexpressionsprofils im cHL beteiligt sind (Mathas et al., 2006). Diese Experimente boten neben dem rein technischen Aspekt zusätzlich die Möglichkeit, die Grundlagen für weitere Arbeiten auf diesem Gebiet zu schaffen. Zu diesem Zweck wurden in die Vektoren *lentiCRISPRv2-EGFP* und *-EBFP* sowie *lentiCRISPRv2-sgRNAonly-EBFP* folgende sgRNAs kloniert: sgABF1 (1-4), sgID2 (1-4), sgE2A (1-4) und *non-targeting*-Kontroll-sgRNAs (ntg, 1-4). Die Sequenzen der jeweiligen sgRNAs und die Details der Klonierung sind in den Kapiteln 2.1.10.4 und 2.2.4.10 (Material und Methoden) aufgeführt.

3.1.3.1 Analysen von CRISPR/Cas9-induzierten Mutationen der genomischen DNA und des *knockouts* von ABF1, ID2 und E2A

Zur Analyse der Frequenz und des Musters der durch das CRISPR/Cas9-System verursachten Mutationen der genomischen DNA der Zielgene wurden die Lymphomzelllinien L428 und BJAB mit Virus der sgRNA-tragenden *lentiCRISPRv2-EGFP* Vektoren transduziert. Mit Hilfe von FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) wurden reporterpositive Zellen aufgereinigt und aus diesen über das QuickExtract-Protokoll genomische DNA isoliert (Kapitel 2.2.7.1, Material und Methoden). Von dieser wurden mittels PCR jene Bereiche der Zielgene amplifiziert, in denen die jeweiligen sgRNAs einen Doppelstrangbruch verursachen sollen. Die Häufigkeit der aus den Doppelstrangbrüchen resultierenden genetischen Modifikationen des Ziellocus dieser

sgRNAs wurde anschließend anhand eines T7-Nuclease-Assays bestimmt, bei dem die T7 Endonuclease die entstandenen PCR-Fragmente im Bereich von *mismatch* Nukleotidpaarungen in kleinere Fragmente schneidet (siehe Abb. 3.3 sowie Kapitel 2.2.7.1). Ergänzend wurden die entstandenen PCR-Produkte nach Sanger sequenziert und die Frequenz entstandener Insertionen und Deletionen mit Hilfe der *online* verfügbaren Software TIDE ermittelt (Abb. 3.4) (Brinkman et al., 2014). Darüber hinaus wurde der jeweilige *knockout* resp. *knockdown* auf Proteinebene im Western Blot kontrolliert (Abb. 3.5).

Insgesamt zeigte sich für E2A für zwei sgRNAs ein guter *knockout* auf Proteinebene. Auch für ABF1 und ID2 ließen sich mit jeweils einer sgRNA Insertionen und Deletionen auf genomischer DNA-Ebene sowie ein *knockout* auf Proteinebene nachweisen.

Die *knockout*-Kontrolle über Western Blot erfolgte dabei in den stabil Cas9-exprimierenden Lymphomzelllinien L428 und BJAB (*lentiCRISPRv2-Cas9only*), die zusätzlich mit dem die jeweilige sgRNA-tragenden Vektor (*lentiCRISPRv2-sgRNAonly*) transduziert worden waren.

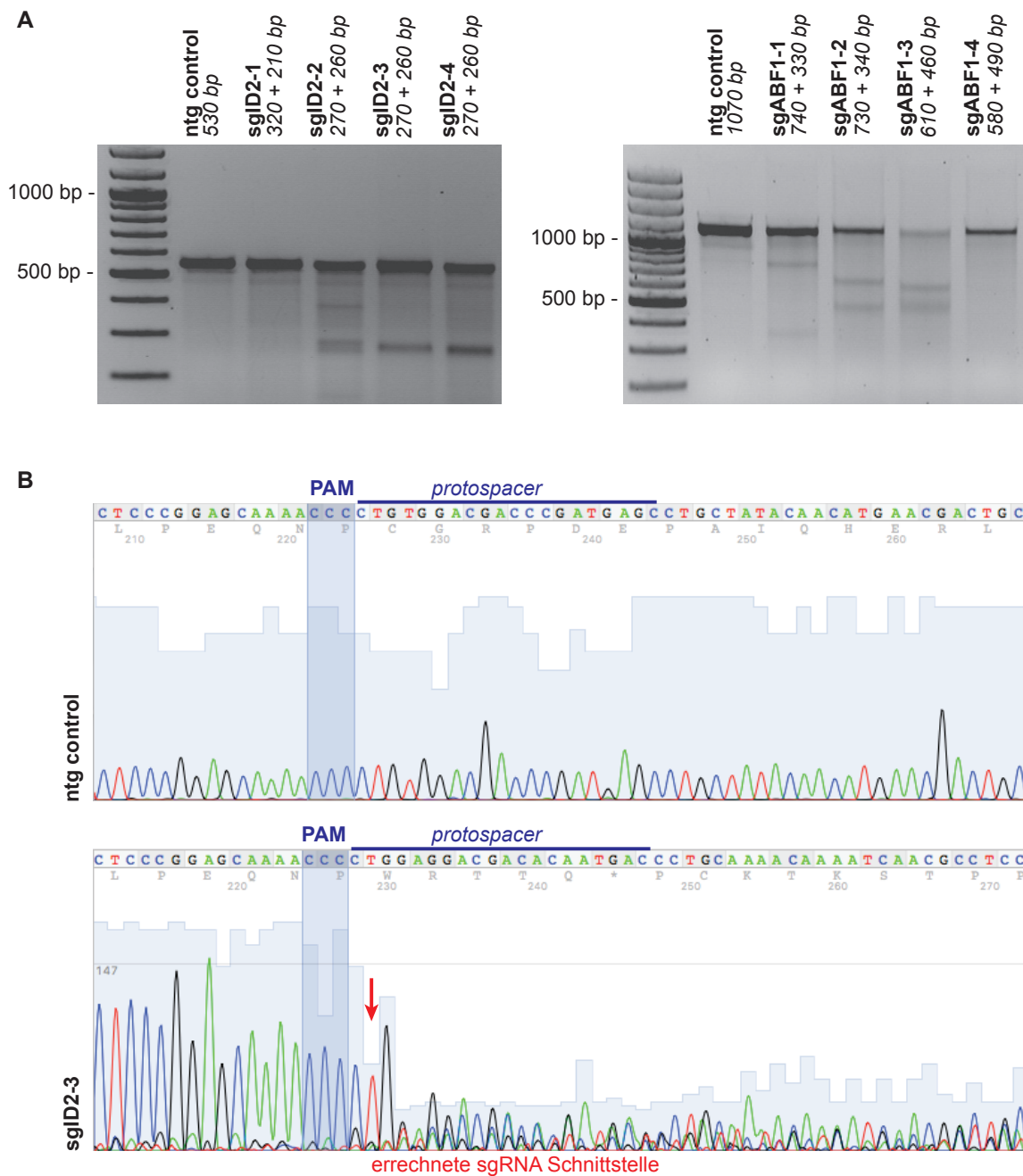


Abb. 3.3 T7-Assay und Sequenz-Analysen von durch CRISPR/Cas9 verursachten Mutationen in L428 Zellen (*lentiCRISPRv2-EGFP*). **A** T7-Nuclease-Assay von PCR-Produkten genomischer DNA nach CRISPR/Cas9 *knockout* mit sgRNAs gegen ID2 (links) und ABF1 (rechts), jeweils im Vergleich zu einer *non-targeting* sgRNA (ntg). Zu sehen ist ein Amplikon der genomischen DNA des jeweiligen Locus sowie bei erfolgreicher CRISPR/Cas9-vermittelter Modifikation je zwei kürzere Fragmente (aufgrund der an der Mutationsstelle entstehenden T7-Endonuclease-Aktivität bei *mismatch* DNA-Paarungen zwischen Wildtyp und mutierten Fragmenten). Die theoretische errechnete Länge dieser Fragmente ist in kursiv aufgeführt. **B** Exemplarische Sanger-Sequenzierung des Amplikons der genomischen DNA des Zielbereichs von sgID2-3. Es ist eine durch erfolgreiche CRISPR/Cas9-Modifikation entstandene Verschiebung des Leserasters ab der errechneten sgRNA Schnittstelle zu sehen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

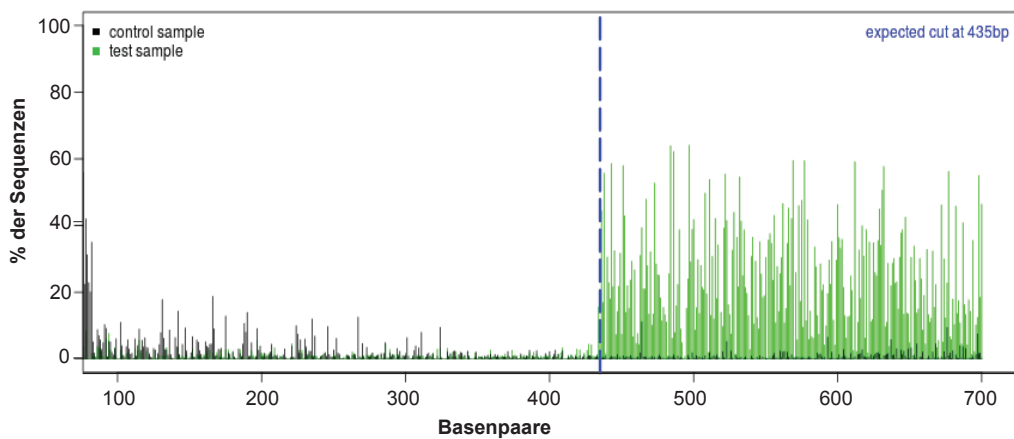
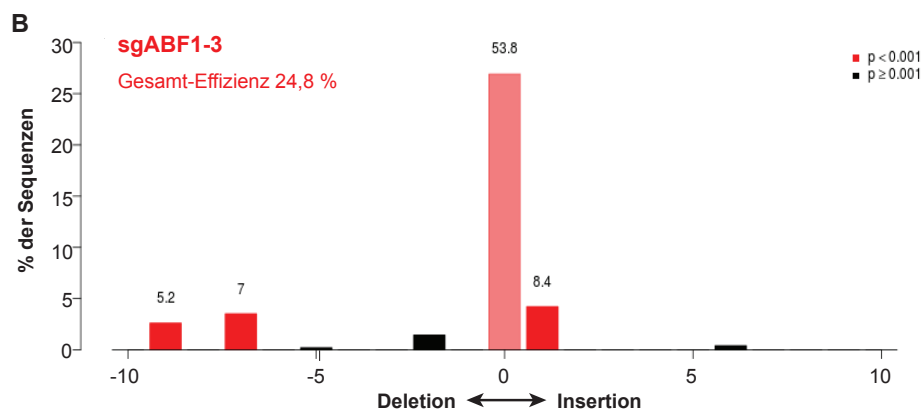
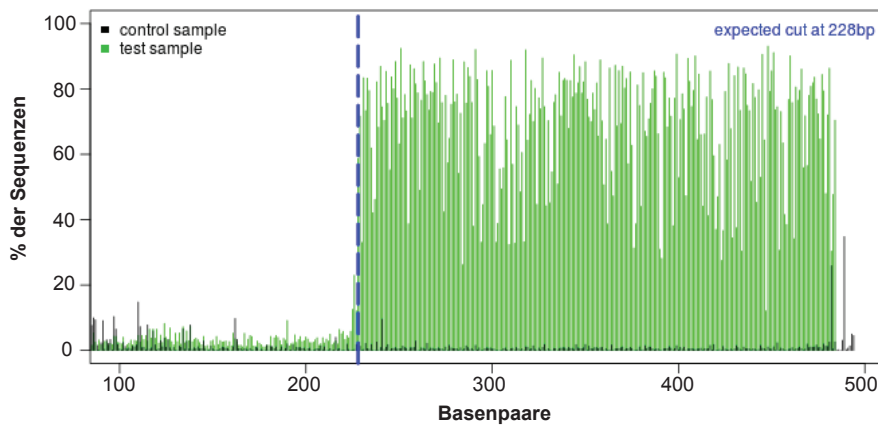
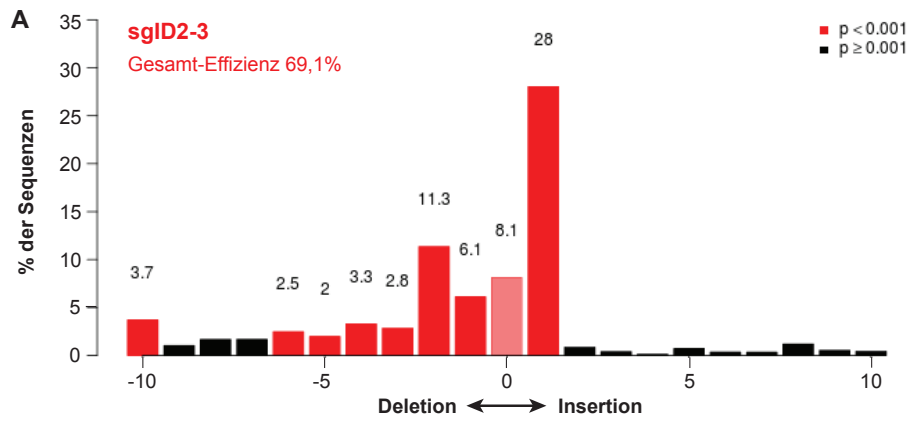


Abb. 3.4 (Erläuterung siehe folgende Seite)

Erläuterung zu Abb. 3.4. TIDE-Analysen der sgRNA-Effizienzen von sgID2-3 (**A**) und sgABF1-3 (**B**) in L428 (*lentiCRISPRv2-EGFP*). Grundprinzip des TIDE-Programms ist der Vergleich zwischen der Kontroll-Sanger-Sequenzierung (unveränderte Sequenz, Wildtyp) und den Sequenzen nach CRISPR/Cas9-vermittelter Mutation des entsprechenden Genlocus; letztere bilden ab der Mutationsstelle eine Sammlung unterschiedlicher Sequenzen (je nach entstandener Veränderung), die bioinformatisch wieder getrennt und systematisch mit der Wildtyp-Sequenz verglichen werden, wodurch Häufigkeit und Art der Modifikationen (Deletion, Insertion) zu erkennen sind. Dargestellt ist die aus den Leserasterverschiebungen in Sanger-Sequenzierungen errechnete Gesamt-Effizienz der jeweiligen sgRNA sowie die jeweiligen Anteile der verschiedenen Mutationen (Insertion, Deletion) für die zu untersuchende sgRNA (*test sample*, grün) im Vergleich zur ntg-Kontrolle (*control sample*, schwarz). Der Punkt 0 auf der X-Achse der oberen Balkendiagramme sowie die blaue Linie in den unteren Sequenz-Darstellungen bezeichnen jeweils die vorhergesagte Position des durch die jeweilige sgRNA eingeführten Doppelstrangbruchs (*expected cut*). Statistisch signifikante ($p < 0.001$) Mutationen sind rot dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

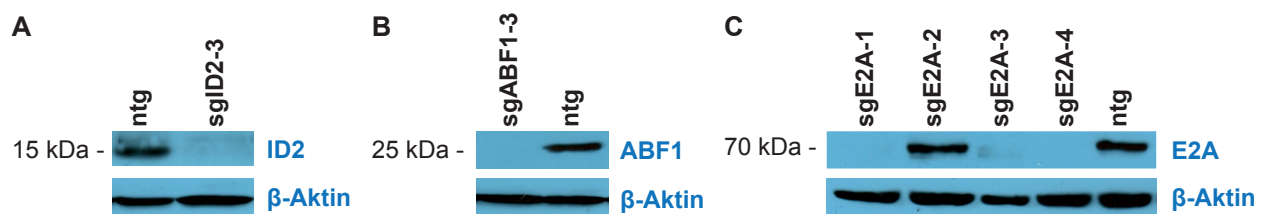


Abb. 3.5 Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten L428-Cas9 Zellen, die jeweils mit einer ntg-Kontrolle oder einer Zielgen-spezifischen sgRNA transduzierten wurden (Zwei-Vektoren-System; Transduktion von *lentiCRISPRv2-Cas9only* und *lentiCRISPRv2-sgRNAonly*). Zu sehen ist der *knockout* für die bereits oben beschriebenen sgRNAs sgID2-3 (**A**) und sgABF1-3 (**B**). **C** Test der *knockout*-Effizienz der sgRNAs gegen E2A. β-Aktin als Ladungskontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei.

3.1.3.2 Analyse der Proliferation und Viabilität von Hodgkin-Zellen unter CRISPR/Cas9-basiertem *knockdown* von ABF1, ID2 und E2A

Um die Auswirkungen eines ABF1-, ID2- und/oder E2A-Verlustes auf die Proliferation von cHL-Zelllinien zu untersuchen, wurden ³H-Thymidin basierte Proliferations-Analysen durchgeführt. Es zeigte sich in der Hodgkin-Zelllinie L428 bei Verlust von E2A ein Proliferationsnachteil, der den Effekt eines E2A-Verlustes in BJAB-Kontrollzellen

übertraf. Hingegen führte der Verlust von ABF1 und ID2 nur zu einem moderaten Proliferationsnachteil.

Darüber hinaus wurde die Viabilität der so veränderten Zellen anhand von PI-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. In der Hodgkin-Zelllinie L428 zeigten sich nach E2A-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle vermehrt PI-positive Zellen als Ausdruck einer reduzierten Viabilität, während sich auch hier nur ein minimaler Unterschied zwischen ID2-*knockdown* und Kontrolle ergab. In der B-NHL-Kontrollzelllinie BJAB ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der Viabilität sowohl für den E2A- als auch den ID2-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.3.3 Etablierung von Wettbewerbs-Assays zur Untersuchung von cHL-Zellen nach CRISPR/Cas9-basiertem *knockdown* von ABF1, ID2 und E2A

Um neben Veränderungen in der Proliferationsrate und der Viabilität die allgemeine Wettbewerbsfähigkeit der jeweiligen *knockout*- im Vergleich zur Kontrollpopulation zu untersuchen, wurden Wettbewerbs-Assays nach folgendem Prinzip etabliert: Jede zu untersuchende Zelllinie wurde getrennt mit Konstrukten von sgRNAs gegen das Zielgen sowie mit *non-targeting* Kontroll-sgRNAs transduziert; für beide Transduktionen wurden Vektoren mit einem unterschiedlichen Reporter verwendet (hier: *knockout*-Zellen EGFP, *non-targeting* Kontroll-Zellen EBFP). Anschließend wurden die Zellpopulationen per FACS aufgereinigt und dann eine Misch-Population erstellt. Das Verhältnis der Reporter in der jeweiligen Kultur zueinander wurde schließlich über die Zeit durchflusszytometrisch bestimmt. Eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten einer Subpopulation weist dabei auf einen Wettbewerbsvorteil dieser Zellen hin.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Proliferations- und Viabilitätsanalysen zeigte sich in Wettbewerbs-Assays bei E2A-Verlust ebenfalls ein deutlicher Nachteil für die cHL-Zelllinie L428 während der Verlust von ID2 nur minimale Auswirkungen aufwies. Für die B-NHL-Kontrollzelllinie BJAB zeigte sich auch in Wettbewerbs-Assays kein nachteiliger Effekt eines E2A- oder ID2-*knockdowns*.

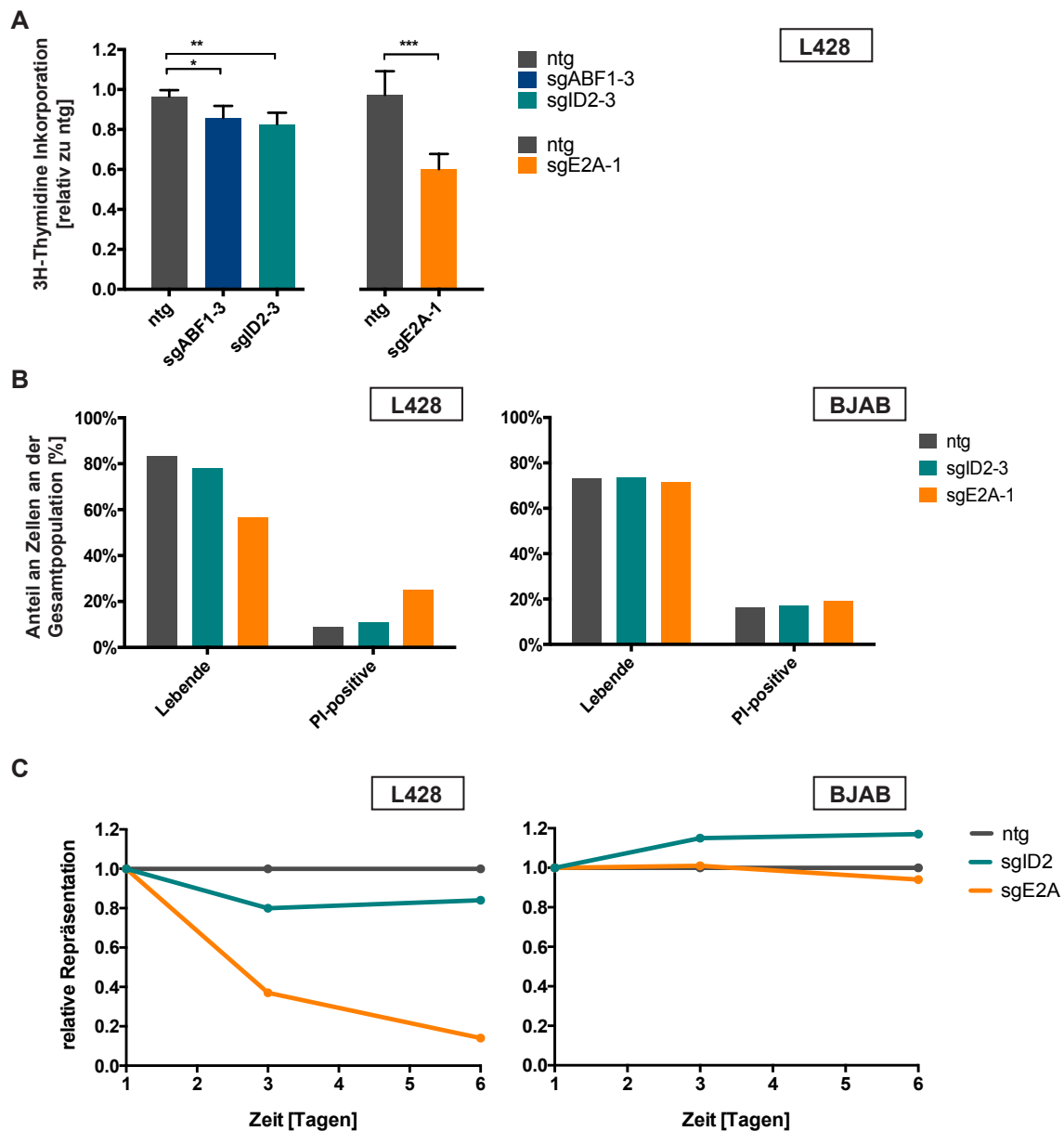


Abb. 3.6 Funktionelle Untersuchungen in CRISPR/Cas9-*knockout* Zellen. Stabil Cas9-exprimierende L428 und BJAB Zellen (*lentiCRISPRv2-Cas9only*) wurden mit den sgRNAs sgID2-3, sgABF1-3 und sgE2A-1 (*lentiCRISPRv2-sgRNAonly*) transduziert. **A** Proliferationsanalysen mittels ³H-Thymidin (Statistik: zweiseitiger t-Test; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001). **B** Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils lebender (FSC-A vs. SSC-A) und toter (PI-positiver) Zellen. **C** Wettbewerbs-Assay von ID2- und E2A-*knockout* im Vergleich zu Kontroll-Zellen (ntg); cHL-Zelllinie L428 (links) und B-NHL-Kontrollzelllinie BJAB (rechts).

3.2 CRISPR/Cas9-Screening im Hodgkin-Lymphom

3.2.1 Konzept und Grundprinzip des Screens

Für die Durchführung eines genomweiten CRISPR/Cas9-basierten *knockout*-Screens wurde die von Shalem et al. generierte *Genome-scale-CRISPR-Knockout version2* (GeCKOv2) Bibliothek verwendet, die mit über 120 000 *single guide* RNAs (sgRNAs) etwa 20 000 humane Gene zum Ziel hat (Shalem et al., 2014).

Diese Bibliothek wurde genutzt, um einen genomweiten *dropout*-Screen durchzuführen, dessen Grundprinzip folgendermaßen beschrieben werden kann: Vom Zeitpunkt der Transduktion an werden über den Beobachtungszeitraum hinweg solche sgRNAs, die ein überlebens- oder proliferationsrelevantes Gen zum Ziel haben, in der Repräsentation aller sgRNAs abnehmen oder ganz verschwinden. SgRNAs, die hingegen einen Tumorsuppressorgen zum Ziel haben, werden über die Zeit in ihrem Anteil an der Gesamtmenge der sgRNAs zunehmen. Die hieraus resultierenden Veränderungen in der quantitativen Zusammensetzung des sgRNA-Pools können zu definierten Endpunkten durch Hochdurchsatz-Sequenzierung ausgelesen und hieraus für die jeweilige Zelllinie relevante Kandidatengene ermittelt werden.

3.2.2 Etablierung grundlegender Techniken

Da die beschriebene genomweite CRISPR-Bibliothek über lentivirale Transduktion in die jeweiligen Zielzellen eingebracht wird, wurde zunächst die generelle Empfänglichkeit von humanen Hodgkin-Zelllinien für eine lentivirale Transduktion mit dem EGFP exprimierenden lentiviralen Plasmid *pLJM1-EGFP* getestet (Sancak et al., 2008). Diese Testtransduktionen zeigten eine hohe Transduzierbarkeit der beiden Zelllinien L428 (78,4%) und L1236 (96,3%), die gleichzeitig sehr etablierte Zelllinienmodelle für das cHL darstellen (Diehl et al., 1985; Kanzler et al., 1996b; Schaadt et al., 1980; Wolf et al., 1996). Die hohen Transduktionsraten bestätigten sich ebenfalls in weiteren Tests mit dem Vektor *lentiCRISPRv2*, der auch die GeCKOv2-Bibliothek trägt und mit dem Transduktionseffizienzen von 59,9% in L428 und 94,0% in L1236 erreicht wurden. Zur besseren direkten Kontrolle der Transduktionseffizienz wurde dabei wie oben beschrieben eine Variante des *lentiCRISPRv2*-Vektors kloniert, die statt der ursprünglichen Puromycin-Resistenz einen EGFP-Reporter trägt

(*lentiCRISPRv2-EGFP*). Auf dieselbe Weise wurden Non-Hodgkin-Zelllinien, die in dem folgenden Screen als Kontrolle dienen sollten, auf ihre Empfänglichkeit für eine lentivirale Transduktion getestet. Dabei erwiesen sich die Burkitt Lymphom Zelllinie BJAB sowie die DLBCL-Zelllinie SU-DHL-4 (*diffuse large B cell lymphoma* (DLBCL), *germinal center B cell-like* (GCB) Subtyp) als geeignete Kontrollen (Epstein et al., 1978; Klein et al., 1974). Die beschriebenen Transduktionseffizienzen des Testvektors *pLJM1-EGFP* sind in Abb. 3.7 sowie die des *lentiCRISPRv2* in Abb. 3.2 (B) dargestellt.

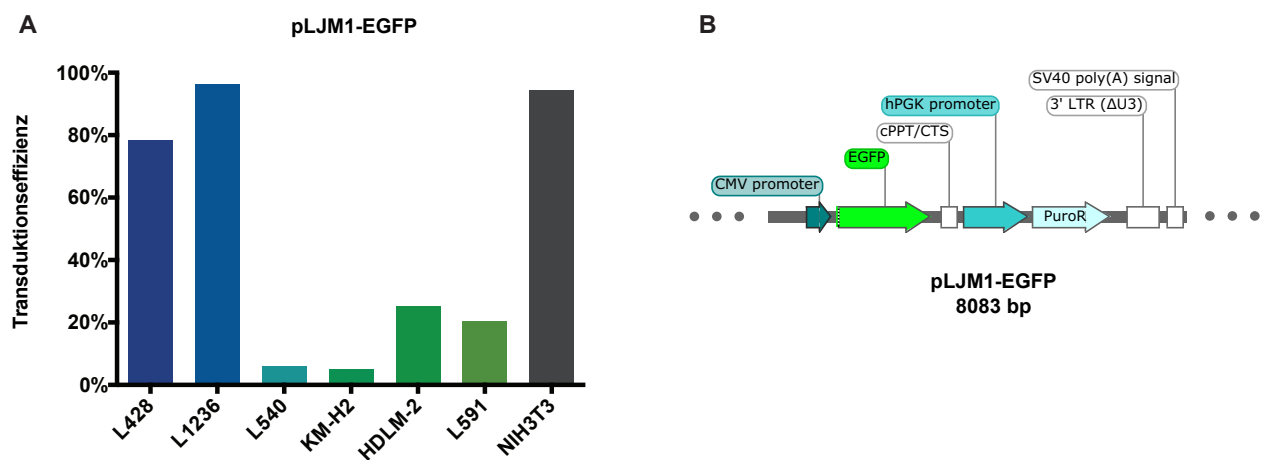


Abb. 3.7 Transduktionstests mit *pLJM1-EGFP*. **A** Erzielte Transduktionseffizienz mit *pLJM1-EGFP* in einer Auswahl an cHL-Zelllinien und NIH3T3 Fibroblasten. **B** Schematische Darstellung des *pLJM1-EGFP* Vektors: Das EGFP-Reportergen steht unter Kontrolle eines CMV-Promoters, das Puromycinresistenzgen unter Kontrolle eines hPGK-Promoters.

Darüber hinaus ist es für die Validität des Screens von besonderer Bedeutung, eine Mehrfachtransduktion einzelner Zellen mit mehr als einer sgRNA zu vermeiden, da sonst nicht nur die tatsächlich relevante sgRNA am Ende des Beobachtungszeitraumes depletiert bzw. angereichert sein wird, sondern auch die zufällig co-transduzierte(n) sgRNA(s). Um dies zu gewährleisten, wurden die Zielzelllinien mit jeweils der Menge an konzentriertem, virustragendem Überstand transduziert der zu einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,4 führte, sodass sich eine der Poission-Verteilung folgende Verteilung in 67% nicht transduzierte, 27% einfach transduzierte und max. 6 % mehrfach transduzierte Zellen ergab. Zur Bestimmung der hierfür jeweils benötigten Virus-Konzentration wurde jede Zelllinie zunächst mit einer Konzentrationsreihe des virustragenden Überstandes transduziert, der hernach auch für den eigentlichen

CRISPR-Screen verwendet wurde, und die Transduktionseffizienz wie beschrieben bestimmt (siehe auch Kapitel 2.2.6.4, Material und Methoden).

Der die *GeCKOv2*-Bibliothek tragende Vektor *lentiCRISPRv2* kodiert gleichzeitig für eine Resistenz gegen das zytotoxisch wirkende Nukleosid-Antibiotikum Puromycin, d.h. es kann mit Hilfe der Puromycin-Behandlung auf erfolgreich transduzierte Zellen selektiert werden. Die jeweilige minimale letale Puromycin-Dosis für die ausgewählten Zielzelllinien wurde in Konzentrationsreihen ermittelt und anschließend für die Selektion während des genomweiten CRISPR/Cas9-Screens eingesetzt. Diese beträgt für L428 0,8 µg/ml, für L1236 0,4 µg/ml, für BJAB 0,6 µg/ml und für SU-DHL-4 0,4 µg/ml Puromycin (siehe Abb. 3.8).

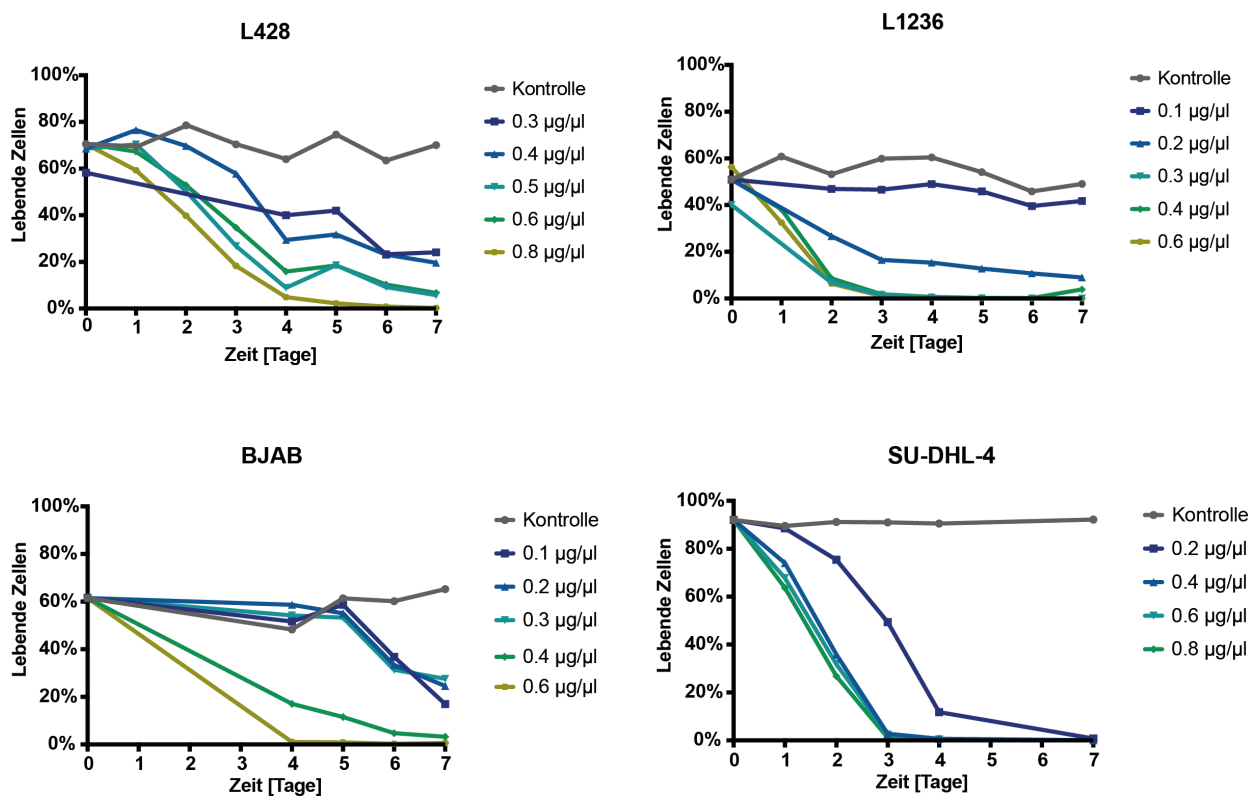


Abb. 3.8 Puromycin-Selektionskurven: Die ausgewählten Zelllinien wurden in Konzentrationsreihen mit Puromycin behandelt und über die Zeit durchflusszytometrisch der Anteil noch lebender Zellen bestimmt (hier dargestellt: über FSC-A vs. SSC-A *gating*). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von mindestens zwei.

3.2.3 Durchführung des genomweiten CRISPR-Screens

Für den genomweiten CRISPR-Screen wurden die oben beschriebenen Hodgkin-Zelllinien L428 und L1236 sowie die Non-Hodgkin-Kontrollzelllinien BJAB und SU-DHL-4 verwendet. Es wurden in Duplikaten jeweils 1×10^8 Zellen jeder Zelllinie mit der entsprechenden Menge konzentrierten virustragenden Überstands der GeCKOv2-Bibliothek transduziert. Zellpellets à je 3×10^7 Zellen wurden zur Erfassung der sgRNA-Repräsentation als Startpunkt an Tag 1 nach Transduktion sowie als Endpunkt an Tag 21 nach Transduktion entnommen und aus diesen wie beschrieben genomische DNA aufbereitet, aus der schließlich die jeweiligen sgRNA-Sequenzen mittels Hochdurchsatzsequenzierung ausgelesen wurden. Hierfür wurden in einer ersten PCR die jeweils spezifischen sgRNA-Sequenzen mit Hilfe von Primern amplifiziert, die in der integrierten lentiviralen DNA proximal und distal im gemeinsamen Sequenzbereich binden. In einer zweiten PCR wurden dann die für die Sequenzierung benötigten *Illumina*®-Adapter, *stagger* und Indices eingebracht (Abb. 3.9; siehe auch Kapitel 2.2.8.2, Material und Methoden).

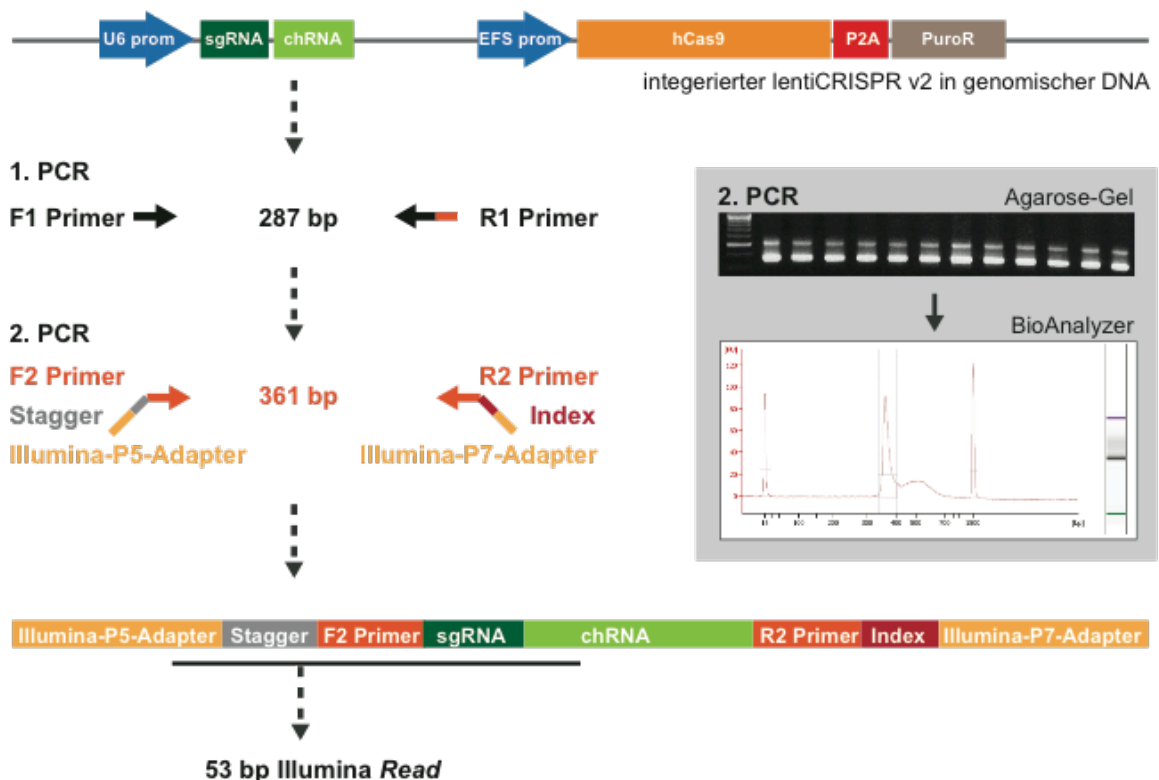


Abb. 3.9 (Erläuterung siehe folgende Seite)

Erläuterung zu Abb. 3.9 Arbeitsfluss der Erstellung einer *library* für die Hochdurchsatzsequenzierung aus genomischer DNA: Die für das Zielgen spezifische sgRNA-Sequenz des in die genomische DNA integrierten *lentiCRISPRv2*-Vektors wurde in einer 1. PCR ausgelesen und anschließend in einer 2. PCR die entsprechenden *Illumina*®-Adapter inklusive Indices und *stagger* angehängt. Die so entstandene sgRNA-Sequenz-*library* jeder Probe wurde über ein Agarose-Gel aufgereinigt und anschließend am BioAnalyzer auf Reinheit und korrekte Fragment-Größe kontrolliert. Bei der folgenden Hochdurchsatzsequenzierung am *Illumina*® *HiSeq 2500* wurden aus jeder *library* in einem 53bp langen *Illumina*® *read* die spezifischen sgRNA-Sequenzen ausgelesen und anschließend ihren Zielgenen zugeordnet.

Zur Kontrolle wurden darüber hinaus Zellpellets für die Präparation von Protein und anschließende Überprüfung der Cas9-Expression im Western Blot gewonnen. Es zeigte sich eine starke Expression der Cas9 in den mit der *GeCKOv2*-Bibliothek transduzierten Proben (Abb. 3.10).

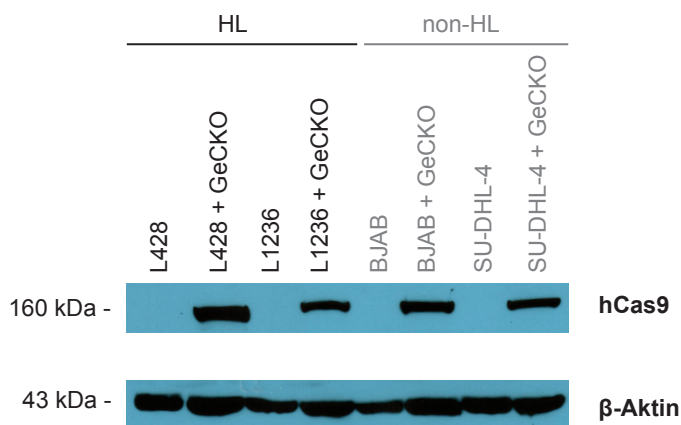


Abb 3.10 Western Blot: Expression der Cas9 in den *GeCKOv2*-transduzierten Zelllinien (Tag 28 nach Transduktion). β -Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

3.2.4 Ergebnisse des genomweiten CRISPR-Screens

3.2.4.1 Allgemeine Auswertung und Überblick

Aus der Hochdurchsatzsequenzierung am *Illumina*® *HiSeq 2500* gingen normalisierte Lesezahlen der einzelnen sgRNA-Sequenzen hervor. Sämtliche verwendete *stagger* konnten gleichverteilt sowie alle Proben mit einer mindestens 500fachen Sequenzierungstiefe gelesen werden, was zunächst die technische Validität und Qualität der Sequenzierung selbst unterstreicht (Abb. 3.11 A). In der Analyse zeigte der direkte Vergleich der Zusammensetzung des sgRNA-Pools zum Endzeitpunkt (Tag 21) mit der zum Ausgangszeitpunkt (Tag 1) eine deutliche Abnahme der Vielfalt der jeweils repräsentierten sgRNAs (Abb. 3.11 B). Zur weiteren Auswertung auf Einzelgenebene wurde zunächst für jede sgRNA jeder Probe der Quotient ihrer Lesezahl am Endpunkt zu der Lesezahl am Startpunkt gebildet. SgRNAs mit einem Quotienten <1 nahmen über den Beobachtungszeitraum ab, sodass angenommen werden kann, dass sie ein proliferationsrelevantes Gen ausgeschaltet haben. SgRNAs hingegen mit einem Quotienten >1 nahmen über den Beobachtungszeitraum zu, sodass analog geschlossen werden kann, dass sie ein proliferationshemmendes Gen ausgeschaltet haben. Um zufällige Effekte und Schwankungen in der sgRNA-Repräsentation zu minimieren, wurde in der folgenden Analyse auf solche Gene fokussiert, bei denen mindestens 2 sgRNAs unabhängig voneinander so depletiert waren, dass sie jeweils einen Quotienten von $\leq 0,6$ aufwiesen. Auf diese Weise ließen sich zahlreiche bekannte *house keeping* Gene (d.h. Gene, die generell eine wichtige Überlebensfunktion besitzen) sowie bekannte entitätsübergreifende Onkogene, wie bspw. MYC, identifizieren, die so als Positivkontrolle dienten und die Validität des Screens sowie der Analysemethode bestätigten. Als Negativkontrollen dienten nicht in lymphatischen Zellen exprimierte bzw. nicht für deren Proliferation relevante Kontrollgene wie Albumin (ALB), Apolipoprotein B (APOB) oder die Geruchsrezeptoren (*olfactory receptors*, OR). Es konnte gezeigt werden, dass diese über die Zeit keiner Depletion oder Mehranreicherung unterlagen und keine Unterschiede zwischen den Hodgkin-Zelllinien und Kontrollen aufwiesen.

