

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

Habilitationsschrift

Maligne Lymphome – Molekulare Mechanismen und therapeutische Implikationen deregulierter Signalwege

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Stephan Mathas
geboren in Köln

Eingereicht: Dezember 2014
Dekanin: Professor Dr. med. A. Grütters-Kieslich
1. Gutachter: Professor Dr. med. Ch. Peschel/TU München
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. M.-L. Hansmann/Frankfurt am Main

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGEN	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 Das klassische Hodgkin-Lymphom	5
1.2 Das anaplastische großzellige Lymphom	8
2. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG EIGENER ARBEITEN	10
2.1 Deregulierte Transkriptionsfaktoren und ihre Bedeutung für Wachstum und Apoptoseschutz der HRS-Zellen	10
2.1.1 Die aberrante Expression und Aktivität von AP-1-Transkriptionsfaktoren in HRS-Zellen	10
2.1.2 Die Inhibition von NF- κ B vermittelt Arsen-induzierte Apoptose in HRS-Zellen	22
2.1.3 Die Blockade Todesrezeptor-vermittelter Apoptose in HRS-Zellen durch c-FLIP	31
2.1.4 Die Identifikation von IRF5 als Schlüsselregulator in HRS-Zellen	45
2.2 Mechanismen und Konsequenzen von Alterationen Linien-spezifischer TF in lymphatischen Neoplasien	57
2.2.1 Die ABF-1 und ID2-vermittelte Reprogrammierung der HRS-Zellen	57
2.2.2 Die Bedeutung des Th2-Zytokins IL-21 für HRS-Zellen und das inflammatorische Begleitinfiltrat des cHL	68
2.2.3 Die Derepression einer repetitiven DNA-Region führt zur Aktivierung des <i>CSF1R</i> -Protoonkogens in humanen Lymphomzellen	78
2.2.4 BAY 43-9006/Sorafenib blockiert CSF1R und induziert Apoptose in HRS-Zelllinien	88
2.3 Die deregulierte Genexpression im Umfeld chromosomaler Bruchpunkte prädisponiert für die Entstehung von Translokationen im ALCL	93
3. DISKUSSION	101
3.1 Deregulierte Signalwege und Transkriptionsfaktoren im cHL	101
3.2 Therapeutische Implikationen deregulierter Signalwege in HRS-Zellen	102
3.3 Alterationen der E2A-Aktivität als Defekt lymphatischer Neoplasien	104
3.4 Einsichten in die Pathogenese des ALCL	107
4. ZUSAMMENFASSUNG	110
5. LITERATURANGABEN	111
DANKSAGUNG	115
ERKLÄRUNG	116

ABKÜRZUNGEN

ABF-1	activated B cell factor 1
ALCL	anaplastic large cell lymphoma; anaplastisches großzelliges Lymphom.
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ALPS	autoimmun-lymphoproliferatives Syndrom
AP-1	activator protein-1
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
BCR	B cell receptor; B-Zell-Rezeptor
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3
cHL	classical Hodgkin lymphoma; klassisches Hodgkin-Lymphom
CD	cluster of differentiation
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CGH	comparative genome hybridization
c-IAP	cellular inhibitor of apoptosis
CSF-1	colony stimulating factor-1
CSF1R	CSF-1-Rezeptor
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, LAG-1
CTCL	cutaneous T cell lymphoma; kutanes T-Zell-Lymphom
DISC	death inducing signaling complex
DNA	deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ETO	eight-twenty-one
FADD	Fas-associated via death domain
FISH	fluorescence in situ hybridization
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FRA2	Fos-related antigen 2
GC	germinal center; Keimzentrum
HHV	humanes Herpesvirus
HLH	helix-loop-helix
HRS	Hodgkin-/Reed-Sternberg
ID2	inhibitor of DNA binding 2; inhibitor of differentiation 2
I κ B α	inhibitor of kappa B α
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IL-21R	Interleukin-21-Rezeptor

IRF	interferon regulatory factor
LTR	long terminal repeat
MaLR	mammalian apparent LTR retrotransposon
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCL-1	myeloid cell leukemia 1
MIP-3 α	macrophage-inflammatory protein-3 α
mRNA	messenger RNA
NEMO	NF- κ B essential modifier
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NK	natural killer
NPM	nucleophosmin
NTC	NOTCH transcriptional complex
PEL	primary effusion lymphoma; primäres Effusionslymphom
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SCID	severe combined immunodeficiency
SeSy	Sézary-Syndrom
siRNA	small interfering RNA
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCF	T cell factor
TCR	T cell receptor; T-Zell-Rezeptor
TF	Transkriptionsfaktor
Th2	T helper 2 lymphocyte
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRE	TPA (12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol 13-acetate) response element
T _{reg}	regulatorische T-Zelle

1. EINLEITUNG

In den bisherigen Jahren meiner Forschungstätigkeit habe ich mich insbesondere mit der molekularen Pathogenese lymphatischer Neoplasien beschäftigt. Schwerpunkt der Forschungstätigkeit war dabei die Erforschung der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms (*classical Hodgkin lymphoma*; cHL), des anaplastischen großzelligen Lymphoms (*anaplastic large cell lymphoma*; ALCL) sowie kutaner T-Zell-Lymphome (*cutaneous T cell lymphomas*; CTCL), und die aus diesen Arbeiten resultierende Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiestrategien. Vor allem das cHL und das ALCL sind Gegenstand der hier präsentierten Arbeit, weshalb auf diese beiden Lymphomentitäten in der Einleitung ausführlicher eingegangen wird.