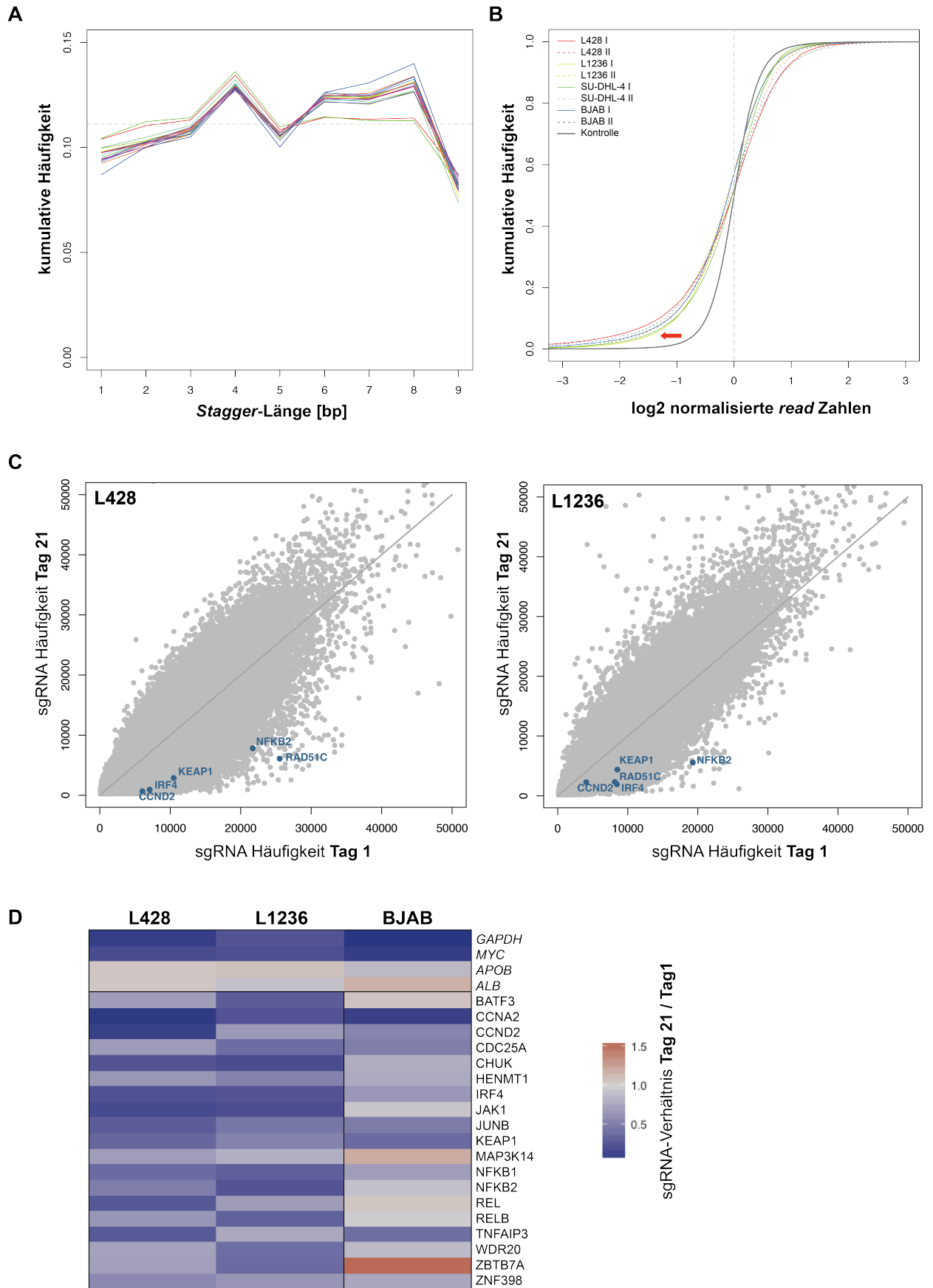


Abb. 3.11 (Erläuterung siehe folgende Seite)

Erläuterung zu Abb. 3.11 Genomweiter CRISPR-Screen. **A** Verteilung der *stagger* (1-9bp Länge): eine gleichmäßige Verteilung der *stagger*-Längen zeigt eine repräsentative Verteilung der Proben untereinander. **B** Dargestellt ist die Verschiebung der log₂-normalisierten sgRNA-*read* Zahlen (entspricht der sgRNA-Häufigkeit) von Tag 1 zu Tag 21 im Vergleich zum errechneten Hintergrund (*noise*; grau). Es zeigt sich eine Reduktion des sgRNA-Pools über den Beobachtungszeitraum für alle Zelllinien. **C** Streudiagramm der sgRNA-Häufigkeit an Tag 1 vs. Tag 21. Exemplarische Hervorhebung einzelner depletierter Kandidatengene in den Hodgkin-Zelllinien L428 (links) und L1236 (rechts). **D** Heatmap der sgRNA-Depletion der ermittelten Kandidatengene sowie von zwei Positiv- (MYC und GAPDH) sowie Negativkontrollen (APOB und ALB) in den Hodgkin-Zelllinien L428 und L1236 im Vergleich zur Kontrollzelllinie BJAB.

3.2.4.2 Bestätigung zahlreicher bekannter Schlüsselfaktoren des cHL

Um für das Hodgkin-Lymphom spezifische Kandidatengene zu identifizieren, wurden im Folgenden alle sgRNAs errechnet, die selektiv in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu den B-NHL-Zelllinien über die Zeit depletiert wurden. Hierfür wurde zunächst der Quotient aus der Verschiebung der sgRNA-Repräsentation von Tag 21 im Vergleich zu Tag 1 in den beiden Hodgkin-Zelllinien errechnet. Als relevant depletiert wurden solche Gene gewertet, bei denen jeweils mindestens zwei (aus sechs) sgRNAs einen Quotienten von $\leq 0,6$ aufwiesen. Als Hodgkin-spezifische Kandidatengene wurden anschließend aus diesen solche Gene klassifiziert, für die wiederum mindestens zwei sgRNAs nicht nur die Kriterien der allgemeinen Depletion erfüllten (s.o.), sondern auch der Quotient der jeweiligen cHL-Zelllinie zu dem Mittel der beiden B-NHL-Kontrollen mindestens $\leq 0,6$ für L428 resp. $\leq 0,75$ für L1236 betrug. Unter Anwendung dieser Kriterien ergaben sich so 267 potentielle Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms, davon 158 für L428, 137 für L1236 und 28 gemeinsame in L428 und L1236. Unter diesen fanden sich zahlreiche gut beschriebene Schlüsselfaktoren für das Hodgkin-Lymphom wieder, was ebenfalls als valide interne Kontrolle des Screens und seiner Analyse diente. So wurde der NF- κ B-Signalweg auf mehreren Ebenen mit den errechneten Kandidatengenen IKK α , NFKB2 und RELB zuverlässig identifiziert. Mit JAK1 und STAT5B wurde darüber hinaus auch der JAK-STAT-Signalweg getroffen. Ebenfalls identifiziert werden konnten mehrere im cHL treibende Transkriptionsfaktoren der AP-1- und ATF-Familie (JUNB, BATF3) sowie IRF4. (Abb. 3.12)

Bei der Betrachtung angereicherter sgRNAs, also potentiellen Tumorsuppressoren, fiel eine deutlich geringere Zahl potentieller Kandidatengene auf: Bei einem *cut-off* von 2

für den Quotienten von Tag 21 zu Tag 1 und mindestens 2 sgRNAs, die dieses Kriterium erfüllen, waren sgRNAs für 94 Gene in den Hodgkin-Zelllinien angereichert. Bei der weiteren Auswahl spezifisch angereicherter sgRNAs (Quotient von cHL- zu B-NHL-Proben >1,5) sank diese Zahl weiter auf 31. Darunter fand sich kein bekannter Tumorsuppressor, wie z.B. TP53, der als Positivkontrolle dienen konnte. (siehe Anhang)

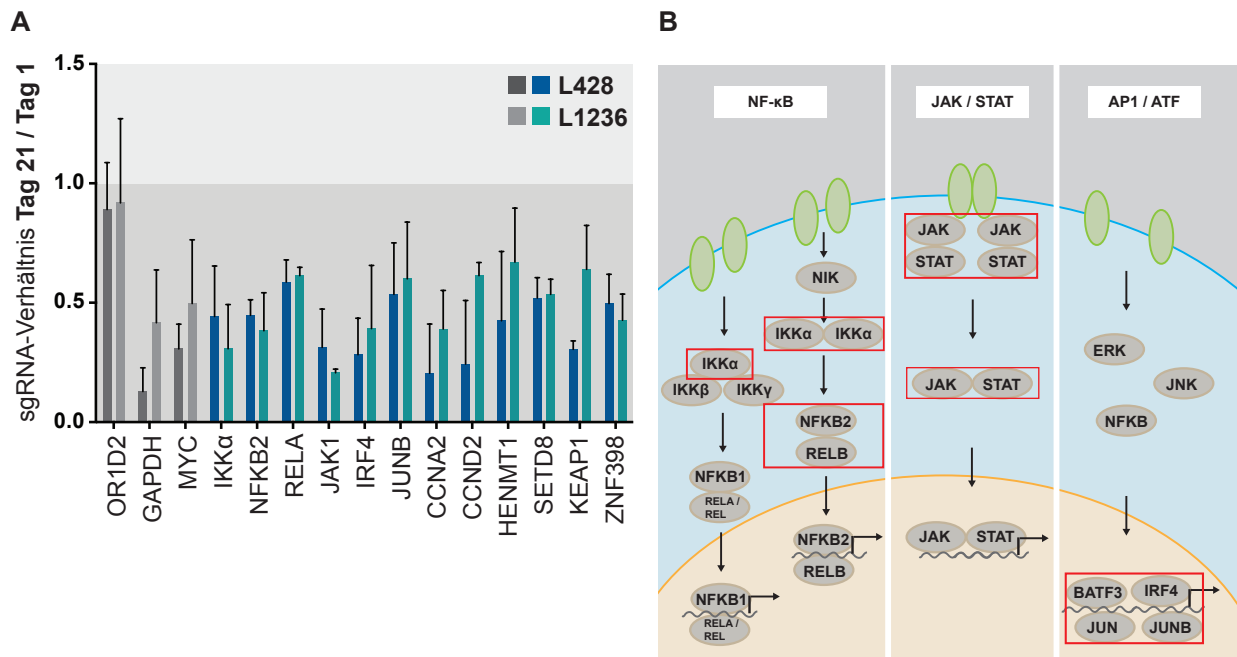


Abb. 3.12 Ergebnisse des genomweiten CRISPR-Screens. **A** sgRNA-Verhältnis von Tag 21 zu Tag 1. Grau: OR1D2 (Negativ-Kontrolle) sowie GAPDH und MYC (Positiv-Kontrollen). Blau resp. türkis: bekannte und neue Kandidatengene (L428, blau; L1236, türkis). Positiv-Kontrollen sowie Kandidaten sind deutlich depletiert; hingegen keine Veränderung der Negativ-Kontrolle (OR1D2). **B** Übersicht über relevante Signalwege im cHL; Hits im genomweiten CRISPR-Screen sind rot umrandet hervorgehoben.

3.2.4.3 Identifizierung neuer potentieller Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

Neben bereits beschriebenen Genen konnten durch den genomweiten CRISPR-Screen auch zahlreiche bisher für die Pathogenese des cHL unerforschte potentielle Kandidatengene aufgedeckt werden. Viele dieser Gene lassen sich dabei wichtigen Schlüssel­doma­inen der Zellbiologie zuordnen. So finden sich unter den errechneten Kandidatengen­en neben dem bereits als hoch­ex­primiert im Hodgkin-Lymphom beschriebenen Cyclin D2 (CCND2) mehrere weitere Zellzyklusregulatoren wie bspw. Cyclin A2 (CCNA2), CDCA2, CDCA5 und CDC25A. Einen weiteren wichtigen Aspekt

der Biologie maligner Zellen nimmt die Reparatur von und Antwort auf DNA-Schäden ein. Auch in diesem Feld ließen sich mit den Genen XRCC6, RAD51C und den Hitzeschockproteinen HSPA9 und HSPE1 einige vielversprechende Kandidaten aufzeigen. Mit den Methyltransferasen HENMT1, SETD8 und METTL2B sowie dem Histonprotein HIST2H2AB ließen sich darüber hinaus auch interessante neue Faktoren im Bereich der epigenetischen Modifikation identifizieren. Schließlich konnten mit BTF3L4, MLX, ZBTB7A und ZNF398 für die Pathogenese des cHL auch neue potentiell relevante Transkriptionsfaktoren ermittelt werden. Darüber hinaus ergaben sich weitere potentielle Kandidatengene, die zunächst keiner übergeordneten Gruppe zugeteilt werden konnten. Eine Zusammenstellung aller aus dem genomweiten CRISPR-Screen hervorgegangenen Kandidatengene sowie der hieraus für die weiteren Analysen ausgewählten Kandidaten ist dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen.

3.2.4.4 Expression der ermittelten Kandidatengene in Hodgkin-Zelllinien

Für den ersten Schritt der Validierung dieser aus dem genomweiten CRISPR-Screen hervorgegangenen Kandidatengene, wurden diese anhand eigener bereits angefertigter Genexpressionsdaten auf ihre Expression im cHL überprüft. Dabei konnte für alle Kandidatengene eine relevante Expression nachgewiesen werden. Die beiden Negativkontrollen APOB und OR1D2 werden wie erwartet nicht exprimiert. (Abb. 3.13)

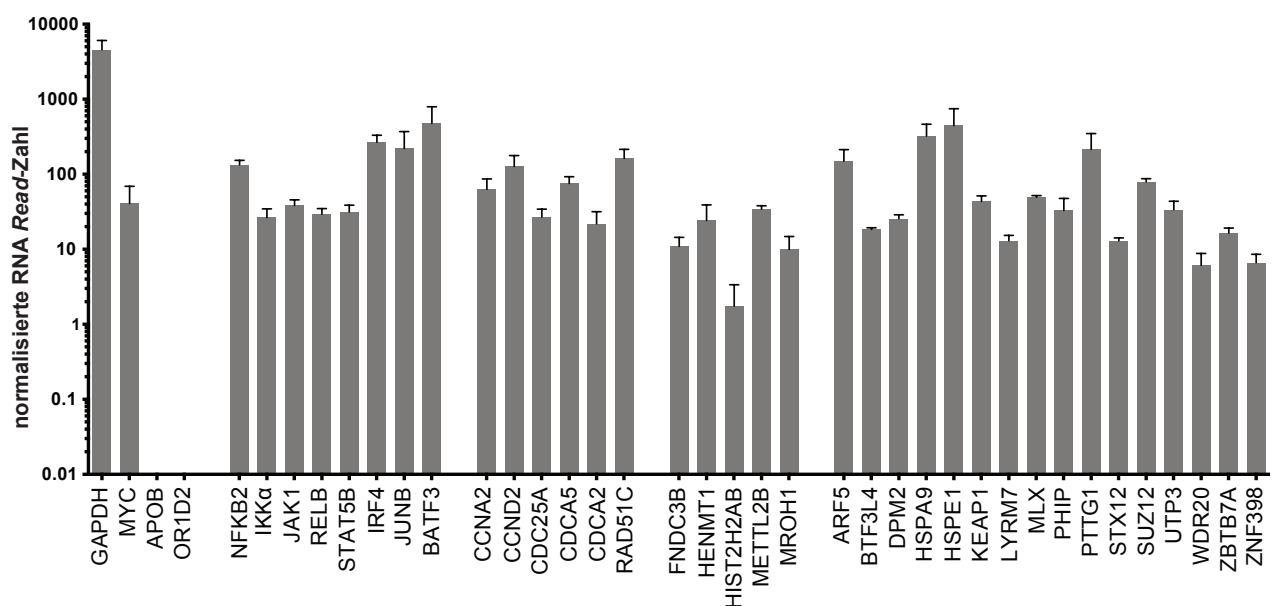


Abb. 3.13 Expression von relevanten Kontroll- und Kandidatengenen in cHL-Zelllinien: Mittelwert normalisierter RNA *Read*-Zahlen der Zelllinien L428 (Triplikate), L1236 (Duplikate) und UHO-1 (Triplikate) (eigene RNA-seq Daten eines anderen Projektes, 2018).

3.2.5 CRISPR/Cas9-Re-Screen zur Validierung potentieller Kandidatengene in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien

Um die aus dem genomweiten CRISPR/Cas9-Screen hervorgegangenen Kandidatengene zu validieren erfolgte ein weiterführender CRISPR/Cas9-Re-Screen. Hierfür wurde eigenständig eine unabhängige Re-Screen-Bibliothek von etwa 1200 sgRNAs entworfen und kloniert, die neben Positiv- und Negativ-Kontrollen insgesamt 141 potentielle Kandidatengene, 21 zusätzliche Gene sowie 9 weitere (im GeCKO-Screen nicht als Kandidaten identifizierte) NF- κ B Gene umfasst und auf demselben *lentiCRISPRv2*-Grundplasmid beruht. Für jedes Gen wurden dabei je drei neue, von solchen aus dem genomweiten CRISPR/Cas9-Screen unabhängige, sgRNAs entworfen (Design der sgRNAs mit Hilfe der Software CrispRGold (Chu et al., 2016)). Eine vollständige Liste aller von dieser Re-Screen-Bibliothek erfassten Gene findet sich im Anhang.

Analog zum vorangegangenen genomweiten CRISPR-Screen wurden die Zelllinien L428 und L1236 für das cHL sowie die Kontrollzelllinien BJAB und SU-DHL-4 mit aus dem *library*-Plasmid-Pool gewonnenem Virusüberstand transduziert. Unter Puromycin wurden positiv transduzierte Zellen selektioniert. Zellpellets für die Ausgangs- und Endverteilung der sgRNAs wurden an Tag 1, 14, 21 sowie 28 nach Transduktion entnommen. Wieder erfolgte die Aufreinigung von genomischer DNA, aus der auf die oben beschriebene Weise die sgRNA-Sequenz ausgelesen und das entstandene PCR-Produkt für die Hochdurchsatzsequenzierung auf dem *Illumina*® *HiSeq 2500* präpariert wurde. Die bioinformatische Auswertung erfolgte ebenfalls analog zum genomweiten CRISPR/Cas9-Screen mit je mindestens zwei sgRNAs pro Gen mit einem Quotienten des End- zum Ausgangszeitpunkt von $\leq 0,6$ für L428 bzw. $\leq 0,7$ für L1236 sowie anschließend von cHL zu Kontrolle für L428 von $\leq 0,6$ bzw. für L1236 von $\leq 0,75$. Die erfolgreiche Durchführung dieses Bestätigungsscreens konnte dabei durch unveränderte Negativkontrollen und *non-targeting* sgRNAs sowie deutlich depletierte Positivkontrollen verifiziert werden. Insgesamt konnten so in diesem unabhängigen Re-Screen für L428 40 und für L1236 15 der potentiellen Kandidaten aus dem genomweiten Screen bestätigt werden. Sieben dieser Kandidatengene ließen sich in beiden Hodgkin-Zelllinien bestätigen. Eine exemplarische Auswahl der im Re-Screen bestätigten Kandidatengene ist in Abb. 3.15 C und D dargestellt. Eine vollständige Liste über alle in diesem CRISPR-Re-Screen validierten Kandidatengene ist Tabelle 3.1 sowie dem Anhang zu entnehmen.

Die bioinformatische Auswertung des Re-Screens in technischer Hinsicht zeigte eine fortgesetzte Veränderung des sgRNA-Pools über die Zeit. Dabei fiel eine ähnliche Entwicklung der sgRNA-Pools für L428, BJAB und SU-DHL-4, jedoch eine deutlich langsamere Veränderung in L1236 Zellen auf, deren sgRNA-Pool-Zusammensetzung an Tag 28 etwa dem der anderen Zelllinien an Tag 14 entspricht (Abb. 3.14). Zudem konnte, wie bereits beim genomweiten Screen, eine gleichmäßige Verteilung der *stagger*-Sequenzen sowie insgesamt eine Abnahme der Vielfalt des sgRNA-Pools beobachtet werden (Abb. 3.15 A,B).

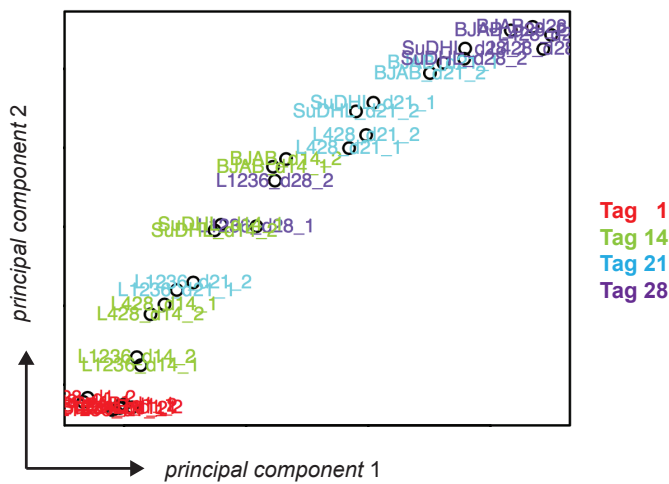


Abb. 3.14 *principal component* Analyse: Veränderung der sgRNA-Pool-Zusammensetzung über die Zeit (Tag 1 bis Tag 28).

Erläuterung zu Abb. 3.15 Ergebnisse des CRISPR-Re-Screens. **A** Verteilung der *stagger* (1-9bp Länge): eine gleichmäßige Verteilung der *stagger*-Längen zeigt eine repräsentative Verteilung der Proben untereinander. **B** Dargestellt ist die Verschiebung der log₂-normalisierten sgRNA-read Zahlen (entspricht der sgRNA-Häufigkeit) von Tag 1 zu Tag 28 im Vergleich zur Hintergrund-Kontrolle (*noise*; grau). Es zeigt sich eine Reduktion des sgRNA-Pools über den Beobachtungszeitraum für alle Zelllinien (roter Pfeil). **C** Streudiagramm der sgRNA-Häufigkeit an Tag 1 vs. Tag 28. Exemplarische Darstellung depletierter Kandidatengene in den cHL Zelllinien L428 (links) und L1236 (rechts). **D** Heatmap der sgRNA-Depletion der ermittelten Kandidatengene sowie von zwei Positiv- (MYC und GAPDH) sowie Negativkontrollen (APOB und ALB) in den Hodgkin-Zelllinien L428 und L1236 im Vergleich zur B-NHL-Kontrollzelllinie BJAB.

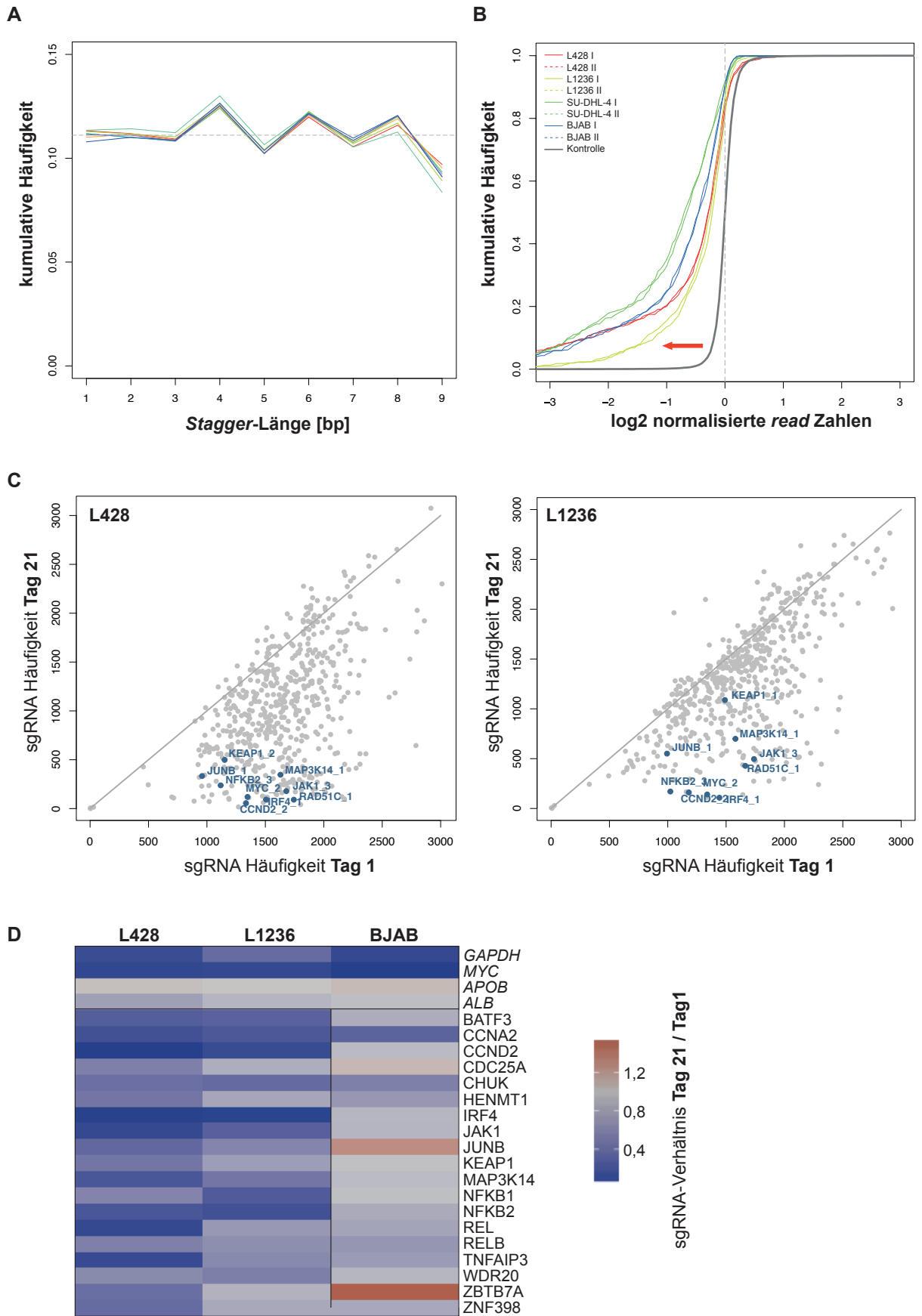


Abb. 3.15 (Erläuterung siehe vorherige Seite)

L428			L1236	
bekannte Gene	neue Kandidatengene		bekannte Gene	neue Kandidatengene
BATF3	AOC2	MLX	BATF3	DPM2
CCNA2	BTF3L4	NHP2L1	CCNA2	EIF1AX
CCND2	CDCA5	NMNAT1	CCND2	FNDC3B
CHUK	COPRS	NRD1	CHUK	IRAK1
IRF4	DNM1	PAQR6	IRF4	LYRM7
JAK1	EEF2	PHIP	JAK1	STX12
JUNB	EIF1	POLR2E	NFKB2	WDR20
MAP3K14	EIF1AX	PPP1R37	RELB	
NFKBIB	HENMT1	PSMA7		
REL	HSPA9	PTTG1		
	HSPE1	RAD51C		
	INCENP	SLC7A1		
	KEAP1	TNFAIP3		
	METTL2B	TUBB		
	MIR6878	ZNF398		

Tab. 3.1 Im Re-Screen bestätigte bekannte sowie neue Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms in den beiden Zelllinien L428 und L1236. Fette Kandidatengene sind beiden Zelllinien gemeinsam.

3.2.5.1 Bestätigung zahlreicher bekannter Schlüsselfaktoren des cHL

Auch im Re-Screen fanden sich die wichtigsten der bereits bekannten Faktoren für die Pathogenese des cHL wieder. Die im genomweiten Screen errechneten Kandidatengene des NF- κ B-Signalwegs IKK α und NFKB2 konnten zuverlässig bestätigt werden. Des Weiteren zeigten sich auch die im genomweiten CRISPR-Screen nicht signifikant depletierten NF- κ B-Komponenten NIK und REL nun im Re-Screen als zuverlässige Kandidatengene. NFKB1 hingegen wies auch in diesem zweiten CRISPR-Screen keine relevante Depletion auf. Während STAT5B im Bestätigungsscreen keine Signifikanz mehr erreichen konnte, konnte JAK1 deutlich als Kandidatengene validiert werden. Auch die im cHL bekannten und im genomweiten Screen identifizierten Transkriptionsfaktoren der AP-1- und ATF-Familie (JUNB, BATF3) sowie IRF4 konnten eindrucksvoll verifiziert werden. Mit einem durchschnittlichen Quotienten von 0,15 (L428) bzw. 0,62 (L1236) im Vergleich über die Zeit (Tag 28 zu Tag 1) sowie im Vergleich zu den B-NHL-Kontrollen von 0,12 (L428) bzw. 0,32 (L1236) erwies sich IRF4 als das am stärksten proliferationsrelevante hodgkinspezifische Zielgen des CRISPR/Cas9-Re-Screens. Für die stärkste IRF4-sgRNA betrug der Quotient über die Zeit dabei nur 0,05 (L428) bzw. 0,08 (L1236) und der Quotient zu den B-NHL-Kontrollen wiederum ebenfalls nur 0,05 (L428) bzw. 0,08 (L1236). (Abb. 3.15 C, D sowie Anhang)

3.2.5.2 Bestätigung neuer potentieller Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

Über die Bestätigung bereits beschriebener Faktoren hinaus konnten im genomweiten CRISPR/Cas9-Screen zahlreiche neue potentielle Kandidatengene für die Pathogenese des cHL identifiziert werden. Mehrere dieser Gene konnten in einem zweiten Schritt auch in dem anschließend durchgeführten CRISPR/Cas9-Re-Screen gefunden und damit bestätigt werden. Unter den so validierten neuen Kandidatengenomen befinden sich die Zellzyklusregulatoren Cyclin D2 (CCND2), Cyclin A2 (CCNA2), CDCA5 und CDC25A. Auch die in die DNA-Reparatur involvierten Kandidatengene ließen sich teilweise im Bestätigungs-Screen validieren. So konnte in diesem ein cHL-spezifischer Effekt von RAD51C gesehen werden. Die beiden Hitzeschockproteine HSPA9 und HSPE1 präsentierten sich in allen vier Lymphom-Zelllinien mit einem Einfluss auf die Proliferation, der in der cHL-Zelllinie L428 auch deutlich stärker war als in den B-NHL-Kontrollzelllinien. Aus dem Bereich der epigenetischen Modifikation ließen sich die Methyltransferasen HENMT1 und METTL2B durch den Re-Screen validieren. Zuletzt konnten mit BTF3L4, MLX und ZNF398 auch mehrere interessante der im genomweiten CRISPR/Cas9-Screen ermittelten neuen Kandidaten aus der Gruppe der Transkriptionsfaktoren bestätigt werden. (Abb. 3.15 C,D; Tab. 3.1; Anhang)

3.2.6 Kompetitions-Assays ausgewählter Kandidatengene

Um die im genomweiten CRISPR/Cas9-Screen ermittelten und im unabhängigen Re-Screen bestätigten Kandidatengene weiterführend zu untersuchen und zu validieren, wurden für ausgewählte Kandidatengene Kompetitions-Assays durchgeführt. Hierfür wurden die beiden bereits in den Screens verwendeten Hodgkin-Zelllinien L428 und L1236 sowie eine dritte, neue cHL-Zelllinie, UHO-1, und die Kontrollzelllinie BJAB jeweils entweder mit einem Pool aus den drei im Re-Screen verwendeten sgRNAs oder einem Pool von sieben *non-targeting* (ntg) Kontroll-sgRNAs transduziert. Die *targeting* sgRNAs wurden zu diesem Zweck in den selbst erstellten, einen EGFP-Reporter tragenden *lentiCRISPRv2*-Vektor (*lentiCRISPRv2-EGFP*) kloniert, während die *non-targeting* sgRNAs in eine ebenfalls selbst erstellte, einen EBFP-Reporter tragende *lentiCRISPRv2*-Variante (*lentiCRISPRv2-EBFP*) gesetzt wurden. Die transduzierten Zelllinien wurden mittels FACS auf reporterpositive Zellen sortiert und aus diesen anschließend Mischpopulationen von EGFP-positiver *knockout*- zu EBFP-positiver

Kontrollpopulation mit einem Mischungsverhältnis von 2:1 erstellt. Dieses Vorgehen ermöglichte es, die Veränderungen im Verhältnis der beiden Populationen zueinander (EGFP⁺, *targeting* sgRNAs, d.h. *knockout*, vs. EBFP⁺, *non-targeting* sgRNAs, d.h. Kontrolle) direkt in einer gemeinsamen Kultur über einen Zeitraum von 30 Tagen durchflusszytometrisch hinsichtlich zu beobachten. Auf diese Weise zeigte sich für die Mehrzahl der untersuchten Kandidatengene für die Hodgkin-Zelllinien eine deutliche Abnahme bzw. Verschiebung des Verhältnisses hin zur Kontrollpopulation und damit also – vergleichbar zu den Ergebnissen aus den beiden CRISPR/Cas9-Screens – ein Proliferations-/Überlebensnachteil der jeweiligen *knockout*-Variante gegenüber kontrollbehandelten Zellen. (Abb. 3.16)

Die technische Überprüfung eines erfolgreichen CRISPR/Cas9-*knockouts* des jeweiligen Zielgenes erfolgte parallel hierzu auf Proteinebene im Western Blot, wenn entsprechende Antikörper verfügbar waren (IKK α , NFKB2, IRF4, JUNB, BATF3, CCNA2, KEAP1, HENMT1; Abb. 3.17).

Eine vollständige Übersicht über alle in den Kompetitions-Assays validierten Kandidatengene ist der unten stehenden Tabelle zu entnehmen. (Tab. 3.2)

Kandidatengen	Validiert in Hodgkin-Zelllinie		
	L428	L1236	UHO-1
BATF3	x	x	-
CCNA2	-	x	x
CCND2	-	x	x
CDC25A	-	x	x
HENMT1	-	-	x
IKK α	x	x	x
IRF4	x	x	x
JAK	x	x	x
JUNB	x	x	x
KEAP1	x	x	x
METTL2B	x	-	-
NFKB2	x	x	x
NIK	x	x	x
RAD51C	x	x	x
REL	x	x	x
WDR20	x	-	-
ZBTB7A	x	-	-
ZNF398	-	x	x

Tab. 3.2 Validierte Kandidatengene: aus den beiden sequentiellen CRISPR-Screens hervorgegangene potentielle Kandidatengene. Dargestellt ist die folgende Validierung in Kompetitions-Assays. Mit x markierte Kandidatengene konnten in der jeweiligen Zelllinie mit mindestens $p < 0,05$ bestätigt werden. Für mit - markierte Kandidatengene konnte kein signifikanter Effekt in der jeweiligen Zelllinie nachgewiesen werden.

Erläuterung zu Abb. 3.16 Kompetitions-Assays ausgewählter Kandidatengene. **A** Ablauf und Grundprinzip der Kompetitions-Assays: Erläuterungen siehe Haupttext. **B** Kompetitions-Assays der Kandidatengene HENMT1, JAK1, RAD51C, WDR20, ZBTB7A und ZNF398. Veränderung der sgRNA-Repräsentation (Verteilungsverhältnis) über die Zeit im Vergleich zum Ausgangsverhältnis in den jeweiligen *knockouts* in Relation zu den Kontrollen. Dargestellt sind die gemeinsamen Ergebnisse aus zwei Experimenten für JAK1 und RAD51C bzw. einfach durchgeführte Experimente für METTL2B, WDR20, ZBTB7A und ZNF398. Statistik: 1-Stichproben t-Test; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ n.s. - nicht signifikant.

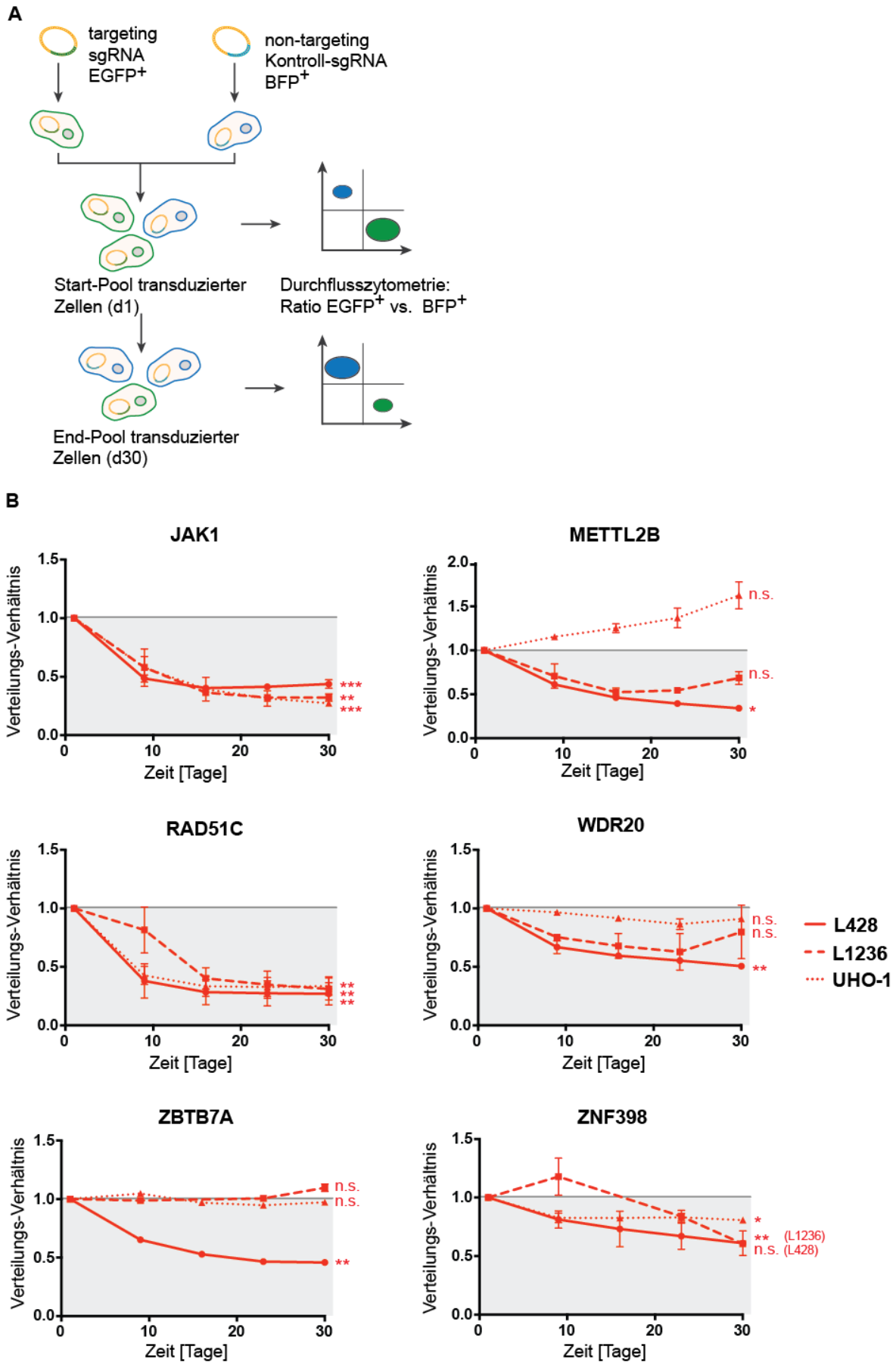


Abb. 3.16 (Erläuterung siehe vorherige Seite)

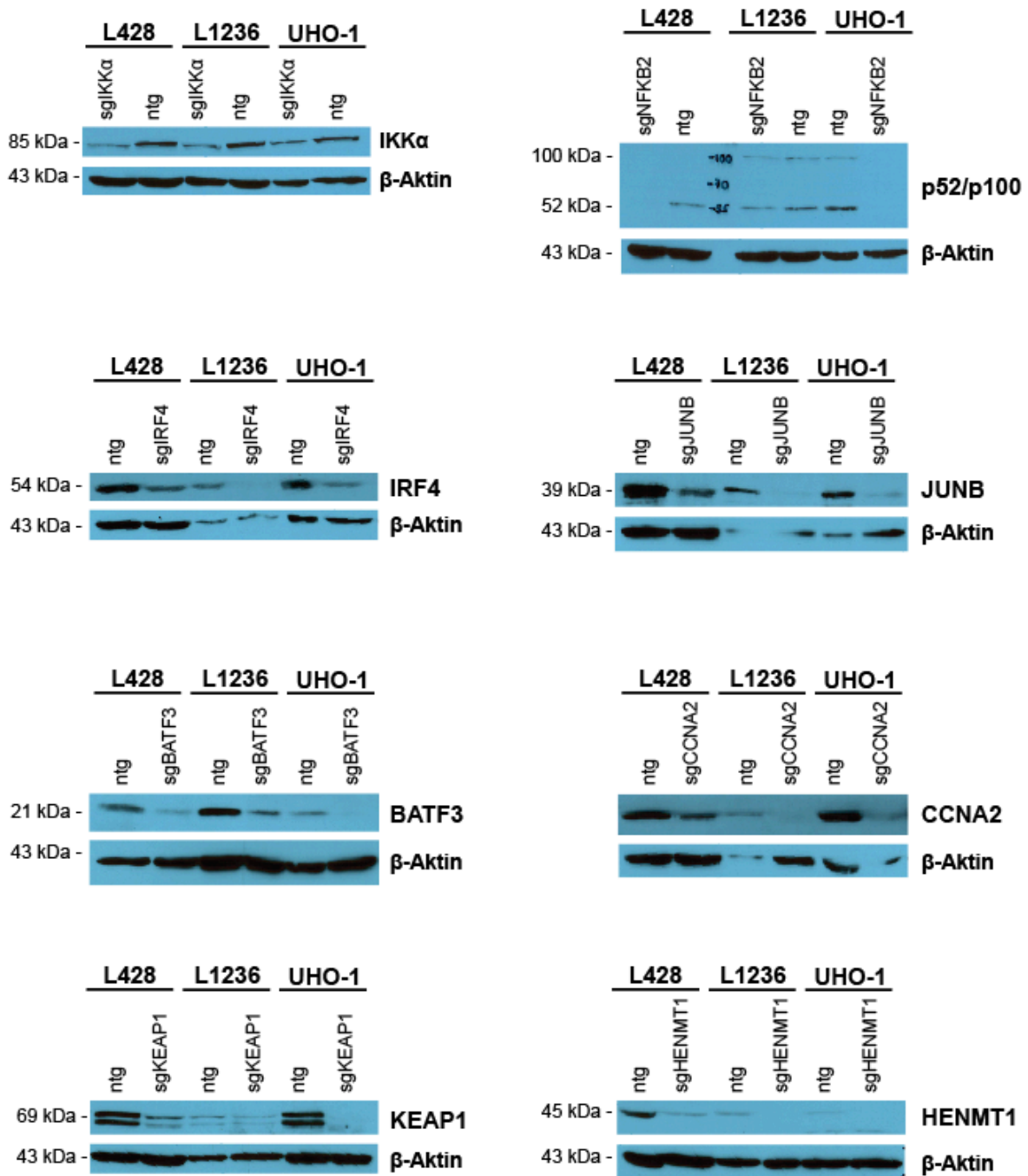


Abb. 3.17 Western Blots zur *knockout*-Kontrolle aller untersuchten Zielproteine, für die ein funktionaler Antikörper zur Verfügung stand. Getestet wurde jeweils dieselbe Kombination aus allen drei im Re-Screen eingesetzten sgRNAs wie sie auch für die Kompetitions-Assays verwendet wurde. Als Kontrolle diente ebenfalls die Transduktion mit einem Pool aus *non-targeting* sgRNAs (ntg). Tag 9 bis 12 nach Transduktion. β-Aktin als Ladungskontrolle.

3.2.7 Die Transkriptionsfaktoren IRF4, JUNB und BATF3 sind von zentraler Bedeutung für die Proliferation von cHL-Zellen

Der Transkriptionsfaktor IRF4 sowie die beiden zur weiteren AP-1-Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren JUNB und BATF3 konnten im genomweiten CRISPR/Cas9-Screen als starke potentielle Kandidatengene identifiziert und im anschließenden Re-Screen bestätigt werden. In den nachfolgend durchgeführten Kompetitions-Assays wurde der besonders starke nachteilige Effekt eines Verlustes dieser Faktoren auf die Proliferation von cHL Tumorzellen deutlich. Dabei präsentierte sich IRF4, das differentiell in Hodgkin-Zelllinien exprimiert ist (im Vergleich zu B-NHL-Zelllinien; Abb. 3.18 B), als das stärkste aller in Kompetitions-Assays untersuchten Kandidatengene mit einer Verschiebung des relativen Verhältnisses der IRF4-*knockout*- zur Kontroll-Population von 1 zum Ausgangszeitpunkt auf 0,09 (L428), 0,11 (L1236) bzw. 0,17 (UHO-1) zum Endzeitpunkt (30 Tage). In denselben Untersuchungen der beiden JUN bzw. ATF Transkriptionsfaktoren zeigte sich ein Abfall des Verhältnisses der jeweiligen *knockout*- zur Kontroll-Population auf 0,22 (L428), 0,21 (L1236) bzw. 0,33 (UHO-1) für JUNB bzw. 0,52 (L428), 0,62 (L1236) für BATF3. Kein Nachteil eines BATF3-Verlustes zeigte sich mit einem Quotienten von 1,01 zum Endzeitpunkt lediglich für UHO-1 (Abb. 3.18 A, C). Für IRF4, das sich auch in den Kompetitions-Assays mit einem sehr starken Effekt präsentierte, wurden darüber hinaus *Rescue*-Experimente durchgeführt. Hierfür erfolgte die doppelte Transduktion der Zielzelllinien mit entweder einer Kombination aus murinem Irf4 (EBFP-Reporter), in dem eine der humanen sgRNAs aufgrund von vier Basen-Fehlpaarungen (darunter eine direkt vor dem PAM und damit besonders relevant) nicht schneiden sollte, und dieser IRF4-sgRNA (EGFP-Reporter) oder einem Leervektor (EBFP-Reporter) und IRF4-sgRNA (EGFP-Reporter). Nun erfolgte ebenfalls die Durchführung von Kompetitions-Assays, indem wiederum Mischpopulationen aus jeweils diesen doppelt reporterpositiven Zellpopulationen und einer mit einer *non-targeting* sgRNA Kontrolle (mCherry-Reporter) transduzierten Zellpopulation erstellt und deren Verhältnis zueinander über die Zeit beobachtet wurde. Hier ergab sich zwar kein vollständiger *Rescue* durch das murine Irf4, jedoch noch ein deutlicher Proliferationsvorteil gegenüber der kompletten IRF4-*knockout*-Population, insbesondere in L1236 und UHO-1 (Abb. 3.18 C). Die Kontrolle der IRF4-Level im Western Blot zeigte eine zu diesen Ergebnissen passende Reduktion von IRF4 im *knockout* (in Kombination mit der Transduktion eines Leervektors) und eine wieder vermehrte IRF4-Expression in den *rescue*-Proben (*knockout* plus Transduktion mit murinem Irf4) (Abb. 3.18 D).

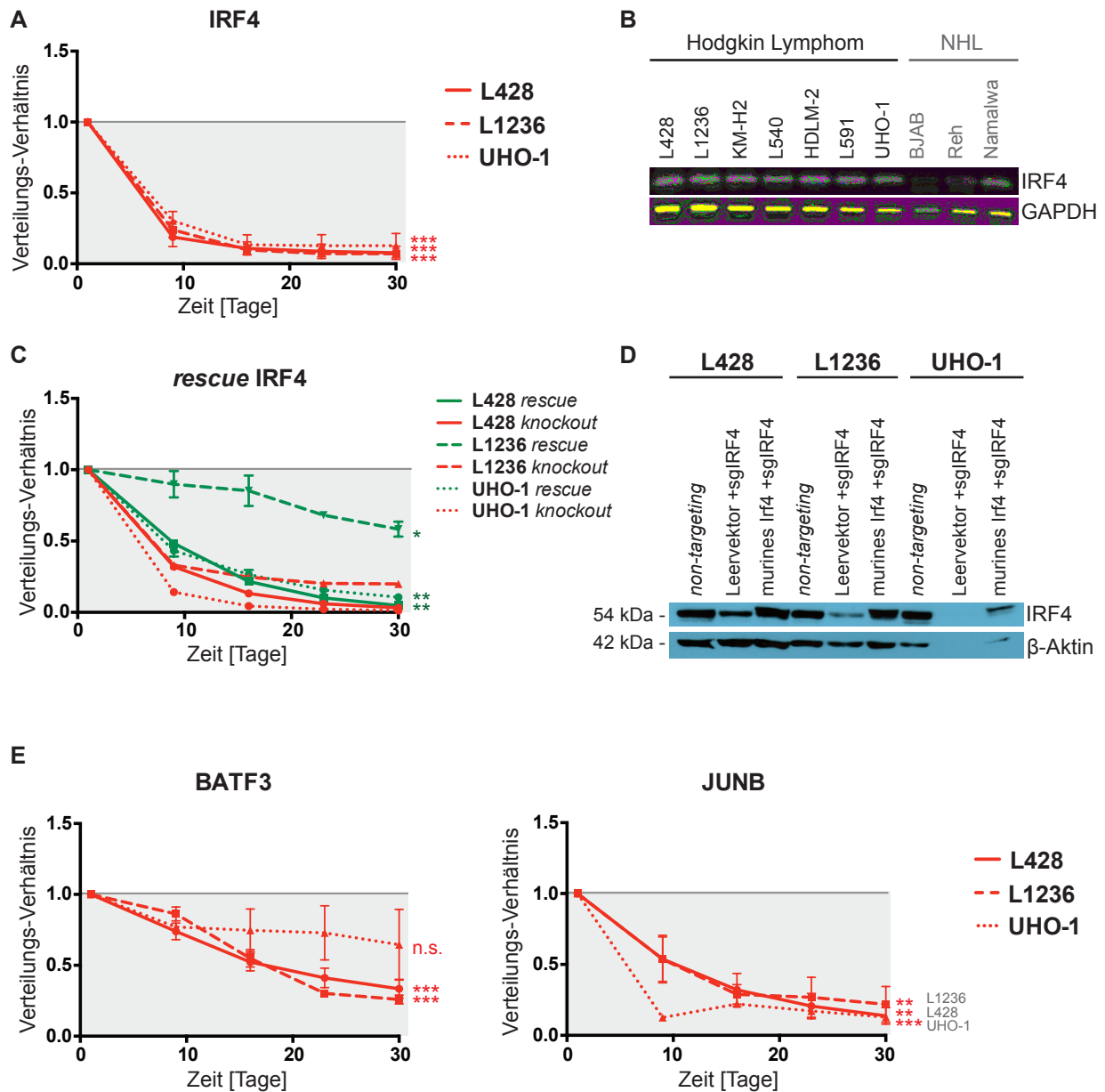


Abb. 3.18 Funktionelle Analyse der Kandidatengene IRF4, BATF3 und JUNB in Kompetitions-Assays. **A** Kompetitions-Assay für IRF4-*knockout* in cHL-Zelllinien. **B** RT-PCR: Expression von IRF4 in cHL- und B-NHL-Zelllinien; GAPDH als Kontrolle. **C** IRF4-*knockout* in Kombination mit einem Leervektor (*knockout*, rot) oder mit einem murines Irf4 exprimierenden Vektor (*rescue*, grün) in Hodgkin-Zelllinien **D** Western Blot zur Expressions- und *knockout*-Kontrolle des IRF4 *rescue*: *non-targeting* sgRNA als Kontrolle, sgIRF4 plus Leervektor (*lentiCRISPRv2-EBFP-emptyvector*) als *knockout* und sgIRF4 plus murines Irf4 (*lentiCRISPRv2-EBFP-Irf4*) als *rescue*. **E** Kompetitions-Assays für BATF3- und JUNB-*knockout* in cHL-Zelllinien. **A**, **C**, **E** Dargestellt ist das gemeinsame Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten für IRF4, BATF3 und JUNB, sowie ein repräsentatives Experiment von zwei für den *rescue* von IRF4. Statistik: 1-Stichproben t-Test; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ n.s. - nicht signifikant.

3.2.8 Der Zellzyklusregulator CCND2 ist relevant und spezifisch für die Proliferation von Hodgkin-Zellen

Der Zellzyklusregulator CCND2 bewies sich nach seiner Identifikation im genomweiten CRISPR/Cas9-Screen auch im anschließenden Bestätigungs-Screen als starkes Kandidatengen für die Proliferation von cHL-Zellen. So führte der Verlust von CCND2 in den drei untersuchten Hodgkin-Zelllinien im Kompetitions-Assay zu einem deutlichen Proliferationsnachteil. (Abb. 3.19 A)

Wie beschrieben sind zwar keine direkten Inhibitoren für Cyclin D2 verfügbar, für die Cyclin D2 abhängigen Kinasen CDK4/6 kann jedoch u.a. der Inhibitor Palbociclib eingesetzt werden (Fry et al., 2004; Leonard et al., 2012; Marzec et al., 2006; Toogood et al., 2005). Zur weiteren Evaluation der Bedeutung der CCND2-CDK4/6-Achse für das Hodgkin-Lymphom wurden daher mehrere Hodgkin-Zelllinien mit Palbociclib behandelt und dessen Effekte auf die Proliferation analysiert. Als Positiv-Kontrolle diente die Mantelzell-Lymphom Zelllinie Mino, die eine t(11;14) Translokation mit daraus resultierender Cyclin D1 Überexpression aufweist und daher als besonders empfindlich gegenüber einer Hemmung von CDK4/6 gilt (Lai et al., 2002; Marzec et al., 2006). Dabei bestätigte eine geringere ³H-Thymidin-Inkorporation in Proliferations-Analysen den signifikanten Wachstumsnachteil für cHL-Zellen bei Inhibition der CCND2-CDK4/6-Achse. (Abb. 3.19 B)

3.2.9 Die Zellzyklusregulatoren CCNA2 und CDC25A sind wichtig für das Wachstum von cHL-Zellen

Das Cyclin CCNA2 und die Zellzyklus-assoziierte Phosphatase CDC25A sind beide als valide Kandidatengene aus den sequentiellen CRISPR-Screens hervorgegangen. Auch in den anschließend durchgeführten Kompetitions-Assays konnte für CCNA2 in allen drei untersuchten Hodgkin-Zelllinien und für CDC25A in UHO-1 ein relevanter Effekt nachgewiesen werden. (Abb. 3.19 A)

CCNA2 und auch CDC25A regulieren jeweils gemeinsam mit der zyklinabhängigen Kinase CDK2 den Zellzyklusprogress. Daher wurde untersucht, ob nicht nur der *knockout* von CCNA2 bzw. CDC25A sondern auch die Behandlung mit dem CDK2-Inhibitor K03861 zu einem Proliferationsnachteil der cHL-Zellen führt (Alexander et al., 2015). Hierfür wurde ein Panel an Hodgkin-Zelllinien steigenden Konzentrationen von K03861 bzw. einer H₂O-Kontrolle ausgesetzt und anschließend deren Auswirkungen

auf die Proliferation untersucht (³H-Thymidin-Proliferations-Assay). Es ergab sich ein moderater negativer Effekt der CDK2-Inhibition auf die Proliferation für einige der Hodgkin-Zelllinien. (Abb. 3.19 C)

Erläuterung zu Abb. 3.19 Kandidatengene: Zellzyklus-Regulatoren. **A** Kompetitions-Assays des CCNA2-, CDC25A- und CCND2-*knockouts*: Veränderung der sgRNA-Repräsentation über die Zeit im Vergleich zum Ausgangsverhältnis in den jeweiligen *knockouts* in Relation zu den Kontrollen. **B, C** Funktionelle Untersuchungen mit den Inhibitoren Palbociclib (CDK4/6; CCND2) und K03861 (CDK2; CCNA2/CDC25A) in cHL-Zelllinien und der Mantelzell-Lymphom Zelllinie Mino als Kontrolle: ³H-Thymidin-basierte Proliferationsanalyse von Tag 5 auf Tag 6 unter Palbociclib (**B**) und K03861 (**C**). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von zwei. Statistik: 1-Stichproben (**A**) bzw. zweiseitiger (**B,C**) t-Test; * p <0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 n.s. - nicht signifikant.

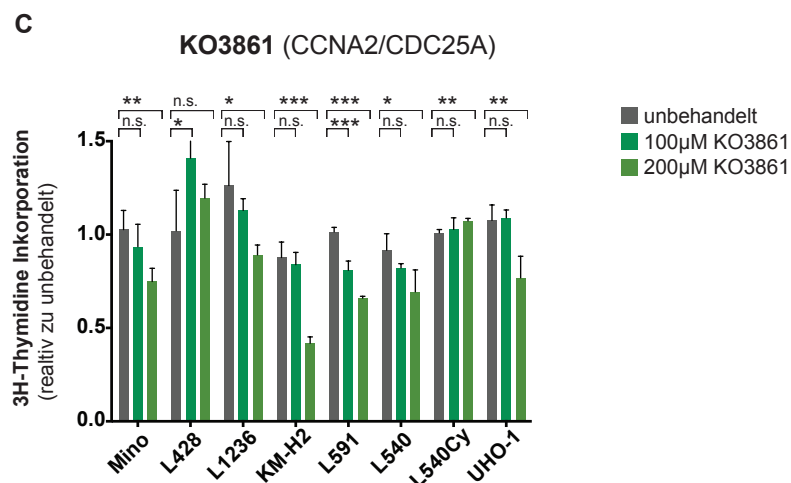
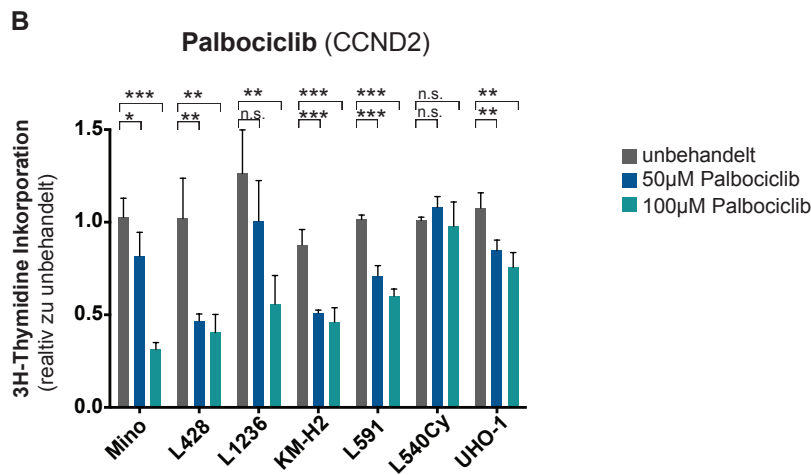
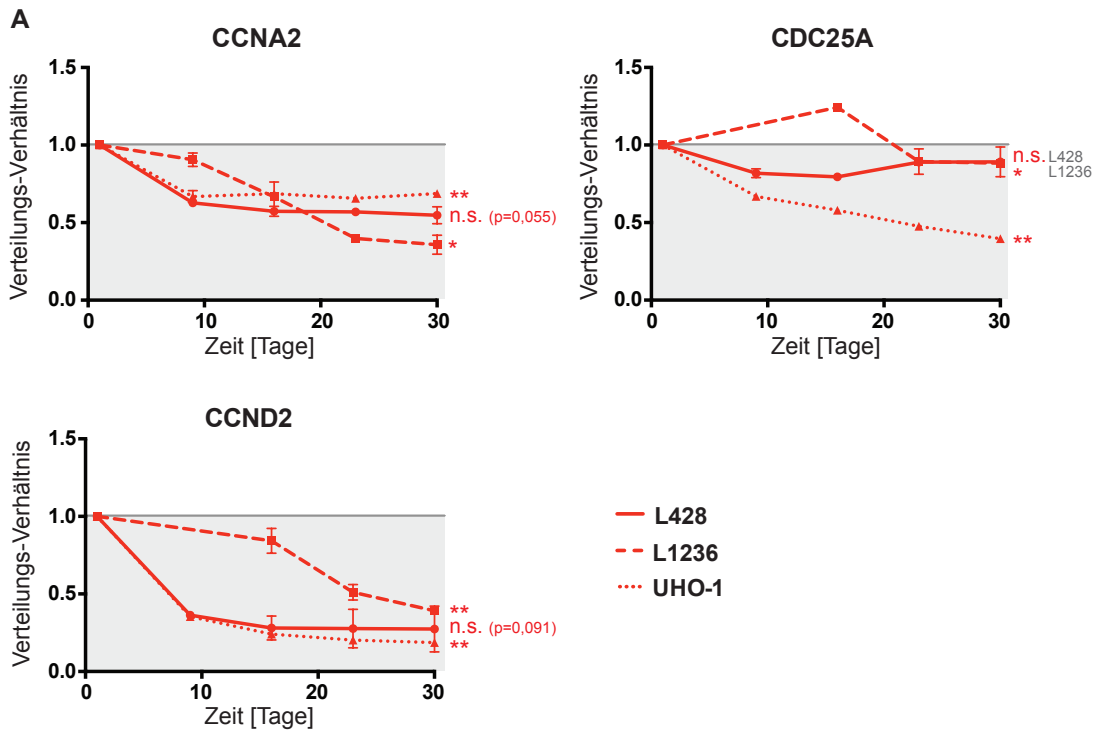


Abb. 3.19 (Erläuterung siehe vorherige Seite)

3.2.10 Insbesondere der alternative, nicht der klassische NF- κ B Signalweg wird in beiden CRISPR/Cas9-Screens als notwendig für das Überleben von cHL-Zellen identifiziert

Wie bereits beschrieben, spielt eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B Signalwegs eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms (Bargou et al., 1996; Emmerich et al., 1999; Hinz et al., 2001; Krappmann et al., 1999; Mathas et al., 2005).

Damit übereinstimmend konnten die Komponenten des NF- κ B Signalwegs IKK α und NFKB2 im genomweiten CRISPR-Screen identifiziert und im folgenden Re-Screen bestätigt werden. Im Hinblick auf die zentrale Bedeutung von NF- κ B in der Pathogenese des cHL waren in den Re-Screen zusätzlich NFKB1, REL, RELA und NIK eingeschlossen worden, um eine möglichst breite Abdeckung des Signalweges zu erreichen. Hiervon konnten in diesem zweiten CRISPR-Screen nun auch REL und NIK verifiziert werden. RELB, das im genomweiten CRISPR-Screen als Kandidatengen in L1236 erschienen war, konnte in diesem Re-Screen jedoch nicht bestätigt werden.

Mit NIK und NFKB2 sind hierbei zwei Faktoren getroffen, die im alternativen, nicht jedoch im klassischen NF- κ B Signalweg wirken. Darüber hinaus fällt das Fehlen der ausschließlich im klassischen NF- κ B Signalweg beteiligten Kinasen IKK β und IKK γ sowie NFKB1 auf. Damit ist der alternative NF- κ B Signalweg auf allen Ebenen getroffen worden, während der klassische NF- κ B Signalweg nur mit den von beiden Signalwegen geteilten Faktoren an den Kandidatengen beteiligt ist.

Alle der so identifizierten Kandidatengene des NF- κ B Signalwegs konnten in unabhängigen Kompetitions-Assays bestätigt werden. (Abb. 3.20)

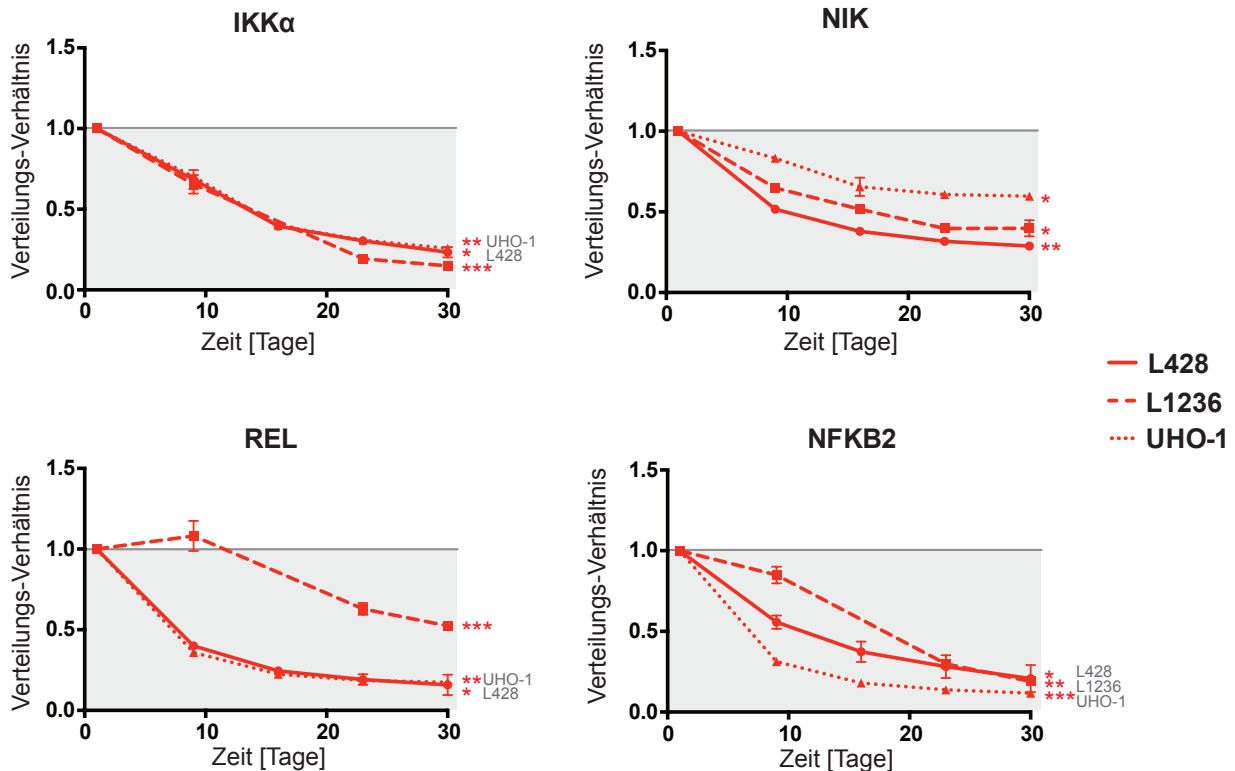


Abb. 3.20 Kandidatengene aus dem NF- κ B Signalweg: Kompetitions-Assays für IKK α , NIK, NFKB2 und REL: Veränderung der sgRNA-Repräsentation (Verteilungsverhältnis) über die Zeit im Vergleich zum Ausgangsverhältnis in den jeweiligen *knockouts* in Relation zu den Kontrollen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei. Statistik: 1-Stichproben t-Test; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

3.2.11 Die Methyltransferase HENMT1 ist ein neues Kandidatengen im cHL

Die *HEN Methyltransferase 1* (HENMT1) ist bisher weitgehend unerforscht und lediglich in der Spermatogenese beschrieben, wo sie transposable Elemente unterdrückt (Lim et al., 2015). Die beiden durchgeführten CRISPR-Screens sowie der anschließende Kompetitions-Assay konnten HENMT1 als neues Kandidatengen im cHL identifizieren und validieren. Dabei zeigte sich ein deutlicher Proliferationsnachteil des HENMT1-Verlustes in L428 und UHO-1 sowie eine leicht nachteilige Tendenz in L1236. (Abb. 3.21 A)

Die Expression von HENMT1 in Hodgkin- und B-NHL-Kontrollzelllinien sowie die Spezifität des HENMT1-*knockouts* wurden im Western Blot untersucht. Schon an Tag 4 war hier in L1236 und ab Tag 6 auch in L428 ein deutlicher *knockout* zu sehen. (Abb. 3.21 B,C)

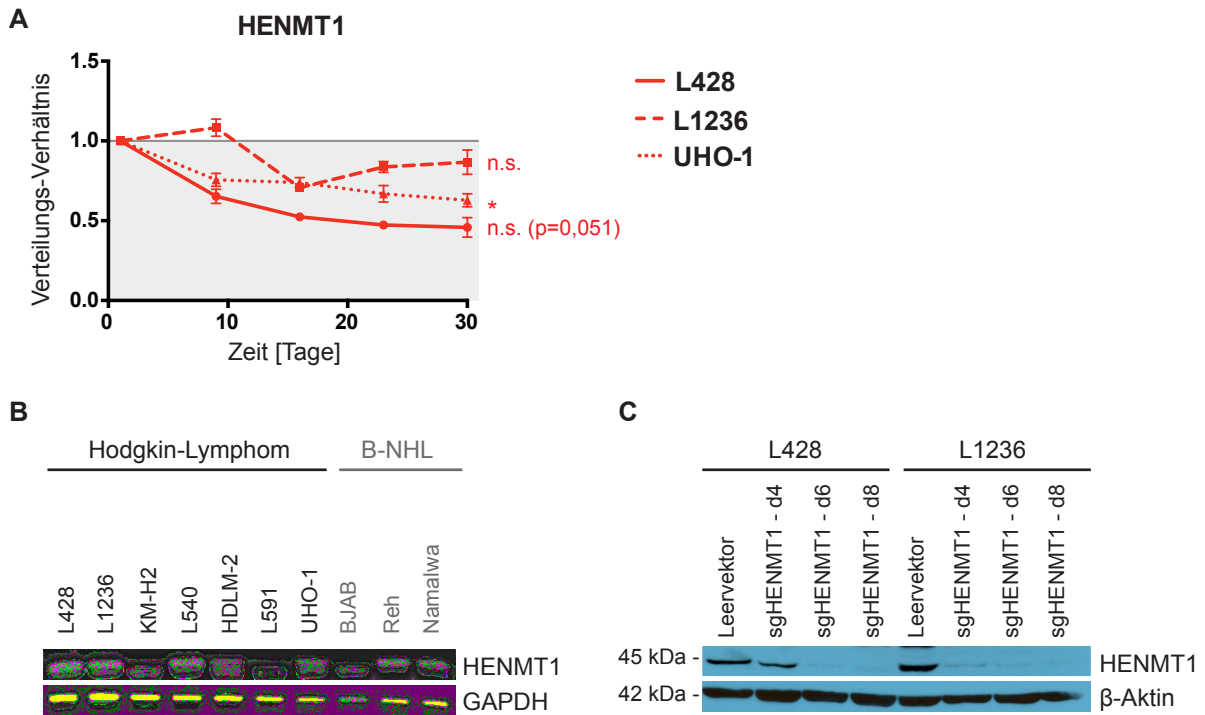


Abb. 3.21 Kandidatengen HENMT1. **A** Kompetitions-Assay: HENMT1-*knockout* in Relation zur *non-targeting* Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei. Statistik: 1-Stichproben t-Test; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ n.s. - nicht signifikant. **B** RT-PCR: RNA-Expression von HENMT1 in cHL- und B-NHL-Zelllinien; GAPDH als Kontrolle. **C** Western-Blot: *knockout* von HENMT1 an Tag 4, 6 und 8 nach lentiviraler Transduktion im Vergleich zu mit Leervektor transduzierten L428 und L1236 Zellen; β -Aktin als Ladungskontrolle.

3.2.12 KEAP1 ist ein potentes neues Onkogen im cHL

Das *Kelch-like ECH-assoziierte Protein 1* (KEAP1) ging als starker und molekularbiologisch interessanter Kandidat aus den beiden sequentiellen CRISPR/Cas9-Screens hervor. In den anschließend durchgeführten Kompetitions-Assays präsentierte sich KEAP1 mit einem signifikanten Proliferationsnachteil des KEAP1-*knockouts* in allen drei untersuchten cHL-Zelllinien. Dieser Effekt war deutlich ausgeprägt mit einer Reduktion der *knockout*-Population im Vergleich zur Kontrolle von 1,00 zum Ausgangszeitpunkt auf 0,44 in L428, 0,37 in L1236 und 0,38 in UHO-1 zum Endzeitpunkt (Tag 30), während sich in BJAB B-NHL-Zellen mit 1,17 kein nachteiliger Effekt des KEAP1-*knockouts* zeigte. Der beobachtete biologische Effekt bei einem *knockout* von KEAP1 in Hodgkin-Zelllinien bewegte sich damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die Auswirkungen eines Verlust der im cHL sehr gut charakterisierten Faktoren des NF- κ B und AP-1 Signalwegs. Auf RNA- und

Proteinebene zeigte sich eine gleichmäßige, stabile Expression von KEAP1 sowohl in den Hodgkin- als auch in den B-NHL-Kontrollzelllinien. (Abb. 3.22)

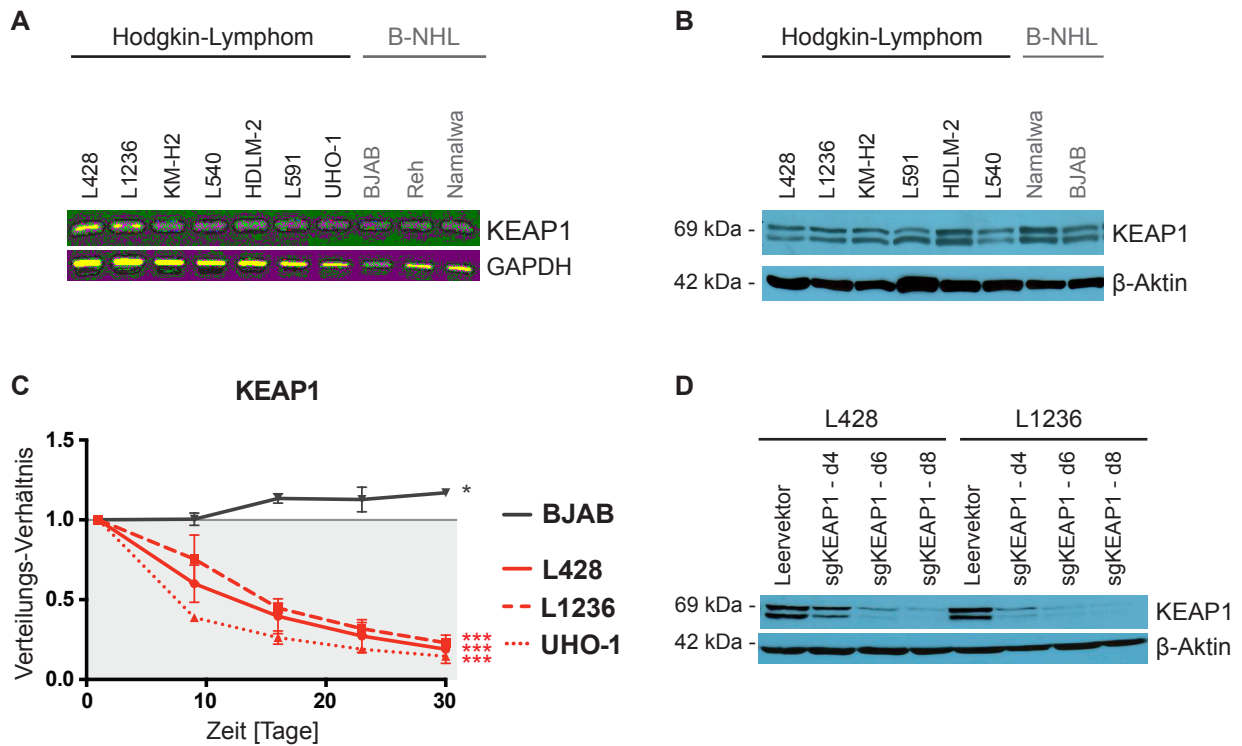


Abb. 3.22 Kandidatengen KEAP1. **A** RT-PCR: RNA-Expression von KEAP1 in Hodgkin- und B-NHL-Zelllinien; GAPDH als Kontrolle. **B** Western-Blot: Protein-Expression von KEAP1 in Hodgkin- und B-NHL-Zelllinien; β -Aktin als Ladungskontrolle. **C** Kompetitions-Assay: KEAP1-*knockout* in Relation zur *non-targeting* Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei. Statistik: 1-Stichproben t-Test; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. **D** Western-Blot: *knockout* von KEAP1 an Tag 4, 6 und 8 nach lentiviraler Transduktion im Vergleich zu mit Leenvektor transduzierten L428 und L1236 Zellen; β -Aktin als Ladungskontrolle.

3.3 Klonierung von BATF- und BATF3-Expressionsvektoren sowie -sgRNAs

Im Rahmen eines anderen Projektes unseres Labors, bei dem die Bedeutung der AP-1 Transkriptionsfaktoren BATF und BATF3 für Wachstum, Überleben und Differenzierung des anaplastisch großzelligen Lymphoms (ALCL) untersucht wurde, erfolgte die Erstellung der hierfür benötigten lentiviralen CRISPR/Cas9 *knockout*-Konstrukte sowie der Expressionsplasmide für BATF und BATF3. Diese Konstrukte wurden eingesetzt, um die Veränderung der Expression von BATF und BATF3 Zielgenen nach *knockout* von BATF und BATF3 sowie die Kompensation des siRNA basierten BATF resp. BATF3 *knockdowns* durch ektope Überexpression dieser zu untersuchen und sind als Teil der Arbeit Schleussner et al., 2018 publiziert worden (*Figure 4E* und *Supplementary Figure 3A*) (Schleussner et al., 2018). Die Sequenzen aller Oligonukleotide einschließlich der sgRNAs sind unter Material und Methoden in den Kapiteln 2.1.10.2 und 2.1.10.3 aufgelistet.

3.3.1 Klonierung von sgRNAs gegen BATF und BATF3

Jeweils drei sgRNAs wurden wie in Kapitel 2.2.4.10 (Material und Methoden) erläutert erstellt und in die oben beschriebenen lentiCRISPR-Vektoren *lentiCRISPRv2-EGFP*, *lentiCRISPRv2-BFP* und *lentiCRISPRv2-mcherry* kloniert.

3.3.2 Klonierung von BATF- und BATF3-Expressionsvektoren

Für die Generierung lentiviraler Expressionsvektoren für BATF und BATF3 wurden die cDNAs von im Labor vorhandener Plasmid-DNA durch PCR amplifiziert, wobei im Rahmen dieser Reaktion die für die Subklonierung notwendigen Restriktions-Schnittstellen eingebracht wurden. Anschließend wurde das entstandene Fragment über eine Agarose-Gel-Elektrophorese aufgereinigt und über *AgeI* und *XbaI* in die wie oben beschrieben generierten lentiviralen Leervektoren *lentiCRISPRv2-EGFP-emptyvector* und *lentiCRISPRv2-BFP-emptyvector* kloniert. (Abb. 3.23)

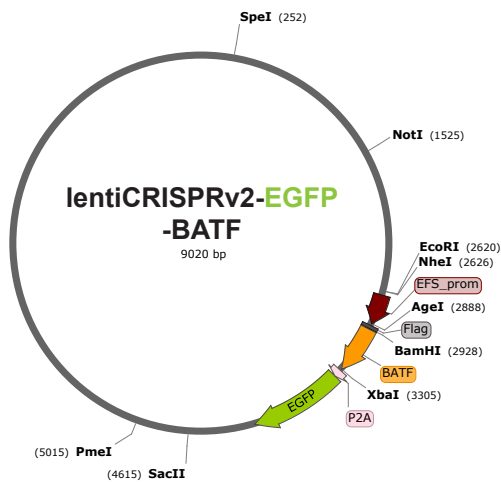
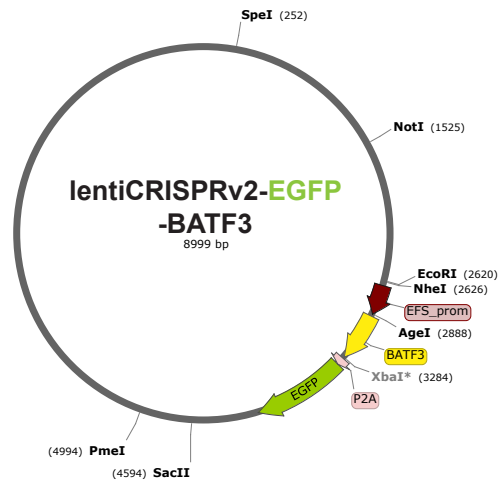
A**B**

Abb. 3.23 Schematische Darstellung der klonierten lentiviralen Expressionsvektoren **(A)** für BATF (*lentiCRISPRv2-EGFP-BATF*) und **(B)** für BATF3 (*lentiCRISPRv2-BATF3*). Hervorgehoben sind der EFS-Promoter, der die Expression von BATF- bzw. BATF3-cDNA treibt, gekoppelt über ein 2A-Peptid an die Expression eines Reportergens (hier EGFP, in einer zweiten Version für Doppeltransduktionen auch EBFP).

4. DISKUSSION

4.1 Etablierung, Technik und Analyse der CRISPR/Cas9-Screens

4.1.1 Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems: Generierung einer „*tool box*“ von Vektoren für den effizienten *knockout* und anschließende funktionelle Analysen

Die genomweite CRISPR/Cas9 GeCKOv2-Bibliothek beruht auf einem lentiviralen Grundgerüst, bei dem sgRNA und Cas9 über einen gemeinsamen ca. 14kb großen Vektor in die Zielzelle eingebracht werden (Shalem et al., 2014). Außerdem ist die Cas9 über ein sich selbst schneidendes Peptid (P2A) mit einem Puromycin-Resistenz-Gen verbunden. (Abb. 3.1)

Für ein CRISPR-Screening ist diese ursprüngliche Vektor-Variante sehr sinnvoll, da auf diese Weise über den gesamten Screening-Zeitraum mit Hilfe von Puromycin ein Selektionsdruck angelegt und aufrecht erhalten werden kann; und das bei Zellzahlen die über durchflusszytometrische Zellsortierung - wie sie bei einem Farbreporter notwendig würde - nicht erreicht werden können. Dieser Selektionsdruck ist dabei insbesondere relevant wegen der für die Validität des Screens notwendigen niedrigen MOI von 0,4 (das entspricht ca. 33% transduzierten Zellen vs. 67% nicht transduzierten Zellen). Ein Nachteil dieser eine Puromycin-Resistenz beinhaltenden Vektoren ist jedoch die fehlende Möglichkeit einer einfachen, direkten Kontrolle der Transduktion und Bestimmung ihrer Effizienz. Für diese sind wiederum Farbreporter ideal, weswegen die Erstellung von Varianten des ursprünglichen *lentiCRISPRv2*-Vektors mit verschiedenen fluoreszierenden Reportern erfolgte. Mit Hilfe des *lentiCRISPRv2-EGFP* konnte zunächst orientierend auf die mit der GeCKOv2-Bibliothek erzielte Transduktionseffizienz geschlossen werden, deren Feinbestimmung dann wie beschrieben anhand der Analyse des Verhältnisses der Zellzahlen unter und ohne Puromycin-Selektion durchgeführt wurde. Darüber hinaus ermöglichen die erstellten *lentiCRISPRv2*-Varianten mit drei verschiedenen fluoreszierenden Reportern die schnelle Anreicherung kleiner Zellzahlen mit Hilfe durchflusszytometrischer Zellsortierung. Sie erlauben außerdem die Analyse transduzierter Subgruppen und eröffnen durch die eingesetzten drei verschiedenen fluoreszierenden Proteine die Möglichkeit zur kontrollierten Kombination mehrerer Vektoren. Daher wurden diese

Varianten für sämtliche Untersuchungen einzelner (Kandidaten-)Gene eingesetzt. (Abb. 3.1)

Als mit dieser Arbeit begonnen wurde, war zunächst nur die ursprüngliche *lentiCRISPRv1*-Variante und die auf dieser beruhende GeCKOv1-Bibliothek verfügbar. Während der Etablierung der CRISPR/Cas9-Technologie für diese Arbeit wurde jedoch eine verbesserte zweite Variante (*lentiCRISPRv2* und GeCKOv2) veröffentlicht (Sanjana et al., 2014). Bei der vergleichenden Testung beider Vektoren fiel in den untersuchten Zelllinien eine deutlich höhere Effizienz des *lentiCRISPRv2*-Vektors auf, sodass alle folgenden Experimente mit diesem durchgeführt und für den genomweiten CRISPR-Screen die GeCKOv2-Bibliothek, die auf diesem neuen Grundgerüst basiert und zusätzlich noch einmal mehr sgRNAs enthält, eingesetzt wurde. (Abb. 3.2)

Um schließlich für die Arbeit mit einzelnen (Kandidaten-)Genen einen noch einfacheren und effektiveren *knockout* zu erzielen, wurde ein Zwei-Vektoren-System erstellt, mit dessen Hilfe zunächst über einen lentiviralen Cas9-Expressionsvektor diese stabil in Zielzelllinien eingebracht und dann anschließend mit einem zweiten Vektor die jeweils Zielgen-spezifische sgRNA transduziert werden kann (Abb. 3.1). Da die CRISPR/Cas9-Vektoren vor allem aufgrund der Länge der Cas9 (ca. 4kb) in vielen Zelllinien nur geringe Transduktionseffizienzen erreichen, wird hier mit zwei nun kleineren Vektoren dieses Problem abgemildert. Aus den durchgeführten Experimenten ging hervor, dass Zellen, in die die Cas9 bereits erfolgreich eingebracht wurde, mit einer Transduktionseffizienz von zu nahezu 100% im Anschluss auch den deutlich kleineren sgRNA-exprimierenden Vektor aufnehmen. Ist mit diesem System einmal eine Cas9-stabile Zelllinie generiert, kann also die Transduktion mit sgRNAs ohne anschließende Selektion oder durchflusszytometrische Zellsortierung erfolgen. Hierdurch können bereits frühere Zeitpunkte nach der Transduktion beobachtet werden (Tage, die sonst zunächst auf die Aufreinigung und Anreicherung transduzierter Zellen entfallen), größere Zellzahlen erreicht und Zellstress vermieden werden. Auf der anderen Seite gilt es, die durch die hohe Transduktionseffizienz des kleinen sgRNA-Vektors (8kb vs. 14kb des *lentiCRISPRv2*) leicht entstehende zu hohe Viruslast der einzelnen Zelle durch Mehrfachtransduktion zu vermeiden.

Da mit dem *lentiCRISPRv2*-Vektor außerdem ein effizientes lentivirales Transfersystem vorlag, das die Effizienzen anderer in unserer Arbeitsgruppe vorhandener lentiviraler Expressionsvektoren deutlich übertrifft, wurde dieses Grundgerüst für die Erstellung

eines *lentiCRISPRv2*-basierten Leervektors für die lentivirale Expression von Zielgenen genutzt. (Abb. 3.1, Abb. 3.18 C und D und Abb. 3.23)

4.1.2 Etablierung der CRISPR/Cas9-Technologie anhand des *knockouts* von ABF1, ID2 und E2A

Um parallel zur Durchführung der beiden CRISPR-Screens bereits ein System für die Untersuchung ausgewählter einzelner Kandidatengene zu etablieren, wurden die erstellten Vektoren und möglichen Analysemethoden anhand von Test-Kandidatengenen untersucht. In diesem Rahmen wurden die beschriebenen *basic Helix-Loop-Helix* Proteine ABF1 und ID2 sowie der von ihnen gebundene Transkriptionsfaktor E2A hinsichtlich der Auswirkungen ihres Verlustes in Hodgkin-Zelllinien untersucht. In einer zurückliegenden Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte die Bedeutung von ABF1 und ID2 für die für das cHL typische linienfremde Genexpression gezeigt werden (Mathas et al., 2006). Mangels effizienter shRNAs konnten zum damaligen Zeitpunkt jedoch keine oder nur begrenzte Aussagen über die Auswirkung eines Verlustes dieser Proteine im cHL getroffen werden. Genau in diesem Fall ermöglicht nun also erst das CRISPR/Cas9-System derartige Untersuchungen, sodass die Etablierung des Systems mit der Beantwortung einer bis dahin noch offenen Fragestellung verbunden werden konnte.