1.1 Das klassische Hodgkin-Lymphom

Das cHL ist beim Erwachsenen mit einer Inzidenz von 3 auf 100.000 eines der häufigsten malignen Lymphome. Histologisch lässt sich das cHL unter anderem durch die Zusammensetzung des zellulären Begleitinfiltrats und durch den Anteil Bindegewebs-ähnlicher Strukturen in vier Subtypen unterteilen: nodulär-sklerosierendes, gemischtzelliges, lymphozytenreiches und lymphozytenarmes cHL (1-3). Insbesondere aus zwei Gründen unterscheidet sich das cHL von so gut wie allen anderen hämatologischen Neoplasien und sogar allen anderen bösartigen Erkrankungen. Zum einen stellen die bösartigen einkernigen Hodgkin- und mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen (im Nachfolgenden als Hodgkin-/Reed-Sternberg- oder HRS-Zellen zusammengefasst) in der Regel nur einen sehr kleinen prozentualen Anteil der erkrankten Lymphknoten dar. So beträgt der Anteil der HRS-Zellen im befallenen Lymphomgewebe meist nur wenige Prozent (3, 4). Die HRS-Zellen werden dabei von einem inflammatorischen Begleitinfiltrat umgeben, das sich aus unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen, regulatorischen T-Zellen (sogenannten T_{reg} -Zellen), eosinophilen Granulozyten und Mastzellen zusammensetzt (4). Nach gängiger Ansicht werden die Zellen des inflammatorischen Begleitinfiltrats durch die außergewöhnliche Vielzahl der von den HRS-Zellen produzierten Zytokine und Chemokine angezogen und unterstützen ihr Überleben durch intensiven Zell-Zell-Kontakt (4). Das zweite einzigartige Charakteristikum des cHL ist der ungewöhnliche Phänotyp der HRS-Zellen (1, 5). HRS-Zellen tragen Merkmale von verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien wie Makrophagen, T-Zellen oder dendritischen Zellen sowie selten von B-Zellen und sind deshalb keiner hämatopoetischen Linie eindeutig zuzuordnen (1, 5). Im Gegensatz zum meist klaren histo-morphologischen Bild der Erkrankung blieb deshalb der zelluläre Ursprung der HRS-Zellen lange Zeit unklar. Erst mit den technischen Möglichkeiten der Einzelzellisolation von HRS-Zellen aus Lymphknotengewebe und der Analyse der Immunglobulingene auf Einzelzellebene konnte der Nachweis erbracht werden, dass HRS-Zellen eine klonale Tumorzellpopulation darstellen und von B-Zellen abstammen (1, 6, 7). Die Mechanismen und zellbiologischen Konsequenzen dieser unter hämatologischen Neoplasien sehr ungewöhnlichen Dedifferenzierung, d.h. dem bei einer B-Zell-

Abstammung bestehenden Verlust der Expression B-Zell-spezifischer Gene (8), sind bis heute nur teilweise geklärt (3) und unter anderem Gegenstand der hier dargestellten Arbeiten.

In den letzten Jahren konnten verschiedene molekulare und genomische Defekte der HRS-Zellen identifiziert werden, die zur Pathogenese dieses Lymphoms beitragen. Auf einige für die eigenen Arbeiten besonders relevanten Defekte soll in diesem Absatz eingegangen werden. Als ein zentraler molekularer Defekt der HRS-Zellen kann die konstitutive Aktivität des Transkriptionsfaktors (TF) *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) angesehen werden (3). Das cHL war eine der ersten Erkrankungen, in denen die onkogene Funktion von NF- κ B beschrieben werden konnte (9, 10). NF- κ B treibt das Wachstum der HRS-Zellen, schützt sie vor programmiertem Zelltod und ist für einen signifikanten Anteil des HRS-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms verantwortlich (10-12). Die zentrale Bedeutung von NF- κ B für die Biologie der HRS-Zellen wird durch verschiedene genomische Defekte von Komponenten des NF- κ B-Signalwegs unterstrichen. So zeigen HRS-Zellen beispielsweise rekurrente Defekte der NF- κ B-Inhibitorproteine *I κ B α* (*NFKBIA*) oder *I κ B ϵ* (*NFKBIE*) sowie des Negativregulators *A20* (*TNFAIP3*), welche alle die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs begünstigen (13-16). Weiterhin sind HRS-Zellen durch eine starke Aktivierung verschiedener *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Faktoren, vor allem STAT3, STAT5 und STAT6, charakterisiert (1). Auch hier bestätigen genomische Defekte wie beispielweise Amplifikationen der STAT-aktivierenden Kinase *JAK2* oder deletäre Mutationen der JAK-STAT-inhibitorischen Phosphatase *PTPN1* die essentielle Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs für die HRS-Zellen (17-19). Wie unter 2.1.1 weiter ausgeführt wurde in eigenen Arbeiten mit dem TF activator protein-1 (AP-1) eine weitere TF-Familie beschrieben, die in HRS-Zellen in ungewöhnlicher Stärke dereguliert ist und neben der Bedeutung für das Wachstum der HRS-Zellen für die Biologie der HRS-Zellen zentrale Gene wie *LGALS1* (*Galectin-1*) oder cluster of differentiation (CD) 30 (CD30) reguliert (20-22). Zudem hat der NOTCH-Signalweg eine wichtige Funktion im cHL (3, 23, 24).