4.1.3 Etablierung der Kontrolle eines effizienten CRISPR/Cas9 *knockouts*

Zunächst erfolgte die Kontrolle der *knockout*-Effizienz der eingesetzten sgRNAs im T7-Assay sowie im Western Blot. Der T7-Assay beruht auf dem Einsatz der T7-Endonuklease, die Basenfehlpaarungen in DNA erkennt und sie an diesen Stellen schneidet (Kapitel 2.2.7.1, Material und Methoden, und Abb. 3.3). Genomische DNA von Zielgenen, die effektiv durch die Cas9 geschnitten und deren Sequenz bei der anschließenden Reparatur mutiert wurde, bildet nach einer PCR-Amplifikation Heterodimere aus unveränderter und/oder unterschiedlich mutierter DNA, während rein unveränderte, nicht modifizierte DNA weiterhin fehlerfrei gepaarte Homodimere bildet. Da die T7-Endonuclease ausschließlich Hetero- nicht aber Homodimere schneidet, kann aus ihrer Aktivität auf die Effizienz der erfolgten Cas9-Modifikation geschlossen werden. Vorteil dieser Analysemethode ist die einfache und kostengünstige Anwendbarkeit: ist der Assay einmal etabliert, müssen lediglich Primer zur Amplifikation des jeweiligen Zielgen-Bereiches aus der genomischen DNA angefertigt werden,

sodass der Assay auf allen beliebigen DNA-Abschnitten von Interesse durchgeführt werden. Da dieser Assay jedoch direkt auf Ebene der genomischen DNA stattfindet, kann er nur Aussagen über deren Veränderung durch CRISPR/Cas9 treffen. Der Rückschluss auf die tatsächliche *knockout*-Effizienz auf Proteinebene kann hieraus nur extrapoliert werden. Eine direkte Untersuchung der CRISPR/Cas9 *knockout*-Effizienz kann hingegen auf Proteinebene im Western Blot erfolgen, für den dann wiederum für jedes zu untersuchende Zielgen ein spezifischer Antikörper eingesetzt werden muss. Darüber hinaus erlaubt der Western Blot nur die Untersuchung des durch CRISPR/Cas9 erzeugten *knockouts* von exprimierten Zielgenen. Eine Überprüfung der CRISPR/Cas9-Aktivität in nicht transkribierten Bereichen, wie bspw. Promotor- oder Enhancerbereichen, ist so nicht möglich. Da das CRISPR/Cas9-System in dieser Arbeit ausschließlich zum *knockout* von Zielgenen eingesetzt wurde, ist der Western Blot zur Analyse dieses *knockouts* geeignet und die Methode der Wahl. Daher erfolgten nach erfolgreicher Etablierung beider Verfahren sämtliche *knockout*-Kontrollen im Western Blot, während der T7-Assay als Methode der zweiten Wahl verbleiben kann, bspw. für weniger intensiv untersuchte Proteine, gegen die bisher kein funktionaler Antikörper erhältlich ist.

Die bei der Durchführung eines T7-Assays entstehenden Amplikons genomischer DNA aus dem Bereich der CRISPR/Cas9-Modifikation können zusätzlich durch Sanger-Technik sequenziert und diese Sequenzen anschließend mit Hilfe des TIDE-Algorithmus analysiert werden, der detaillierte Informationen über das Muster der eingeführten Mutationen liefert. Auch diese Methode konnte erfolgreich getestet werden und bestätigte die Wirksamkeit des von uns eingesetzten CRISPR/Cas9-Ansatzes. (Abb. 3.3 und 3.4)

4.1.4 Etablierung von Kompetitions- und Proliferationsassays anhand des CRISPR/Cas9-vermittelten *knockouts* von ABF1, ID2 und E2A

In ³H-Thymidin-basierten Proliferationsuntersuchungen konnte ein milder negativer Effekt des ABF1- resp. ID2-Verlustes sowie ein deutlicher Nachteil durch E2A-*knockout* in der Hodgkin-Zelllinie L428 festgestellt werden. Außerdem zeigte sich eine leichte (ABF1) bis prominente (E2A) Reduktion der Viabilität der *knockout*-Zellen für die Hodgkin-Zelllinie L428. Die neu etablierten Kompetitions-Assays zeigen mit einem ebenfalls leichten (ABF1) bis deutlichem (E2A) Nachteil für die jeweiligen *knockout*-

Populationen ein Ergebnis, das damit übereinstimmt mit den Resultaten aus den Proliferations- und Viabilitätsanalysen. (Abb. 3.6)

Somit konnte die für die spätere Analyse der aus den CRISPR/Cas9-Screens hervorgegangenen Kandidatengene notwendige Methodik erfolgreich etabliert und getestet werden.

Da der Fokus dieses Teils der Arbeit auf der grundsätzlichen Etablierung der CRISPR/Cas9-Technologie lag, erfolgten diese Analysen zunächst in nur einer cHL- und einer Kontroll-B-NHL-Zelllinie. Die Aussagen, die mit diesen ersten Experimenten über die Effekte eines ID2-, ABF1 bzw. E2A-Verlustes auf Hodgkin-Zellen getroffen wurden, bedürfen daher in Zukunft noch weiterer Validierung durch Wiederholung und Durchführung auch in einem größeren Panel an Zelllinien.

4.1.5 Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems und lentiviralen Transfers für genomweites *loss-of-function* Screening

Für die Durchführung genomweiter Screens steht eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung. Unterscheidet man zunächst prinzipiell zwischen sog. *gain-of-function* vs. *loss-of-function* Screens, so stehen für erstere bspw. cDNA-Bibliotheken, CRISPR-basierte Aktivierungs-Screens oder das *PiggyBac*-Transposon-System zur Verfügung. Das *PiggyBac*-Transposon-System ist dabei besonders geeignet für vorwärtsgerichtete Screeningverfahren, bspw. in Mausmodellen, also zur Suche nach Kandidatengenen, die zur Tumorentstehung beitragen (Rad et al., 2010). Um ein Screening im humanen System und in bereits entstandenen Tumoren durchzuführen, haben wir uns für die Arbeit mit etablierten Zelllinien des cHL entschieden. Hier ist nun ein rückwärtsgerichtetes Screeningverfahren hilfreich, also die Frage: welche deregulierten Gene und Signalwege sind entscheidend für das Überleben der Tumorzellen? Für diese Fragestellung eignet sich ein *loss-of-function* Screen, weswegen sich auch in dieser Arbeit für einen solchen entschieden wurde.

Methodisch kommen für einen über einen längeren Zeitraum angelegten *loss-of-function* Screen nach heutigem Stand vor allem zwei Systeme in Betracht: shRNA- oder CRISPR/Cas9-basierter *knockdown* resp. *knockout*. *Small hairpin* RNAs (shRNAs) sind kleine RNAs, die jeweils spezifisch eine passende mRNA binden und damit deren Abbau fördern und/oder die Translation verhindern. Dadurch wird ein *knockdown* des jeweiligen Zielproteins erreicht. Lentivirale shRNA-Bibliotheken ermöglichen genomweite *loss-of-function* Screens exprimierter Gene. Eine Untersuchung

regulatorischer DNA-Elemente ist durch die Angriffsebene auf mRNA-Ebene nicht möglich. Weitere Nachteile shRNA-basierter Screeningverfahren sind vor allem eine niedrigere *knockdown*-Effizienz sowie höhere *off-target* Effekte, also Effekte, die durch das unspezifische Wirken einer shRNA auf ein anderes als das eigentliche Zielgen auftreten oder durch Überexpression der shRNA zelluläre Abwehrmechanismen aktivieren. Zwar beschränkt sich auch der von uns mit Hilfe der GeCKO-Bibliothek durchgeführte CRISPR/Cas9-Screen auf Gene und deckt keine regulatorischen DNA-Elemente ab, das CRISPR/Cas9-basierte Screening überzeugt aber durch die Möglichkeit eines unumkehrbaren *knockouts* direkt auf der genomischen Ebene mit im Vergleich höherer *knockout*-Effizienz sowie durch relativ geringere *off-target* Effekte. (Adamson et al., 2012; Schultz et al., 2011; Shalem et al., 2014; Wang et al., 2014)

Prinzipiell kann der Transfer von Expressionskonstrukten in Zielzellen durch eine Vielzahl verschiedener Methoden erfolgen. Transfektion beschreibt dabei den Transfer des Expressionskonstruktes (in Form eines Plasmides), das entweder durch eine chemisch oder elektrisch erzeugte Durchlässigkeit der Zellmembran der Zielzelle in diese eingeschleust wird und zu einer vorübergehenden, kurzfristigen Transgenexpression führt. Retrovirale Transfersysteme bedienen sich der Fähigkeit dieser Viren, in Wirtszellen einzudringen und ihre RNA nach einer reversen Transkription in die genomische DNA der Zielzelle zu integrieren (Grandgenett and Mumm, 1990). Um eine möglichst hohe *knockout*-Effizienz durch das CRISPR/Cas9-System zu erreichen, ist neben einer hohen Transduktions- resp. Transfektionseffizienz auch eine lange Transgenexpression relevant, da auf diese Weise die Cas9 so lange aktiv bleibt bis die Ziel-DNA erfolgreich geschnitten und so verändert wurde, dass sie durch die ihr ursprünglich entsprechende sgRNA nicht mehr erkannt wird. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte beobachtet werden, dass dieser Prozess innerhalb einer großen Zellpopulation regelhaft mehrere Tage in Anspruch nimmt, bevor ein suffizienter *knockout* erreicht ist und sich die biologischen Folgen ausbilden (Abb. 3.21 C und Abb. 3.22 D).

Aus diesen Gründen haben wir uns, um ein möglichst effektives und valides *loss-of-function* Screening in cHL- und B-NHL-Zelllinien zu erreichen, für einen lentiviralen genomweiten CRISPR/Cas9-Screen, zunächst unter Verwendung der publizierten GeCKO-Bibliothek sowie im Re-Screen mit einer selbst entworfenen und klonierten sgRNA-Bibliothek, entschieden.

Für die Durchführung des CRISPR-Screens wurde eine MOI von 0,4 angestrebt, die einer Transduktionseffizienz von 33% entspricht (siehe Kapitel 2.2.6.4). Hierdurch wird einerseits wie beschrieben die Transduktion einer Zelle mit mehr als einer sgRNA (wie es bei einer höheren Transduktionseffizienz zu erwarten wäre) vermieden und andererseits eine so hohe Transduktionseffizienz erzielt, dass eine möglichst gute Repräsentation des sgRNA-Pools durch die Transduktion möglichst vieler Zellen erreicht wird (siehe Kapitel 2.2.6.4 sowie 3.2.2). Daraus folgt, dass in für einen solchen CRISPR-Screen geeigneten Zelllinien mit der maximalen unverdünnten Virusmenge mindestens eine Transduktionseffizienz von 33% erreicht werden muss; bei Erzielung höherer Transduktionseffizienzen kann dann über Titration die Menge Virusüberstand bestimmt werden, mit der genau noch eine Transduktionseffizienz von 33% erzielt wird. In Test-Transduktionen mit demselben Vektor-Grundgerüst, wie es auch für den Screen verwendet wurde, konnte eine hohe Transduktionseffizienz für die beiden Hodgkin-Zelllinien L1236 (>90%) und L428 (ca. 60%) erreicht werden. Für eine dritte Hodgkin-Zelllinie, HDLM-2 konnte mit 34% eine noch ausreichende Transduktionseffizienz erreicht werden (Abb. 3.2). Da diese sich jedoch durch ihren in der Ätiologie des cHL sehr seltenen T-Zell-Ursprung von den B-Zell-abgeleiteten klassischen Hodgkin-Zelllinien unterscheidet, wurde sie nicht in den Screen aufgenommen (Drexler et al., 1989). Die in späteren Experimenten verwendete zusätzliche Hodgkin-Zelllinie UHO-1 stand dem Labor zum Zeitpunkt der Durchführung der beiden CRISPR-Screens noch nicht zur Verfügung.

Als Kontrollzelllinien wurden Zelllinien ausgewählt, die aus NHL B-Zell-Neoplasien hervorgegangen sind. Insbesondere wurden hierfür *germinal center B-cell like* (GCB) DLBCL sowie Burkitt-Lymphom Zelllinien ausgewählt, da diese durch ihren B-Zell Ursprung einerseits nahe genug, durch ihre deutlich distinkte bisher bekannte Tumorbilogie aber auch weit genug entfernt vom cHL sind, sodass Grund für die Annahme bestand, sehr gut Unterschiede herausarbeiten zu können. Ein anderer Subtyp des DLBCL, der *activated B-cell like* (ABC) Typ eignet sich aufgrund seiner hohen NF- κ B-Aktivität hingegen deutlich schlechter als Kontrolle, da er damit einen sehr wichtigen deregulierten Signalweg mit dem cHL teilt (Davis et al., 2001; Lam et al., 2005). In Test-Transduktionen wurden in den beiden GCB-DLBCL-Zelllinien BJAB und SU-DHL-4 mit ca. 85% bzw. ca. 35% gute Transduktionseffizienzen erreicht, sodass diese beiden Zelllinien aufgrund ihrer Entität und der guten lentiviralen

Transduzierbarkeit als Kontrollzelllinien für das CRISPR/Cas9-Screening ausgewählt wurden.

4.1.6 Technische Aspekte der CRISPR/Cas9-Screens

In der für den genomweiten Screen verwendeten GeCKO-Bibliothek wird jedes Gen durch jeweils sechs individuelle sgRNAs adressiert. Bei der Auswertung dieses genomweiten CRISPR/Cas9-Screens fiel bei der Betrachtung der Positivkontrollen wie ACTB und GAPDH jedoch auf, dass nicht alle sgRNAs dieselbe Wirkung entfalten konnten, d.h. jeweils neben einigen sehr effizienten sgRNAs für ein Gen auch weniger effiziente bis hin zu unwirksamen sgRNAs in der Bibliothek enthalten waren. Um dennoch alle potentiellen Kandidatengene für die Pathogenese des cHL identifizieren zu können, wurde die Bedingung gewählt, dass nur mindestens zwei der insgesamt sechs sgRNAs jedes Gens eine relevante Depletion über den Beobachtungszeitraum aufweisen müssen (Repräsentations-Verhältnis $\leq 0,6$ von Tag 21 zu Tag 1 des Screens). Damit wurde ein gewisser Anteil falsch positiver ermittelter Kandidatengene für die Optimierung der Sensitivität des genomweiten Screens in Kauf genommen. Um jedoch eine ausreichende Spezifität des gesamten Screening-Prozesses zu gewährleisten, erfolgte die Durchführung eines zweiten, unabhängigen CRISPR/Cas9-Screens mit insgesamt 141 ermittelten potentiellen Kandidatengen sowie 44 zusätzlichen Genen und Kontrollgenen und 69 *non-targeting* sgRNAs als weitere Negativ-Kontrollen. In diesem Re-Screen wurden für jedes Gen drei neue sgRNAs selbst entworfen und hierfür ein sgRNA-Design-Tool von besonderer Effizienz verwendet (CrisprGold)(Chu et al., 2016), so dass in diesem Bestätigungs-Screen nun die große Mehrheit aller sgRNAs als effizient gewertet werden und stringenter Kriterien für die Auswertung angewendet werden konnten. So ergab sich schließlich mit derselben Bedingung für eine relevante Depletion der sgRNA-Repräsentation über den Beobachtungszeitraum, die nun für zwei aus drei sgRNAs erfüllt sein musste, eine finale Anzahl von ca. 40 robusten Kandidatengen für die Pathogenese des cHL. (Tabelle 3.1; Anhang)

4.1.7 Statistische Besonderheiten der CRISPR/Cas9-Screen Auswertung

Da sich die Effizienz jeder sgRNA unterscheidet, weichen auch die analysierten Effekte für die Depletion jeder einzelnen sgRNA für ein bestimmtes Zielgen methodenbedingt immanent voneinander ab, wie auch die in Abb. 3.11 zu beobachtende hohe

Standardabweichung zwischen den Quotienten der sgRNAs zeigt. Dadurch muss der Effekt jeder sgRNA zunächst für sich betrachtet werden, bevor in einem zweiten Schritt die Zahl der unabhängig depletierten sgRNAs pro Gen berechnet wird. Um also Replikate für statistische Berechnungen zu generieren, dürfen nicht mindestens drei verschiedene sgRNAs als Replikate betrachtet werden, sondern müsste der Screen selbst in mindestens Triplikaten durchgeführt werden, um anschließend mindestens drei unabhängige Depletionswerte für jede sgRNA zu erhalten und auf Grundlage dessen Signifikanzen berechnen zu können. Dies war zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeiten aus technischen Gründen sowie wegen der hohen Kosten der Hochdurchsatzsequenzierung für große Probenzahlen bei gleichbleibender Tiefe der Sequenzierung nicht möglich. Die Validität der Ergebnisse wurde daher durch die Frage nach der Reproduzierbarkeit in einem sequenziellen CRISPR-Re-Screen mit unabhängigen neuen sgRNAs getestet. Dieses Vorgehen hat zudem den zusätzlichen Vorteil, dass - im Gegensatz zu der beschriebenen alternativen Vorgehensweise in Triplikaten desselben GeCKO-Screens - durch die Verwendung neuer unabhängiger sgRNAs so auch auf *off-target* Effekte einer sgRNA zurückzuführende Depletionen ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus erfolgte schließlich eine dritte unabhängige Untersuchung und Bestätigung der in den beiden sequenziellen CRISPR/Cas9-Screens ermittelten Kandidatengene durch Kompetitions-Assays.

4.1.8 Betrachtung der Effizienz von sgRNAs

Im Gegensatz zu der in den Hodgkin-Zelllinien beobachteten geringen Effizienz der sgRNAs im GeCKO-Screen, berichteten Shalem et al. in ihrer Arbeit zur GeCKO-sgRNA-Bibliothek von einer deutlich höheren sgRNA-Effizienz von über 90%. Diese testeten sie jedoch lediglich anhand von einzelnen sgRNAs gegen EGFP und zwar in HEK293 Zellen, die jeweils nur eine einzelne Kopie des EGFP-Gens enthielten (Shalem et al., 2014).

Die deutlich schlechtere gemittelte Effizienz über die gesamte GeCKO-sgRNA-Bibliothek, wie sie sich im genomweiten Screen in Hodgkin-Zelllinien darstellte, kann im Vergleich auf mehrere Unterschiede zurückgeführt werden. Eine erste methodische Differenz ist die unterschiedliche Auswahl der gezielten sgRNAs gegen EGFP und der Zusammenstellung der gesamten GeCKO-Bibliothek und ihrer über 120 000 sgRNAs. Während die sechs gegen EGFP gerichteten sgRNAs individuell entworfen wurden, wurde die GeCKO-Bibliothek nach einem neu entwickelten Algorithmus entworfen.

Darüber hinaus wurde die GeCKO-Bibliothek als konzentriertes Virus und, um Mehrfachtransduktionen zu vermeiden, mit einer niedrigen MOI transduziert, während für die Transduktionen mit den EGFP-sgRNAs unkonzentriertes, frisches Virus in einer vermutlich auch höheren MOI eingesetzt wurde. Eine effizientere und ggf. sogar mehrfache Transduktion hat selbstverständlich auch eine höhere *knockout*-Effizienz zur Folge. Des Weiteren kommt hinzu, dass die für die EGFP-Testexperimente von Shalem et al. verwendete modifizierte HEK293-Zelllinie nur eine einzelne Kopie des EGFP-Gens besitzt, während alle Zielgene auf genomischer DNA doppelt vorliegen. Der *knockout* einer einzelnen Kopie eines Zielgenes ist dabei also wahrscheinlicher als der gleichzeitige *knockout* von zwei Kopien (oder gar mehr, s.u.). (Shalem et al., 2014)

Zusätzlich ist die Effizienz der Cas9 selbst darüber hinaus von der Zugänglichkeit der genomischen DNA in dem betreffenden Bereich abhängig, d.h. offenes Chromatin ist leichter zugänglich als (partiell) geschlossene genomische DNA. In der Regel korreliert dies auch mit der Expressionsstärke des jeweiligen Gens, sodass das Chromatin hoch exprimierter und damit eventuell auch überlebensrelevanter Gene auch tendenziell offen ist (Verkuijl and Rots, 2019). Besonders gut zugänglich sind auch retroviral von außen in die Zielzelle eingebrachte fremde Gene, wie das EGFP im Fall des sgRNA-Tests bei Shalem et al., da sich diese selbst in besonders offene Bereiche des Chromatins integrieren (Sultana et al., 2017) – ein zweiter unabhängiger Faktor also, der die höhere *knockout*-Effizienz bei Shalem et al. zu erklären vermag. Dazu passend haben auch andere Gruppen in ihren CRISPR-Screens niedrigere sgRNA-Effizienzen beobachtet (Koike-Yusa et al., 2014; Parnas et al., 2015). Schließlich kann die geringere sgRNA-Effizienz zusätzlich in einer besonderen biologischen Eigenschaft der Hodgkin-Zelllinien begründet liegen: Diese haben meist einen mehr als diploiden Chromosomensatz, sodass in jeder Zelle nicht nur zwei Allele jedes Gens, sondern oft vier oder mehr Kopien vorliegen, die für einen effizienten *knockout* alle einzeln getroffen und zerstört werden müssen. So hat die für den genomweiten CRISPR/Cas9-Screen eingesetzte Zelllinie L428 einen hypertetraploiden Karyotyp und die L1236 immerhin einen hypotriploiden (DSMZ: L428 (ACC197), L1236 (ACC530)).

Um diese Limitationen des genomweiten CRISPR/Cas9-Screens zu überwinden und die aus diesem Screen hervorgegangenen potentiellen Kandidatengene zu überprüfen, wurde ein unabhängiger gezielter Bestätigungsscreen durchgeführt. Dieser deckte 141 potentielle Kandidatengene und 14 Positiv- und Negativkontrollgene ab (sowie zusätzlich 9 zu untersuchende Gene des NF- κ B Signalwegs und 21 weitere Gene von

Interesse; siehe Anhang). Die sgRNAs wurden ausgewählt mit CrispRGold, das zusätzlich zu ersten sgRNA-Design-Tools solche sgRNAs auswählt, die nicht nur eine geringe *off-target*-Aktivität haben, sondern auch alle Transkriptvarianten des Zielgens ansteuern. Außerdem werden für die Vorhersage der Effizienz der sgRNA mögliche Sekundärstrukturen der entstehenden sgRNA-Sequenz berücksichtigt. Insgesamt erreicht dieses sgRNA-Design-Verfahren so deutlich höhere Effizienzen (11 aus 12 getesteten sgRNAs mit hoher *knockout*-Effizienz in der Originalarbeit) (Chu et al., 2016). Aufgrund der damit wahrscheinlich deutlich höheren sgRNA-Effizienz, wurde für den Re-Screen eine sgRNA-Bibliothek erstellt, in der jedes Zielgen durch jeweils drei verschiedene sgRNAs abgedeckt wurde und die zusätzlich 69 *non-targeting* sgRNAs als Kontrollen enthält. Durch diesen gezielten Re-Screen konnten über 40 Kandidatengene in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden. Darunter fanden sich mit den oben beschriebenen Faktoren des NF- κ B und JAK-STAT-Signalwegs und der AP-1/JUN-Transkriptionsfaktoren, IRF4 sowie Cyclin D2 beinahe alle im genomweiten Screen identifizierten bereits bekannten Faktoren der Pathogenese des cHL wieder.

4.1.9 Einfluss der Proliferationsgeschwindigkeit einer Zelllinie auf die Ergebnisse des CRISPR-Screens

Bei der Analyse der sgRNA-Depletionen im genomweiten CRISPR-Screen wie auch im Re-Screen fiel eine insgesamt geringere Depletion der sgRNAs für die Hodgkin-Zelllinie L1236 auf (Abb. 3.12 A und 3.14). Könnte dies für sich betrachtet auf eine geringere Relevanz des jeweiligen Zielgenes für die Biologie dieser Zelllinie hinweisen, so zeigt die generelle Breite dieses Effektes, der auch die Positiv-Kontroll-Gene gleichermaßen betrifft, dass es sich um ein von der Relevanz des jeweiligen Genes unabhängigen, allgemeinen Effekt handelt. So weisen bspw. sgRNAs gegen GAPDH für L1236 im Re-Screen im Mittel einen Quotienten von 0,40 auf, während dieser für L428 bei 0,17, für BJAB bei 0,15 und für SU-DHL-4 ebenfalls bei 0,15 liegt. Der Verlauf der allgemeinen Veränderung der sgRNA-Pool-Zusammensetzung über die Zeit, wie er in Abb. 3.13 dargestellt ist, zeigt, dass der sgRNA-Pool der Zelllinie L1236 gegenüber denen der übrigen Zelllinien auf der Zeitachse zurückfällt. So hat der sgRNA-Pool in L1236 an Tag 28 erst eine Veränderung seiner Zusammensetzung im Vergleich zum Startpunkt erreicht, die die übrigen Zelllinien bereits an Tag 14 aufweisen. Dieser Effekt geht einher mit der Beobachtung, dass die Proliferationsgeschwindigkeit der L1236 in

unserer Zellkultur deutlich langsamer ist als die der übrigen Zelllinien. Diese Beobachtung bestätigt auch der Abgleich mit dem Zelllinienkatalog der DSMZ, der für L1236 eine Verdopplungszeit von 48 Stunden beschreibt während diese für L428 mit nur 35 sowie für BJAB mit ca. 40 Stunden angegeben ist (DSMZ: L428 (ACC197), L1236 (ACC530), BJAB (ACC757)). Über den Beobachtungszeitraum der CRISPR-Screens hinweg konnten sich somit bei niedriger Proliferationsgeschwindigkeit die im *loss-of-function* Screen beobachteten negativen Effekte eines Zielgen-*knockouts* auf die Proliferation entsprechend nur weniger deutlich auswirken.

Vergleicht man also unter Berücksichtigung dieser Unterschiede nun den mittleren Quotienten der sgRNAs gegen GAPDH von L1236 an Tag 28 mit dem der Kontrolle BJAB an Tag 14, so kommt man mit 0,40 und 0,38 zu vergleichbaren Effekten. Um die insgesamt schwächeren Effekte in L1236 daher bei der Berechnung und Analyse zu berücksichtigen, wurden im Re-Screen mit einem *cut-off* von $\leq 0,7$ für L1236 vs. $\leq 0,6$ für L428 für den Quotienten von Tag 28 zu Tag 1 (und einem *cut-off* von $\leq 0,6$ für L428 bzw. für L1236 von $\leq 0,75$ für den Quotienten zu den B-NHL-Kontrollen) für den beobachteten Effekt leicht korrigierte Kriterien angewendet.

4.1.10 Validierung der CRISPR-Screen Resultate in Kompetitions-Assays

Um die Ergebnisse der beiden CRISPR-Screens in einem unabhängigen dritten Versuch zu validieren, wurden Kompetitions-Assays durchgeführt, bei denen Mischpopulationen EBFP-positiver *non-targeting* Kontroll-Zellen und EGFP-positiver *knockout*-Zellen des jeweiligen Kandidatengenes über die Zeit durchflusszytometrisch beobachtet wurden. Die beiden bereits in den CRISPR-Screens eingesetzten Zelllinien L428 und L1236 wurden in diesen Experimenten um eine zu diesem Zeitpunkt nun neu in unserem Labor vorhandene Hodgkin-Zelllinie, UHO-1, die ebenfalls eine sehr gute lentivirale Transduzierbarkeit aufweist, ergänzt und damit die Aussagekraft der in den Kompetitions-Assays beobachteten Effekte weiter verbessert.

In diesen Untersuchungen konnte eine Vielzahl der getesteten Kandidatengene validiert werden. Dies bestätigt und festigt die Ergebnisse des genomweiten Screens und des Bestätigungsscreens und etabliert gleichzeitig ein neues Verfahren zur Untersuchung der Effekte des *knockouts* eines Zielgenes auf Proliferation und/oder Überleben einer Zelle.

4.2 Tumorbiologische Ergebnisse der CRISPR/Cas9-Screens und weitere Untersuchungen der Kandidatengene im cHL

4.2.1 Genomweiter CRISPR/Cas9-Screen und Re-Screen identifizieren zahlreiche potente Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

In diesem genomweiten CRISPR/Cas9-basierten *knockout*-Screen und einem nachfolgenden Re-Screen wurden schließlich über 40 Kandidatengene für die Pathogenese des cHL identifiziert (Tab. 3.1; Anhang). Der Einsatz eines genomweiten Screens erlaubte dabei eine unvoreingenommene und offene Suche nach solchen Kandidatengenen über das gesamte humane Genom hinweg. So wurden nicht nur bekannte relevante Gene für das Überleben von Hodgkin-Zellen entdeckt, sondern auch mehrere neue Kandidatengene identifiziert. Das zuverlässige und breite Auffinden bereits als relevant für die Pathogenese des cHL beschriebener Faktoren dient dabei als Marker für die Validität des CRISPR/Cas9-Screens und seiner Analyse selbst. Zudem erlaubt der genomweite Screen gemeinsam mit seinem unabhängigen Bestätigungs-Screen erstmals, die Relevanz dieser bisher in Einzeluntersuchungen beschriebenen Gene im Vergleich untereinander zu beurteilen und diese hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proliferation und das Überleben von Hodgkin-Zelllinien zu evaluieren.

4.2.2 Der NF- κ B Signalweg im cHL: bekannter onkogener Treiber und neue Erkenntnisse

Unter den ermittelten Kandidatengenen des genomweiten CRISPR/Cas9-Screens konnten zahlreiche Faktoren des in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms gut beschriebenen NF- κ B Signalwegs gefunden werden (Bargou et al., 1996; Hinz et al., 2001; Jungnickel et al., 2000; Krappmann et al., 1999; Martín-Subero et al., 2002; Mathas et al., 2005). Mit NIK, IKK α , NFKB2 und RELB wurde dabei der alternative NF- κ B Signalweg auf jeder seiner Ebenen getroffen. Im Gegensatz dazu wurde der klassische NF- κ B Signalweg mit IKK α zwar ebenfalls identifiziert (wenn auch die Bedeutung von IKK α für diesen Zweig vermutlich geringer anzusetzen ist), jedoch zeigten bei der Betrachtung beider unabhängiger Screens seine hauptsächlichen Faktoren IKK β und NEMO (IKK γ), NFKB1, REL und RELA keinen die Kriterien der Depletion erfüllenden, relevanten Proliferationsnachteil für Hodgkin-Zelllinien. Dieses

Muster spricht für eine deutliche Überlegenheit des alternativen gegenüber dem klassischen NF- κ B Signalweg hinsichtlich der Relevanz für die Proliferation von Hodgkin-Zelllinien. Unterstützt werden diese Ergebnisse u.a. durch eine Arbeit von Oliveira et al., in der ebenfalls gezeigt wurde, dass in Hodgkin-Zellen vorrangig der alternative NF- κ B Signalweg entscheidend ist (de Oliveira et al., 2016). Auch konnte insbesondere gezeigt werden, dass das cHL besonders von NIK und RELB, also dem alternativen NF- κ B Signalweg, abhängig ist, während bspw. hingegen das DLBCL v.a. auf REL und RELA angewiesen ist, also Faktoren, die mit dem klassischen NF- κ B Signalweg assoziiert sind (Gamboa-Cedeño et al., 2019; Ranuncolo et al., 2012). (Abb. 3.20)

Obwohl der NF- κ B Signalweg in seiner wichtigen Rolle für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms und anderer Lymphom- und Tumorentitäten lange bekannt ist, ist es bisher nicht gelungen, eine effektive Inhibition des NF- κ B Signalwegs als Therapieoption zu etablieren (Mottok and Steidl, 2018). Dies kann u.a. darin begründet liegen, dass der NF- κ B Signalweg mit seinem alternativen und klassischen Weg und den dabei existierenden Querverbindungen kaum durch die Inhibition eines einzelnen Faktors auszuschalten sein mag. Auch werden es von Entität zu Entität unterschiedliche Punkte im NF- κ B Signalweg sein, die für eine effiziente, tumorbiologisch relevante Hemmung geblockt werden müssen. Gemeinsam mit den oben beschriebenen Arbeiten könnten nun die aus den CRISPR-Screens gewonnenen Ergebnisse als Grundlage genutzt werden, um gezielte Ansätze für die Inhibition des NF- κ B Signalwegs in der Therapie des cHL zu etablieren. So legen die aus den CRISPR-Screens gewonnenen Erkenntnisse nahe, dass bspw. eine Inhibition von IKK α oder NIK im cHL erfolgversprechend sein könnte. Für NIK sind dabei bereits einige Inhibitoren verfügbar und bspw. auch als wirkungsvolle Inhibitoren des alternativen NF- κ B Signalwegs im Mantelzell-Lymphom identifiziert worden (Blaquiere et al., 2018; Castanedo et al., 2017; Rahal et al., 2014).

4.2.3 Der JAK/STAT-Signalweg in cHL und CRISPR-Screens

Während zunächst im genomweiten CRISPR-Screen mit JAK1 und STAT5B zwei Faktoren des JAK/STAT-Signalweges identifiziert worden waren, konnte im Re-Screen nur JAK1 als valides Kandidatengen bestätigt werden. Dieses zeigte dann jedoch auch einen deutlichen Effekt in den zuletzt durchgeführten Kompetitions-Assays. (Abb. 3.16)

Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges ist als wichtiger Aspekt der Molekularbiologie des cHL bekannt und ausführlich untersucht (Baus and Pfitzner, 2006; Cochet et al., 2006). Insbesondere ist auch das von uns im genomweiten Screen identifizierte STAT5(B) sowohl als aktiviert als auch als mutiert beschrieben (Scheeren et al., 2008; Tiacci et al., 2018; Weniger et al., 2006). Im Re-Screen zeigte eine von drei sgRNAs ebenfalls einen negativen Effekt des STAT5B-Verlustes. Da jedoch zwei sgRNAs nicht die Depletions-Kriterien erreichten, wurde STAT5B nicht als bestätigt klassifiziert. In Zusammenschau der Ergebnisse aus dem genomweiten Screen, der einen damit einhergehend depletierten sgRNA im Bestätigungs-Screen sowie der eindeutigen Beschreibung in der Literatur, kann eine Relevanz von STAT5B für das Überleben und die Proliferation von Hodgkin-Zellen jedoch als wahrscheinlich angenommen werden. Das Nicht-Erfüllen der Depletions-Kriterien im Re-Screen ist unter diesen Aspekten vermutlich am ehesten auf eine mangelnde Effizienz von zwei der drei sgRNAs zurückzuführen.

Die Rezeptortyrosinkinase JAK1, über die STATs wie STAT5B aktiviert werden, ist als validiertes Kandidatengen aus beiden CRISPR-Screens hervorgegangen und konnte auch in Kompetitions-Assays bestätigt werden. Insgesamt konnte so also eine relevante Rolle des JAK/STAT-Signalweges für die Proliferation resp. das Überleben von Hodgkin-Zelllinien, wie sie bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde, gezeigt werden.

4.2.4 AP-1 Transkriptionsfaktoren im cHL und in den CRISPR-Screens

Auch zahlreiche bereits als dereguliert im cHL beschriebene Transkriptionsfaktoren konnten in den beiden CRISPR/Cas9-Screens nachvollzogen werden, darunter die Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie JUNB und BATF3. JUNB ist im cHL hoch experimentiert und ist, teilweise gemeinsam mit Faktoren des NF- κ B Signalwegs, relevant für die Proliferation von Hodgkin-Zellen (Mathas et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigte der Verlust von JUNB sowohl in den CRISPR-Screens als auch in den Kompetitions-Assays einen deutlichen und spezifischen Proliferationsnachteil für die untersuchten Hodgkin-Zelllinien.

Neben JUNB ist die Hochregulation von ATF-Transkriptionsfaktoren wie BATF3 im cHL bekannt. Dabei bildet BATF3 Heterodimere mit JUN-Transkriptionsfaktoren wie c-JUN und JUNB, die die Transkription von Zielgenen, bspw. von MYC, induzieren (Lollies et al., 2018). Auch hier konnte in den sequenziellen CRISPR-Screens sowie

anschließenden Kompetitions-Assays ein Nachteil des BATF3-Verlustes für Hodgkin-Zelllinien gezeigt werden. (Abb. 3.18)

Da BATF3 und JUNB kooperativ wirken, wäre darüber hinaus in weiteren Arbeiten eine Untersuchung der Auswirkung eines Doppel-*knockouts* beider Zielgene auf die Proliferation und das Überleben von HRS-Zellen interessant.

4.2.5 IRF4 ist ein sehr starkes Kandidatengen der CRISPR-Screens und notwendig für das Überleben von Hodgkin-Zellen

Auch IRF4 ist zwar bereits im cHL beschrieben, konnte durch den genomweiten Screening-Ansatz jedoch erstmals hinsichtlich seiner Relevanz untersucht werden (Aldinucci et al., 2011; Buettner et al., 2005; Carbone et al., 2002). Während die deregulierten Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie in der Betrachtung der Tumorbilogie des cHL bisher deutlich gegenüber IRF4 im Fokus standen, konnte nun gezeigt werden, dass der IRF4-Verlust den stärksten aller beobachteten cHL-spezifischen Effekte aufweist (Abb. 3.18; Anhang). Schon im genomweiten CRISPR-Screen konnte IRF4 mit fünf (L428) bzw. drei (L1236) aus sechs sgRNAs mit Depletionen von 0,08 bis 0,54 von Tag 21 zu Tag 1 als starkes Kandidatengen identifiziert werden. Dies bestätigte sich anschließend im Re-Screen sowie in den Kompetitions-Assays. Da für diese beiden Experimente neue sgRNAs entwickelt und eingesetzt wurden, ist anzunehmen, dass der starke nachteilige Effekt des IRF4-Verlusts tatsächlich auf die notwendige Rolle von IRF4 im cHL und eben nicht auf einen zufällig besonders starken *knockout* oder ggf. unspezifischen Effekt nur einer sgRNA zurückzuführen ist. Darüber hinaus erfolgte die Kontrolle des *knockouts* von IRF4 durch die drei in Re-Screen und Kompetitions-Assays verwendeten sgRNAs im Western Blot. Auch der *knockout* der AP1-Faktoren JUNB und BATF3 wurde auf dieselbe Weise überprüft und für alle drei Transkriptionsfaktoren eine vergleichbare *knockout*-Effizienz beobachtet (Abb. 3.17). Auch diese Ergebnisse stärken die Annahme, dass es der IRF4-Verlust selbst ist, der eine herausstellende Rolle für das Überleben von Hodgkin-Zellen darstellt. Es ist anzumerken, dass ein unmittelbarer quantitativer Vergleich der biologischen Effekte für die *knockouts* verschiedener Gene wegen der zahlreichen experimentellen Variablen nur bedingt möglich ist; dennoch liefern die beschriebenen Daten – gerade wenn wie hier geschehen ähnliche *knockout*-Effizienzen auf Proteinebene nachgewiesen wurden – zumindest erste Anhaltspunkte für eine relative Einordnung der Bedeutung der unterschiedlichen Signalwege.

Wegen der beobachteten starken Abhängigkeit aller untersuchten Hodgkin-Zelllinien von IRF4 erfolgte zur weiteren Untersuchung dieser ein *rescue*-Versuch des IRF4-*knockouts* durch die exogene Expression von murinem Irf4, das sich in seiner Nukleotidsequenz vom humanen IRF4 im Bereich der Zielsequenz der verwendeten sgRNA unterscheidet (siehe unten). Zwar konnte keine vollständige Kompensation des IRF4-*knockouts* erreicht werden, jedoch eine deutliche Abschwächung des Effektes - insbesondere in den beiden Zelllinien L1236 und UHO-1, während diese Abmilderung für L428 schwächer ausfiel. Eine Kontrolle des *knockouts* von IRF4 und der Expression von murinem Irf4 in den *rescue*-Proben erfolgte im Western Blot, der für die *rescue*-Proben eine Rückkehr des IRF4-Levels zum Ausgangsniveau zeigte (Abb. 3.18). Dass also trotz der ausreichenden Level an ektopem murinen Irf4 im *rescue*-Versuch nicht die Kurvenverläufe der *non-targeting* Kontrollen erreicht wurden, könnte bspw. darauf zurückzuführen sein, dass humanes und murines IRF4 funktionell nicht vollständig gleichartig wirken. Das murine Irf4 wurde jedoch gewählt, weil in diesem durch *mismatches* in den Basenpaarungen der gewählten sgRNA und ihrer PAM diese sgRNA nicht aktiv ist, während exogen eingebrachtes humanes IRF4 ebenfalls durch CRISPR/Cas9 erkannt und inaktiviert würde. Der deutlich schwächere Effekt des *rescues* in der Zelllinie L428 steht ferner im Einklang mit einer aktuellen anderen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe, in der beobachtet wurde, dass IRF4 in L428 mutiert ist und diese Mutante spezifische biologische Effekte besitzt, die durch Wildtyp-IRF4 nicht kompensiert werden können (noch unveröffentlicht, persönliche Mitteilung S. Mathas).

4.2.6 Die Zellzyklusregulatoren CCND2, CCNA2 und CDC25A in cHL und CRISPR-Screens: Palbociclib als mögliche zielgerichtete Therapie im Hodgkin-Lymphom

Die beiden Cycline D2 und A2 sowie CDC25A konnten im genomweiten Screen als Kandidatengene im cHL identifiziert und im anschließenden Re-Screen wie den Kompetitions-Assays bestätigt werden.

CCNA2 und CDC25A, die beide über die Cyclin-abhängige Kinase CDK2 wirken, zeigten dabei in den Kompetitions-Assays einen moderaten Effekt für alle (CCNA2) resp. insbesondere eine (CDC25A) der untersuchten Hodgkin-Zelllinien. Um diese Ergebnisse weiter zu vertiefen und zu untersuchen, ob diese Achse auch auf die Behandlung mit einem Inhibitor anspricht, wurden Hodgkin-Zelllinien mit dem CDK2-

Inhibitor K03861 behandelt (Alexander et al., 2015). Dabei zeigte sich in einigen Zelllinien eine verminderte Proliferationsrate unter steigenden Dosen von K03861. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse aus den *knockout*-Versuchen und legen gleichzeitig die Grundlage für weitere Untersuchungen mit dem Ziel einer molekularen Therapiestrategie für das cHL. (Abb. 3.19 A, C)

Den stärksten Effekt wies jedoch CCND2 auf, das u.a. durch den NF- κ B Signalweg und STAT5 induziert wird, und im cHL ebenso wie diese Signalwege dereguliert resp. hoch exprimiert ist (Bai et al., 2004; Teramoto et al., 1999). Die Inhibition der durch CCND2 aktivierten Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4/6 mit Palbociclib führte ebenfalls zu einer signifikanten Proliferationseinschränkung in allen sechs untersuchten Hodgkin-Zelllinien. Da Palbociclib bereits in der Therapie solider Tumore zugelassen ist und für die Therapie des Mantelzell-Lymphoms, dessen Charakteristikum eine Translokation von CCND1 unter die Kontrolle des IgH-Enhancers und eine daraus resultierende Überexpression von CCND1 ist, intensiv untersucht wird, besteht hier potentiell und nach weiteren Untersuchungen die Möglichkeit der Etablierung einer neuen effektiven zielgerichteten Therapie des Hodgkin-Lymphoms (Leonard et al., 2012). (Abb. 3.19 A,B)

4.2.7 CRISPR/Cas9-basiertes *knockout*-Screening identifiziert neue Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms

Durch den genomweiten CRISPR/Cas9-Screen konnten neben der beschriebenen Rekonstruktion des bisher bekannten tumorbiologischen Netzwerkes im cHL auch neue, für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms bisher unbekannte Kandidatengene identifiziert und im anschließenden Re-Screen bestätigt werden. Eine Übersicht über diese insgesamt 30 (L428) bzw. sieben (L1236) Kandidatengene ist in der Tabelle 3.2 zu finden. Acht dieser Kandidatengene wurden weiterführend in Kompetitions-Assays untersucht und konnten dabei teilweise für alle drei, teilweise nur für ein oder zwei der untersuchten Hodgkin-Zelllinien bestätigt werden (Tab. 3.2 sowie Abb. 3.16, 3.21 A und 3.22 C). Zwei besonders interessante neue Kandidatengene wurden schließlich noch weitergehend untersucht.

4.2.7.1 Die Methyltransferase HENMT1 als neues Kandidatengen im cHL

Die bisher weitgehend unerforschte Methyltransferase HENMT1 ging als neues Kandidatengen im cHL aus den sequenziellen CRISPR/Cas9-Screens hervor und konnte auch – bei moderaten Effekten – in Kompetitions-Assays bestätigt werden. Eine Western Blot Kontrolle zeigte den effizienten *knockout* von HENMT1, das auch in der Mehrzahl der untersuchten Hodgkin-Zelllinien exprimiert ist, wie RNA-seq Daten und eine RT-PCR belegen. (Abb. 3.13 und 3.21)

Da HENMT1 bislang kaum untersucht ist, wäre es vermutlich in keine gezielte Untersuchung zur Pathogenese des cHL aufgenommen wurden und konnte so nur durch das unvoreingenommene genomweite CRISPR/Cas9-Screening als Kandidatengen für Proliferation und Überleben von Hodgkin-Zellen identifiziert werden. Gleichzeitig gilt es so nun jedoch auch, den Mechanismus hinter diesem Effekt und die molekulare Rolle von HENMT1 im Hodgkin-Lymphom zu ergründen.