Welche Mechanismen zu einer Aktivierung dieser Signalwege führen ist weitgehend unklar. Eine wichtige Rolle könnte dabei das Epstein-Barr-Virus (EBV) haben. EBV kann in HRS-Zellen von ca. 40 – 50% der cHL-Fälle nachgewiesen werden, und die akute EBV-Infektion (die sogenannte infektiöse Mononukleose) ist in den nachfolgenden 3 – 5 Jahren mit einer gesteigerten cHL-Inzidenz vergesellschaftet (1, 25). EBV kann u.a. über das Membranprotein LMP1 die NF- κ B- und AP-1-Signalwege aktivieren (26). Darüberhinaus wird die EBV-Infektion von HRS-Zellen mit dem Verlust des B-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms in Verbindung gebracht (27). Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle von EBV in der Pathogenese des cHL ist der Befund, dass einige der Mutationen von Genen des NF- κ B-Signalwegs eher in EBV-negativen cHL-Fällen gefunden werden, also die EBV-Infektion die Aktivierung dieses Signalwegs möglicherweise übernimmt (15, 28).

Der Verlust des B-Zell-Phänotyps im cHL scheint eher funktioneller Natur zu sein. So wurde u.a. durch eigene Forschungsarbeiten eine funktionelle Blockade des B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktornetzwerks beschrieben (29). Für eine solche funktionelle Blockade B-Zell-

spezifischer Gene spricht weiterhin, dass HRS-Zellen in einem prozentualen Anteil der cHL-Fälle immer wieder, wenn auch meist schwächer als normalerweise in B-Zellen, neben dem B-Zell-spezifischen TF Pax5 B-Zell-spezifische Gene wie CD20 exprimieren (30, 31). Weiterhin wurden epigenetische Veränderungen beschrieben, die zu dem Expressionsverlust B-Linien-spezifischer Gene führen (3, 32). In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass pharmakologisch induzierte epigenetische Veränderungen in non-Hodgkin-Zellen zur Aktivierung eines cHL-ähnlichen Genexpressionsprogramms führen (33).

Im Hinblick auf die Behandlung stellt das cHL eine außergewöhnliche Erfolgsgeschichte dar. Durch Polychemotherapie und gegebenenfalls Kombination mit Bestrahlung lassen sich in den frühen Stadien deutlich über 90% der cHL-Patienten heilen, und auch bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium ist die Heilungsrate hoch (34). Allerdings ist dieser Therapieerfolg mit einer relevanten Therapie-assoziierten Frühtoxizität (hier sind vor allem Organschäden und schwere infektiöse Komplikationen zu nennen) und Spättoxizität (vor allem Organschäden, Zweitneoplasien und Unfruchtbarkeit) behaftet (34). Aufgrund des oft jungen Alters der cHL-Patienten werden im Gegensatz zu anderen bösartigen Erkrankungen, die im späteren Alter auftreten, diese Komplikationen von den Patienten meist noch erlebt. Aus diesen Gründen ist die Entwicklung neuer zielgerichteter und vor allem weniger toxischer Therapiestrategien zur Behandlung des cHL von großer Bedeutung (35). Mit der Einführung des Chemotherapie-gekoppelten CD30-Antikörpers Brentuximab wurde in den letzten Jahren ein zielgerichtetes Therapieprinzip für die cHL-Behandlung erfolgreich etabliert (36). Ziel der Erforschung der cHL-Pathogenese ist die Entwicklung weiterer, auf molekularen Defekten der bösartigen HRS-Zellen basierenden Therapiestrategien, um die Behandlung mit Polychemotherapeutika weiter zu reduzieren oder ganz verzichtbar zu machen.

Zuletzt sei zum cHL bemerkt, dass die Seltenheit und Fragilität der HRS-Zellen die Forschungsarbeit mit aus Lymphknoten isolierten HRS-Zellen erschwert. Auch wenn die Aufreinigung von HRS-Zellen aus frischem Lymphknotengewebe und die Analyse genomischer Defekte in den so aufgereinigten HRS-Zellen oder in den durch Mikrodissektion gewonnenen Einzelzellen machbar sind (37, 38), sind molekularbiologische Studien mit solchen Zellen so gut wie nicht durchführbar. Aus diesem Grund wurden molekularbiologische und zellbiologische Untersuchungen an HRS-Zellen fast ausnahmslos an Zelllinien durchgeführt. Hierzu steht eine zwar begrenzte aber gut charakterisierte Anzahl von HRS-Zelllinien zur Verfügung, die teilweise einen B-Zell-, aber auch einen T-Zell-Ursprung haben (39-41). Die Identifikation wegweisender molekularer sowie genomischer Defekte der cHL-Pathogenese hat in einer Vielzahl von Untersuchungen den Nutzen dieser Zelllinien als Modelle für HRS-Zellen bestätigt (16, 17, 42, 43). Die meisten der etablierten HRS-Zelllinien wurden für die hier vorgestellten experimentellen Arbeiten genutzt. Dabei wurden alle Schlüsselbefunde an primären cHL-Fällen immunhistochemisch oder molekularbiologisch überprüft.

1.2 Das anaplastische großzellige Lymphom

Das ALCL ist eine recht seltene Lymphomentität, die in der Regel von T-Zellen abstammt und durch großzellige, pleomorphe CD30-positive Tumorzellen charakterisiert ist (44). Erstmals im ALCL wurde mit der t(2;5)(p23;q35) eine charakteristische Translokation beschrieben, die über die Fusion des N-Terminus von *nucleophosmin* (NPM) mit dem C-terminus der *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) zur Expression des NPM-ALK Fusionsproteins und damit zur konstitutiven Aktivierung der onkogenen ALK führt (45, 46). Diese Kinase wird normalerweise in lymphatischen Zellen nicht exprimiert (47). NPM-ALK transformiert verschiedene Zelltypen *in vitro*; dieses transformierende Potential wurde zudem in verschiedenen Mausmodellen *in vivo* bestätigt (47, 48). Sein transformierendes Potential vermittelt NPM-ALK über eine durch die ALK-Kinasedomäne vermittelte Aktivierung verschiedener onkogener Signalwege und TF wie beispielsweise STAT3 oder AP-1 (47, 48). Im Weiteren werden ALCL mit ALK-Translokation als ALK-positive ALCL bezeichnet.

Passend zu einer zentralen Funktion von ALK im ALK-positiven ALCL führt die spezifische ALK-Hemmung zum Zelltod verschiedener ALCL-Zelllinien, zur Regression von ALCL-Xenotransplantaten *in vivo* sowie zur Remission von ALK-positiven ALCL in Patienten (49-51). Zu erwähnen ist, dass neben NPM mittlerweile eine größere Zahl anderer Translokationspartner von ALK beschrieben wurde; je nach Translokationspartner befindet sich dabei das Fusionsprotein eher oder ausschließlich im Zellkern oder Zytoplasma (44, 48). Interessanterweise werden ALK-Translokationen nur in ca. 40 – 60% der ALCL-Fälle gefunden (44, 48). In den übrigen Fällen lassen sich trotz so gut wie nicht zu unterscheidendem pathologisch-anatomischem Erscheinungsbild ALK-Translokationen nicht nachweisen (im Weiteren als ALK-negative ALCL bezeichnet). Auch auf mehr globaler Ebene, beispielsweise durch *microarray*-basierte Genexpressionsanalysen, zeigen sich viele Gemeinsamkeiten zwischen ALK-positiven und ALK-negativen ALCL. Auch wenn es beispielsweise im Expressionsprofil der micro-RNAs oder in den genomischen Aberrationen signifikante Unterschiede zwischen diesen ALCL-Formen gibt (52, 53) werden Unterschiede insbesondere auf durch ALK-aktivierte Signalwege zurückgeführt (54, 55). Vor allem aufgrund des unterschiedlichen klinischen Verlaufs werden ALK-positive und ALK-negative ALCL derzeit in der aktuellen WHO-Klassifikation als (wenn auch vorläufige) eigenständige Lymphomentitäten klassifiziert (56). Der Pathogenesemechanismus der ALK-negativen ALCL ist derzeit unklar.

Das ALCL weist eine Reihe von pathogenetischen und biologischen Parallelen und Gemeinsamkeiten mit dem cHL auf. So wie die von B-Zellen abstammenden HRS-Zellen ihren B-Zell-Phänotypen verloren haben, zeigen die von T-Zellen abstammenden ALCL-Zellen in den allermeisten Fällen einen Verlust des T-Zell-Phänotypen (44, 57). Insbesondere weisen ALCL-Zellen dabei einen ausgeprägten Verlust der Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR) sowie TCR-assoziiierter Signalproteine auf (57, 58). Neben der im cHL und ALCL gemeinsamen aberranten Expression des Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR-)-Superfamilienmitglieds CD30 gibt es eine Überlappung deregulierter Signalwege wie beispielsweise einer ausgeprägten NF-κB-Aktivierung im cHL und

ALK-negativen ALCL, einer starken Expression des NF- κ B-modulierenden Faktors *B-cell CLL/lymphoma 3* (BCL3) oder der konstitutiven AP-1-Aktivierung (20, 55, 59, 60). Diese Befunde legen nahe, dass es bestimmte Gemeinsamkeiten in der Biologie sowie in grundlegenden Aspekten der Pathogenese von cHL und ALCL gibt.

Im Gegensatz zum cHL ist der Therapieerfolg beim ALCL schlechter (61). Insgesamt scheinen ALK-positive ALCL eine etwas bessere Prognose als ALK-negative ALCL zu haben (44, 61), was unter anderem auf die Immunogenität von NPM-ALK zurückgeführt wird (62). Neben konventionellen Chemotherapeutika steht mit dem CD30-Immuntoxin Brentuximab für beide ALCL-Entitäten eine innovative Substanz zur Verfügung, die in klinischen Studien zu beeindruckenden Therapieerfolgen geführt hat (63). Einige NPM-ALK-positive ALCL-Patienten wurden zudem bereits mit dem spezifischen ALK-Inhibitor Crizotinib behandelt, was ebenfalls in der Mehrzahl der Patienten zu einem sehr guten Ansprechen führte (50, 51). Wie effektiv diese Substanzen in Hinblick auf einen Langzeittherapieerfolg beim ALCL sein werden ist derzeit nur schwer beurteilbar.