4.2.7.2 KEAP1 als potentes neues Kandidatengen im cHL

KEAP1, das als Substratadapter-Protein eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes bekannt ist, konnte durch CRISPR/Cas9-basiertes genomweites *knockout*-Screening identifiziert und durch einen Re-Screen und Kompetitions-Assays als das stärkste neue Kandidatengen für die Proliferation und das Überleben von Hodgkin-Zellen verifiziert werden.

Die Effizienz des *knockouts* konnte in Western Blot Kontrollen dargestellt werden (Abb. 3.22 D). Expressionsanalysen anhand von RNA-seq Daten und RT-PCR zeigen eine ubiquitäre Expression von KEAP1 in allen untersuchten Hodgkin- und B-NHL-Zelllinien (Abb. 3.13 und 3.22 A). Trotz seines offensichtlich starken biologischen Effektes wäre es durch die Betrachtung differenzieller Genexpression also nicht als Kandidatengen für das cHL identifiziert worden. Dies zeigt noch einmal eindrücklich die methodische Stärke des gewählten genomweiten *loss-of-function* CRISPR-Screenings in Bezug auf die funktionelle Identifizierung von Kandidatengenen.

Die bisher bekannte zentrale Funktion von KEAP1 ist die Regulation der Antwort auf oxidativen Stress. Unter normalen physiologischen Bedingungen bindet KEAP1 an NRF2, den wichtigsten Transkriptionsfaktor für die zelluläre Reaktion auf reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS), und vermittelt dessen Ubiquitinierung und proteosomalen Abbau. Beim Auftreten von oxidativem Stress kommt es durch die Modifikation von Cysteinresten zu einer Konformationsänderung

von KEAP1, was eine Freisetzung von NRF2 mit anschließender Translokation in den Zellkern mit Aktivierung zahlreicher zytoprotektiv wirkender Zielgene zur Folge hat. In der Tumorbilogie ist KEAP1 bisher als Tumorsuppressor eingeordnet worden. Dies bezieht sich insbesondere auf das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, wo Deletionen und inaktivierende Mutationen von KEAP1 zu einer Überaktivität von NRF2 führen, die mit einem verstärkten Schutz der malignen Zelle vor hohem oxidativen Stress einhergeht, wie er in diesen in typischer Weise vorkommt (Dinkova-Kostova et al., 2002; Jaramillo and Zhang, 2013; Zhang et al., 2004). In einem Screen ausgewählter bekannter Onkogene wäre KEAP1 also ebenso wenig berücksichtigt worden wie bei der Auswahl differenziell exprimierter Gene.

Als Kandidatengen selbst ist KEAP1 darüber hinaus aufgrund der bisher bekannten Biologie mechanistisch sehr interessant. In weiterführenden Arbeiten soll die Rolle von KEAP1 im Hodgkin-Lymphom für die Zellbiologie untersucht werden. Dabei ist nicht nur die klassische KEAP1-NRF2-Achse von Interesse, sondern vor allem die Frage nach neuen, bisher unzureichend beschriebenen KEAP1-Funktionen. Dies verbindet sich mit der Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus der dualen Rolle von KEAP1 als Tumorsuppressor im Lungenkarzinom und Onkogen im Hodgkin-Lymphom.

4.3 Zusammenfassende Beurteilung der CRISPR/Cas9-Screens im Hodgkin-Lymphom

Mit dem genomweiten CRISPR/Cas9-Screen und dem folgenden Re-Screen konnten über 40 Kandidatengene für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms identifiziert werden. Dabei wurden mit Kandidatengenen aus dem NF- κ B und JAK/STAT-Signalweg, den Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie und IRF4 sowie dem Zellzyklusregulator Cyclin D2 zahlreiche bekannte wichtige Faktoren im cHL erfasst. Damit konnten in einer einzigen Arbeit nahezu alle in den letzten 20 Jahren mühsam erarbeiteten cHL-assozierten Signalwege nachvollzogen werden. Einerseits validiert hierbei das Finden dieser bekannten Faktoren die technische Herangehensweise wie bioinformatische Auswertung des Screens. Umgekehrt kann auch der Screen diese bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Pathogenese des cHL validieren. Dabei stellt der Ansatz des genomweiten Screenings eine erste unvoreingenommene (da eben genomweite) Analyse der tumorbiologisch relevanten Treiber der Hodgkin-Pathogenese

dar. Durch diese offene, von allen bisherigen Hypothesen zur Pathogenese des cHL unabhängige Herangehensweise („*discovery-driven*“) konnten so neue Kandidatengene wie HENMT1 und KEAP1 identifiziert werden, die in auf bisherigen Hypothesen aufbauenden Untersuchungen („*hypothesis-driven*“) nicht berücksichtigt worden wären. Zugleich steht durch den Ansatz des CRISPR/Cas9-basierten *knockout* die funktionelle Relevanz der untersuchten Gene für das Überleben und Wachstum der Hodgkin-Zellen im Fokus. Dies unterscheidet diese Analysen elementar von der Untersuchung von Expressionsprofilen und Sequenzierung, d.h. es wurden die relevanten Treiber des cHL jenseits der klassischen Kriterien von Überexpression und genomischen Aberrationen identifiziert. So ist bspw. auch das neu identifizierte Kandidatengene KEAP1 ubiquitär, also nicht differentiell und Hodgkin-spezifisch, exprimiert und im cHL auch auf genomischer Ebene nicht verändert. Es wäre damit durch die klassischen Analysen von Überexpression und genomischen Aberrationen nicht entdeckt worden.

Schließlich erlaubt das parallele Screening (zunächst genomweit und anschließend unter 141 ausgewählten potentiellen Kandidatengenen) die Möglichkeit des direkten Vergleiches der Effekte eines *knockouts* aller möglichen Kandidatengene relativ zueinander und damit bis zu einem gewissen Grad eine Gewichtung ihrer funktionellen Relevanz. Dies wurde bspw. anhand von IRF4 deutlich, für das ein Effekt beobachtet werden konnte, der in seiner Stärke deutlich über den anderer identifizierter und bekannter Transkriptionsfaktoren hinaus reichte.

Es ist jedoch anzumerken, dass dieser Screen keinen Anspruch auf eine vollständige Erfassung aller relevanten Treiber der cHL-Pathogenese erheben kann und will. Dies liegt an den technischen und experimentellen Bedingungen, wie z. B. an den oben diskutierten Limitationen der verwendeten genomweiten CRISPR/Cas9 *library*, die eine Erstgeneration-Bibliothek mit noch eingeschränkter Effizienz darstellt, sowie an der limitierten Zahl verwendeter Hodgkin- und Kontrollzelllinien. Verbesserte Bibliotheken, insbesondere solche mit einem speziellen Fokus, können durchaus zu einer verfeinerten Analyse mit zusätzlichen Kandidatengenen führen.

Darüber hinaus können zwar durch das CRISPR/Cas9-System prinzipiell auch nicht kodierende Bereiche des Genoms und der Einfluss von epigenetischen Modifikationen untersucht werden, durch den ausgewählten Screen mit der GeCKO-Bibliothek wurden in dieser Arbeit jedoch nur die Effekte eines *knockouts* von Zielgenen untersucht. Eine weitere Limitation ist die Arbeit mit Zelllinien: Diese stellen ein (dedifferenziertes) spätes Stadium der Erkrankung dar, sind vollständig immortalisiert mit einer hohen Last an

genetischen Aberrationen und wachsen unabhängig des im cHL eigentlich besonders wichtigen Tumormicroenvironments. Veränderungen, die unter Umständen sehr wichtig für die Entwicklung des cHL sind, aber ggf. für den Erhalt des dann erreichten dedifferenzierten Stadiums wieder entbehrlich sind, werden so durch das funktionelle *knockout*-Screening in etablierten Zelllinien nicht (mehr) identifiziert. Zudem können nur intrinsische Faktoren der Hodgkin-Zellen erfasst werden während Interaktionen mit dem Tumormicroenvironment nicht oder nur schlecht zu untersuchen sind – was gerade im cHL mit seinen komplexen Wechselwirkungen mit dem Tumormicroenvironment, das gegenüber ca. 1% HRS-Zellen den Großteil der Zellen im betroffenen Gewebe ausmacht, eine wichtige Limitation darstellt.

In weiterführenden Arbeiten gilt es nun, die aus den CRISPR-Screens gewonnenen Ergebnisse für die Erprobung neuer Therapieoptionen zu nutzen und hierzu beispielsweise wie beschrieben den Einsatz gezielter Inhibitoren des alternativen NF- κ B Signalwegs (NIK-Inhibitoren) und/oder der CCND2-CDK4/6-Achse (Palbociclib) in weiteren *in vitro* und folgenden *in vivo* Experimenten zu untersuchen. Um solche Therapieoptionen in Zukunft auch für die neu identifizierten Kandidatengene entwickeln zu können, soll deren tumorbiologisches Wirkprinzip weiter entschlüsselt werden. So soll unter anderem geklärt werden, welcher molekulare Mechanismus der dualen Rolle von KEAP1 als Tumorsupressor im Lungenkarzinom und Onkogen im Hodgkin-Lymphom zugrunde liegt. Zu diesem Zweck werden in einer anderen Arbeit die Interaktionspartner von KEAP1 im Hodgkin-Lymphom mit Hilfe von Immunpräzipitation und Massenspektrometrie ermittelt sowie die Effekte eines KEAP1-*knockouts* auf Transkriptom und Proteom untersucht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson, B., Smogorzewska, A., Sigoillot, F.D., King, R.W., and Elledge, S.J. (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat. Cell Biol.* *14*(3), 318–328.
- Aldinucci, D., Celegato, M., Borghese, C., Colombatti, A., and Carbone, A. (2011). IRF4 silencing inhibits Hodgkin lymphoma cell proliferation, survival and CCL5 secretion. *Br. J. Haematol.* *152*(2), 182–190.
- Alexander, L.T., Möbitz, H., Drucekes, P., Savitsky, P., Fedorov, O., Elkins, J.M., Deane, C.M., Cowan-Jacob, S.W., and Knapp, S. (2015). Type II Inhibitors Targeting CDK2. *ACS Chem. Biol.* *10*(9), 2116–2125.
- Alperovich, A., and Younes, A. (2016). Targeting CD30 using brentuximab vedotin in the treatment of Hodgkin lymphoma. *Cancer J. (United States)* *22*(1), 23–26.
- Bai, M., Tsanou, E., Agnantis, N.J., Kamina, S., Grepí, C., Stefanaki, K., Rontogianni, D., Galani, V., and Kanavaros, P. (2004). Proliferation profile of classical Hodgkin's lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Mod. Pathol.* *17*(11), 1338–1345.
- Bargou, R.C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M.Y., Bommert, K., Royer, H.D., Scheidereit, C., and Dörken, B. (1996). High-level nuclear NF- κ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* *87*(10), 4340–4347.
- Barth, T.F.E., Martin-Subero, J.I., Joos, S., Menz, C.K., Hasel, C., Mechttersheimer, G., Parwaresch, R.M., Lichter, P., Siebert, R., and Möller, P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *101*(9), 3681–3686.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* *15*(3), 172–184.
- Baus, D., and Pfitzner, E. (2006). Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int. J. Cancer* *118*(6), 1404–1413.
- Bernards, R., Brummelkamp, T.R., and Beijersbergen, R.L. (2006). shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nat. Methods* *3*(9), 701–706.
- Blaquiere, N., Castanedo, G.M., Burch, J.D., Berezhkovskiy, L.M., Brightbill, H., Brown, S., Chan, C., Chiang, P.C., Crawford, J.J., Dong, T., Fan, P., Feng, J., Ghilardi, N., Godemann, R., Gogol, E., Grabbe, A., Hole, A.J., Hu, B., Hymowitz, S.G., Ismaili, M., Hicham A., Le, H., Lee, P., Lee, W., Lin, X., Liu, N., McEwan, P.A., McKenzie, B., Silvestre, H.L., Suto, E., Sujatha-Bhaskar, S., Wu, G., Wu, L.C., Zhang, Y., Zhong, Z., and Staben, S.T. (2018). Scaffold-Hopping Approach to Discover Potent, Selective, and Efficacious Inhibitors of NF- κ B Inducing Kinase. *J. Med. Chem.* *61*(15), 6801–6813.
- Blom, B., and Spits, H. (2006). Development of Human Lymphoid Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *24*(1), 287–320.
- Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* *25*(6), 280–288.

- Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M., and Van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* *42*(22), e168.
- Buettner, M., Greiner, A., Avramidou, A., Jäck, H.M., and Niedobitek, G. (2005). Evidence of abortive plasma cell differentiation in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Hematol. Oncol.* *23*(3-4), 127–132.
- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F., and Hay, R.T. (1999). Mutations in the IκBα gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IκBα. *Oncogene* *18*(20), 3063–3070.
- Carbone, A., Gloghini, A., Aldinucci, D., Gattei, V., Dalla-Favera, R., and Gaidano, G. (2002). Expression pattern of MUM1/IRF4 in the spectrum of pathology of Hodgkin's disease. *Br. J. Haematol.* *117*(2), 366–372.
- Carbone, P.P., Kaplan, H.S., Musshoff, K., Smithers, D.W., and Tubiana, M. (1971). Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Procedures. *Cancer Res.* *31*(11), 1860–1861.
- Castanedo, G.M., Blaquiere, N., Beresini, M., Bravo, B., Brightbill, H., Chen, J., Cui, H.F., Eigenbrot, C., Everett, C., Feng, J., Godemann, R., Gogol, E., Hymowitz, S., Johnson, A., Kayagaki, N., Kohli, P.B., Knüppel, K., Kraemer, J., Krüger, S., Loke, P., McEwan, P., Montalbetti, C., Roberts, D.A., Smith, M., Steinbacher, S., Sujatha-Bhaskar, S., Takahashi, R., Wang, X., Wu, L.C., Zhang, Y., and Staben, S.T. (2017). Structure-based design of tricyclic NF-κB inducing kinase (NIK) inhibitors that have high selectivity over phosphoinositide-3-kinase (PI3K). *J. Med. Chem.* *60*(2), 627–640.
- Chu, V.T., Graf, R., Wirtz, T., Weber, T., Favret, J., Li, X., Petsch, K., Tran, N.T., Sieweke, M.H., Berek, C., Kühn, R., and Rajewsky, K. (2016). Efficient CRISPR-mediated mutagenesis in primary immune cells using CrispRGold and a C57BL/6 Cas9 transgenic mouse line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*(44), 12514–12519.
- Cochet, O., Frelin, C., Peyron, J.F., and Imbert, V. (2006). Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cell. Signal.* *18*(4), 449–455.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* (80-). *339*(6121), 819–823.
- Cooper, G.M., and Hausmann R.E. (2013). The Cell Cycle. In: *The Cell - A Molecular Approach*. 6th Edition. Sunderland, Massachusetts U.S.A. Sinauer Associates 2013, 641-80
- Corcoran, L.M., Karvelas, M., Nossal, G.J.V., Ye, Z.S., Jacks, T., and Baltimore, D. (1993). Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev.* *7*(4), 570–582.
- Davis, E.R., Brown, K.D., Siebenlist, U., and Staudt, L.M. (2001). Constitutive nuclear factor κB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* *194*(12), 1861–1874.
- DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science.* *288*(5470), 1439–1441.

Diehl, V., Pfreundschuh, M., Fonatsch, C., Stein, H., Falk, M., Burrichter, H., and Schaadt, M. (1985). Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. *Cancer Surv.* 4(2), 399–419.

Diehl, V., Thomas, R.K., and Re, D. (2004). Part II: Hodgkin's lymphoma - Diagnosis and treatment. *Lancet Oncol.* 5(1), 19–26.

Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(18), 11908–11913.

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., and 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(16), 3484–3494.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-). 346(6213), 1258096.

Drexler, H.G., Gignac, S.M., Hoffbrand, A. V., Leber, B.F., Norton, J., Lok, M.S., and Minowada, J. (1989). Characterization of Hodgkin's disease derived cell line HDLM-2. *Recent Results Cancer Res.* 117, 75–82.

DSMZ - L428 (ACC197): <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-197> ; zugegriffen am 18.09.2019.

DSMZ - L1236(ACC530): <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-530> ; zugegriffen am 18.09.2019.

DSMZ - BJAB (ACC757): <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-757> ; zugegriffen am 18.09.2019.

Dutton, A., Reynolds, G.M., Dawson, C.W., Young, L.S., and Murray, P.G. (2005). Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J. Pathol.* 205(4), 498–506.

Emmerich, F., Meiser, M., Hummel, M., Demel, G., Foss, H.D., Jundt, F., Mathas, S., Krappmann, D., Scheidereit, C., Stein, H., and Dörken, B. (1999). Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF- κ B activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94(9), 3129–3134.

Emmerich, F., Theurich, S., Hummel, M., Haeffker, A., Vry, M.S., Döhner, K., Bommert, K., Stein, H., and Dörken, B. (2003). Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J. Pathol.* 201(3), 413–420.

Engert, A., and Skoetz, N. (2013). Hodgkin Lymphom S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten. Leitlinienprogr. Onkol. Der AWMF, Dtsch. Krebsgesellschaft e.V. Und Dtsch. Krebshilfe e.V. 1–158.

Engert, A., Diehl, V., Franklin, J., Lohri, A., Dörken, B., Ludwig, W.D., Koch, P., Hänel, M., Pfreundschuh, M., Wilhelm, M., Trümper, L., Aulitzky, W.E., Bentz, M., Rummel, M., Sezer, O., Müller-Hermelink, H.K., Hasenclever, D., and Löffler, M. (2009). Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 Years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J. Clin. Oncol.* 27(27), 4548–4554.

Engert, A., Plütschow, A., Eich, H.T., Lohri, A., Dörken, B., Borchmann, P., Berger, B., Greil, R., Willborn, K.C., Wilhelm, M., Debus, J., Eble, M.J., Sökler, M., Ho, A., Rank, A., Ganser, A., Trümper, L., Bokemeyer, C., Kirchner, H., Schubert, J., Král, Z., Fuchs, M., Müller-Hermelink, H.K., Müller, R.P., and Diehl, V. (2010). Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 363(7), 640–652.

Epstein, A.L., Levy, R., Kim, H., Henle, W., Henle, G., and Kaplan, H.S. (1978). Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines. *Cancer* 42(5), 2379–2391.

Finkbeiner, S. Real Fast Mini Preps. Gladstone Institutes:

<http://gladstone.org/u/sfinkbeiner/labdocs/dnatech/Real.Fast.Mini.Preps.pdf> ; zugegriffen am 12.11.2019.

Fiumara, P., Snell, V., Li, Y., Mukhopadhyay, A., Younes, M., Gillenwater, A.M., Cabanillas, F., Aggarwal, B.B., and Younes, A. (2001). Functional expression of receptor activator of nuclear factor κ B in Hodgkin disease cell lines. *Blood* 98(9), 2784–2790.

Fry, D.W., Harvey, P.J., Keller, P.R., Elliott, W.L., Meade, M.A., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X.X., Leopold, W.R., Pryer, N.K., and Toogood, P.L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 3(11), 1427–1438.

Gamboa-Cedeño, A.M., Castillo, M., Xiao, W., Waldmann, T.A., and Ranuncolo, S.M. (2019). Alternative and canonical NF- κ B pathways DNA-binding hierarchies networks define Hodgkin lymphoma and Non-Hodgkin diffuse large B Cell lymphoma respectively. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 145(6), 1437–1448.

Georgakis, G. V., Li, Y., Rassidakis, G.Z., Medeiros, L.J., Mills, G.B., and Younes, A. (2006). Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* 132(4), 503–511.

Ghia, P., Ten Boekel, E., Sanz, E., De La Hera, A., Rolink, A., and Melchers, F. (1996). Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J. Exp. Med.* 184(6), 2217–2229.

Gibson, D.G. (2009). Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 37(20), 6984–6990.

Grandgenett, D.P., and Mumm, S.R. (1990). Unraveling retrovirus integration. *Cell* 60(1), 3–4.

Green, M.R., Rodig, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Sinha, P., O'Donnell, E., Neuberg, D., and Shipp, M.A. (2012). Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: Implications for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* 18(6), 1611–1618.

de Groot, A.F., Kuijpers, C.J., and Kroep, J.R. (2017). CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: A review. *Cancer Treat. Rev.* 60, 130–138.

- Hinz, M., Löser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dörken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NF- κ B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 97(9), 2798–2807.
- Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dörken, B., Zenke, M., Stein, H., and Scheidereit, C. (2002). Nuclear factor κ B-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.*
- Hodgkin (1832). On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *J. R. Soc. Med.* 17, 68–114.
- Hodgson, D.C. (2011). Late effects in the era of modern therapy for Hodgkin lymphoma. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2011, 323–329.
- Von Hoff, L., Kärgel, E., Franke, V., McShane, E., Schulz-Beiss, K.W., Patone, G., Schleussner, N., Kolesnichenko, M., Hübner, N., Daumke, O., Selbach, M., Akalin, A., Mathas, S., and Scheidereit, C. (2019). Autocrine LTA signaling drives NF- κ B and JAK-STAT activity and myeloid gene expression in Hodgkin lymphoma. *Blood* 133(13), 1489–1494.
- Ishiguro, A., Spirin, K.S., Shiohara, M., Tobler, A., Gombart, A.F., Israel, M.A., Norton, J.D., and Koeffler, H.P. (1996). Id2 expression increases with differentiation of human myeloid cells. *Blood* 87(12), 5225–5231.
- Janz, M., Hummel, M., Truss, M., Wollert-Wulf, B., Mathas, S., Jöhrens, K., Hagemeyer, C., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B., and 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(6), 2536–2539.
- Jaramillo, M.C., and Zhang, D.D. (2013). The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev.* 27(20), 2179–2191.
- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* 13(7), 1549–1556.
- Joos, S., Küpper, M., Ohl, S., Von Bonin, F., Mechttersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Möller, P., Pfreundschuh, M., Trümper, L., et al. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30 + Hodgkin cells. *Cancer Res.* 60(3), 549–552.
- Jost, P.J., and Ruland, J. (2007). Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: Mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109, 2700–2707.
- Jundt, F., Kley, K., Anagnostopoulos, I., Pröbsting, K.S., Greiner, A., Mathas, S., Scheidereit, C., Wirth, T., Stein, H., and Dörken, B. (2002a). Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 99(8), 3060–3062.
- Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Förster, R., Mathas, S., Stein, H., and Dörken, B. (2002b). Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99(9), 3398–3403.

- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Bräuninger, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., and 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*(2), 395-402.
- Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S.J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J.L., Rabinovich, G.A., and Shipp, M.A. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed-Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*(32), 13134–13139.
- Kaileh, M., and Sen, R. (2012). NF- κ B function in B lymphocytes. *Immunol. Rev.* *246*(1), 254–271.
- Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1996a). 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*(4), 1495–1505.
- Kanzler, H., Hansmann, M.L., Kapp, U., Wolf, J., Diehl, V., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1996b). Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (L1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells of a Hodgkin's lymphoma patient. *Blood* *87*(8), 3429–3436.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.* *17*(6), 1700–1709.
- Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* *8*(1), 22–33.
- Klein, G., Lindahl, T., Jondal, M., Leibold, W., Menézes, J., Nilsson, K., and Sundström, C. (1974). Continuous lymphoid cell lines with characteristics of B cells (bone marrow derived), lacking the Epstein Barr virus genome and derived from three human lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*(8), 3283–3286.
- Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.P., Velasco-Herrera, M.D.C., and Yusa, K. (2014). Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.* *32*(3), 267–273.
- Krappmann, D., Emmerich, F., Kordes, U., Scharschmidt, E., Do, B., and Scheidereit, C. (1999). Molecular mechanisms of constitutive NF- κ B / Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* *18*(4), 943–953.
- Kreher, S., Bouhlef, M.A., Cauchy, P., Lamprecht, B., Li, S., Grau, M., Hummel, F., Köchert, K., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Hummel, M., Hiscott, J., Wenzel, S.S., Lenz, P., Schneider, M., Küppers, R., Scheidereit, C., Giefing, M., Siebert, R., Rajewsky, K., Lenz, G., Cockerill, P.N., Janz, M., Dörken, B., Bonifer, C., and Mathas, S. (2014). Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*(42), E4513-22.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *5*(4), 251–262.
- Küppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer* *9*(1), 15–27.

- Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M.L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*(23), 10962–10966.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* *341*(20), 1520–1529.
- Küppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Bräuninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Califano, A., Hansmann, M.L., and Dalla-Favera, R. (2003). Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J. Clin. Invest.* *111*(4), 529–537.
- Lai, R., McDonnell, T., O'Connor, S., Medeiros, L., Oudat, R., Keating, M., Morgan, M., Curiel, T., and Ford, R. (2002). Establishment and characterization of a new mantle cell lymphoma cell line, Mino. *Leuk. Res.* *26*(9), 849–855.
- Lam, K.P., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* *90*(6), 1073–1083.
- Lam, L.T., Davis, R.E., Pierce, J., Hepperle, M., Xu, Y., Hottelot, M., Nong, Y., Wen, D., Adams, J., Dang, L., and Staudt, L.M. (2005). Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin. Cancer Res.* *11*(1), 28–40.
- Lau, A., Villeneuve, N., Sun, Z., Wong, P., and Zhang, D. (2008). Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* *58*(5-6), 262–270.
- Leonard, J.P., LaCasce, A.S., Smith, M.R., Noy, A., Chirieac, L.R., Rodig, S.J., Yu, J.Q., Vallabhajosula, S., Schoder, H., English, P., Neuberg, D.S., Martin, P., Millenson, M.M., Ely, S.A., Courtney, R., Shaik, N., Wilner, K.D., Randolph, S., Van Den Abbeele, A.D., Chen-Kiang, S.Y., Yap, J.T., and Shapiro, G.I. (2012). Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma. *Blood* *119*(20), 4597–4607.
- Lim, S.L., Qu, Z.P., Kortschak, R.D., Lawrence, D.M., Geoghegan, J., Hempfling, A.L., Bergmann, M., Goodnow, C.C., Ormandy, C.J., Wong, L., Mann, J., Scott, H.S., Jamsai, D., Adelson, D.L., and O'Bryan, M.K. (2015). HENMT1 and piRNA Stability Are Required for Adult Male Germ Cell Transposon Repression and to Define the Spermatogenic Program in the Mouse. *PLoS Genet.* *11*(10), 1–30.
- Limon, J.J., and Fruman, D.A. (2012). Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front. Immunol.* *3*, 228.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* *376*(6537), 263–267.
- Lollies, A., Hartmann, S., Schneider, M., Bracht, T., Weiß, A.L., Arnolds, J., Klein-Hitpass, L., Sitek, B., Hansmann, M.L., Küppers, R., and Weniger, M.A. (2018). An oncogenic axis of STAT-mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* *32*(1), 92–101.
- Malin, S., McManus, S., Cobaleda, C., Novatchkova, M., Delogu, A., Bouillet, P., Strasser, A., and Busslinger, M. (2010). Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat. Immunol.* *11*(2), 171–179.

- Martín-Subero, J.I., Gesk, S., Harder, L., Sonoki, T., Tucker, P.W., Schlegelberger, B., Grote, W., Novo, F.J., Calasanz, M.J., Hansmann, M.L., Dyer, M.J., and Siebert, R. (2002). Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99(4), 1474-7.
- Marzec, M., Kasprzycka, M., Lai, R., Gladden, A.B., Wlodarski, P., Tomczak, E., Nowell, P., DePrimo, S.E., Sadis, S., Eck, S., Schuster, S.J., Diehl, J.A., and Wasik, M.A. (2006). Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity. *Blood* 108(5), 1744-50.
- Massari, M.E., Rivera, R.R., Volland, J.R., Quong, M.W., Breit, T.M., van Dongen, J.J.M., de Smit, O., and Murre, C. (1998). Characterization of ABF-1, a Novel Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Expressed in Activated B Lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18(6), 3130–3139.
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., and Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *EMBO J.* 21(15), 4104–4113.
- 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- κ B p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 106(13), 4287–4293.
- 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., and Dörken, Bernd (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(2), 207–215.
- Matthias, P., and Rolink, A.G. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 5(6), 497–508.
- Mottok, A., and Steidl, C. (2018). Biology of classical Hodgkin lymphoma: Implications for prognosis and novel therapies. *Blood* 131, 1654–1665.
- de Oliveira, K.A.P., Kaergel, E., Heinig, M., Fontaine, J.F., Patone, G., Muro, E.M., Mathas, S., Hummel, M., Andrade-Navarro, M.A., Hübner, N., and Scheidereit, C. (2016). A roadmap of constitutive NF- κ B activity in hodgkin lymphoma: Dominant roles of p50 and p52 revealed by genome-wide analyses. *Genome Med.* 8(1), 28.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 11(3), 961–971.
- Parnas, O., Jovanovic, M., Eisenhaure, T.M., Herbst, R.H., Dixit, A., Ye, C.J., Przybylski, D., Platt, R.J., Tirosh, I., Sanjana, N.E., Shalem, O., Satija, R., Raychowdhury, R., Mertins, P., Carr, S.A., Zhang, F., Hacohen, N., and Regev, A. (2015). A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell* 162, 675–686.
- Peng, L., Zhang, F., Shang, R., Wang, X., Chen, J., Chou, J.J., Ma, J., Wu, L., and Huang, Y. (2018). Identification of substrates of the small RNA methyltransferase Hen1 in mouse spermatogonial stem cells and analysis of its methyl-transfer domain. *J. Biol. Chem.* 293(26), 9981–9994.
- Pines, J., and Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346(6286), 760–763.

Rad, R., Rad, L., Wang, W., Cadinanos, J., Vassiliou, G., Rice, S., Campos, L.S., Yusa, K., Banerjee, R., Li, M.A., De La Rosa, J., Strong, A., Lu, D., Ellis, P., Conte, N., Yang, F.T., Liu, P., and Bradley, A. (2010). PiggyBac transposon mutagenesis: A tool for cancer gene discovery in mice. *Science*. *330*(6007), 1104–1107.

Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J.M., Kridel, R., Chan, F.C., Meissner, B., Bhang, H.E., Ruddy, D., Kauffmann, A., Farsidjani, A., Derti, A., Rakiec, D., Naylor, T., Pfister, E., Kovats, S., Kim, S., Dietze, K., Dörken, B., Steidl, C., Tzankov, A., Hummel, M., Monahan, J., Morrissey, M.P., Fritsch, C., Sellers, W.R., Cooke, V.G., Gascoyne, R.D., Lenz, G., and Stegmeier, F. (2014). Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat. Med.* *20*(1), 87–92.

Ranuncolo, S.M., Pittaluga, S., Evbuomwan, M.O., Jaffe, E.S., and Lewis, B.A. (2012). Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival. *Blood* *120*(18), 3756–3763.

Re, D., Müschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V., and Wolf, J. (2001). Oct-2 and bob-1 deficiency in hodgkin and reed sternberg cells. *Cancer Res.* *61*(5), 2080–2084.

Reed, D. (1902). On the pathological changes in Hodgkin's disease with special reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp. Rep.* *10*, 133–193.

Renné, C., Martin-Subero, J.I., Eickernjäger, M., Hansmann, M.L., Küppers, R., Siebert, R., and Bräuninger, A. (2006). Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Pathol.* *169*(2), 655–664.

Rivera, R., and Murre, C. (2001). The regulation and function of the Id proteins in lymphocyte development. *Oncogene* *46*(5), 818–834.

Rolink, A.G., Nutt, S.L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* *401*(6753), 603–606.

Rui, L., Emre, N.C.T., 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., Muller-Hermelink, H.K., Savage, K., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Gascoyne, R.D., Levens, D., and Staudt, L.M. (2010). Cooperative Epigenetic Modulation by Cancer Amplicon Genes. *Cancer Cell* *18*(6), 590–605.

Ryan, M.D., and Drew, J. (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J.* *13*(4), 928–933.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* (80-). *320*(5882), 1496–1501.

Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* *32*(4), 347–350.

Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* *11*(8), 783–784.

Schaadt, M., Diehl, V., Stein, H., Fonatsch, C., and Kirchner, H.H. (1980). Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 26(6), 723–731.

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.M., and Spits, H. (2008). IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: Evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 111(9), 4706–4715.

Schleussner, N., Merkel, O., Costanza, M., Liang, H.C., Hummel, F., Romagnani, C., Durek, P., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Jöhrens, K., Niedobitek, A., Griffin, P.R., Piva, R., Sczakiel, H.L., Woessmann, W., Damm-Welk, C., Hinze, C., Stoiber, D., Gillissen, B., Turner, S.D., Kaergel, E., von Hoff, L., Grau, M., Lenz, G., Dörken, B., Scheidereit, C., Kenner, L., Janz, M., and Mathas, S. (2018). The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 32(9), 1994–2007.

Schultz, N., Marenstein, D.R., De Angelis, D.A., Wang, W.Q., Nelander, S., Jacobsen, A., Marks, D.S., Massagué, J., and Sander, C. (2011). Off-target effects dominate a large-scale RNAi screen for modulators of the TGF- β pathway and reveal microRNA regulation of TGFBR2. *Silence* 2, 3.

Schwering, I., Bräuninger, A., Klein, U., Jungnickel, B., Tinguely, M., Diehl, V., Hansmann, M.L., Dalla-Favera, R., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2003). Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101(4), 1505–1512.

ThermoFisher Scientific - Double Digest Calculator:

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html> ; zugegriffen am 30.10.2019.

Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5), 705–716.

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., and Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 343, 84–87.

Shalem, O., Sanjana, N.E., and Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 16, 299–311.

Singh, A., Boldin-Adamsky, S., Thimmulappa, R.K., Rath, S.K., Ashush, H., Coulter, J., Blackford, A., Goodman, S.N., Bunz, F., Watson, W.H., Gabrielson, E., Feinstein, E., and Biswal, S. (2008). RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res.* 68(19), 7975–7984.

Smith, J.A., and Martin, L. (1973). Do Cells Cycle? (cell kinetics/control of growth/DNA replication/cell culture). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70(4), 1263–1267.

Solvason, N., Wu, W.W., Kabra, N., Wu, X., Lees, E., and Howard, M.C. (1996). Induction of cell cycle regulatory proteins in anti-immunoglobulin-stimulated mature B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184(2), 407–417.

Sorek, R., Lawrence, C.M., and Wiedenheft, B. (2013). CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 237–266.

- Spina, V., Brusca, A., Cuccaro, A., Martini, M., Trani, M. Di, Forestieri, G., Manzoni, M., Condoluci, A., Arribas, A., Terzi-Di-Bergamo, L., Locatelli, Silvia L., Cupelli, E., Ceriani, L., Moccia, A.A., Stathis, A., Nassi, L., Deambrogi, C., Diop, F., Guidetti, F., Cocomazzi, A., Annunziata, S., Rufini, V., Giordano, A., Neri, A., Boldorini, R., Gerber, B., Bertoni, F., Ghielmini, M., Stüssi, G., Santoro, A., Cavalli, F., Zucca, E., Larocca, L.M., Gaidano, G., Hohaus, S., Carlo-Stella, C., and Rossi, D. (2018). Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *131*(22), 2413–2425.
- Staudt, L.M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, P.A., and Baltimore, D. (1986). A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature* *323*(6089), 640–643.
- Sternberg, C. (1898). Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Z. Heilkd.* *19*, 21–90.
- Sultana, T., Zamborlini, A., Cristofari, G., and Lesage, P. (2017). Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat. Rev. Genet.* *18*(5), 292–308.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. (2017). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.
- Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M., and Vignali, D.A.A. (2012). Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.* *2012*(2), 199–204.
- Tanguay, D.A., and Chiles, T.C. (1996). Regulation of the catalytic subunit (p34^{PSK-J3}/cdk4) for the major D-type cyclin in mature B lymphocytes. *J. Immunol.* *156*(2), 539–548.
- Teramoto, N., Pokrovskaja, K., Szekely, L., Polack, A., Yoshino, T., Akagi, T., and Klein, G. (1999). Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions. *Int. J. Cancer* *81*(4), 543–550.
- Thomas, R.K., Re, D., Zander, T., Wolf, J., and Diehl, V. (2002). Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* *13*(4), 147–152.
- Tiacci, E., Ladewig, E., Schiavoni, G., Penson, A., Fortini, E., Pettirossi, V., Wang, Y., Rosseto, A., Venanzi, A., Vlasevska, S., Pacini, R., Piattoni, S., Tabarrini, A., Pucciarini, A., Bigerna, B., Santi, A., Gianni, A.M., Viviani, S., Cabras, A., Ascani, S., Mecucci, C., Pasqualucci, L., Rabadan, R., and Falini, B. (2018). Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *131*(22), 2454–2465.
- Toogood, P.L., Harvey, P.J., Repine, J.T., Sheehan, D.J., VanderWel, S.N., Zhou, H., Keller, P.R., McNamara, D.J., Sherry, D., Zhu, T., Brodfuehrer, J., Choi, C., Barvian, M.R., and Fry, D.W. (2005). Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J. Med. Chem.* *48*(7), 2388–2406.
- Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H.D., and Delabie, J. (2001). The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* *159*(5), 1807–1814.
- Valsami, S., Pappa, V., Rontogianni, D., Kotsioti, F., Papageorgiou, E., Dervenoulas, J., Karmiris, T., Papageorgiou, S., Harhalakis, N., Xiros, N., Nikiforakis, E., and Economopoulos, T. (2007). A clinicopathological study of B-cell differentiation markers and transcription factors in classical Hodgkin's lymphoma: A potential prognostic role of MUM1/IRF4. *Haematologica* *92*(10), 1343–1350.

- Verkuijl, S.A., and Rots, M.G. (2019). The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR–Cas9 editing efficiencies. *Curr. Opin. Biotechnol.* *55*, 68–73.
- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* *343*(6166), 80–84.
- Weniger, M.A., Melzner, I., Menz, C.K., Wegener, S., Bucur, A.J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.F., and 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*(18), 2679–2684.
- Wolf, J., Kapp, U., Bohlen, H., Kornacker, M., Schoch, C., Stahl, B., Mücke, S., Von Kalle, C., Fonatsch, C., Schaefer, H.E., Hansmann, M.L., and Diehl, V. (1996). Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood* *87*(8), 3418–3428.
- Younes, A., Ansell, S., Fowler, N., Wilson, W., De Vos, S., Seymour, J., Advani, R., Forero, A., Morschhauser, F., Kersten, M.J., Tobinai, K., Zinzani, P.L., Zucca, E., Abramson, J., and Vose, J. (2017). The landscape of new drugs in lymphoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*(6), 335–346.
- Zhang, D.D., Lo, S.-C., Cross, J. V., Templeton, D.J., and Hannink, M. (2004). Keap1 Is a Redox-Regulated Substrate Adaptor Protein for a Cul3-Dependent Ubiquitin Ligase Complex. *Mol. Cell. Biol.* *24*(24), 10941–10953.
- Zheng, B., Flumara, P., Li, Y. V., Georgakis, G., Snell, V., Younes, M., Vauthey, J.N., Carbone, A., and Younes, A. (2003). MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: A signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* *102*(3), 1019–1027.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* *79*(5), 875–884.