In dem nachfolgenden Teil der Habilitationsschrift werden ausgewählte eigene Arbeiten ausführlich dargestellt.

2. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG EIGENER ARBEITEN

2.1 Deregulierte Transkriptionsfaktoren und ihre Bedeutung für Wachstum und Apoptoseschutz der HRS-Zellen

2.1.1 Die aberrante Expression und Aktivität von AP-1-Transkriptionsfaktoren in HRS-Zellen

Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mechta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., Scheidereit, C. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *EMBO Journal*. 2002; 21:4104-4113.

Wie schon in der Einleitung ausgeführt ist in den malignen HRS-Zellen des cHL der TF NF- κ B im Gegensatz zur physiologischen transienten Aktivierung konstitutiv aktiviert (9). Diese NF- κ B-Aktivität stellt einen zentralen molekularen Defekt der HRS-Zellen dar und ist wesentlich an der Pathogenese des cHL beteiligt (3, 10). Die konstitutive NF- κ B-Aktivität treibt das Wachstum der HRS-Zellen, schützt die Zellen vor programmiertem Zelltod und reguliert wesentliche Komponenten des HRS-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms (10-12). Als ein in mehreren Hodgkin-Zelllinien nachzuweisender Grund für die konstitutive NF- κ B-Aktivität wurde eine Aktivierung des inhibitor of kappa B- (I κ B)-Kinase Komplexes (IKK) nachgewiesen (64). Da die IKK-Aktivierung einen zentralen NF- κ B-Aktivierungsmechanismus in HRS-Zellen darstellt, sind die IKK-Aktivierungsmechanismen in diesen Zellen von besonderem Interesse. Viele Signalkaskaden, welche im physiologischen Kontext auf eine Aktivierung des IKK-Komplexes und damit NF- κ B zulaufen, führen ebenfalls zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und nachfolgend des AP-1-TF-Komplexes. Interessanterweise agieren dabei die TF NF- κ B und AP-1 oft synergistisch, was insbesondere für biologisch relevante Zielgene wie Zykline und Zytokine gezeigt werden konnte (65, 66). Aus diesem Grund wurde von mir in der im *EMBO Journal* erschienenen Arbeit (20) die Aktivität des AP-1-Komplexes und der MAPK in Hodgkin- und non-Hodgkin-Zelllinien analysiert.

Die vergleichende Analyse verschiedener Hodgkin- und non-Hodgkin-Zelllinien in Hinblick auf die DNA-Bindungsaktivität am klassischen AP-1 „*TPA response element*“ (TRE)-DNA-Bindungsmotif TGAGTCA erbrachte den Befund einer massiven AP-1-Bindungsaktivität in HRS-, nicht aber in non-Hodgkin-Zelllinien. Weiterführende Analysen zeigten, dass der AP-1-Komplex der Hodgkin-Zelllinien insbesondere die Jun-Familienmitglieder c-JUN und JUNB enthält. Passend hierzu konnten wir sowohl in den HRS-Zelllinien als auch in HRS-Zellen in cHL-befallenem Lymphknotengewebe eine hohe Proteinexpression der AP-1-Faktoren c-JUN und JUNB bei weitgehendem Fehlen von klassischen Fos-Faktoren nachweisen. Diese ungewöhnliche Zusammensetzung des AP-1-Komplexes ging mit der Abwesenheit einer MAPK-Aktivierung einher. Wir konnten zudem zeigen, dass c-JUN in HRS-Zellen positiv autoreguliert ist, während die hohe

JUNB-Expression zumindest teilweise durch NF- κ B getrieben wird. Weiterhin verlangsamte sich das Wachstum der HRS-Zelllinien nach Blockade der AP-1-Aktivität durch Transfektion der cHL-Zellen mit einer dominant-negativen FOS-Variante, und NF- κ B und AP-1 regulierten in HRS-Zellen gemeinsam biologisch relevante Zielgene wie den Zellzyklusregulator Zyklin D2, den Chemokin-Rezeptor CCR7 oder das Protoonkogen c-MET.

DOI-Verlinkung Mathas *et al.*, EMBO J, 2002, 21:4104

<http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf389>

2.1.2 Die Inhibition von NF- κ B vermittelt Arsen-induzierte Apoptose in HRS-Zellen

Mathas, S., Lietz, A., Janz, M., Hinz, M., Jundt, F., Scheiderei, C., Bommert, K., Dörken, B. Inhibition of NF- κ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood*. 2003; 102:1028-1034.

Das im vorangegangenen Absatz beschriebene Fehlen einer MAPK-Aktivität, das u.a. auf eine Rezeptor-nahe Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der IKK- und MAPK-Aktivierung zurückzuführen ist (20, 67), unterstreicht die zentrale Bedeutung der IKK-Aktivierung für die Biologie der HRS-Zellen. In der in *Blood* erschienenen Nachfolgearbeit wurde deshalb von mir untersucht, inwieweit sich die Blockade des IKK-Komplexes in HRS-Zellen therapeutisch nutzen lässt (68). Folgende Mechanismen der NF- κ B-Aktivierung in HRS-Zellen waren zu diesem Zeitpunkt bekannt: Deletäre Mutationen der NF- κ B-Inhibitor-Proteine I κ B α und I κ B ϵ sowie die bereits genannte konstitutive Aktivität des I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes (3). Der IKK-Komplex ist zentraler Vermittler der „klassischen“ NF- κ B-Aktivierung verschiedener Signalwege (69). Er besteht u.a. aus den katalytisch aktiven Untereinheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Untereinheit IKK γ /NEMO. Nach Aktivierung des IKK-Komplexes kommt es zur IKK-vermittelten Phosphorylierung der I κ B-Proteine, welche nachfolgend ubiquitinyliert und degradiert werden. Nach erfolgter Degradation der I κ B-Proteine kann freies NF- κ B in den Kern translozieren und dort transkriptionell aktiv werden (69). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Arsenverbindungen mit einer für die Aktivierung von IKK β kritischen Domäne interagieren und damit die Aktivierung des IKK-Komplexes blockieren können (70). Unter mehreren getesteten Substanzen, die möglicherweise mit dem NF- κ B-Signalweg interferieren, hatte in unseren Experimenten Arsen den stärksten Effekt in Hinblick auf eine Apoptoseinduktion der HRS-Zellen (unpublizierte Daten). In oben angeführter Arbeit haben wir untersucht, ob Arsenverbindungen die NF- κ B- und IKK-Aktivität in HRS-Zellen blockieren können, und inwieweit die Blockade von NF- κ B zur Arsen-vermittelten Apoptose beiträgt.

Diese Experimente wurden sowohl mit Natriumarsenit (NaAsO₂) als auch Arsentrioxid (As₂O₃) durchgeführt. Da für beide Substanzen sehr ähnliche biologische Effekte beobachtet wurden, wird im Folgenden für beide Substanzen der Begriff „Arsen“ verwendet. Wir konnten zeigen, dass es durch die Behandlung von HRS-Zelllinien mit Arsen zu einer dosis- und zeitabhängigen Abnahme der NF- κ B-DNA-Bindungsaktivität kam. Die Arsen-Behandlung führte zu einer Stabilisierung und somit Zunahme der Proteinexpression des NF- κ B-Inhibitors I κ B α bei gleichzeitiger Abnahme der I κ B α mRNA-Expression, was indirekt auf eine Blockade des IKK-Komplexes hindeutete. Eine Arsen-vermittelte Blockade der IKK-Aktivität in HRS-Zellen konnte direkt durch Messung der IKK-Aktivität nachgewiesen werden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Arsen-vermittelte NF- κ B-Blockade zur Herunterregulation von NF- κ B-Zielgenen wie IL-13, c-IAP2 oder CCR7 und zu einer Apoptoseinduktion von HRS-Zelllinien mit konstitutiver IKK-/NF- κ B-Aktivität führte. Die zentrale Bedeutung der NF- κ B-Inhibition für Arsen-induzierte Apoptose wurde experimentell insbesondere

dadurch belegt, dass die Transfektion von HRS-Zelllinien mit der NF- κ B-Untereinheit p65 die Arsen-induzierte Apoptose blockierte. Die Arsen-vermittelte Apoptoseinduktion durch NF- κ B-Blockade in HRS-Zelllinien konnten wir ebenfalls *in vivo* nachweisen. Hierzu wurde ein SCID-Maus-Xenotransplantationsmodell der HRS-Zelllinien L540Cy (konstitutive IKK-/NF- κ B-Aktivität, Arsen-sensibel) und HD-MyZ (nur geringe NF- κ B-Aktivität, Arsen-resistent) gewählt. Da in der Behandlung von Patienten in der Regel As₂O₃ eingesetzt wird, wurden die Mausexperimente entsprechend nur mit As₂O₃ durchgeführt. Die Behandlung von Mäusen mit Arsen führte zu einer ausgeprägten Wachstumsverlangsamung oder sogar zu einer kompletten Remission von Tumoren der Zelllinie L540Cy. Tumore der Zelllinie HD-MyZ waren gegenüber der Arsenbehandlung resistent. Einhergehend mit der biologischen Aktivität zeigte sich in explantierten L540Cy-Tumoren eine Arsen-vermittelte Abnahme der NF- κ B-Aktivität, nicht aber in Zellen der Linie HD-MyZ. Diese Daten haben gezeigt, dass die IKK-/NF- κ B-Blockade ein wirksames Therapieprinzip des cHL darstellt und die Behandlung von HL-Patienten mit Arsenderivaten in klinischen Studien getestet werden sollte. In diesem Zusammenhang ist ein Fallbericht aus dem Jahr 1937 erwähnenswert, in dem bei einem cHL-Patienten von der Induktion einer Remission durch Arsen berichtet wird (71).

DOI-Verlinkung Mathas *et al.*, Blood, 2003, 102:1028

<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-04-1154>

2.1.3 Die Blockade Todesrezeptor-vermittelter Apoptose in HRS-Zellen durch c-FLIP

Mathas, S.*, Lietz, A.*, Anagnostopoulos, I., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M., Jundt, F., Hirsch, B., Jöhrens-Leder, K., Vornlocher, H.-P., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004; 199:1041-1052. *, geteilte Erstautorschaft.