ANHANG

Ergebnisse des Genomweiten CRISPR/Cas9-Screens: depletierte sgRNAs

Legende: Unterstrichene Kandidaten sind ausgewählt für den Re-Screen

Fette Kandidaten sind beiden Zelllinien (L428 und L1236) gemein

Kandidatengene L428				Kandidatengene L1236			
sgRNA	GeCKO-ID	Verhältnis d21/d1 cHL	Verhältnis zu B-NHL	sgRNA	GeCKO-ID	Verhältnis d21/d1 cHL	Verhältnis zu B-NHL
ABHD17A	HGLibA_00264	0,22	0,51	<u>ABCA7</u>	HGLibA_00122	0,49	0,30
ABHD17A	HGLibB_00264	0,49	0,55	<u>ABCA7</u>	HGLibB_00121	0,53	0,45
AGPAT3	HGLibB_01221	0,53	0,36	ADAMTS15	HGLibA_00807	0,43	0,44
AGPAT3	HGLibB_01222	0,57	0,60	ADAMTS15	HGLibA_00805	0,56	0,50
ANKRD52	HGLibA_02117	0,23	0,53	<u>AOC2</u>	HGLibB_02268	0,47	0,43
ANKRD52	HGLibB_02116	0,56	0,59	<u>AOC2</u>	HGLibB_02267	0,55	0,51
<u>ANXA2</u>	HGLibB_02230	0,43	0,47	APPL1	HGLibA_02566	0,54	0,64
<u>ANXA2</u>	HGLibB_02229	0,47	0,47	APPL1	HGLibA_02565	0,59	0,74
ARCN1	HGLibB_02635	0,31	0,54	<u>AREL1</u>	HGLibB_02641	0,50	0,47
ARCN1	HGLibB_02634	0,56	0,59	<u>AREL1</u>	HGLibB_02640	0,60	0,57
<u>ARF5</u>	HGLibA_02654	0,53	0,18	<u>ARF5</u>	HGLibA_02654	0,53	0,28
<u>ARF5</u>	HGLibA_02655	0,59	0,38	<u>ARF5</u>	HGLibB_02652	0,59	0,59
<u>ARF5</u>	HGLibB_02652	0,60	0,41	<u>ARF5</u>	HGLibA_02655	0,60	0,63
<u>ASPHD1</u>	HGLibA_03354	0,50	0,42	ARHGEF25	HGLibA_02838	0,54	0,37
<u>ASPHD1</u>	HGLibA_03353	0,57	0,44	ARHGEF25	HGLibB_02836	0,58	0,72
<u>ATP2A2</u>	HGLibA_03608	0,30	0,26	ATP5J2	HGLibA_03674	0,11	0,42
<u>ATP2A2</u>	HGLibB_03607	0,50	0,59	ATP5J2	HGLibB_03671	0,48	0,57
ATP2C2	HGLibA_03629	0,42	0,54	ATP6V1G1	HGLibB_03756	0,12	0,50
ATP2C2	HGLibA_03628	0,52	0,55	ATP6V1G1	HGLibB_03755	0,29	0,75
BTAf1	HGLibB_04887	0,38	0,43	<u>BATF3</u>	HGLibA_04180	0,47	0,25
BTAf1	HGLibB_04888	0,47	0,50	<u>BATF3</u>	HGLibB_04176	0,49	0,31
<u>BTF3L4</u>	HGLibA_04939	0,55	0,57	<u>BATF3</u>	HGLibA_04179	0,54	0,43
<u>BTF3L4</u>	HGLibA_04937	0,59	0,60	BCL2L1	HGLibB_04300	0,07	0,52
C12orf44	HGLibB_05242	0,36	0,47	BCL2L1	HGLibB_04301	0,30	0,75
C12orf44	HGLibA_05247	0,39	0,52	<u>C17orf72</u>	HGLibB_05564	0,39	0,49
C17orf96	HGLibB_05589	0,40	0,50	<u>C17orf72</u>	HGLibA_05567	0,49	0,54
C17orf96	HGLibA_05594	0,60	0,60	C19orf80	HGLibB_05706	0,41	0,57
C22orf26	HGLibA_06063	0,04	0,23	C19orf80	HGLibA_05712	0,57	0,75

C22orf26	HGLibB_06057	0,30	0,58	C9orf66	HGLibA_06751	0,48	0,54
<u>CCDC130</u>	HGLibB_07585	0,49	0,53	C9orf66	HGLibB_06748	0,55	0,67
<u>CCDC130</u>	HGLibB_07586	0,59	0,60	<u>CCDC19</u>	HGLibB_07720	0,52	0,51
<u>CCNA2</u>	HGLibA_08055	0,12	0,13	<u>CCDC19</u>	HGLibA_07726	0,54	0,71
<u>CCNA2</u>	HGLibB_08047	0,35	0,53	CCL21	HGLibB_07987	0,37	0,33
<u>CCND2</u>	HGLibB_08069	0,33	0,16	CCL21	HGLibA_07994	0,56	0,51
<u>CCND2</u>	HGLibA_08076	0,36	0,23	<u>CDADC1</u>	HGLibB_08495	0,44	0,49
<u>CCND2</u>	HGLibB_08068	0,59	0,60	<u>CDADC1</u>	HGLibB_08493	0,55	0,72
<u>CDADC1</u>	HGLibB_08493	0,44	0,22	<u>CDC25A</u>	HGLibA_08528	0,45	0,43
<u>CDADC1</u>	HGLibB_08495	0,55	0,56	<u>CDC25A</u>	HGLibB_08521	0,51	0,68
<u>CDC20</u>	HGLibB_08511	0,56	0,38	<u>CDCA2</u>	HGLibB_08595	0,59	0,58
<u>CDC20</u>	HGLibB_08512	0,33	0,43	<u>CDCA2</u>	HGLibB_08596	0,57	0,66
<u>CDC20</u>	HGLibB_08510	0,23	0,49	<u>CEP290</u>	HGLibB_09123	0,36	0,60
<u>CDCA5</u>	HGLibA_08612	0,47	0,26	<u>CEP290</u>	HGLibA_09131	0,52	0,74
<u>CDCA5</u>	HGLibB_08603	0,32	0,37	<u>CHUK</u>	HGLibB_09661	0,20	0,31
<u>CEP290</u>	HGLibB_09123	0,36	0,46	<u>CHUK</u>	HGLibA_09669	0,48	0,37
<u>CEP290</u>	HGLibA_09131	0,52	0,52	<u>CHUK</u>	HGLibA_09670	0,30	0,47
<u>CHUK</u>	HGLibB_09661	0,20	0,39	<u>CHUK</u>	HGLibB_09660	0,53	0,65
<u>CHUK</u>	HGLibB_09660	0,53	0,53	CRABP2	HGLibA_11057	0,53	0,70
<u>COPRS</u>	HGLibB_10700	0,54	0,58	CRABP2	HGLibB_11044	0,54	0,71
<u>COPRS</u>	HGLibB_10698	0,59	0,59	CROT	HGLibA_11213	0,59	0,36
CPSF3	HGLibB_10989	0,23	0,47	CROT	HGLibB_11202	0,54	0,62
CPSF3	HGLibA_11001	0,21	0,58	<u>CRP</u>	HGLibA_11216	0,53	0,21
<u>CST7</u>	HGLibA_11465	0,39	0,53	<u>CRP</u>	HGLibB_11203	0,56	0,39
<u>CST7</u>	HGLibB_11453	0,43	0,56	<u>CST7</u>	HGLibB_11453	0,43	0,53
CTC1	HGLibB_11582	0,49	0,58	<u>CST7</u>	HGLibA_11465	0,39	0,54
CTC1	HGLibB_11581	0,41	0,60	CYP2E1	HGLibB_12116	0,56	0,44
DAB2	HGLibA_12268	0,57	0,38	CYP2E1	HGLibB_12117	0,55	0,54
DAB2	HGLibB_12256	0,38	0,55	DGKB	HGLibB_13044	0,54	0,54
<u>DDX18</u>	HGLibA_12661	0,30	0,44	DGKB	HGLibB_13043	0,56	0,70
<u>DDX18</u>	HGLibB_12645	0,25	0,51	<u>DNMBP</u>	HGLibA_13695	0,59	0,37
<u>DDX18</u>	HGLibA_12659	0,41	0,58	<u>DNMBP</u>	HGLibB_13676	0,53	0,51
DDX59	HGLibB_12743	0,26	0,45	<u>DNMT3B</u>	HGLibA_13705	0,28	0,35
DDX59	HGLibA_12743	0,40	0,52	<u>DNMT3B</u>	HGLibB_13705	0,54	0,42

	12757				13684		
DNAH8	HGLibB_	0,60	0,53	<u>DPM2</u>	HGLibA_	0,37	0,44
	13479				13861		
DNAH8	HGLibB_	0,57	0,58	<u>DPM2</u>	HGLibB_	0,34	0,49
	13480				13838		
<u>DNM1</u>	HGLibB_	0,56	0,29	DYNLRB1	HGLibB_	0,36	0,35
	13664				14237		
<u>DNM1</u>	HGLibB_	0,59	0,30	DYNLRB1	HGLibA_	0,31	0,67
	13663				14259		
<u>DNMBP</u>	HGLibA_	0,59	0,48	<u>DYRK1A</u>	HGLibA_	0,22	0,35
	13695				14271		
<u>DNMBP</u>	HGLibB_	0,53	0,49	<u>DYRK1A</u>	HGLibA_	0,49	0,68
	13676				14272		
<u>DNMTIP2</u>	HGLibA_	0,54	0,49	<u>EFCAB2</u>	HGLibA_	0,47	0,45
	13722				14536		
<u>DNMTIP2</u>	HGLibB_	0,52	0,53	<u>EFCAB2</u>	HGLibB_	0,53	0,49
	13701				14514		
<u>DUX2</u>	HGLibA_	0,47	0,43	ERBB3	HGLibB_	0,56	0,61
	14202				15396		
<u>DUX2</u>	HGLibB_	0,54	0,50	ERBB3	HGLibA_	0,55	0,65
	14181				15419		
<u>EEF2</u>	HGLibA_	0,46	0,16	<u>EXOC7</u>	HGLibA_	0,38	0,38
	14507				15759		
<u>EEF2</u>	HGLibA_	0,41	0,31	<u>EXOC7</u>	HGLibA_	0,55	0,48
	14508				15760		
<u>EEF2</u>	HGLibB_	0,43	0,42	FAHD2B	HGLibA_	0,55	0,57
	14485				15961		
<u>EFCAB2</u>	HGLibB_	0,53	0,33	FAHD2B	HGLibB_	0,40	0,69
	14514				15940		
<u>EFCAB2</u>	HGLibA_	0,47	0,53	FGF21	HGLibB_	0,59	0,58
	14536				17373		
<u>EIF1</u>	HGLibB_	0,25	0,15	FGF21	HGLibB_	0,49	0,65
	14683				17374		
<u>EIF1</u>	HGLibA_	0,26	0,54	<u>FNDC3B</u>	HGLibA_	0,57	0,68
	14705				17750		
EIF2B1	HGLibA_	0,28	0,43	<u>FNDC3B</u>	HGLibB_	0,37	0,71
	14736				17728		
EIF2B1	HGLibB_	0,55	0,56	GGA2	HGLibA_	0,54	0,69
	14713				18984		
EIF2B5	HGLibB_	0,24	0,52	GGA2	HGLibB_	0,59	0,75
	14726				18959		
EIF2B5	HGLibB_	0,44	0,53	GLI1	HGLibA_	0,60	0,54
	14725				19247		
EIF2S3	HGLibA_	0,50	0,38	GLI1	HGLibA_	0,56	0,54
	14760				19246		
EIF2S3	HGLibA_	0,55	0,54	GNL3L	HGLibB_	0,57	0,58
	14758				19525		
EIF3A	HGLibB_	0,49	0,55	GNL3L	HGLibB_	0,41	0,73
	14741				19527		
EIF3A	HGLibB_	0,56	0,59	GOLGA6L4	HGLibA_	0,30	0,53
	14740				19625		
<u>EIF3D</u>	HGLibA_	0,35	0,21	GOLGA6L4	HGLibA_	0,47	0,65
	14773				19626		
<u>EIF3D</u>	HGLibA_	0,29	0,39	<u>GPD1L</u>	HGLibA_	0,60	0,35
	14774				19785		
<u>EIF3D</u>	HGLibA_	0,47	0,54	<u>GPD1L</u>	HGLibB_	0,59	0,36
	14775				19757		
<u>EXOSC3</u>	HGLibA_	0,47	0,30	GTF3C6	HGLibA_	0,58	0,49
	15777				20594		
<u>EXOSC3</u>	HGLibB_	0,34	0,43	GTF3C6	HGLibA_	0,32	0,65
	15757				20596		
FBN3	HGLibA_	0,56	0,52	HADHB	HGLibB_	0,32	0,18
	16962				20783		
FBN3	HGLibB_	0,55	0,55	HADHB	HGLibB_	0,47	0,61
	16939				20784		
<u>FBXO41</u>	HGLibA_	0,50	0,40	<u>HIST2H2AB</u>	HGLibA_	0,53	0,42
	17095				21529		

<u>FBXO41</u>	HGLibA_	0,50	0,47	<u>HIST2H2AB</u>	HGLibB_	0,57	0,65
	17097				21501		
<u>FGF21</u>	HGLibB_	0,59	0,37	<u>HIST2H2AB</u>	HGLibB_	0,44	0,71
	17373				21499		
<u>FGF21</u>	HGLibB_	0,49	0,55	<u>HNRNPH1</u>	HGLibA_	0,57	0,48
	17374				21823		
<u>GOLPH3</u>	HGLibB_	0,32	0,28	<u>HNRNPH1</u>	HGLibB_	0,41	0,58
	19628				21794		
<u>GOLPH3</u>	HGLibB_	0,60	0,42	hsa-mir-548q	HGLibA_	0,41	0,46
	19629				27113		
GPX4	HGLibA_	0,55	0,50	hsa-mir-548q	HGLibA_	0,43	0,48
	20179				27112		
GPX4	HGLibB_	0,40	0,56	ICAM1	HGLibB_	0,52	0,40
	20152				22464		
GTF2A1	HGLibB_	0,48	0,53	ICAM1	HGLibB_	0,57	0,62
	20491				22462		
GTF2A1	HGLibA_	0,37	0,56	IFT46	HGLibB_	0,57	0,63
	20520				22729		
GUK1	HGLibB_	0,37	0,26	IFT46	HGLibA_	0,47	0,70
	20644				30050		
GUK1	HGLibA_	0,53	0,56	<u>IRF4</u>	HGLibA_	0,19	0,08
	20674				30877		
<u>HENMT1</u>	HGLibA_	0,53	0,47	<u>IRF4</u>	HGLibA_	0,46	0,38
	21135				30878		
<u>HENMT1</u>	HGLibA_	0,57	0,55	<u>IRF4</u>	HGLibB_	0,21	0,54
	21136				23557		
HIATL1	HGLibA_	0,57	0,52	ISG20L2	HGLibB_	0,60	0,59
	21280				23627		
HIATL1	HGLibB_	0,54	0,53	ISG20L2	HGLibB_	0,21	0,72
	21252				23629		
<u>HMGB1</u>	HGLibB_	0,36	0,32	<u>JAK1</u>	HGLibB_	0,17	0,19
	21663				23879		
<u>HMGB1</u>	HGLibB_	0,26	0,59	<u>JAK1</u>	HGLibB_	0,26	0,23
	21662				23880		
<u>HNRNPH1</u>	HGLibA_	0,57	0,39	<u>JAK1</u>	HGLibA_	0,34	0,25
	21823				31202		
<u>HNRNPH1</u>	HGLibB_	0,41	0,59	JAK3	HGLibA_	0,59	0,67
	21794				31207		
HRC	HGLibA_	0,46	0,55	JAK3	HGLibB_	0,51	0,71
	22084				23885		
HRC	HGLibB_	0,46	0,58	<u>JUNB</u>	HGLibA_	0,58	0,30
	22056				31293		
hsa-mir-449a	HGLibA_	0,50	0,54	<u>JUNB</u>	HGLibB_	0,35	0,66
	25472				23972		
hsa-mir-449a	HGLibA_	0,60	0,60	KRTAP4-9	HGLibB_	0,37	0,40
	25471				25744		
hsa-mir-4512	HGLibA_	0,18	0,34	KRTAP4-9	HGLibA_	0,58	0,71
	25545				33068		
hsa-mir-4512	HGLibA_	0,12	0,48	KRTAP9-2	HGLibA_	0,40	0,51
	25544				33121		
hsa-mir-483	HGLibA_	0,30	0,38	KRTAP9-2	HGLibB_	0,32	0,69
	26378				25797		
hsa-mir-483	HGLibA_	0,32	0,53	KRTAP9-6	HGLibA_	0,60	0,71
	26379				33130		
hsa-mir-616	HGLibA_	0,53	0,43	KRTAP9-6	HGLibB_	0,53	0,74
	27754				25806		
hsa-mir-616	HGLibA_	0,52	0,48	LETM1	HGLibA_	0,35	0,54
	27753				33620		
<u>hsa-mir-6878</u>	HGLibA_	0,55	0,23	LETM1	HGLibB_	0,56	0,61
	28752				26296		
<u>hsa-mir-6878</u>	HGLibA_	0,48	0,36	LINGO4	HGLibA_	0,50	0,58
	28751				33882		
<u>HSPA9</u>	HGLibB_	0,32	0,32	LINGO4	HGLibB_	0,58	0,69
	22268				26558		
<u>HSPA9</u>	HGLibA_	0,43	0,50	<u>LPHN2</u>	HGLibA_	0,45	0,42
	29587				34377		
<u>HSPA9</u>	HGLibA_	0,55	0,50	<u>LPHN2</u>	HGLibA_	0,60	0,43

	29586				34378		
<u>HSPE1</u>	HGLibA_	0,31	0,39	LSM5	HGLibA_	0,45	0,53
	29622				34834		
<u>HSPE1</u>	HGLibB_	0,41	0,58	LSM5	HGLibA_	0,47	0,67
	22304				34833		
<u>IFITM3</u>	HGLibA_	0,38	0,42	LSM6	HGLibA_	0,13	0,39
	29936				34835		
<u>IFITM3</u>	HGLibB_	0,19	0,51	LSM6	HGLibB_	0,29	0,61
	22616				27508		
<u>INCENP</u>	HGLibA_	0,24	0,26	LY6E	HGLibA_	0,57	0,58
	30565				34943		
<u>INCENP</u>	HGLibA_	0,60	0,47	LY6E	HGLibA_	0,40	0,71
	30566				34945		
<u>INSL3</u>	HGLibB_	0,15	0,39	MAD2L2	HGLibA_	0,27	0,31
	23351				35140		
<u>INSL3</u>	HGLibB_	0,46	0,41	MAD2L2	HGLibB_	0,51	0,75
	23349				27809		
<u>IRF4</u>	HGLibB_	0,49	0,38	MBTD1	HGLibA_	0,57	0,49
	23556				35820		
<u>IRF4</u>	HGLibA_	0,19	0,44	MBTD1	HGLibA_	0,59	0,63
	30877				35821		
<u>IRF4</u>	HGLibB_	0,21	0,47	MCM10	HGLibB_	0,52	0,26
	23557				28561		
<u>IRF4</u>	HGLibB_	0,34	0,49	MCM10	HGLibA_	0,38	0,62
	23555				35890		
<u>IRF4</u>	HGLibA_	0,46	0,51	<u>METTL2B</u>	HGLibA_	0,43	0,47
	30878				36290		
<u>JAK1</u>	HGLibB_	0,17	0,16	<u>METTL2B</u>	HGLibA_	0,54	0,53
	23879				36292		
<u>JAK1</u>	HGLibB_	0,26	0,35	MIPOL1	HGLibB_	0,58	0,61
	23880				29256		
<u>JAK1</u>	HGLibA_	0,34	0,53	MIPOL1	HGLibB_	0,48	0,66
	31202				29257		
<u>JUNB</u>	HGLibB_	0,35	0,42	MRPS36	HGLibA_	0,49	0,50
	23972				37390		
<u>JUNB</u>	HGLibA_	0,58	0,60	MRPS36	HGLibB_	0,52	0,68
	31293				30061		
<u>KEAP1</u>	HGLibB_	0,52	0,26	MYO1A	HGLibA_	0,56	0,54
	24514				38107		
<u>KEAP1</u>	HGLibA_	0,42	0,57	MYO1A	HGLibB_	0,48	0,61
	31837				30778		
<u>KRTCAP2</u>	HGLibB_	0,55	0,23	<u>NAB2</u>	HGLibA_	0,59	0,28
	25817				38308		
<u>KRTCAP2</u>	HGLibA_	0,53	0,28	<u>NAB2</u>	HGLibA_	0,58	0,65
	33143				38310		
<u>KRTCAP2</u>	HGLibB_	0,47	0,42	<u>NAB2</u>	HGLibB_	0,43	0,74
	25819				30978		
<u>LYRM7</u>	HGLibA_	0,57	0,42	<u>NCAPH</u>	HGLibB_	0,35	0,40
	35045				31233		
<u>LYRM7</u>	HGLibA_	0,53	0,44	<u>NCAPH</u>	HGLibA_	0,53	0,50
	35046				38564		
<u>MAGT1</u>	HGLibA_	0,20	0,32	NCK1	HGLibB_	0,42	0,32
	35300				31263		
<u>MAGT1</u>	HGLibB_	0,52	0,56	NCK1	HGLibA_	0,39	0,73
	27971				38592		
<u>MEIS1</u>	HGLibA_	0,41	0,46	<u>NDC80</u>	HGLibA_	0,30	0,67
	36158				38672		
<u>MEIS1</u>	HGLibB_	0,44	0,50	<u>NDC80</u>	HGLibA_	0,49	0,72
	28830				38670		
<u>MLX</u>	HGLibB_	0,41	0,35	<u>NFKB2</u>	HGLibB_	0,35	0,27
	29396				31775		
<u>MLX</u>	HGLibA_	0,59	0,45	<u>NFKB2</u>	HGLibA_	0,33	0,46
	36727				39105		
<u>MROH1</u>	HGLibB_	0,49	0,42	<u>NFKB2</u>	HGLibB_	0,47	0,66
	29825				31776		
<u>MROH1</u>	HGLibA_	0,41	0,42	<u>NMNAT1</u>	HGLibA_	0,30	0,53
	37154				39473		

<u>MRPL34</u>	HGLibA_	0,48	0,34	<u>NMNAT1</u>	HGLibA_	0,18	0,65
	37244				39472		
<u>MRPL34</u>	HGLibB_	0,16	0,49	NRBP1	HGLibA_	0,50	0,54
	29917				39944		
<u>MUS81</u>	HGLibA_	0,46	0,33	NRBP1	HGLibB_	0,60	0,67
	37863				32612		
<u>MUS81</u>	HGLibB_	0,54	0,43	<u>NRD1</u>	HGLibA_	0,28	0,41
	30532				39951		
MZT1	HGLibA_	0,25	0,43	<u>NRD1</u>	HGLibB_	0,39	0,42
	38228				32619		
MZT1	HGLibB_	0,53	0,59	OSBPL8	HGLibB_	0,36	0,66
	30898				34623		
NELFB	HGLibB_	0,30	0,44	OSBPL8	HGLibA_	0,39	0,66
	31630				41955		
NELFB	HGLibA_	0,15	0,58	OXGR1	HGLibB_	0,60	0,63
	38961				34776		
<u>NFKB2</u>	HGLibA_	0,33	0,57	OXGR1	HGLibB_	0,56	0,68
	39105				34777		
<u>NFKB2</u>	HGLibB_	0,35	0,58	<u>PNPT1</u>	HGLibA_	0,44	0,48
	31775				44719		
<u>NHP2L1</u>	HGLibB_	0,26	0,48	<u>PNPT1</u>	HGLibA_	0,37	0,64
	31868				44720		
<u>NHP2L1</u>	HGLibA_	0,60	0,49	POLR2I	HGLibB_	0,32	0,47
	39200				37540		
<u>NMNAT1</u>	HGLibA_	0,18	0,13	POLR2I	HGLibB_	0,27	0,69
	39472				37539		
<u>NMNAT1</u>	HGLibB_	0,24	0,42	<u>PPP1R37</u>	HGLibA_	0,57	0,21
	32142				45382		
NPIPA5	HGLibB_	0,57	0,41	<u>PPP1R37</u>	HGLibA_	0,45	0,62
	32428				45383		
NPIPA5	HGLibB_	0,18	0,52	PRPF19	HGLibA_	0,35	0,56
	32429				46000		
NPLOC4	HGLibB_	0,34	0,41	PRPF19	HGLibA_	0,27	0,61
	32439				46001		
NPLOC4	HGLibB_	0,38	0,55	PTPN22	HGLibA_	0,37	0,66
	32440				46747		
<u>NUP155</u>	HGLibA_	0,44	0,23	PTPN22	HGLibA_	0,55	0,68
	40316				46748		
<u>NUP155</u>	HGLibB_	0,31	0,43	PTPN4	HGLibA_	0,55	0,49
	32984				46758		
<u>PDE1B</u>	HGLibA_	0,54	0,31	PTPN4	HGLibB_	0,60	0,59
	43059				39418		
<u>PDE1B</u>	HGLibB_	0,48	0,38	PYURF	HGLibB_	0,58	0,48
	35725				39657		
<u>PELO</u>	HGLibA_	0,46	0,41	PYURF	HGLibB_	0,58	0,74
	43329				39658		
<u>PELO</u>	HGLibB_	0,57	0,52	RC3H1	HGLibA_	0,46	0,22
	35996				47951		
<u>PES1</u>	HGLibA_	0,41	0,46	RC3H1	HGLibB_	0,40	0,58
	43353				40610		
<u>PES1</u>	HGLibA_	0,41	0,51	<u>RELB</u>	HGLibB_	0,46	0,36
	43355				40764		
<u>PES1</u>	HGLibA_	0,57	0,57	<u>RELB</u>	HGLibB_	0,46	0,55
	43354				40763		
<u>PGK1</u>	HGLibB_	0,49	0,24	<u>RELB</u>	HGLibB_	0,40	0,74
	36194				40765		
<u>PGK1</u>	HGLibA_	0,57	0,50	<u>RNF125</u>	HGLibB_	0,51	0,45
	43527				41441		
PHF12	HGLibA_	0,53	0,49	<u>RNF125</u>	HGLibB_	0,51	0,71
	43626				41442		
PHF12	HGLibB_	0,47	0,51	<u>RNF20</u>	HGLibB_	0,56	0,38
	36293				41559		
<u>PHIP</u>	HGLibB_	0,57	0,50	<u>RNF20</u>	HGLibA_	0,57	0,62
	36353				48898		
<u>PHIP</u>	HGLibA_	0,59	0,51	RPL4	HGLibA_	0,25	0,66
	43686				49270		
<u>POLR2E</u>	HGLibB_	0,58	0,47	RPL4	HGLibB_	0,33	0,68

	37527				41929		
<u>POLR2E</u>	HGLibA_ 44865	0,52	0,50	<u>RRM2</u>	HGLibA_ 49543	0,36	0,68
<u>POLR2E</u>	HGLibB_ 37526	0,31	0,56	<u>RRM2</u>	HGLibA_ 49541	0,46	0,71
PRIM2	HGLibB_ 38435	0,39	0,39	<u>RUNX1</u>	HGLibA_ 49744	0,46	0,70
PRIM2	HGLibB_ 38437	0,45	0,52	<u>RUNX1</u>	HGLibB_ 42402	0,60	0,70
<u>PRR13</u>	HGLibA_ 46065	0,36	0,39	RXFP4	HGLibB_ 42450	0,50	0,67
<u>PRR13</u>	HGLibA_ 46064	0,50	0,49	RXFP4	HGLibB_ 42449	0,47	0,70
PSMA5	HGLibA_ 46371	0,43	0,48	SDAD1	HGLibB_ 43042	0,48	0,62
PSMA5	HGLibB_ 39032	0,51	0,60	SDAD1	HGLibA_ 50381	0,41	0,75
<u>PSMA7</u>	HGLibA_ 46377	0,52	0,36	SENP3	HGLibA_ 50679	0,60	0,72
<u>PSMA7</u>	HGLibB_ 39039	0,54	0,49	SENP3	HGLibB_ 43337	0,60	0,74
PSMB3	HGLibB_ 39056	0,26	0,25	<u>SETD8</u>	HGLibA_ 50950	0,57	0,56
PSMB3	HGLibA_ 46394	0,32	0,58	<u>SETD8</u>	HGLibB_ 43607	0,48	0,66
PSMD8	HGLibB_ 39136	0,46	0,55	<u>SETD8</u>	HGLibA_ 50948	0,58	0,71
PSMD8	HGLibA_ 46473	0,41	0,58	SH2B3	HGLibA_ 51168	0,45	0,56
<u>PTPN11</u>	HGLibA_ 46720	0,60	0,31	SH2B3	HGLibB_ 43828	0,57	0,73
<u>PTPN11</u>	HGLibB_ 39384	0,28	0,36	SLC1A4	HGLibA_ 51803	0,55	0,46
<u>PTTG1</u>	HGLibA_ 46851	0,41	0,41	SLC1A4	HGLibA_ 51805	0,50	0,75
<u>PTTG1</u>	HGLibA_ 46849	0,54	0,48	<u>SLC34A1</u>	HGLibB_ 44885	0,51	0,45
<u>RAD51C</u>	HGLibB_ 40039	0,44	0,43	<u>SLC34A1</u>	HGLibB_ 44886	0,41	0,64
<u>RAD51C</u>	HGLibA_ 47378	0,26	0,54	SLC3A2	HGLibB_ 45081	0,31	0,50
<u>RBX1</u>	HGLibA_ 47946	0,32	0,28	SLC3A2	HGLibA_ 52420	0,42	0,62
<u>RBX1</u>	HGLibA_ 47948	0,38	0,49	<u>SLIT3</u>	HGLibB_ 45458	0,59	0,30
<u>RDM1</u>	HGLibB_ 40703	0,57	0,48	<u>SLIT3</u>	HGLibB_ 45457	0,58	0,32
<u>RDM1</u>	HGLibA_ 48042	0,60	0,60	<u>SLITRK3</u>	HGLibA_ 52806	0,56	0,29
<u>RERE</u>	HGLibA_ 48146	0,45	0,49	<u>SLITRK3</u>	HGLibA_ 52807	0,60	0,49
<u>RERE</u>	HGLibB_ 40806	0,59	0,57	SLMO2	HGLibB_ 45487	0,55	0,54
<u>RFC5</u>	HGLibB_ 40862	0,14	0,38	SLMO2	HGLibB_ 45488	0,13	0,57
<u>RFC5</u>	HGLibB_ 40863	0,39	0,46	<u>SMARCC2</u>	HGLibB_ 45572	0,54	0,33
<u>RFC5</u>	HGLibA_ 48201	0,46	0,58	<u>SMARCC2</u>	HGLibA_ 52913	0,47	0,54
<u>RNF20</u>	HGLibB_ 41559	0,56	0,53	SNAPC1	HGLibA_ 53178	0,18	0,36
<u>RNF20</u>	HGLibA_ 48898	0,57	0,58	SNAPC1	HGLibB_ 45835	0,57	0,70
RPL11	HGLibA_ 49149	0,17	0,43	<u>SNW1</u>	HGLibB_ 45965	0,47	0,60
RPL11	HGLibB_ 41809	0,47	0,53	<u>SNW1</u>	HGLibB_ 45964	0,50	0,68

RPL11	HGLibA_	0,28	0,56	SPINK14	HGLibA_	0,33	0,23
	49150				53976		
<u>RPL13A</u>	HGLibB_	0,51	0,19	SPINK14	HGLibA_	0,49	0,25
	41818				53977		
<u>RPL13A</u>	HGLibA_	0,25	0,40	SREK1IP1	HGLibB_	0,58	0,58
	49159				46900		
RPL18	HGLibB_	0,60	0,29	SREK1IP1	HGLibA_	0,58	0,69
	41834				54246		
RPL18	HGLibA_	0,60	0,56	STX12	HGLibB_	0,55	0,50
	49173				47564		
RPL5	HGLibB_	0,51	0,35	STX12	HGLibA_	0,55	0,64
	41933				54908		
RPL5	HGLibB_	0,23	0,56	SUZ12	HGLibA_	0,27	0,58
	41935				55160		
RPL8	HGLibA_	0,55	0,35	SUZ12	HGLibB_	0,58	0,75
	49290				47813		
RPL8	HGLibA_	0,50	0,60	TBCC	HGLibA_	0,58	0,67
	49289				55873		
<u>RPLP0</u>	HGLibB_	0,45	0,29	TBCC	HGLibB_	0,35	0,74
	41955				48524		
<u>RPLP0</u>	HGLibA_	0,43	0,44	TFRC	HGLibB_	0,51	0,41
	49297				49137		
<u>RPS16</u>	HGLibA_	0,56	0,37	TFRC	HGLibB_	0,28	0,71
	49370				49136		
<u>RPS16</u>	HGLibB_	0,29	0,48	TLDC1	HGLibB_	0,42	0,46
	42031				49542		
<u>RPS16</u>	HGLibB_	0,35	0,52	TLDC1	HGLibA_	0,50	0,72
	42030				56889		
RPS20	HGLibB_	0,55	0,51	TMCC2	HGLibB_	0,48	0,45
	42050				49714		
RPS20	HGLibB_	0,58	0,54	TMCC2	HGLibA_	0,59	0,70
	42051				57063		
RPS20	HGLibA_	0,26	0,58	TMED2	HGLibB_	0,46	0,41
	49392				49745		
RPS26	HGLibA_	0,19	0,49	TMED2	HGLibB_	0,47	0,65
	49406				49744		
RPS26	HGLibB_	0,51	0,60	TMEM194A	HGLibA_	0,55	0,32
	42066				57442		
RPS29	HGLibB_	0,38	0,36	TMEM194A	HGLibB_	0,57	0,74
	42082				50094		
RPS29	HGLibB_	0,09	0,53	TMEM52	HGLibA_	0,43	0,34
	42081				57720		
RRM2	HGLibB_	0,23	0,45	TMEM52	HGLibB_	0,51	0,56
	42201				50372		
RRM2	HGLibA_	0,36	0,59	TMSB10	HGLibA_	0,43	0,40
	49543				57946		
RRP12	HGLibB_	0,54	0,47	TMSB10	HGLibB_	0,37	0,47
	42217				50596		
RRP12	HGLibA_	0,39	0,60	TOMM70A	HGLibA_	0,42	0,67
	49558				58271		
SDC1	HGLibB_	0,53	0,46	TOMM70A	HGLibB_	0,59	0,70
	43045				50920		
SDC1	HGLibB_	0,56	0,60	TUBA1B	HGLibB_	0,44	0,53
	43044				52182		
<u>SDE2</u>	HGLibB_	0,57	0,31	TUBA1B	HGLibB_	0,12	0,56
	43068				52180		
<u>SDE2</u>	HGLibA_	0,45	0,46	UBXN7	HGLibA_	0,40	0,43
	50410				60082		
<u>SF1</u>	HGLibB_	0,24	0,16	UBXN7	HGLibB_	0,53	0,65
	43634				52729		
<u>SF1</u>	HGLibB_	0,10	0,50	VDAC1	HGLibB_	0,52	0,48
	43636				53532		
<u>SF1</u>	HGLibA_	0,32	0,54	VDAC1	HGLibA_	0,54	0,59
	50977				60886		
SHFM1	HGLibA_	0,42	0,53	VPS4A	HGLibA_	0,56	0,62
	51314				61084		
SHFM1	HGLibB_	0,35	0,55	VPS4A	HGLibB_	0,40	0,70

	43975				53731		
<u>SLC25A3</u>	HGLibA_	0,44	0,44	<u>WDR20</u>	HGLibB_	0,58	0,30
	51986				53981		
<u>SLC25A3</u>	HGLibB_	0,49	0,51	<u>WDR20</u>	HGLibB_	0,54	0,37
	44646				53979		
<u>SLC34A1</u>	HGLibB_	0,51	0,35	<u>WNT5A</u>	HGLibA_	0,46	0,42
	44885				61662		
<u>SLC34A1</u>	HGLibB_	0,41	0,56	<u>WNT5A</u>	HGLibB_	0,57	0,56
	44886				54308		
<u>SLC7A1</u>	HGLibA_	0,45	0,15	<u>XRCC6</u>	HGLibA_	0,50	0,52
	52635				61885		
<u>SLC7A1</u>	HGLibA_	0,46	0,44	<u>XRCC6</u>	HGLibA_	0,56	0,53
	52634				61886		
<u>SNRNP35</u>	HGLibA_	0,48	0,42	<u>ZBTB20</u>	HGLibB_	0,58	0,20
	53238				54772		
<u>SNRNP35</u>	HGLibA_	0,46	0,43	<u>ZBTB20</u>	HGLibB_	0,59	0,69
	53239				54771		
<u>SNW1</u>	HGLibB_	0,34	0,44	<u>ZBTB39</u>	HGLibB_	0,38	0,67
	45966				54806		
<u>SNW1</u>	HGLibB_	0,47	0,57	<u>ZBTB39</u>	HGLibB_	0,46	0,68
	45965				54808		
<u>SPAG6</u>	HGLibB_	0,38	0,44	<u>ZBTB7A</u>	HGLibB_	0,32	0,31
	46308				54850		
<u>SPAG6</u>	HGLibB_	0,44	0,47	<u>ZBTB7A</u>	HGLibA_	0,53	0,57
	46307				62203		
<u>SPATA5</u>	HGLibB_	0,45	0,53	<u>ZNF398</u>	HGLibA_	0,60	0,37
	46460				63208		
<u>SPATA5</u>	HGLibA_	0,29	0,60	<u>ZNF398</u>	HGLibB_	0,59	0,44
	53804				55855		
<u>SPINK14</u>	HGLibA_	0,49	0,46	<u>ZNRD1</u>	HGLibA_	0,29	0,53
	53977				64222		
<u>SPINK14</u>	HGLibA_	0,33	0,54	<u>ZNRD1</u>	HGLibA_	0,56	0,73
	53976				64224		
<u>SQRDL</u>	HGLibB_	0,47	0,43	<u>ZSWIM4</u>	HGLibA_	0,56	0,46
	46858				64334		
<u>SQRDL</u>	HGLibB_	0,58	0,56	<u>ZSWIM4</u>	HGLibB_	0,55	0,73
	46859				56980		
<u>SSRP1</u>	HGLibA_	0,36	0,27				
	54453						
<u>SSRP1</u>	HGLibA_	0,59	0,59				
	54454						
<u>STAT5B</u>	HGLibB_	0,45	0,39				
	47339						
<u>STAT5B</u>	HGLibA_	0,47	0,48				
	54684						
<u>STX12</u>	HGLibA_	0,55	0,30				
	54908						
<u>STX12</u>	HGLibB_	0,55	0,39				
	47564						
<u>SUZ12</u>	HGLibA_	0,43	0,43				
	55159						
<u>SUZ12</u>	HGLibB_	0,48	0,50				
	47814						
<u>TAC3</u>	HGLibB_	0,43	0,54				
	48095						
<u>TAC3</u>	HGLibA_	0,52	0,55				
	55441						
<u>TBL3</u>	HGLibB_	0,34	0,41				
	48560						
<u>TBL3</u>	HGLibB_	0,48	0,53				
	48562						
<u>TBX5</u>	HGLibB_	0,53	0,53				
	48615						
<u>TBX5</u>	HGLibA_	0,47	0,60				
	55963						
<u>TCP1</u>	HGLibA_	0,17	0,33				
	56119						

<u>TCP1</u>	HGLibB_	0,50	0,48
	48770		
<u>THOP1</u>	HGLibB_	0,51	0,26
	49321		
<u>THOP1</u>	HGLibA_	0,52	0,34
	56670		
<u>TIGD3</u>	HGLibA_	0,51	0,42
	56756		
<u>TIGD3</u>	HGLibA_	0,55	0,47
	56758		
<u>TMCC2</u>	HGLibB_	0,48	0,47
	49714		
<u>TMCC2</u>	HGLibA_	0,59	0,50
	57063		
<u>TMED2</u>	HGLibA_	0,42	0,53
	57092		
<u>TMED2</u>	HGLibB_	0,47	0,54
	49744		
<u>TNFAIP3</u>	HGLibA_	0,51	0,28
	58001		
<u>TNFAIP3</u>	HGLibA_	0,50	0,58
	57999		
<u>TRMT5</u>	HGLibB_	0,41	0,50
	51627		
<u>TRMT5</u>	HGLibB_	0,47	0,59
	51626		
<u>TTLL9</u>	HGLibB_	0,27	0,22
	52152		
<u>TTLL9</u>	HGLibA_	0,49	0,56
	59505		
<u>TUBB</u>	HGLibA_	0,34	0,10
	59558		
<u>TUBB</u>	HGLibB_	0,48	0,49
	52204		
<u>TUBG1</u>	HGLibB_	0,26	0,47
	52238		
<u>TUBG1</u>	HGLibA_	0,58	0,59
	59590		
<u>TXNL4A</u>	HGLibA_	0,45	0,25
	59725		
<u>TXNL4A</u>	HGLibB_	0,36	0,45
	52373		
<u>UBXN7</u>	HGLibA_	0,32	0,24
	60084		
<u>UBXN7</u>	HGLibA_	0,40	0,45
	60082		
<u>UTP3</u>	HGLibB_	0,53	0,30
	53385		
<u>UTP3</u>	HGLibB_	0,49	0,52
	53386		
<u>UTP3</u>	HGLibB_	0,49	0,54
	53387		
<u>VDAC1</u>	HGLibA_	0,54	0,32
	60886		
<u>VDAC1</u>	HGLibB_	0,52	0,49
	53532		
<u>VPS18</u>	HGLibB_	0,51	0,36
	53681		
<u>VPS18</u>	HGLibA_	0,59	0,47
	61033		
<u>XRCC6</u>	HGLibA_	0,50	0,30
	61885		
<u>XRCC6</u>	HGLibA_	0,56	0,50
	61886		
<u>ZBTB39</u>	HGLibB_	0,38	0,52
	54806		
<u>ZBTB39</u>	HGLibB_	0,60	0,57

	54807		
<u>ZDHHC8</u>	HGLibB_55062	0,42	0,53
<u>ZDHHC8</u>	HGLibA_62418	0,41	0,55

In Hodgkin-Zelllinien angereicherte sgRNAs

sgRNA	GeCKO-ID	Verhältnis d21/d1 cHL	Verhältnis zu B-NHL
A4GALT	HGLibA_00017	2,43	2,50
A4GALT	HGLibB_00016	2,21	1,53
ATP10B	HGLibB_03545	4,04	1,68
ATP10B	HGLibA_03548	2,52	1,56
C1orf105	HGLibB_05730	7,02	4,36
C1orf105	HGLibA_05735	2,33	1,57
CCDC129	HGLibA_07587	3,52	2,61
CCDC129	HGLibB_07580	2,69	1,92
CNKSR2	HGLibA_10299	2,14	2,15
CNKSR2	HGLibB_10287	4,58	1,90
CTAGE9	HGLibA_11581	3,03	2,75
CTAGE9	HGLibB_11568	2,14	1,53
DPCR1	HGLibA_13815	2,09	2,22
DPCR1	HGLibA_13814	2,07	1,75
EVI2B	HGLibB_15667	4,85	4,10
EVI2B	HGLibA_15689	2,32	2,16
GKN1	HGLibB_19182	2,54	4,17
GKN1	HGLibB_19183	4,20	2,06
HOXB9	HGLibA_21953	4,58	2,42
HOXB9	HGLibA_21952	2,27	1,71
hsa-mir-1284	HGLibA_22649	2,45	2,70
hsa-mir-1284	HGLibA_22650	2,78	2,11
hsa-mir-450a-1	HGLibA_25528	2,27	2,69
hsa-mir-450a-1	HGLibA_25527	2,44	1,92
hsa-mir-6795	HGLibA_28412	2,33	3,18
hsa-mir-6795	HGLibA_28410	2,12	3,12
hsa-mir-92b	HGLibA_29352	12,90	14,83
hsa-mir-92b	HGLibA_29351	2,42	2,12
KIAA0391	HGLibB_24599	2,00	1,57
KIAA0391	HGLibB_24598	2,14	1,53
KLK14	HGLibB_25210	3,73	2,32
KLK14	HGLibA_32534	2,07	2,06
KRBOX4	HGLibA_32683	2,39	2,20
KRBOX4	HGLibA_32684	2,13	1,69
KRT79	HGLibB_25513	4,82	6,38
KRT79	HGLibB_25514	2,57	2,44
KRTAP1-1	HGLibB_25544	3,36	6,46

KRTAP1-1	HGLibB_25542	3,25	3,28
MTFP1	HGLibB_30315	3,31	1,74
MTFP1	HGLibB_30317	2,69	1,56
NLRP5	HGLibB_32080	2,61	2,29
NLRP5	HGLibA_39413	2,57	1,54
RNF123	HGLibA_48778	2,41	1,81
RNF123	HGLibA_48777	2,69	1,50
RNF223	HGLibB_41595	2,14	1,78
RNF223	HGLibA_48935	2,52	1,62
RP2	HGLibA_49081	2,70	2,32
RP2	HGLibA_49082	2,49	2,28
SLC5A2	HGLibA_52552	2,94	3,12
SLC5A2	HGLibB_45213	2,37	1,91
SMIM21	HGLibB_45694	4,02	2,50
SMIM21	HGLibA_53038	2,43	1,73
TIGD1	HGLibA_56752	3,56	7,01
TIGD1	HGLibA_56751	3,76	1,89
TMEM86B	HGLibB_50469	3,51	7,32
TMEM86B	HGLibB_50468	2,52	1,56
UBQLN3	HGLibA_60025	8,86	8,81
UBQLN3	HGLibA_60026	2,22	1,50
USP17L8	HGLibB_53221	2,95	2,48
USP17L8	HGLibA_60575	2,08	1,83
XPOT	HGLibA_61865	2,34	1,93
XPOT	HGLibA_61864	2,14	1,78

(Kandidaten-)Gene in der CRISPR/Cas9-Re-Screen *library*

Legende: *Kursive* Gene waren depletiert, aber erfüllten die Depletions-Kriterien nicht vollständig
Insgesamt 185 Gene (à 3 sgRNAs) und 69 *non-targeting* sgRNAs

GeCKO-Screen Kandidaten	Negativ- Kontrollen	Positiv- Kontrollen	NF-κB Gene	Zusätzliche Gene
141	12	2	9	21
ABCA7	ALB	GAPDH	IKBKB	<i>C6orf223</i>
ANXA2	APOB	MYC	IKBKG	<i>EFCAB9</i>
AOC2	OR10J3		MAP3K14	<i>EIF1AX</i>
AREL1	OR13G1		NFKB1	<i>IGIP</i>
ARF5	OR1D2		NFKBIA	<i>IQCA1</i>
ASPHD1	OR2H2		NFKBIB	<i>IRAK4</i>
ATP2A2	OR3A1		NOTCH1	<i>KDM4C</i>
BATF3	OR4F4		REL	<i>PAQR6</i>
BDP1	OR51E1		RELA	<i>PPP1CB</i>
BTAF1	OR5V1			<i>RNF8</i>
BTF3L4	OR6A2			<i>USF2</i>
C17ORF72	OR7D4			<i>ZNF175</i>
CCDC130				HIF1A
CCDC19	69 <i>non-targeting</i>			IRAK1
CCNA2	sgRNAs			KDM3B
CCND2				SETD2
CDADC1				TLR4
CDC20				TLR7
CDC25A				RPS3A
CDCA2				TPTE
CDCA5				UMPS
CEP290				
CHUK				
COPRS				
CRP				
CST7				
DDX18				
DNM1				
DNMBP				
DNMT3B				
DNTTIP2				
DPM2				
DUX2				
DYRK1A				
EEF2				
EFCAB2				
EIF1				
EIF3D				
EXOC7				
EXOSC3				
FBXO41				
FGF21				
FNDC3B				
GOLPH3				
GPD1L				
HENMT1				
HIST2H2AB				
HMGB1				
HNRNPH1				
HSPA9				
HSPE1				
INCENP				
INSL3				

IRF4
JAK1
JUNB
KEAP1
KRTCAP2
LPHN2
LYRM7
MEIS1
METTL2B
MIR6878
MLX
MROH1
MRPL34
MUS81
NAB2
NCAPH
NDC80
NFKB2
NHP2L1
NMNAT1
NRD1
NUP155
PDE1B
PELO
PES1
PGK1
PHIP
PNPT1
POLR2E
PPP1R37
PRR13
PSMA7
PTPN11
PTTG1
RAD51C
RBX1
RDM1
RELB
RERE
RFC5
RNF125
RNF20
RPL13A
RPLP0
RPS16
RRM2
RUNX1
SDE2
SETD8
SF1
SLC25A3
SLC34A1
SLC7A1
SLIT3
SLITRK3
SMARCC2
SNRNP35
SNW1
SPAG6
SPINK14
SSRP1
STAT5B
STX12