Neben den Mechanismen der Aktivierung von NF- κ B haben wir uns mit der Frage beschäftigt, wie HRS-Zellen vor programmiertem Zelltod geschützt werden. Eine zentrale Funktion von NF- κ B ist dabei der Schutz der Zellen vor Todesrezeptor-induziertem Zelltod. Todesrezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des lymphatischen Systems. Insbesondere hängt die Negativselektion lymphatischer Zellen im Rahmen der B- und T-Zell-Ontogenese während der Keimzentrumsreaktion und im Thymus vom Todesrezeptor CD95 ab. Im B-Zell-System unterstreichen folgende Tatsachen die Bedeutung des CD95-Systems für die Balance zwischen B-Zell-Proliferation und -Apoptose: (a) Mäuse ohne funktionstüchtige CD95-Expression leiden an Lymphadenopathie, Autoimmunerkrankungen und einer höheren Inzidenz von B-Zell-Lymphomen (72, 73); (b) aufgereinigte Keimzentrums (GC)-B-Zellen sterben rasch durch CD95-induzierten Zelltod (74), und CD95 steuert die Negativselektion von B-Zellen im GC (75); (c) Patienten mit autoimmun-lymphoproliferativem Syndrom (ALPS) haben Keimbahnmutationen in Genen, die Apoptose in Lymphozyten regulieren (76). Gemeinsames Resultat dieser Defekte in ALPS-Patienten ist, dass das CD95-System nicht mehr funktionstüchtig ist und es deshalb zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Lymphomen kommt (77); (d) klonale deletäre CD95-Mutationen wurden in humanen Lymphomen identifiziert, insbesondere in Lymphomen mit einem Ursprung in GC-B-Zellen (78).

Die malignen HRS-Zellen des cHL stammen nach bisherigen Erkenntnissen von GC- oder post-GC-B-Zellen ab, haben aber einen Großteil des B-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms einschließlich Komponenten des B-Zell-Rezeptors (BCR) verloren, und in einem Anteil der cHL-Fälle lassen sich sogar deletäre Mutationen der Immunglobulingene nachweisen (3). Normalerweise werden B-Zellen ohne funktionstüchtigen BCR im GC im Rahmen der Negativselektion durch CD95-induzierte Apoptose eliminiert (79). Dies trifft offensichtlich für HRS-Zellen nicht zu. Zum Zeitpunkt der hier besprochenen Arbeit war bekannt, dass CD95 in HRS-Zellen in der Regel nicht mutiert ist und HRS-Zellen resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose sind (80, 81). Damit stellte sich die Frage, wie sich HRS-Zellen vor Todesrezeptor-induzierter Apoptose schützen, und welche Rolle die konstitutive NF- κ B-Aktivität dabei spielt.

In einem ersten Schritt haben wir in der im *Journal of Experimental Medicine* erschienenen Arbeit (82) die Proteinexpression der Komponenten des sogenannten *death-inducing signaling complex* (DISC; bestehend aus CD95, FADD, Caspase 8, Caspase 10) untersucht. Jede dieser Komponenten zeigte eine Expression in HRS-Zelllinien sowie - bei Verfügbarkeit von funktionstüchtigen Antikörpern - in HL-Patientenproben. Im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten, in denen oft eine Abnahme der CD95-Expression beobachtet wird (83), zeigte CD95

interessanterweise eine sehr starke Expression in HRS-Zellen. Durch Immunpräzipitationen konnte weiterhin eine starke Bildung des DISC in HRS-Zellen nachgewiesen werden. Wir haben aufgrund dieser Daten postuliert, dass in HRS-Zellen eine funktionelle Blockade der CD95-vermittelten Apoptoseinduktion vorliegt. Tatsächlich konnten wir in HRS-Zelllinien im Gegensatz zu CD95-sensitiven Zellen eine rasche Inkorporation von *FLICE-inhibitory proteins* (FLIPs) in den DISC nachweisen. FLIPs können im DISC die DISC-nahe Aktivierung von Caspasen und damit Zelltod blockieren (84). Passend zu diesem Befund konnten wir eine NF- κ B-abhängige starke Expression von c-FLIPs in HRS-Zellen nachweisen. Einen direkten Zusammenhang zwischen der hohen FLIP-Expression und der Blockade von Todesrezeptor-induzierter Apoptose konnten wir experimentell dadurch belegen, dass die selektive Herunterregulation von FLIPs mittels *small-interfering* (si)RNAs HRS-Zellen gegen Todesrezeptor-induzierte Apoptose sensitivierte. Dieser Befund untermauerte die Bedeutung von NF- κ B für das Überleben der HRS-Zellen.

DOI-Verlinkung Mathas *et al.*, J Exp Med, 2004, 199:1041

<http://dx.doi.org/10.1084/jem.20031080>

2.1.4 Die Identifikation von IRF5 als Schlüsselregulator in HRS-Zellen

Kreher, S., Bouhrel, 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., **Mathas, S.** Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2014; 111:E4513-4522.