SUZ12
TCP1
THOP1
TIGD3
TLDC1
TMCC2
TMEM52
TMSB10
TNFAIP3
TUBB
TXNL4A
UBXN7
UTP3
VDAC1
VPS18
WDR20
WNT5A
XRCC6
ZBTB20
ZBTB39
ZBTB7A
ZDHHC8
ZNF398
ZNRD1
ZSWIM4

Ergebnisse des CRISPR/Cas9-Re-Screens

Legende: **Fette** Kandidaten sind beiden Zelllinien (L428 und L1236) gemein

Kandidatengene L428			Kandidatengene L1236		
sgRNA	Verhältnis d28/d1 cHL	Verhältnis zu B-NHL	sgRNA	Verhältnis d28/d1 cHL	Verhältnis zu B-NHL
AOC2_1	0,43	0,42	BATF3_2	0,63	0,46
AOC2_3	0,57	0,47	BATF3_3	0,31	0,31
BATF3_2	0,34	0,25	CCNA2_2	0,24	0,57
BATF3_3	0,25	0,25	CCNA2_3	0,21	0,52
BTF3L4_2	0,40	0,40	CCND2_1	0,33	0,28
BTF3L4_3	0,59	0,48	CCND2_2	0,13	0,13
CCNA2_2	0,20	0,49	CCND2_3	0,40	0,33
CCNA2_3	0,19	0,46	CHUK_1	0,29	0,34
CCND2_1	0,08	0,07	CHUK_3	0,53	0,49
CCND2_2	0,05	0,05	DPM2_1	0,48	0,68
CCND2_3	0,20	0,16	DPM2_3	0,56	0,65
CDCA5_2	0,36	0,48	EIF1AX_1	0,30	0,52
CDCA5_3	0,42	0,39	EIF1AX_2	0,61	0,74
CHUK_1	0,36	0,42	FNDC3B_1	0,66	0,68
CHUK_3	0,54	0,50	FNDC3B_3	0,69	0,61
COPRS_1	0,48	0,51	IRAK1_2	0,47	0,38
COPRS_3	0,41	0,43	IRAK1_3	0,38	0,32
DNM1_1	0,42	0,34	IRF4_1	0,08	0,08
DNM1_3	0,18	0,23	IRF4_2	0,66	0,55
EEF2_1	0,40	0,57	IRF4_3	0,49	0,33
EEF2_3	0,15	0,59	JAK1_1	0,36	0,34
EIF1_1	0,43	0,45	JAK1_3	0,31	0,30
EIF1_2	0,30	0,31	LYRM7_1	0,53	0,64
EIF1AX_1	0,14	0,24	LYRM7_2	0,68	0,55
EIF1AX_2	0,45	0,54	NFKB2_1	0,49	0,38
HENMT1_1	0,51	0,51	NFKB2_2	0,62	0,60
HENMT1_3	0,50	0,60	NFKB2_3	0,14	0,16
HSPA9_1	0,13	0,44	RELB_1	0,57	0,51
HSPA9_3	0,35	0,54	RELB_2	0,69	0,66
HSPE1_1	0,10	0,30	STX12_2	0,68	0,65
HSPE1_2	0,24	0,42	STX12_3	0,59	0,57
INCENP_1	0,21	0,46	WDR20_1	0,53	0,52
INCENP_2	0,10	0,39	WDR20_3	0,52	0,44
IRF4_1	0,05	0,05			
IRF4_2	0,24	0,20			
IRF4_3	0,15	0,10			
JAK1_1	0,19	0,18			
JAK1_3	0,16	0,15			
JUNB_1	0,42	0,28			
JUNB_2	0,47	0,30			
JUNB_3	0,57	0,39			

KEAP1_1	0,47	0,38
KEAP1_2	0,44	0,41
MAP3K14_1	0,25	0,21
MAP3K14_2	0,52	0,41
METTL2B_1	0,33	0,53
METTL2B_3	0,40	0,47
MIR6878_1	0,50	0,56
MIR6878_3	0,55	0,45
MLX_1	0,33	0,41
MLX_2	0,26	0,37
MLX_3	0,57	0,50
NFKBIB_1	0,49	0,38
NFKBIB_3	0,60	0,47
NHP2L1_1	0,17	0,55
NHP2L1_2	0,24	0,54
NMNAT1_2	0,43	0,44
NMNAT1_3	0,43	0,46
NRD1_2	0,43	0,43
NRD1_3	0,26	0,31
PAQR6_1	0,38	0,49
PAQR6_2	0,48	0,57
PAQR6_3	0,41	0,51
PHIP_2	0,58	0,49
PHIP_3	0,45	0,43
POLR2E_1	0,05	0,59
POLR2E_2	0,13	0,60
PPP1R37_2	0,53	0,51
PPP1R37_3	0,39	0,53
PSMA7_2	0,17	0,57
PSMA7_3	0,09	0,59
PTTG1_2	0,60	0,56
PTTG1_3	0,54	0,53
RAD51C_1	0,07	0,43
RAD51C_2	0,16	0,38
REL_1	0,38	0,37
REL_2	0,11	0,14
REL_3	0,30	0,24
SLC7A1_1	0,25	0,56
SLC7A1_2	0,16	0,46
SLC7A1_3	0,25	0,47
TNFAIP3_2	0,15	0,13
TNFAIP3_3	0,10	0,09
TUBB_2	0,15	0,18
TUBB_3	0,04	0,58
ZNF398_2	0,44	0,43
ZNF398_3	0,46	0,52

sgRNA-Sequenzen der CRISPR/Cas9-Re-Screen *library*

sgRNA	Oligo + (5'-3')	Oligo - (5'-3')
ABCA7_1	CACCGTGCTCGCGGAACATCGATTC	AAACGAATCGATGTTCCGCGAGCAC
ABCA7_2	CACCGTGACCGTGGACGAGCAGTC	AAACGACGTGCTCGTCCACGGTCAC
ABCA7_3	CACCGGAACCAGACGTGCTCGTCCA	AAACTGGACGAGCACGTCTGGTTCC
ALB_1	CACCGGCAGCATTCCGTGTGGACTT	AAACAAGTCCACACGGAATGCTGCC
ALB_2	CACCGTTTAGCTCGGCTTATTCCAG	AAACCTGGAATAAGCCGAGCTAAAC
ALB_3	CACCGGCAACTCTTCGTGAAACCTA	AAACTAGGTTTCACGAAGAGTTGCC
ANXA2_1	CACCGCAGCACTTACCCGAGCATCT	AAACAGATGCTCGGGTAAGTGCTGC
ANXA2_2	CACCGTCTCTGTGCATTGCTGCGGT	AAACACCGCAGCAATGCACAGAGAC
ANXA2_3	CACCGTGGGAAACCAACCTTTGCCA	AAACTGGCAAAGGTTGGTTTCCCAC
AOC2_1	CACCGTGACTGTGGAGCGTCACGGC	AAACGCCGTGACGCTCCACAGTCAC
AOC2_2	CACCGGGGCACTACTATGCAGACTT	AAACAAGTCTGCATAGTAGTGCCCC
AOC2_3	CACCGACTTAAACTCCCGTTCCAAC	AAACGTTGGAACGGGAGTTTAAGTC
APOB_1	CACCGCGACCCGATTCAAGCACCTC	AAACGAGGTGCTTGAATCGGGTCGC
APOB_2	CACCGAAACTCACTTGTGACCGCG	AAACCGCGGTCAACAAGTGAGTTTC
APOB_3	CACCGGTCCCGGTCAGCGGATAGT	AAACACTATCCGCTGACCGGGGACC
AREL1_1	CACCGGACTATTTATGACTACGTGC	AAACGCACGTAGTCATAAATAGTCC
AREL1_2	CACCGGTAAATGCTCACGCCTGAAG	AAACCTTCAGGCGTGAGCATTTACC
AREL1_3	CACCGATCTCGGGTACTATTTGAA	AAACTTCAAATAGTACCCCGAGATC
ARF5_1	CACCGTCCCCGGGCTCACCTATGGT	AAACACCATAGGTGAGCCCCGGGGAC
ARF5_2	CACCGGGACAGTAATGACCGGGAGC	AAACGCTCCCGGTCATTACTGTCCC
ARF5_3	CACCGTTGTGGTGGACAGTAATGAC	AAACGTCATTACTGTCCACCACAAC
ASPHD1_1	CACCGCCTACGCAAGGCGCTACTCC	AAACGGAGTAGCGCCTTGCGTAGGC
ASPHD1_2	CACCGTTGCGTAGGCCCGAAGCCGC	AAACGCGGCTTCGGGCCTACGCAAC
ASPHD1_3	CACCGCTCTGGTACTGCTACCGCCT	AAACAGGCGGTAGCAGTACCAGAGC
ATP2A2_1	CACCGTTCCGCGTCAACGAGAGTAC	AAACGTAICTCTCGTTGACGCCGAAC
ATP2A2_2	CACCGAAATGCCATCGAAGCCCTTA	AAACTAAGGGCTTCGATGGCATTTC
ATP2A2_3	CACCGTTCAATGACCCGGTTCATGG	AAACCCATGAACCGGGTCATTGAAC
BATF3_1	CACCGGCGCCGCGACGCTCCTCTGC	AAACGCAGAGGAGCGTCGCGGCGCC
BATF3_2	CACCGCCCCGATCTCTCCGCAGCA	AAACTGCTGCGGAGAGAGATCGGGC
BATF3_3	CACCGAGCAAGAAAACCATGCTG	AAACCAGCATGGTGTCTTTCTTGCTC
BDP1_1	CACCGGTGCCACAGTCGATTTCCGG	AAACCCGAAATCGACTGTGGGCACC
BDP1_2	CACCGCACAGTCGATTTCCGGTGGAG	AAACCTCCACCGAAATCGACTGTGC
BDP1_3	CACCGGCTCCACCGAAATCGACTGT	AAACACAGTCGATTTCCGGTGGAGCC
BTAF1_1	CACCGTCATTCTGCATTTCGTGTGAA	AAACTTCACACGAATGCAGAATGAC
BTAF1_2	CACCGAAAATGTGTCGGAGCATATC	AAACGATATGCTCCGACACATTTTC
BTAF1_3	CACCGTAAACGCGGCTGCACAGCTA	AAACTAGCTGTGCAGCCGCGTTTAC
BTF3L4_1	CACCGCACTCACCTTGCCCCCTATC	AAACGATAGGGGGCAAGGTGAGTGC
BTF3L4_2	CACCGTACAGCTCGCAGAAAGAAGA	AAACTCTTCTTTCTGCGAGCTGTAC
BTF3L4_3	CACCGTCAGAGTTCTCTAAAAAAAC	AAACGTTTTTTTAGAGAACTCTGAC
C17ORF72_1	CACCGAGGTGGGACGGCCACGAGA	AAACTCTCGTGGGCCGTCCCACCTC
C17ORF72_2	CACCGTCACCTTCCTTCACGCGGCC	AAACGGCCGCGTGAAGGAAGGTGAC
C17ORF72_3	CACCGCCAGCTGCTGCTGAGTCGCC	AAACGGCGACTCAGCAGCAGCTGGC
C6ORF223_1	CACCGAGGCCCACTCCGTTGCTGAA	AAACTTCAGCAACGGAGTGGGCCTC

C6ORF223_2	CACCGcctaGGTGCCTCCAGTTTGA	AAACTCAAACCTGGAGGCACCTAGGC
C6ORF223_3	CACCGTCTCACCTCCGCAGAATGC	AAACGCATTCTGCGGAGGGTGAGAC
CCDC130_1	CACCGGATCACGTAGTCGCAGTTGG	AAACCCAACCTGCGACTACGTGATCC
CCDC130_2	CACCGTGCGACTACGTGATCGTGAG	AAACCTCACGATCACGTAGTCGCAC
CCDC130_3	CACCGCACGATCACGTAGTCGCAGT	AAACACTGCGACTACGTGATCGTGC
CCDC19_1	CACCGAGCGGCAGAAATCCATTCAA	AAACTTGAATGGATTTCTGCCGCTC
CCDC19_2	CACCGCTTATCTCGGAGCAGCACAA	AAACTTGTGCTGCTCCGAGATAAGC
CCDC19_3	CACCGGACCAAAGCCGTGAGCTCTG	AAACCAGAGCTCACGGCTTTGGTCC
CCNA2_1	CACCGCCGTCCAACAACCGCGGACC	AAACGGTCCGCGGTTGTTGGACGGC
CCNA2_2	CACCGCAGCGCCCGTCCAACAACCG	AAACCGGTTGTTGGACGGGCGCTGC
CCNA2_3	CACCGGCAGCAGACGGCGCTCCAAG	AAACCTTGGAGCGCCGTCTGCTGCC
CCND2_1	CACCGCCAACCTACATGCGCAGAA	AAACTTCTGCGCATGTAGGGTTGGC
CCND2_2	CACCGGTAAATGCACAGCTTCTCCG	AAACCGGAGAAGCTGTGCATTTACC
CCND2_3	CACCGAGCGCTCCTCGATGGTGAGC	AAACGCTCACCATCGAGGAGCGCTC
CDADC1_1	CACCGTCAACCTTTGGTGTGTTATA	AAACTATAACACACCAAAGTTGAC
CDADC1_2	CACCGTCTAGTGAAGATTTACATGC	AAACGCATGTAAATCTTCACTAGAC
CDADC1_3	CACCGAGAAATAAGTTTGCTTACGG	AAACCCGTAAGCAAACCTTATTTCTC
CDC20_1	CACCGGGCGCATCCAGGATACGGTC	AAACGACCGTATCCTGGATGCGCCC
CDC20_2	CACCGCAGACCTGAACCTTGTGGAT	AAACATCCACAAGGTTCAAGTCTGC
CDC20_3	CACCGTGCACCTACAATAGTCATTT	AAACAAATGACTATTGTAAGTGAC
CDC25A_1	CACCGCTTCACGACGGGCTGCGACG	AAACCGTCGCAGCCCGTCGTGAAGC
CDC25A_2	CACCGCCAAATAGCGCCTTCACGAC	AAACGTCGTGAAGGCGCTATTTGGC
CDC25A_3	CACCGCCCGTCGTGAAGGCGCTATT	AAACAATAGCGCCTTCACGACGGGC
CDCA2_1	CACCGACAGTAACCGTAGAGCAATT	AAACAATTGCTCTACGGTACTGTG
CDCA2_2	CACCGGGATATTCTCCGACGTTTGG	AAACCCAAACGTCGGAGAATATCCC
CDCA2_3	CACCGGCAAATACTCCATTGCGTAA	AAACTTACGCAATGGAGTATTTGCC
CDCA5_1	CACCGCACGATCCTCTTTAAGACGA	AAACTCGTCTTAAAGAGGATCGTGC
CDCA5_2	CACCGCAGCTGTCCAATCACCTCGC	AAACGCGAGGTGATTGGACAGCTGC
CDCA5_3	CACCGCCCTGGCAGGGAGCTTACTA	AAACTAGTAAGCTCCCTGCCAGGGC
CEP290_1	CACCGTTGTCGCTCCAATTCTACTA	AAACTAGTAGAATTGGAGCGACAAC
CEP290_2	CACCGTTCGGTAAGCTGATCAACT	AAACAGTTGATCAGCTTACCGGAAC
CEP290_3	CACCGCTGCAGGTGGACGAGATACT	AAACAGTATCTCGTCCACCTGCAGC
CHUK_1	CACCGACAGACGTTCCCGAAGCCGC	AAACGCGGCTTCGGGAACGTCTGTG
CHUK_2	CACCGGGCTATTTGGTTGAGGTA	AAACTTTACCTCAACCAAATAGCCC
CHUK_3	CACCGATCACAGGCCTTTACAACAT	AAACATGTTGTAAAGGCCTGTGATC
COPRS_1	CACCGATCAGAGTCCTCCTCATCCA	AAACTGGATGAGGAGGACTCTGATC
COPRS_2	CACCGCATGGACCTTCAGGCCGCGC	AAACCGGCGGCCTGAAGGTCCATGC
COPRS_3	CACCGGGCATGGACCTTCAGGCCGC	AAACGCGGCCTGAAGGTCCATGCC
CRP_1	CACCGACGGAACGTCTCCTCGACCCG	AAACCGGGTCGAGGACAGTTCCGTC
CRP_2	CACCGGCTTCGTTAACGGTGCTTTG	AAACCAAAGCACCGTTAACGAAGCC
CRP_3	CACCGATAGGAAGTATCCGACTCTT	AAACAAGAGTCGGATACTTCTATC
CST7_1	CACCGCCAGACCGTTACCTGAACTA	AAACTAGTTCAGGTAACGGTCTGGC
CST7_2	CACCGCTTAACTCACGTGTGAAGCC	AAACGGCTTCACACGTGAGTTAAGC
CST7_3	CACCGACAATAAAGACCAATGACCC	AAACGGGTCAATTGGTCTTTATTGTC
DDX18_1	CACCGGATGAACGCTTACCATTCT	AAACAGGAATGGTAAGCGTTTCATCC
DDX18_2	CACCGAGCTGATCGTATCTTGATG	AAACCATCCAAGATACGATCAGCTC

DDX18_3	CACCGGACGTTACCTGTCAGTCCCA	AAACTGGGACTGACAGGTAACGTCC
DNM1_1	CACCGTGATGACCCCGATGGTGCGC	AAACGCGCACCATCGGGGTCATCAC
DNM1_2	CACCGGAAGGACATTACCGCCGCT	AAACAGGCGGCGGTAATGTCCTTCC
DNM1_3	CACCGGAAATTCACCGACTTCGAGG	AAACCCTCGAAGTCGGTGAATTTCC
DNMBP_1	CACCGAGGTAGGACGGTGTGAGAT	AAACATCTCGACACCGTCCTACCTC
DNMBP_2	CACCGGGTGACCTGGTGATTCTCGA	AAACTCGAGAATCACCAGGTCACCC
DNMBP_3	CACCGGACAAGCCCGGGCCCTAATG	AAACCATTAGGGCCCGGGCTTGTC
DNMT3B_1	CACCGAAGACTCGATCCTCGTCAAC	AAACGTTGACGAGGATCGAGTCTTC
DNMT3B_2	CACCGAGAGTCGCGAGCTTGATCTT	AAACAAGATCAAGCTCGCGACTCTC
DNMT3B_3	CACCGCAAGCTCGCGACTCTCCAAG	AAACCTTGGAGAGTCGCGAGCTTGC
DNTTIP2_1	CACCGCCGCGTCGGCTGAAAGTTCC	AAACGGAACTTTCAGCCGACGCGGC
DNTTIP2_2	CACCGGGGACTGAACCATCTACGGA	AAACTCCGTAGATGGTTCAGTCCCC
DNTTIP2_3	CACCGAACTACAGGCTCACTACCAA	AAACTTGGTAGTGAGCCTGTAGTTC
DPM2_1	CACCGTGATCAGGCTAACGGCGACG	AAACCGTCGCCGTTAGCCTGATCAC
DPM2_2	CACCGACATGCTGACTGTGATGAA	AAACTTCATCGACAGTCAGCATGTC
DPM2_3	CACCGTCTTCACCTACTACACCGCC	AAACGGCGGTGTAGTAGGTGAAGAC
DUX2_1	CACCGGGCGGTCTGGGATCCGGTGA	AAACTCACCGGATCCCAGACCGCCC
DUX2_2	CACCGCCGTTCCCCACGCGCCGGTG	AAACCACCGGCGCGTGGGGAACGGC
DUX2_3	CACCGCCTTCGCCACACCGGCGCG	AAACCGCGCCGGTGTGGGCGAAGGC
DYRK1A_1	CACCGCACTTATGTTTGGCTGGCGA	AAACTCGCCAGCCAAACATAAGTGC
DYRK1A_2	CACCGTATGACTAGAATCGTCTCCC	AAACGGGAGACGATTCTAGTCATAC
DYRK1A_3	CACCGGGTGCAAGCCGAACAGATGA	AAACTCATCTGTTTCGGCTTGCACCC
EEF2_1	CACCGAAGCCCACGGTACCGAGGAC	AAACGTCTCGGTACCGTGGGCTTC
EEF2_2	CACCGGATCCTGTCCTCGGTACCGT	AAACACGGTACCGAGGACAGGATCC
EEF2_3	CACCGGGCCAAGTTCGCCGCCAAGG	AAACCCTTGGCGGCGAACTTGGCCC
EFCAB2_1	CACCGTCATGCAGCTCTCCTTCCGT	AAACACGGAAGGAGAGCTGCATGAC
EFCAB2_2	CACCGTTAGGATGCTGTCCTACGGA	AAACTCCGTAGGACAGCATCCTAAC
EFCAB2_3	CACCGCCACTGTATTATTCGACTCA	AAACTGAGTCGAATAATACAGTGGC
EFCAB9_1	CACCGTTTTCATATTCTGGACGTGCA	AAACTGCACGTCCAGAATATGAAAC
EFCAB9_2	CACCGCTGAAAGTACTGACCATTCA	AAACTGAATGGTCAGTACTTTCAGC
EFCAB9_3	CACCGCGCGCGGCTACTTGCTGGT	AAACACCAGGCAAGTAGCCGCGCGC
EIF1_1	CACCGCCCATAGCTTACCGAAAGAG	AAACCTCTTTCGGTAAGCTATGGGC
EIF1_2	CACCGATAGCTTACCGAAAGAGTGG	AAACCCACTCTTTCGGTAAGCTATC
EIF1_3	CACCGTACCGAAAGAGTGGAGGTTT	AAACGAACCTCCACTCTTTCGGTAC
EIF1AX_1	CACCGCTCCCCGCTAGAGTATGCTC	AAACGAGCATACTCTAGCGGGGAGC
EIF1AX_2	CACCGTTTTAAACCATCAGGTAAGG	AAACCCTTTACCTGATGGTTTTAAC
EIF1AX_3	CACCGGGCGGCATTACCTTTATTCT	AAACAGAATAAAGGTAATGCCGCC
EIF3D_1	CACCGCAAATCTCATTGATTCCGC	AAACGCGGAATCGAATGAGATTTGC
EIF3D_2	CACCGATGCGCTTGATGCTCCGCAG	AAACCTGCGGAGCATCAAGCGCATC
EIF3D_3	CACCGTGCGCGCTGTATCCACCAGC	AAACGCTGGTGGATACAGCGCGCAC
EXOC7_1	CACCGCATCCCTGTGCACAAGCAGA	AAACTCTGCTTGTGCACAGGGATGC
EXOC7_2	CACCGTGAGAGCCGCCTTATGAAGC	AAACGCTTCATAAGGCGGCTCTCAC
EXOC7_3	CACCGTGGAGTTCTCCAGCTTCATA	AAACTATGAAGCTGGAGAACTCCAC
EXOSC3_1	CACCGGGTGCGGTTGTATGCGGTC	AAACGACCGCATAACAACGCGCACCC
EXOSC3_2	CACCGTCGCGGGTGCAGCTTGATG	AAACCATAACAACGCGCACCCGCGAC
EXOSC3_3	CACCGTTGTATGCGGTCCGGGCCTT	AAACAAGGCCCGGACCGCATACAAC

FBXO41_1	CACCGCCGAGGACGCCACGGACTTG	AAACCAAGTCCGTGGCGTCCTCGGC
FBXO41_2	CACCGCCGCAAGTCCGTGGCGTCCT	AAACAGGACGCCACGGACTTGCGGC
FBXO41_3	CACCGTGTCTCGAAGACCTCTCGC	AAACCGAGAGGTCTTCGAGAGCAC
FGF21_1	CACCGCTGTGTAGAGGTACCGCTGC	AAACGCAGCGGTACCTCTACACAGC
FGF21_2	CACCGCAGTCCTCTCCTGCAATTCG	AAACCGAATTGCAGGAGAGGACTGC
FGF21_3	CACCGGGAAACTCACCGATCCATAC	AAACGTATGGATCGGTGAGTTTCCC
FNDC3B_1	CACCGCTGGCCGCTCGAAACGACAT	AAACATGTCGTTTCGAGCGGCCAGC
FNDC3B_2	CACCGGGTACCAATGTCGTTTCGAG	AAACCTCGAAACGACATTGGTACCC
FNDC3B_3	CACCGTAAGGCCACCTCGTAACTGT	AAACACAGTTACGAGGTGGCCTTAC
GAPDH_1	CACCGCTGCTGTAGGCTCATTGCA	AAACTGCAAATGAGCCTACAGCAGC
GAPDH_2	CACCGTTCCTCACCTGATGATCTTG	AAACCAAGATCATCAGGTGAGGAAC
GAPDH_3	CACCGTTCCTCACTCCTGGAAGA	AAACTCTTCCAGGAGTGAGTGGAAC
GOLPH3_1	CACCGGCAACGCCGCCGACAAGGAG	AAACcTCCTTGTCGGCGGCGTTGCC
GOLPH3_2	CACCGTGAAGTCAGATGCTCCAAC	AAACGTTGGAGCATCTGACTTACAC
GOLPH3_3	CACCGgcTCCTTGTCGGCGGCGTTG	AAACCAACGCCGCCGACAAGGAGCC
GPD1L_1	CACCGTCCTTGTAGGGCATAGACGA	AAACTCGTCTATGCCCTACAAGGAC
GPD1L_2	CACCGCACTCGAGTTACCTTGATGA	AAACTCATCAAGGTAAGTTCGAGTGC
GPD1L_3	CACCGTGACATCATCCGTGAGAAGA	AAACTCTTCTCACGGATGATGTCAC
HENMT1_1	CACCGTGGTACCGCTGTCTGTATAG	AAACCTATACAGACAGCGGTACCAC
HENMT1_2	CACCGAACCTCCACTATACAGACAG	AAACCTGTCTGTATAGTGGAGGTTT
HENMT1_3	CACCGATTGTATCATGGCTCCGTTG	AAACCAACGGAGCCATGATACAATC
HIF1A_1	CACCGAAGTGACCCTAACTAGCCG	AAACCGGCTAGTTAGGGTACACTTC
HIF1A_2	CACCGGAGCGGCCTAAAAGTTCTTC	AAACGAAGAACTTTTAGGCCGCTCC
HIF1A_3	CACCGTTCCTTACTTCGCCGAGATC	AAACGATCTCGGCGAAGTAAAGAAC
HIST2H2AB_1	CACCGGGTCTCGAGTACCTGACCG	AAACCGGTCAGGTAAGTTCGAGGACCC
HIST2H2AB_2	CACCGGTACCTGACCGCGGAAATTC	AAACGAATTTCCGCGGTCAGGTACC
HIST2H2AB_3	CACCGGACCGCCGCCAGGTACACCG	AAACCGGTGTACCTGGCGGCGGTCC
HMGB1_1	CACCGAGATACTCACGGAGGCCTCT	AAACAGAGGCCTCCGTGAGTATCTC
HMGB1_2	CACCGGATACTCACGGAGGCCTCTT	AAACAAGAGGCCTCCGTGAGTATCC
HMGB1_3	CACCGAGATATGGCAAAGCGGACA	AAACTGTCCGCTTTTGCCATATCTC
HNRNPH1_1	CACCGTCAACAAAAGCCTCGCCACT	AAACAGTGCGGAGGCTTTTGTGAC
HNRNPH1_2	CACCGAACATTGCCGGTGGACTTCC	AAACGGAAGTCCACCGGCAATGTTT
HNRNPH1_3	CACCGTGATCCACCACGAAAGCTTA	AAACTAAGCTTTTCGTGGTGGATCAC
HSPA9_1	CACCGCTTCAGGATCATCATATCGC	AAACGCGATATGATGATCCTGAAGC
HSPA9_2	CACCGTCGCCGCCAATGAGACGCT	AAACAGCGTCTCATTGGCCGGCGAC
HSPA9_3	CACCGTATGCTACCAAGCGTTCAT	AAACATGAGACGCTTGGTAGCATAAC
HSPE1_1	CACCGCACTCCTTTCAACCAATACT	AAACAGTATTGGTTGAAAGGAGTGC
HSPE1_2	CACCGAACAGTAGTCGCTGTTGGAT	AAACATCCAACAGCGACTACTGTTT
HSPE1_3	CACCGTCCACTCTTTGACCGAGTAT	AAACATACTCGGTCAAAGAGTGGAC
IGIP_1	CACCGGGAGAACATGACAGCAAATA	AAACTATTTGCTGTGATGTTCTCCC
IGIP_2	CACCGATGAAGAAACGCAGTGTGTC	AAACGACACACTGCGTTTCTTCATC
IGIP_3	CACCGATGTTCTCCCATCTCAGTGC	AAACGCACTGAGATGGGAGAACATC
IKBBK_1	CACCGACACAGTGACCGTGCAGTAC	AAACGTAGTCGACGGTCACTGTGTC
IKBBK_2	CACCGGCAGCCATTGGGCCCATACG	AAACCGTATGGGCCCAATGGCTGCC
IKBBK_3	CACCGGGATCCGTGCCCTCTGTGCG	AAACCGACAGAGGGGCACGGATCCC
IKBK_1	CACCGGGCAGCAGATCAGGACGTAC	AAACGTACGTCCTGATCTGCTGCC

IKBKG_2	CACCGTGGTGGCCCGCAGCAGATC	AAACGATCTGCTGCCGGGCCACCAC
IKBKG_3	CACCGCTGGGCGAAGAGTCTCCTCT	AAACAGAGGAGACTCTTCGCCCAGC
INCENP_1	CACCGGAGTCCGTGCGAGAGCCCGT	AAACACGGGCTCTCGCACGGACTCC
INCENP_2	CACCGGCACGGACTCTCAATCGGTG	AAACCACCGATTGAGAGTCCGTGCC
INCENP_3	CACCGCTCTCGCACGGACTCTCAAT	AAACATTGAGAGTCCGTGCGAGAGC
INSL3_1	CACCGGCACTAGCGCGCGTACGAAG	AAACCTTCGTACGCGCGCTAGTGCC
INSL3_2	CACCGCTAGCGCGCGTACGAAGTGG	AAACCCACTTCGTACGCGCGCTAGC
INSL3_3	CACCGCTGGCTTCGGTGGACCAGCG	AAACCGCTGGTCCACCGAAGCCAGC
IQCA1_1	CACCGGGCACGGCAAGGTCGCCTAA	AAACTTAGGCGACCTTGCCGTGCC
IQCA1_2	CACCGTGCATTGATGAACCAATGC	AAACGCATTGGTTCATCGAATGCAC
IQCA1_3	CACCGGCGACGTTTCCATCAACGTA	AAACTACGTTGATGGAACGTGCGC
IRAK1_1	CACCGCGGTCTGGTGCGCACGATC	AAACGATCGTGCGCACAGACCAGC
IRAK1_2	CACCGGATCAACCGCAACGCCCGTG	AAACCACGGGCGTTGCGGTTGATCC
IRAK1_3	CACCGCTTTGGGTGCGTGTACCGGG	AAACCCCGGTACACGCACCCAAAGC
IRAK4_1	CACCGCTGTCTAGCAATGAACCATT	AAACAATGGTTCATTGCTAGACAGC
IRAK4_2	CACCGGATGAACGACCCATTTCTGT	AAACACAGAAATGGGTGCTTCATCC
IRAK4_3	CACCGATGGTACTCCACCACTTTCT	AAACAGAAAGTGGTGGAGTACCATC
IRF4_1	CACCGCTGATCGACCAGATCGACAG	AAACCTGTCGATCTGGTTCGATCAGC
IRF4_2	CACCGACGTCATGGGACATTGGTAC	AAACGTACCAATGTCCCATGACGTC
IRF4_3	CACCGCAGACCCGTACAAAGTGTAC	AAACGTACACTTTGTACGGGTCTGC
JAK1_1	CACCGGTTGTGGACGATCAACGGGG	AAACCCCGTGGATCGTCCACAACC
JAK1_2	CACCGGATCAACGGGGGGGCCACGT	AAACACGTGGCCCCCGTGGATCC
JAK1_3	CACCGTATGTTGTGGACGATCAACG	AAACCGTTGATCGTCCACAACATAC
JUNB_1	CACCGCACGACGACGCCTACACCCC	AAACGGGGTGTAGGCGTCTCGTGC
JUNB_2	CACCGGCGCTTTGAGACTCCGGTAG	AAACCTACCGGAGTCTCAAAGCGCC
JUNB_3	CACCGACACAGCTACGGGATACGGC	AAACGCCGTATCCCGTAGCTGTGTC
KDM3B_1	CACCGTCTTGATGGGCGCCCCGTG	AAACCACGGGGCGCCATACAAGAC
KDM3B_2	CACCGCACCTCCATAAGACGAGTGA	AAACTCACTCGTCTTATGGAGGTGC
KDM3B_3	CACCGATCTTCTGGATCGAGAGCTT	AAACAAGCTCTCGATCCAGAAGATC
KDM4C_1	CACCGCTTTGCAAGACCCGCACGAT	AAACATCGTGCGGGTCTTGCAAAGC
KDM4C_2	CACCGAGCTCGCCTCAATACAGTCT	AAACAGACTGTATTGAGGCGAGCTC
KDM4C_3	CACCGGAACTCCCGGAACTCCTCCA	AAACTGGAGGAGTTCGGGAGTTCC
KEAP1_1	CACCGTGACAGCACCGTTCATGACG	AAACCGTCATGAACGGTGTGTGCAC
KEAP1_2	CACCGACAGCGACGGTCTACGTCC	AAACGGACGTAGAACCGTCGCTGTC
KEAP1_3	CACCGGAACGTGCGCTGCGAGTCCG	AAACCGGACTCGCAGCGCACGTTCC
KRTCAP2_1	CACCGGCAGATGTACAGCCGTGAGC	AAACGCTGACGGCTGTACATCTGCC
KRTCAP2_2	CACCGTGCGCATAGCTAACCGCACC	AAACGGTGCGGTTAGCTATGCGCAC
KRTCAP2_3	CACCGGCCCGCCCGTGAGTCCAAC	AAACGTTGACTCACGGGCGGGGCC
LPHN2_1	CACCGTTGAGAGCGCTAACTATGGT	AAACACCATAGTTAGCGCTCTCAAC
LPHN2_2	CACCGATTAAGTATCGGTACGATA	AAACTATCGTACCGATACTTTAATC
LPHN2_3	CACCGTATAATACCCGATTAACCG	AAACCGGTTAATCGGGTATTATAC
LYRM7_1	CACCGATACTTACCTTCTAATGCTC	AAACGAGCATTAGAAGGTAAGTATC
LYRM7_2	CACCGAGCTCTTTAAACACTGCAC	AAACGTGCAGTGTTTAAAGAGCTC
LYRM7_3	CACCGTTCTTCAATTTATCTTTATTC	AAACGAATAAAGATAAATGAAGAAC
MAP3K14_1	CACCGCTAACATATGGGGCGCCGAG	AAACCTCGGCGCCCATATGTTAGC
MAP3K14_2	CACCGTCTGATCAAGACTCTCGGAC	AAACGTCCGAGAGTCTTGATCAGAC

MAP3K14_3	CACCGCACGTGGTTCAGACATTGCA	AAACTGCAATGTCTGAACCACGTGC
MEIS1_1	CACCGACGACGATCTACCCCATTAC	AAACGTAATGGGGTAGATCGTCGTC
MEIS1_2	CACCGTCTACCCCATTACGGGGGCA	AAACTGCCCCCGTAATGGGGTAGAC
MEIS1_3	CACCGGACGATCTACCCCATTACGG	AAACCCGTAATGGGGTAGATCGTCC
METTL2B_1	CACCGGTTACATTCTCCTCCACAGG	AAACCCTGTGGAGGAGAATGTAACC
METTL2B_2	CACCGCTCTTATCGGCGAGGATTGC	AAACGCAATCCTCGCCGATAAGAGC
METTL2B_3	CACCGGCGCCGGATCGCTCAGGAAC	AAACGTTCTGAGCGATCCGGCGCC
MIR6878_1	CACCGGTCAGCTAAAGACCATGAGA	AAACTCTCATGGTCTTTAGCTGACC
MIR6878_2	CACCGTGTAGCTAAAGACCATGAG	AAACCTCATGGTCTTTAGCTGACAC
MIR6878_3	CACCGAGATTCTGAAAATCACTAAC	AAACGTTAGTGATTTTCAGAATCTC
MLX_1	CACCGAGTCTACAAAAGACCGGCGG	AAACCCGCGGTCTTTGTAGGACTC
MLX_2	CACCGAGGAGTCTACAAAAGACCGG	AAACCCGCTCTTTGTAGGACTCCTC
MLX_3	CACCGGGTGACATCCTTGCGTAACG	AAACCGTTACGCAAGGATGTCACCC
MROH1_1	CACCGCTGCCGCAGATACTCCTCGC	AAACGCGAGGAGTATCTGCGGCAGC
MROH1_2	CACCGGCTGGACGCCATCACCGATA	AAACTATCGGTGATGGCGTCCAGCC
MROH1_3	CACCGTCAGGACCGCTGCTCGGTAT	AAACATACCGAGCAGCGGTCCTGAC
MRPL34_1	CACCGAGTAGGTCGGCAGCGTTGCT	AAACAGCAACGCTGCCGACCTACTC
MRPL34_2	CACCGAACGCTGCCGACCTACTCGT	AAACACGAGTAGGTGCGCAGCGTTC
MRPL34_3	CACCGACCTACTCGTGGGGCCCAAC	AAACGTTGGGCCCCACGAGTAGGTC
MUS81_1	CACCGGGCGCTCACCGCCCGATGTT	AAACAACATCGGGCGGTGAGCGCCC
MUS81_2	CACCGTCGTTGCTGGCTGACCGAG	AAACCTCGGTCAGCCAGCGAACGAC
MUS81_3	CACCGTCCGCAAGTCGCCCTGCG	AAACCGCAGGGGCGACTTGCGGAAC
MYC_1	CACCGAACGTTGAGGGGCATCGTCG	AAACCGACGATGCCCTCAACGTTT
MYC_2	CACCGGCCGTATTTCTACTGCGACG	AAACCGTCGAGTAGAAATACGGCC
MYC_3	CACCGGGTGTGACCGCAACGTAGGA	AAACTCCTACGTTGCGGTACACCCC
NAB2_1	CACCGTTGCCCACTAACTTGAGTCT	AAACAGACTCAAGTTAGTGGGCAAC
NAB2_2	CACCGTGGGGGTGGTCCAGACCGAC	AAACGTCGGTCTGGACCACCCCCAC
NAB2_3	CACCGCCTGCCCAACGTCCGACTC	AAACGAGTCGGACGTTGGGGCAGGC
NCAPH_1	CACCGCAAGATCTATGCTGTGCGCG	AAACCGCGCACAGCATAGATCTTGC
NCAPH_2	CACCGGGGCAAAGATGCACCGTCTT	AAACAAGACGGTGCATCTTTGCCCC
NCAPH_3	CACCGGGACTCTGTATACATCGGCA	AAACTGCCGATGTATACAGAGTCCC
NDC80_1	CACCGGGATCCCAGGAATAGTCAACT	AAACAGTTGACTATTCGGGGATCCC
NDC80_2	CACCGTGTAGGAAGTTCGTATGAG	AAACCTCATAAGAACTTCTGACAC
NDC80_3	CACCGACAATGTGAGGCCATGTATG	AAACCATACATGGCCTCACATTGTC
NFKB1_1	CACCGGATAGTTTCGGCGGTGGTAG	AAACCTACCACCGCCGAAACTATCC
NFKB1_2	CACCGACATGAGCCGCACCACGCTG	AAACCAGCGTGGTGGCGCTCATGTC
NFKB1_3	CACCGCCATCCCATGGTGGACTACC	AAACGGTAGTCCACCATGGGATGGC
NFKB2_1	CACCGACCCATACCCGTAAGGCCCT	AAACAGGGCCTTACGGGTATGGGTC
NFKB2_2	CACCGCATGTGGGAGCCACCCCGA	AAACTCGGGGGTGGCTCCCACATGC
NFKB2_3	CACCGCCACTCCATAGAATCTCCGG	AAACCCGAGATTCTATGGAGTGGC
NFKBIA_1	CACCGCTGGACGACCGCCACGACAG	AAACCTGTCGTGGCGGTGTCGACGC
NFKBIA_2	CACCGCCTCGAAAGTCTCGGAGCTC	AAACGAGCTCCGAGACTTTGAGGC
NFKBIA_3	CACCGTCTTCTTACGCCGTCGCG	AAACCGCGACGGGCTGAAGAAGGAC
NFKBIB_1	CACCGCCCGACACCTACCTCGCTCA	AAACTGAGCGAGGTAGGTGTCGGGC
NFKBIB_2	CACCGCTGAGCGAGGTAGGTGTCGG	AAACCCGACACCTACCTCGCTCAGC
NFKBIB_3	CACCGTTGGTGTGCGGAGTACGGTC	AAACGACCGTACTCCCGACACCAAC

NHP2L1_1	CACCGAGTTACATGACTGCTGAACG	AAACCGTTCAGCAGTCATGTAAC TC
NHP2L1_2	CACCGCATGTA ACTATAAGCAGCTT	AAACAAGCTGCTTATAGTTACATGC
NHP2L1_3	CACCGTCGGCAAGGGGATAGGCCTT	AAACAAGGCCTATCCCCTTGCCGAC
NMNAT1_1	CACCGGGAAGGTACACAGTTGTCAA	AAACTTGACA ACTGTGTACCTTCCC
NMNAT1_2	CACCGTTGCTACCAAGAATTCTAAA	AAACTTTAGAATTCTTGGTAGCAAC
NMNAT1_3	CACCGGACTCATTCTGCCTATCAC	AAACGTGATAGGCAGGAATGAGTCC
NOTCH1_1	CACCGCGTTGACGTCGATCTCGCAT	AAACATGCGAGATCGACGTCAACGC
NOTCH1_2	CACCGTTGACGTCGATCTCGCATCG	AAACCGATGCGAGATCGACGTCAAC
NOTCH1_3	CACCGCGTGTATTGACGACGTTGCC	AAACGGCAACGTCGTCAATACACGC
NRD1_1	CACCGTGTCAAATGGATCCGTTAAA	AAACTTTAACGGATCCATTTGACAC
NRD1_2	CACCGCTGATCCAGATGACCTGCCG	AAACCGGCAGGTCATCTGGATCAGC
NRD1_3	CACCGAGTGCGTTCACAATCAGTTG	AAACCAACTGATTGTGAACGCACTC
NUP155_1	CACCGACCAGGAGGTGTCGCACATG	AAACCATGTGCGACACCTCCTGGTC
NUP155_2	CACCGTGAACCAGCGTCAGTGTATT	AAACAATACACTGACGCTGGTTCAC
NUP155_3	CACCGAGTGTATTAGGCCGTGCTAA	AAACTTAGCACGGCCTAATACACTC
OR10J3_1	CACCGCCATGATGACTGAATACCTT	AAACAAGGTATTCAGTCATCATGGC
OR10J3_2	CACCGGAGCTGAGTGGCACAGCTTT	AAACAAAGCTGTGCCACTCAGCTCC
OR10J3_3	CACCGTCCAGAGGCCAGTTGGATAC	AAACGTATCCA ACTGGCCTCTGGAC
OR13G1_1	CACCGAAGCATCATACCGAAGATGC	AAACGCATCTTCGGTATGATGCTTC
OR13G1_2	CACCGGCATCATACCGAAGATGCTG	AAACCAGCATCTTCGGTATGATGCC
OR13G1_3	CACCGTGCACACAGCTCTTATCATG	AAACCATGATAAGAGCTGTGTGCAC
OR1D2_1	CACCGTGGGTCCTATCCGTCCTCTA	AAACTAGAGGACGGATAGGACCCAC
OR1D2_2	CACCGTGAGGCCATAGAGGACGGAT	AAACATCCGTCCTCTATGGCCTCAC
OR1D2_3	CACCGGACGGATAGGACCCAACACA	AAACTGTGTTGGGTCCTATCCGTCC
OR2H2_1	CACCGCACCTGCCGATCGGGGCAGA	AAACTCTGCCCCGATCGGCAGGTGC
OR2H2_2	CACCGGCCCTTCTGCCCCGATCGGC	AAACGCCGATCGGGGCAGAAGGGCC
OR2H2_3	CACCGAATCATCCACCTGCCGATCG	AAACCGATCGGCAGGTGGATGATTC
OR3A1_1	CACCGGAACTGCACGCTTGCGGGAC	AAACGTCCC GCAAGCGTGCAGTTCC
OR3A1_2	CACCGCACAGGGA ACTGCACGCTTG	AAACCAAGCGTGCAGTTCCCTGTGC
OR3A1_3	CACCGGGTTGCCCTGACCGTGACC	AAACGGTCACGGTCAGGGGCAACCC
OR4F4_1	CACCGAGGCCAACTGGCTCACCGAA	AAACTTCGGTGAGCCAGTTGGCCTC
OR4F4_2	CACCGGGCATTATGGCTGTGCGATG	AAACCATGCGACAGCCATAATGCCC
OR4F4_3	CACCGGCCGTGCACTTACCCTTCTG	AAACCAGAAGGGTAAGTGCACGGCC
OR51E1_1	CACCGACGAGGCAACGTAAGTACTG	AAACCAGTACTTACGTTGCCTCGTC
OR51E1_2	CACCGCTAGCACAGCAATAAGGTAG	AAACCTACCTTATTGCTGTGCTAGC
OR51E1_3	CACCGTTCATCCTAATAGGCCTCCC	AAACGGGAGGCCTATTAGGATGAAC
OR5V1_1	CACCGGGAGGTGCACCATCATCTGG	AAACCCAGATGATGGTGCACCTCCC
OR5V1_2	CACCGCAGCAATGTCCCCAGATGA	AAACTCATCTGGGGGACATTGCTGC
OR5V1_3	CACCGAATCTGATTGTTGCCACAGA	AAACTCTGTGGCAACAATCAGATTC
OR6A2_1	CACCGGCAAACAATAGTACCTGTAG	AAACCTACAGG TACTATTGTTTGCC
OR6A2_2	CACCGTGGACAGCTAATCTCCTTTG	AAACCAAAGGAGATTAGCTGTCCAC
OR6A2_3	CACCGCTCAGTCAGCACCAACACAT	AAACATGTGTTGGTGCTGACTGAGC
OR7D4_1	CACCGCAGGATCATCTGAGAGTCCC	AAACGGGACTCTCAGATGATCCTGC
OR7D4_2	CACCGGATGAAACAGATGTCAACAA	AAACTTGTTGACATCTGTTTCATCC
OR7D4_3	CACCGATTATCAAAATTTCTCCTCC	AAACGGAGGAGAAATTTTGATAATC
PAQR6_1	CACCGGTTGTGGAACAGGAATGGAT	AAACATCCATTCTGTTCGACAACC

PAQR6_2	CACCGAGGCGAAGGCTCCTGTGCGG	AAACCCGCACAGGAGCCTTCGCCTC
PAQR6_3	CACCGTCCTTACCCGATAAAAGAGT	AAACTCTTTTTATCGGGTAAGGAC
PDE1B_1	CACCGTAACATCGGCTGCGTGATC	AAACGATCCACGCAGCCGATGTTAC
PDE1B_2	CACCGTCTGGGTAACATCGGCTGCG	AAACCGCAGCCGATGTTACCCAGAC
PDE1B_3	CACCGGAACCGCAGTAGAGTAAGTG	AAACCACTTACTCTACTGCGGTTCC
PELO_1	CACCGGGCTTGAGAGTCGAAGTCGA	AAACTCGACTTCGACTCTCAAGCCC
PELO_2	CACCGCACTTACAACCTCGTGACAGG	AAACCCTGCACGAGGTTGTAAGTGC
PELO_3	CACCGGGTACTGGAGCGCATCGAGC	AAACGCTCGATGCGCTCCAGTACCC
PES1_1	CACCGTGCCTACTAGCTCGAGGGTC	AAACGACCCTCGAGCTAGTAGGCAC
PES1_2	CACCGCCCTTTGCCTACTAGCTCGA	AAACTCGAGCTAGTAGGCAAAGGGC
PES1_3	CACCGGGCTGGGGTCTACCTTCGG	AAACCCGAAGGTAGGACCCCAGCCC
PGK1_1	CACCGAGAGTTCTTCATACCCGCCC	AAACGGGCGGGTATGAAGAACTCTC
PGK1_2	CACCGCCAGCATATTATTGATGAGC	AAACGCTCATCAATAATATGCTGGC
PGK1_3	CACCGTCTCTTTGGTTGCAGGATTA	AAACTAATCCTGCAACCAAAGAGAC
PHIP_1	CACCGCTACGTCTTAGTCCTACGTT	AAACAACGTAGGACTAAGACGTAGC
PHIP_2	CACCGACTCTAGGATCGAACGGGTG	AAACCACCCGTTTCGATCCTAGAGTC
PHIP_3	CACCGTTATCGTACAAGATCTGCAT	AAACATGCAGATCTTGTACGATAAC
PNPT1_1	CACCGCCTTCTGCCACGGCGGGATC	AAACGATCCC GCCGTGGCAGAAGGC
PNPT1_2	CACCGTCACTATAGGTGCGATGGTC	AAACGACCATCGCACCTATAGTGAC
PNPT1_3	CACCGCTATATCACTATAGGTGCGA	AAACTCGCACCTATAGTGATATAGC
POLR2E_1	CACCGTCAACAGATAGCCACGGTCG	AAACCGACCGTGGCTATCTGGTGAC
POLR2E_2	CACCGCATCACACGGGCTCTCATCG	AAACCGATGAGAGCCCGTGTGATGC
POLR2E_3	CACCGGTGCCACGACCGTGGCTATC	AAACGATAGCCACGGTTCGTGGCACC
PPP1CB_1	CACCGGATTGATGCTAGCACACTCA	AAACTGAGTGTGCTAGCATCAATCC
PPP1CB_2	CACCGTCAGTACGAGGATGTCTGTC	AAACGGACGACATCCTCGTACTGAC
PPP1CB_3	CACCGAGGCTTATGTATCAAGTCTC	AAACGAGACTTGATACATAAGCCTC
PPP1R37_1	CACCGACACGATATCCTCGTCGGAC	AAACGTCCGACGAGGATATCGTGTC
PPP1R37_2	CACCGCGTCACATTCCCGTCCGACG	AAACCGTCCGACGGGAATGTGACGC
PPP1R37_3	CACCGCATGATCGAGTACTACGAGT	AAACTCGTAGTACTCGATCATGC
PRR13_1	CACCGCCCCAAACACCTACCGGCAT	AAACATGCCGGTAGGTGTTTGGGGC
PRR13_2	CACCGCCCCAAACACCTACCGGCATT	AAACAATGCCGGTAGGTGTTTGGGC
PRR13_3	CACCGGGACCCAACGGTTGGCATCC	AAACGGATGCCAACCGTTGGGTCCC
PSMA7_1	CACCGCTTCAGACTGGCGATGTAGC	AAACGCTACATCGCCAGTCTGAAGC
PSMA7_2	CACCGCGCGGTGAGCCCTTCTTGA	AAACTCAAGAAGGGCTCGACCGCGC
PSMA7_3	CACCGCCAAGTGGAGTACGCGCAGG	AAACCCTGCGCGTACTCCACTTGGC
PTPN11_1	CACCGAATATTGATACTTACAGGGC	AAACGCCCTGTAAGTATCAATATTC
PTPN11_2	CACCGGTTACTGACCTTTCAGAGGT	AAACACCTCTGAAAGGTCAGTAACC
PTPN11_3	CACCGTTCTTCTAGTTGATCATAACC	AAACGGTATGATCAACTAGAAGAAC
PTTG1_1	CACCGGATACTACCTAGAGGATTGA	AAACTCAATCCTCTAGGTAGTATCC
PTTG1_2	CACCGCCCGTGTGGTTGCTAAGGAT	AAACATCCTTAGCAACCACACGGGC
PTTG1_3	CACCGGCCCATCCTTAGCAACCACA	AAACTGTGGTTGCTAAGGATGGGCC
RAD51C_1	CACCGGTTACCTTTGCTAAGCTCGG	AAACCCGAGCTTAGCAAAGGTAACC
RAD51C_2	CACCGCTTGAGCAGGAGCATACCCA	AAACTGGGTATGCTCCTGCTCAAGC
RAD51C_3	CACCGTCAGCACTAGATGATATTCT	AAACAGAATATCATCTAGTGCTGAC
RBX1_1	CACCGCTTCTGAAGTAGCGGACGCC	AAACGGCGTCCGCTACTTCAGAAGC
RBX1_2	CACCGCATAGAATGTCAAGCTAACC	AAACGGTTAGCTTGACATTCTATGC

RBX1_3	CACCGACCCCGAGCGGCACCAACAG	AAACCTGTTGGTGCCGCTCGGGGTC
RDM1_1	CACCGTTAATGACGGCATAGAAACC	AAACGGTTTCTATGCCGTCATTAAC
RDM1_2	CACCGGTTTCAATGGGTGTTCCAAA	AAACTTTGGAACACCCATTGAAACC
RDM1_3	CACCGCTTGGCATTTGGAAGTGTTC	AAACGAACAGTTCCAAATGCCAAGC
REL_1	CACCGTAAATTGGGTTCGAGACAAC	AAACGTTGTCTCGAACCCAATTTAC
REL_2	CACCGATTGGGTTCGAGACAACAGG	AAACCCTGTTGTCTCGAACCCAATC
REL_3	CACCGGGTCTATTACCTGGATAGAA	AAACTTCTATCCAGGTAATAGACCC
RELA_1	CACCGTGCCGAGTGAACCGAAACTC	AAACGAGTTTCGGTTCACTCGGCAC
RELA_2	CACCGAGCAGAGCCGCACAGCATTG	AAACGAATGCTGTGCGGCTCTGCTC
RELA_3	CACCGGTTCTATAGAAGAGCAGCG	AAACCGCTGCTCTTCTATAGGAACC
RELB_1	CACCGTACATCAAGGAGAACGGCTT	AAACAAGCCGTTCTCCTTGATGTAC
RELB_2	CACCGGGGACACTAGTCGGCCAGG	AAACCCTGGGCCGACTAGTGTCCCC
RELB_3	CACCGCTACGAGTGCGAGGGCCGCT	AAACAGCGGCCCTCGCACTCGTAGC
RERE_1	CACCGAGTCGCAGCGTCAACGATGA	AAACTCATCGTTGACGCTGCGACTC
RERE_2	CACCGTTAAGAGTAACAAACGCCAG	AAACCTGGCGTTTGTTACTCTTAAC
RERE_3	CACCGCAGATGTCGACACTACGCAG	AAACCTGCGTAGTGTGACATCTGC
RFC5_1	CACCGCGCTGCACGAGGTTTCGGTT	AAACAACCGAAACCTCGTGACGCG
RFC5_2	CACCGCGAACCGAAACCTCGTGACG	AAACCTGCACGAGGTTTCGGTTCGC
RFC5_3	CACCGCTGAATGCTTCAGATGACCG	AAACCGGTCATCTGAAGCATTGAGC
RNF125_1	CACCGGCGCAGTGAAGGACGTGAC	AAACGTCACGTCCTTCGACTGCGCC
RNF125_2	CACCGGGAAGATATGCCCGGAATA	AAACTATTGCCGGGCATATCTTCCC
RNF125_3	CACCGCTTTAGACTGGTAGCAATAC	AAACGTATTGCTACCAGTCTAAAGC
RNF20_1	CACCGTATTGATTGTCAACCGATAC	AAACGTATCGGTTGACAATCAATAC
RNF20_2	CACCGGCTCCAGATCATAACGTTTA	AAACTAAACGTTATGATCTGGAGCC
RNF20_3	CACCGCATCCTTAAACGTTATGATC	AAACGATCATAACGTTTAAAGGATGC
RNF8_1	CACCGGTGACTGTAGGACGAGGATT	AAACAATCCTCGTCCTACAGTCACC
RNF8_2	CACCGAGCGCGTCTGGAACCTTTAA	AAACTTAAAGGTTCCAGACGCGCTC
RNF8_3	CACCGCTTGAGCCAAGTAAGACCAC	AAACGTGGTCTTACTTGGCTCAAGC
RPL13A_1	CACCGCACGCTCTGCTCACCTCGCA	AAACTGCGAGGTGAGCAGAGCGTGC
RPL13A_2	CACCGGCATAGCTCACCTTGTCGTA	AAACTACGACAAGGTGAGCTATGCC
RPL13A_3	CACCGTAGCTCACCTTGTCGTAGGG	AAACCCCTACGACAAGGTGAGCTAC
RPLP0_1	CACCGCTGCACCTTACGATGATCTTA	AAACTAAGATCATCGTAAGTGCAGC
RPLP0_2	CACCGCAATTGTCCCTTACCTTAT	AAACATAAGGTAAGGGGACAATTGC
RPLP0_3	CACCGCACACAGCCTTCCCGCGAA	AAACTTCGCGGGAAGGCTGTGGTGC
RPS16_1	CACCGCCTGGGACTACCATAAATC	AAACGATTTATGGTGAGTCCCAGGC
RPS16_2	CACCGACCTTGTAAGTGTAGCGTGCG	AAACCGCACGCTACAGTACAAGGTC
RPS16_3	CACCGACAGAAGACAGCGACAGCTG	AAACCAGCTGTCGCTGTCTTCTGTC
RPS3A_1	CACCGCGCGACTTACACTTTCTTCT	AAACAGAAGAAAGTGTAAAGTCGCGC
RPS3A_2	CACCGTAAGCTACTTACTGGTTCCT	AAACAGGAACCAGTAAGTAGCTTAC
RPS3A_3	CACCGCTTACTGGTTCCTTGGGTCC	AAACGGACCCAAGGAACCAGTAAGC
RRM2_1	CACCGGGGTCCTCCGATTACCTCCT	AAACAGGAGGTAATCGGAGGACCCC
RRM2_2	CACCGGATCCTCCTCGCGGTCTTGC	AAACGCAAGACCGCGAGGAGGATCC
RRM2_3	CACCGTCCTCCGATTACCTCCTCGG	AAACCCGAGGAGGTAATCGGAGGAC
RUNX1_1	CACCGGGTAGGTGGCGACTTGCGGT	AAACACCGCAAGTCGCCACCTACCC
RUNX1_2	CACCGCTCAGGTTTGTGCGGTGCAAG	AAACCTTCGACCGACAAACCTGAGC
RUNX1_3	CACCGTTCACTGAGCCGCTCGGAAA	AAACTTTCGAGCGGCTCAGTGAAC

SDE2_1	CACCGATCCCGACAAGCTTCTCGAT	AAACATCGAGAAGCTTGTCTGGGATC
SDE2_2	CACCGCCGGTGGATAAAAATCCCGGA	AAACTCCGGGATTTTATCCACCGGC
SDE2_3	CACCGAGTGCCGGTGGATAAAAATCC	AAACGGATTTTATCCACCGGCACTC
SETD2_1	CACCGACTCTGATCGTCTGCTACCAT	AAACATGGTAGCGACGATCAGAGTC
SETD2_2	CACCGTAGCGGTCCTCTCTCGATA	AAACTATCGAGAGAGGACGCGCTAC
SETD2_3	CACCGCAAGAAACCCTCGTATCAAC	AAACGTTGATACGAGGGTTTCTTGC
SETD8_1	CACCGCTGCTTACCCCGTCCGGTGCG	AAACCGCACCGACGGGGTAAGCAGC
SETD8_2	CACCGAGGGTGCCTGCTTACCCCGT	AAACACGGGGTAAGCAGGCACCCTC
SETD8_3	CACCGGCACGTGACTACCTGCAGCT	AAACAGCTGCAGGTAGTCACGTGCC
SF1_1	CACCGCTGACTCGTAAACTGCGCAC	AAACGTGCGCAGTTTACGAGTCAGC
SF1_2	CACCGATGCCAAGATTATGATCCGG	AAACCCGGATCATAATCTTGGCATC
SF1_3	CACCGAGCCCATCTACAATAGCGAG	AAACCTCGCTATTGTAGATGGGCTC
SLC25A3_1	CACCGGCTGGTGCACGATGGTCTCG	AAACCGAGACCATCGTGCACCAGCC
SLC25A3_2	CACCGCAACACGCCACATCTGCAGC	AAACGCTGCAGATGTGGCGTGTTC
SLC25A3_3	CACCGCTTAAAGAGGATGGTGTTCG	AAACCGAACACCATCCTCTTTAAGC
SLC34A1_1	CACCGCGCCTGCATCAGGGCCACGA	AAACTCGTGGCCCTGATGCAGGCGC
SLC34A1_2	CACCGCTCGCATCACATGCCCCCA	AAACTGGGGGGCATGTGATGCGAGC
SLC34A1_3	CACCGTCACATGCCCCACGGACT	AAACAGTCCGTGGGGGCATGTGAC
SLC7A1_1	CACCGAGGTACTTCAAGCGTAGCGA	AAACTCGCTACGCTTGAAGTACCTC
SLC7A1_2	CACCGGCCTATCAGCTCGTGAAGG	AAACCCCTTCGACGAGCTGATAGGCC
SLC7A1_3	CACCGGTCCGTGAGAACTCCCGAT	AAACATCGGGGAGTTCTCACGGACC
SLIT3_1	CACCGCTTCCGAGCGCTGCGCGATT	AAACAATCGCGCAGCGCTCGGAAGC
SLIT3_2	CACCGTCTCAAATCGCGCAGCGCT	AAACAGCGCTGCGCGATTTGGAGAC
SLIT3_3	CACCGCAAATCGCGCAGCGCTCGGA	AAACTCCGAGCGCTGCGCGATTTGC
SLITRK3_1	CACCGTTAGTCAGATTACCGAGTTC	AAACGAACTCGGTAATCTGACTAAC
SLITRK3_2	CACCGGTCCTCTATTAGGGGAATCG	AAACCGATTCCCCTAATAGAGGACC
SLITRK3_3	CACCGTACCCCGATTCCCCTAATAG	AAACCTATTAGGGGAATCGGGGTAC
SMARCC2_1	CACCGTTGTCCCGTTCGATCTGAATC	AAACGATTCAGATCGACGGGACAAC
SMARCC2_2	CACCGAGTTCGACAACGTGCGGCTG	AAACCAGCCGCACGTTGTGAACTC
SMARCC2_3	CACCGCCTTACACTAAGTCAAAGCG	AAACCGCTTTGACTTAGTGTAAAGGC
SNRNP35_1	CACCGTGAAGACCCACACGACCGCG	AAACCGCGGTGCTGTGGGTCTTCAC
SNRNP35_2	CACCGTCCAGACCGCGCGGTCTGT	AAACACACGACCGCGCGGTCTGGAC
SNRNP35_3	CACCGACACGACCGCGCGGTCTGGA	AAACTCCAGACCGCGCGGTCTGTGC
SNW1_1	CACCGGCCTTTCCGGTATCCGTACG	AAACCGTACGGATACCGGAAAGGCC
SNW1_2	CACCGCCCCGTACGGATACCGGAA	AAACTTCCGGTATCCGTACGGGGGC
SNW1_3	CACCGCAGCCTTTCCGGTATCCGTA	AAACTACGGATACCGGAAAGGCTGC
SPAG6_1	CACCGGAGAACTCTTCTTCTGGACG	AAACCGTCCAGAAGAAGAGTTCTCC
SPAG6_2	CACCGTTGTGGAGCACTGGATACGC	AAACGCGTATCCAGTGCTCCACAAC
SPAG6_3	CACCGGCTCAGGCAATAGTCGATTG	AAACCAATCGACTATTGCCTGAGCC
SPINK14_1	CACCGAGACACTGGTGGCCACCACG	AAACCGTGGTGGCCACCAGTGTCTC
SPINK14_2	CACCGTTTCAGGCCCTAGACACTGG	AAACCCAGTGTCTAGGGCCTGAAAC
SPINK14_3	CACCGACCTTAATAATTCCACGTGG	AAACCCACGTGGAATTATTAAGGTC
SSRP1_1	CACCGCGAATGTCATAACGACCACG	AAACCGTGGTCTTATGACATTTCGC
SSRP1_2	CACCGCCCGGCTGACCATCTCATAG	AAACCTATGAGATGGTCAGCCGGGC
SSRP1_3	CACCGTCGACTGAGGTTGAGCCGTC	AAACGACGGCTCAACCTCAGTCGAC
STAT5B_1	CACCGTGCGGCATTATTTATCCAG	AAACCTGGGATAAATAATGCCGCAC

STAT5B_2	CACCGCATCAGATGCAAGCGTTATA	AAACTATAACGCTTGCATCTGATGC
STAT5B_3	CACCGTCTAGCTCAGTTTGGCCCGC	AAACGCGGGCCAAACTGAGCTAGAC
STX12_1	CACCGTGCTGCTGAAGTCCCGGAGC	AAACGCTCCGGGACTTCAGCAGCAC
STX12_2	CACCGGGTACCCCGGCTCACTGGCT	AAACAGCCAGTGAGCCGGGGTACCC
STX12_3	CACCGAGCATCATCCAGACGTGCAG	AAACCTGCACGTCTGGATGATGCTC
SUZ12_1	CACCGCAGTTCACTCTTCGTTGGAC	AAACGTCCAACGAAGAGTGAAGTGC
SUZ12_2	CACCGCGAAGAGTGAAGTGAACGCT	AAACACGTTGCAGTTCACCTCTTCGC
SUZ12_3	CACCGCATTTGCAGCTTACGTTTAC	AAACGTAAACGTAAGCTGCAAATGC
TCP1_1	CACCGAAACGCATTGCCAAAGCTTC	AAACGAAGCTTTGGCAATGCGTTTC
TCP1_2	CACCGACAGAGTTGACTGGATAGCG	AAACCGCTATCCAGTCAACTCTGTC
TCP1_3	CACCGAGACATACCTCCAGAAGCTT	AAACAAGCTTCTGGAGGTATGTCTC
THOP1_1	CACCGCACGCACGCCGACTATGTCC	AAACGGACATAGTCGGCGTGCGTGC
THOP1_2	CACCGAACCTGGTCATACACGCGCT	AAACAGCGCGTGTATGACCAGGTTC
THOP1_3	CACCGCTGTGGTAAACGACCTGCGG	AAACCCGCAGGTCGTTTACCACAGC
TIGD3_1	CACCGCTCGTCGATCCCGCTGTACT	AAACAGTACAGCGGGATCGACGAGC
TIGD3_2	CACCGCAAGTACAGCGGGATCGACG	AAACCGTCGATCCCGCTGTACTTGC
TIGD3_3	CACCGTCTTGAGATGCGCGAGATC	AAACGATCTCGCGCATCTGCAAGAC
TLDC1_1	CACCGTGCGGAGGGTCGACCTGACA	AAACTGTCAGGTCGACCCTCCGCAC
TLDC1_2	CACCGGTCCCCGGCAGAACCACGTC	AAACGACGTGGTTCTGCCGGGGACC
TLDC1_3	CACCGCTGTGACCGAGCTGTGATCG	AAACCGATCACAGCTCGGTACAGC
TLR4_1	CACCGAGTAGTCTAAGTATGCTAAT	AAACATTAGCATACTTAGACTACTC
TLR4_2	CACCGAGAAGTCCATCGTTTGGTTC	AAACGAACCAAACGATGGACTTCTC
TLR4_3	CACCGATAAGTCAATAATATCATCG	AAACCGATGATATTATTGACTTATC
TLR7_1	CACCGAATGGGGCATTATAACAACG	AAACCGTTGTTATAATGCCCCATTC
TLR7_2	CACCGGTGAGGTTCTGTTGTTCTG	AAACACGAACACCACGAACCTCACC
TLR7_3	CACCGCAGATCCAATTGGATGAGGC	AAACGCCTCATCCAATTGGATCTGC
TMCC2_1	CACCGGGAGGCTCGCGACGACAATG	AAACCATTGTCTGTCGCGAGCCTCCC
TMCC2_2	CACCGCCGCCGTCGGTCTCGGGAAA	AAACTTTCCCGAGACCGACGGCGGC
TMCC2_3	CACCGAGCACGCGGTTGAAGGCGGT	AAACACCGCCTTCAACCGCGTGCTC
TMEM52_1	CACCGCCCCGACTTACTGGTCCGAG	AAACCTCGGACCAGTAAGTCGGGGC
TMEM52_2	CACCGCCCCCGACTTACTGGTCCG	AAACCGGACCAGTAAGTCGGGGGGC
TMEM52_3	CACCGAGGGATGACTGCCACGTGCG	AAACGCGACGTGGCAGTCATCCCTC
TMSB10_1	CACCGGGAAATCGCCAGCTTCGATA	AAACTATCGAAGCTGGCGATTTCCC
TMSB10_2	CACCGCAGCTTGGCCTTATCGAAGC	AAACGCTTCGATAAGGCCAAGCTGC
TMSB10_3	CACCGGCTGAAGAAAACGGAGACGC	AAACGCGTCTCCGTTTTCTCAGCC
TNFAIP3_1	CACCGTTCCAGTGTGTATCGGTGCA	AAACTGCACCGATACACACTGGAAC
TNFAIP3_2	CACCGCACGCAACTTTAAATTCCGC	AAACGCGGAATTTAAAGTTGCGTGC
TNFAIP3_3	CACCGTGTATAGCCGAGAACAATG	AAACCATTGTTCTCGGCTATGACAC
TPTE_1	CACCGTCTAGATAGAACAGGAACTA	AAACTAGTTCCTGTTCTATCTAGAC
TPTE_2	CACCGTGATTCTAACGACCCTATTA	AAACTAATAGGGTCGTTAGAATCAC
TPTE_3	CACCGATAAAGACCCTTACCTTGAT	AAACATCAAGGTAAGGGTCTTTATC
TUBB_1	CACCGGACTGCATTCCAGGTCAGTC	AAACGACTGACCTGGAATGCAGTCC
TUBB_2	CACCGACTGCATTCCAGGTCAGTCT	AAACAGACTGACCTGGAATGCAGTC
TUBB_3	CACCGTCCCCCTCGGCAGTTCTGGG	AAACCCCGAAGTCCGAGGGGGAC
TXNL4A_1	CACCGCCTTCTCGGCGATGCTGTAC	AAACGTACAGCATCGCCGAGAAGGC
TXNL4A_2	CACCGAGTCCGGCGCGCTACCTTCT	AAACAGAAGGTAGCGCGCCGGACTC

TXNL4A_3	CACCGTCGTCCATCTTCATGCACGT	AAACACGTGCATGAAGATGGACGAC
UBXN7_1	CACCGACCGCGTCTCTTACCGGTAA	AAACTTACCGGTAAGAGACGCGGTC
UBXN7_2	CACCGTGCTCCACACATCGCGGTTG	AAACCAACCGCGATGTGTGGAGCAC
UBXN7_3	CACCGAGTGCCTCAACCGCGATGTG	AAACCACATCGCGGTTGAGGCACTC
UMPS_1	CACCGCCCCGCAGATCGATGTAGAT	AAACATCTACATCGATCTGCGGGGC
UMPS_2	CACCGCCGCAGATCGATGTAGATGG	AAACCCATCTACATCGATCTGCGGC
UMPS_3	CACCGTTTGTGGCAGCGAATCATAA	AAACTTATGATTCGCTGCCACAAAC
USF2_1	CACCGCAGCCACGACAAGGGACCCG	AAACCGGGTCCCTTGTGCTGGCTGC
USF2_2	CACCGCCACGACAAGGGACCCGAGG	AAACCCCTCGGGTCCCTTGTGCTGGC
USF2_3	CACCGGCGTCATCATGACGTAGAAC	AAACGTTCTACGTCATGATGACGCC
UTP3_1	CACCGCCCACGCTCACCGACGAAAA	AAACTTTTCGTCGGTGAGCGTGGGC
UTP3_2	CACCGTCCCGGGCCGCTTAGCTAA	AAACTTAGCTAAGGCGGCCCCGGGAC
UTP3_3	CACCGACTTTCATGAGGCACGATCC	AAACGGATCGTGCCTCATGAAAGTC
VDAC1_1	CACCGTTGAAGGAATTTACAAGCTC	AAACGAGCTTGTAATTCCTTCAAC
VDAC1_2	CACCGGCAACACTCACCATAGCCCT	AAACAGGGCTATGGTGAGTGTTGCC
VDAC1_3	CACCGTGAAACTCTTACCCAGTGTT	AAACAACACTGGGTAAGAGTTTCAC
VPS18_1	CACCGACTGGTAATGCGCTCGGAAG	AAACCTTCCGAGCGCATTACCAGTC
VPS18_2	CACCGAGACTGGTAATGCGCTCGGA	AAACTCCGAGCGCATTACCAGTCTC
VPS18_3	CACCGCATTTAGCACGTACAATGGG	AAACCCCATTTGACGTGCTAAATGC
WDR20_1	CACCGCTGGTCGTTGAGGTTTACGA	AAACTCGTAAACCTCAACGACCAGC
WDR20_2	CACCGCCGGGTGCCCTTCAACTCGC	AAACGCGAGTTGAAGGGCACCCGGC
WDR20_3	CACCGTTACGAAGGAGACGCGGACA	AAACTGTCCGCGTCTCCTTCGTAAC
WNT5A_1	CACCGAGTATCAATTCCGACATCGA	AAACTCGATGTCGGAATTGATACTC
WNT5A_2	CACCGTTCGATGTGCGAATTGATAC	AAACGTATCAATTCCGACATCGAAC
WNT5A_3	CACCGCGAGACGGCCTTCACATACG	AAACCGTATGTGAAGGCCGTCTCGC
XRCC6_1	CACCGAAATATGCCACCTGTATCT	AAACAGATACAGGTGGGCATATTTT
XRCC6_2	CACCGTCTACCTACCTGAGACCTCT	AAACAGAGGTCTCAGGTAGGTAGAC
XRCC6_3	CACCGCTCCCTGTTGCGTGTACCCAG	AAACCTGGGTACACGAACAGGGAGC
ZBTB20_1	CACCGTCATGTACAGCGGCGTGCTA	AAACTAGCACGCCGCTGTACATGAC
ZBTB20_2	CACCGGACGTAACGGTGCGCATCCA	AAACTGGATGCGCACCGTTACGTCC
ZBTB20_3	CACCGACGGTTGCGCTGCTCGTTGA	AAACTCAACGAGCAGCGCAACCGTC
ZBTB39_1	CACCGTGCGACGTCACCATTGTGGT	AAACACCACAATGGTGACGTGCGAC
ZBTB39_2	CACCGCTACGAGGTAGCTGAGCGTC	AAACGACGCTCAGCTACCTCGTAGC
ZBTB39_3	CACCGCAGGCTATGGTTAGCGTCAC	AAACGTGACGCTAACCATAGCCTGC
ZBTB7A_1	CACCGTAAGCCGTTGCAGTCGCCCG	AAACCGGGCGACTGCAACGGCTTAC
ZBTB7A_2	CACCGATCATCGGACGCCCAAAGG	AAACCCTTTGGGGCGTCCGATGATC
ZBTB7A_3	CACCGGTCATCATCGGACGCCCAA	AAACTTGGGGCGTCCGATGATGACC
ZDHC8_1	CACCGGGCTTCAAACCTACCGCGAG	AAACCTCGCGGTGAGTTTGAAGCCC
ZDHC8_2	CACCGGGCTCCGCTGTACAAGAACG	AAACCGTTCTTGTACAGCGGAGCCC
ZDHC8_3	CACCGGCTTAGTGACAACGGGCTGA	AAACTCAGCCCCTTGTCACTAAGCC
ZNF175_1	CACCGCTTGATGACGTTGTTGGGTC	AAACGACCCAACAACGTCATCAAGC
ZNF175_2	CACCGGTATATCTGACAGATCATAC	AAACGTATGATCTGTCAGATATACC
ZNF175_3	CACCGCTATAGCCATCTCTTCGCAG	AAACCTGCGAAGAGATGGCTATAGC
ZNF398_1	CACCGGGCACAAACGAGGATCTAGCA	AAACTGCTAGATCCTCGTTGTGCC
ZNF398_2	CACCGATCTCAGATTCAACCAGAAG	AAACCTTCTGGTTGAATCTGAGATC
ZNF398_3	CACCGAACACCTGCTCGCCAACTGG	AAACCCAGTTGGCGAGCAGGTGTT

ZNRD1_1	CACCGGGTGACCGTATCCTGAGCCC	AAACGGGCTCAGGATACGGTCACCC
ZNRD1_2	CACCGTCGGTTGTGTTCCACCAACT	AAACAGTTGGTGGAACACAACCGAC
ZNRD1_3	CACCGTTCCTCCACCGACATAGGCA	AAACTGCCTATGTCGGTGGAGGAAC
ZSWIM4_1	CACCGACCAAAACACGATGCGCTTC	AAACGAAGCGCATCGTGTTTTGGTC
ZSWIM4_2	CACCGGGGCGTGCCGAATGCGGTAC	AAACGTACCGCATTCCGGCACGCCCC
ZSWIM4_3	CACCGAATCAGCATGCGCGCCCCGT	AAACACGGGGCGCGCATGCTGATTC
non-targeting_1	CACCGACGGAGGCTAAGCGTCGCAA	AAACTTGCGACGCTTAGCCTCCGTC
non-targeting_2	CACCGCGCTTCCGCGGCCCGTTCAA	AAACTTGAACGGGCCGCGGAAGCGC
non-targeting_3	CACCGATCGTTTTCCGCTTAACGGCG	AAACCGCCGTTAAGCGGAAACGATC
non-targeting_4	CACCGTAGGCGCGCCGCTCTCTAC	AAACGTAGAGAGCGGCGCGCCTAC
non-targeting_5	CACCGCCATATCGGGGCGAGACATG	AAACCATGTCTCGCCCCGATATGGC
non-targeting_6	CACCGTACTAACGCGCTCCTACAG	AAACCTGTAGGAGCGGCGTTAGTAC
non-targeting_7	CACCGTGAGGATCATGTCGAGCGCC	AAACGGCGCTCGACATGATCCTCAC
non-targeting_8	CACCGGGCCCGCATAGGATATCGC	AAACGCGATATCCTATGCGGGCCC
non-targeting_9	CACCGTAGACAACCGCGGAGAATGC	AAACGCATTCTCCGCGGTTGTCTAC
non-targeting_10	CACCGACGGGCGGCTATCGCTGACT	AAACAGTCAGCGATAGCCGCCCGTC
non-targeting_11	CACCGCGCGGAAATTTTACCGACGA	AAACTCGTCGGTAAAATTTCCGCGC
non-targeting_12	CACCGCTTACAATCGTCGGTCCAAT	AAACATTGGACCGACGATTGTAAGC
non-targeting_13	CACCGCGTGCGTCCCGGGTTACCC	AAACGGGTAACCCGGGACGCACGC
non-targeting_14	CACCGCGGAGTAACAAGCGGACGGA	AAACTCCGTCCGCTTGTTACTCCGC
non-targeting_15	CACCGCGAGTGTTATACGCACCGTT	AAACAACGGTGCGTATAACTCTCGC
non-targeting_16	CACCGCGACTAACCGGAAACTTTTT	AAACAAAAAGTTTCCGGTTAGTCGC
non-targeting_17	CACCGCAACGGGTTCTCCCGGCTAC	AAACGTAGCCGGGAGAACCCGTTGC
non-targeting_18	CACCGCAGGAGTCGCCGATACGCGT	AAACACGCGTATCGGCGACTCCTGC
non-targeting_19	CACCGTTCACGTCGTCTCGCGACCA	AAACTGGTCGCGAGACGACGTGAAC
non-targeting_20	CACCGTGTGGATTCCGCCGCTTA	AAACTAAGCGGCGGAATCCGACAC
non-targeting_21	CACCCACGAACTCACACCGCGCGA	AAACTCGCGCGGTGTGAGTTTCGTGC
non-targeting_22	CACCGCGCTAGTACGCTCCTCTATA	AAACTATAGAGGAGCGTACTAGCGC
non-targeting_23	CACCGTCGCGCTTGGGTTATACGCT	AAACAGCGTATAACCCAAGCGCGAC
non-targeting_24	CACCGCTATCTCGAGTGGTAATGCG	AAACCGCATTACCACTCGAGATAGC
non-targeting_25	CACCGAATCGACTCGAACTTCGTGT	AAACACACGAAGTTCGAGTCGATTC
non-targeting_26	CACCGCCCGATGGACTATACCGAAC	AAACGTTCCGGTATAGTCCATCGGGC
non-targeting_27	CACCGACGTTGAGTACGACCAGCT	AAACAGCTGGTCGTACTIONGACGTC
non-targeting_28	CACCGCGCGACGACTCAACCTAGTC	AAACGACTAGGTTGAGTCGTGCGCG
non-targeting_29	CACCGGTCACCGATCGAGAGCTAG	AAACCTAGCTCTCGATCGGTGACC
non-targeting_30	CACCGCTCAACCGACCGTATGGTCA	AAACTGACCATACGGTCCGTTGAGC
non-targeting_31	CACCGCGTATTCGACTCTCAACGCG	AAACCGCGTTGAGAGTCGAATACGC
non-targeting_32	CACCGCTAGCCGCCAGATCGAGCC	AAACGGCTCGATCTGGGCGGCTAGC
non-targeting_33	CACCGAATCGACCGACACTAATGT	AAACACATTAGTGTCCGGTTCGATTC
non-targeting_34	CACCGACTTCAGTTCGGCGTAGTCA	AAACTGACTACGCCGAAGTGAAGTC
non-targeting_35	CACCGTGCGATGTCGCTTCAACGT	AAACACGTTGAAGCGACATCGCAC
non-targeting_36	CACCGCGCCTAATTTCCGGATCAAT	AAACATTGATCCGGAATTAGGCGC
non-targeting_37	CACCGCGTGGCCGGAACCGTCATAG	AAACCTATGACGGTCCGGCCACGC
non-targeting_38	CACCGACCCTCCGAATCGTAACGGA	AAACTCCGTTACGATTCCGAGGGTC
non-targeting_39	CACCGAAACGGTACGACAGCGTGTG	AAACCACACGCTGTGATCCGTTTC
non-targeting_40	CACCGACATAGTCGACGGCTCGATT	AAACAATCGAGCCGTCGACTATGTC

non-targeting_41	CACCGATGGCGCTTCAGTCGTCGG	AAACCCGACGACTGAAGCGCCATC
non-targeting_42	CACCGATAATCCGGAAACGCTCGAC	AAACGTCGAGCGTTTCCGGATTATC
non-targeting_43	CACCGCGCCGGGCTGACAATTAACG	AAACCGTTAATTGTCAGCCCGGCGC
non-targeting_44	CACCGCGTCGCCATATGCCGGTGGC	AAACGCCACCGGCATATGGCGACGC
non-targeting_45	CACCGCGGGCCTATAACACCATCGA	AAACTCGATGGTGTATAGGCCCGC
non-targeting_46	CACCGCGCCGTTCCGAGATACTTGA	AAACTCAAGTATCTCGGAACGGCGC
non-targeting_47	CACCGCGGGACGTCGCGAAAATGTA	AAACTACATTTTCGCGACGTCCCGC
non-targeting_48	CACCGTCGGCATAACGGGACACACGC	AAACGCGTGTGTCCCGTATGCCGAC
non-targeting_49	CACCGAGCTCCATCGCCGCGATAAT	AAACATTATCGCGGCGATGGAGCTC
non-targeting_50	CACCGATCGTATCATCAGCTAGCGC	AAACGCGCTAGCTGATGATACGATC
non-targeting_51	CACCGTCGATCGAGGTTGCATTCCG	AAACCCGAATGCAACCTCGATCGAC
non-targeting_52	CACCGCTCGACAGTTCGTCCCGAGC	AAACGCTCGGGACGAACTGTGAGC
non-targeting_53	CACCGCGGTAGTATTAATCGCTGAC	AAACGTCAGCGATTAATACTACCGC
non-targeting_54	CACCGTGAACGCGTGTTCCTTGCA	AAACTGCAAGGAAACACGCGTTCAC
non-targeting_55	CACCGCGACGCTAGGTAACGTAGAG	AAACCTCTACGTTACCTAGCGTCGC
non-targeting_56	CACCGCATTGTTGAGCGGGCGCGCT	AAACAGCGCGCCCGCTCAACAATGC
non-targeting_57	CACCGCCGCTATTGAAACCGCCAC	AAACGTTGGCGGTTTCAATAGCGGC
non-targeting_58	CACCGAGACACGTCACCGGTCAAAA	AAACTTTTGACCGGTGACGTGTCTC
non-targeting_59	CACCGTTTACGATCTAGCGGCGTAG	AAACCTACGCCGCTAGATCGTAAAC
non-targeting_60	CACCGTTCGCACGATTGCACCTTGG	AAACCCAAGGTGCAATCGTGCGAAC
non-targeting_61	CACCGGTTAGAGACTAGGCGCGCG	AAACCGCGCGCCTAGTCTCTAAC
non-targeting_62	CACCGCCTCCGTGCTAACGCGGACG	AAACCGTCCGCGTTAGCACGGAGGC
non-targeting_63	CACCGTTATCGCGTAGTGCTGACGT	AAACACGTCAGCACTACGCGATAAC
non-targeting_64	CACCGTACGCTTGCGTTTAGCGTCC	AAACGGACGCTAAACGCAAGCGTAC
non-targeting_65	CACCGCGCGGCCACGCGTCATCGC	AAACGCGATGACGCGTGGGCCGCGC
non-targeting_66	CACCGAGCTCGCCATGTCGGTTCTC	AAACGAGAACCGACATGGCGAGCTC
non-targeting_67	CACCGAACTAGCCCGAGCAGCTTCG	AAACCGAAGCTGCTCGGGCTAGTTC
non-targeting_68	CACCGCGCAAGGTGTCGGTAACCCCT	AAACAGGGTTACCGACACCTTGCGC
non-targeting_69	CACCGCTTCGACGCCATCGTGCTCA	AAACTGAGCACGATGGCGTCGAAGC

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Henrike Lisa Sczakiel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Identifizierung Pathogenese-relevanter Kandidatengene im Hodgkin-Lymphom durch CRISPR/Cas9-basiertes *knockout*-Screening‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Henrike Lisa Sczakiel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Schleussner N., Merkel O., Costanza M., Liang H.C., Hummel F., Romagnani C., Durek P., Anagnostopoulos I., Hummel M., Jöhrens K., Niedobitek A., Griffin P.R., Piva R., Sczakiel H.L., Woessmann W., Damm-Welk C., Hinze C., Stoiber D., Gillissen B., Turner S.D., Kaergel E., von Hoff L., Grau M., Lenz G., Dörken B., Scheiderei C., Kenner L., Janz M., and Mathas S. (2018).

The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma.

Leukemia 32(9):1994-2007.

Beitrag im Einzelnen:

- Klonierung der sgRNAs für CRISPR/Cas9-*knockout* von BATF und BATF3. Methoden: siehe *Supplementary Methods*. Verwendung dieser in *Figure 4E*.

- Klonierung von lentiviralen Expressionskonstrukten für BATF und BATF3. Methoden: siehe *Supplementary Methods*. Verwendung dieser in *Supplementary Figure 3A*.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

Schleussner N., Merkel O., Costanza M., Liang H.C., Hummel F., Romagnani C., Durek P., Anagnostopoulos I., Hummel M., Jöhrens K., Niedobitek A., Griffin P.R., Piva R., **Sczakiel H.L.**, Woessmann W., Damm-Welk C., Hinze C., Stoiber D., Gillissen B., Turner S.D., Kaergel E., von Hoff L., Grau M., Lenz G., Dörken B., Scheidereit C., Kenner L., Janz M., and Mathas S. (2018). **The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma.** *Leukemia* 32(9):1994-2007.

DANKSAGUNG

In erster Linie danke ich Herrn PD Dr. Martin Janz für die Überlassung dieses spannenden Projektes und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Vor allem bedanke ich mich dabei sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die sehr lehrreiche und enge Betreuung und Begleitung über all die Jahre hinweg.

Mein besonders herzlicher Dank gilt auch Brigitte Wollert-Wulf für die einmalige technische Einarbeitung und experimentelle wie persönliche Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Stephan Mathas sowie allen anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für Diskussionen und die unterstützende, kollegiale Atmosphäre.

Außerdem möchte ich unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Michael Hummel für Sequenzierungen, Dr. Robin Graf für sgRNA-Design und Arthur Yio für bioinformatische Unterstützung danken. Herrn Dr. Konrad Neumann vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie danke ich für die statistische Beratung.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und all meinen Freunden, die mich in den vergangenen Jahren begleitet und sehr unterstützt haben.