Neben der konstitutiven NF- κ B und AP-1-Aktivität zeichnen das cHL komplexe Veränderungen weiterer TF aus. Es stellte sich deshalb die Frage, wie möglichst unvoreingenommen transkriptionelle Schlüsselregulatoren in HRS-Zellen identifiziert werden können. Hierzu haben wir in der in *PNAS* erschienenen Arbeit (85) in Kooperation mit C. Bonifer (Birmingham, UK) in einem ersten Schritt mittels DNase I-Verdau von HRS- im Vergleich zu non-Hodgkin-Zellen HRS-Zell-spezifische offene Chromatinregionen definiert, um in einem zweiten Schritt in diesen Regionen überrepräsentierte TF-Bindungsmotive zu identifizieren (beide Untersuchungen wurden im Labor von C. Bonifer durchgeführt) und letztendlich die biologische Funktion zugehöriger TF weiter aufzuarbeiten. Die Analyse von im offenen Chromatin von HRS-Zellen angereicherten TF-Bindungsmotiven erbrachte den Befund eines gehäuftten Auftretens von Bindungsmotiven für induzierbare TF, insbesondere NF- κ B, AP-1, STAT und IRFs. Diese Analyse bestätigte somit zum einen die bereits bekannten wichtigen Funktionen von NF- κ B-, AP-1- und STAT-Faktoren für die cHL-Pathogenese (3), zum anderen validierte dies unseren experimentellen Ansatz. Aufgrund der bekannten Rolle von NF- κ B, AP-1 und STATs für HRS-Zellen entschieden wir uns zur Analyse einer möglichen Funktion von IRF-Faktoren in der cHL-Pathogenese. Die Analyse der neun bekannten verschiedenen IRF-Faktoren in HRS-Zellen zeigte neben der bereits bekannten starken Expression von IRF4 (86) eine HRS-Zell-spezifische, massive Expression von IRF5 nicht nur in allen HRS-Zelllinien sondern auch so gut wie allen cHL-Patientenfällen. IRF5 ist ein Schlüsselfaktor für die transkriptionelle Regulation einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Genen wie in HRS-Zellen stark exprimierten Zytokinen (87, 88). Durch funktionelle Analysen mittels IRF5-Blockade in HRS-Zellen durch dominant-negative IRF5-Varianten oder spezifische IRF5-Herunterregulation mittels siRNA konnten wir nachweisen, dass IRF5 zusammen mit dem TF NF- κ B in HRS-Zellen tatsächlich für die hohe Zytokinexpression verantwortlich ist und zudem das Überleben der HRS-Zellen sicherstellt.

In komplementären Experimenten haben wir die Frage gestellt, ob die Aktivierung von IRF5 mit oder ohne NF- κ B-Aktivierung in non-Hodgkin-Zellen wie im cHL zu einer Aktivierung pro-inflammatorischer Gene oder sogar zu HRS-Zell-ähnlichen Veränderungen weiterer Genexpressionsmuster führt. Hierzu haben wir eine konstitutiv aktive IRF5-Variante (IRF5-4D) (89) sowie, zur Aktivierung von NF- κ B, eine aktive IKK β -Variante (IKK β EE) (90) in non-Hodgkin-Zellen eingebracht. Dies führte in diesen Zellen zur Hochregulation einer großen Zahl pro-inflammatorischer Gene, die mit dem cHL assoziiert sind. Ähnliche IRF5-vermittelte Effekte waren in murinen splenischen B-Zellen zu beobachten. In diesen Zellen kam es weiterhin zu einer Hochregulation von

HRS-Zell-charakteristischen Gene wie *CD30*, *ABF-1*, *ID2* oder *c-MET*, wohingegen es zu einem teilweise kompletten Verlust B-Zell-spezifischer Gene sowie des epigenetischen Koregulators CBFA2T3 kam. Neben diesen Effekten auf die Genregulation konnten wir nachweisen, dass die Aktivierung von IRF5 über einen transkriptionellen Crosstalk zur Aktivierung einer HRS-Zell-charakteristischen AP-1-Aktivierung führte. Diese Daten zeigen somit, dass durch die aberrante Aktivierung einer kleinen Zahl von TF die meisten charakteristischen Änderungen von HRS-Zellen in non-Hodgkin-Zellen nachvollzogen werden können.

DOI-Verlinkung Kreher *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111:e4513

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1406985111>

2.2 Mechanismen und Konsequenzen von Alterationen Linien-spezifischer TF in lymphatischen Neoplasien

2.2.1 Die ABF-1- und ID2- vermittelte Reprogrammierung der HRS-Zellen

Mathas, S.*, Janz, M.*, Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., Jöhrens, K., Bommert, K., Stein, H., Dörken, B. Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nature Immunology*. 2006; 7:207-215. *, geteilte Erstautorschaft.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt von mir sind die Mechanismen und Konsequenzen der Dedifferenzierung des klassischen Hodgkin Lymphoms sowie bestimmter non-Hodgkin-Lymphome. Das cHL unterscheidet sich anatomisch-pathologisch insbesondere durch zwei Befunde von so gut wie allen anderen Lymphomen: Neben der nur geringen Zahl von Tumorzellen in den vom cHL befallenen Lymphknoten lassen Oberflächenmarker- oder Genexpressionsprofil der HRS-Zellen keinen Rückschluss auf die zelluläre Identität der Ursprungszelle zu (3). Hierbei ist vor allem der Expressionsverlust B-Zell-spezifischer Gene ungewöhnlich ein (8). Über die molekularen Mechanismen des Verlusts B-Zell-spezifischer Gene in HRS-Zellen war zu Beginn der in *Nature Immunology* publizierten Arbeit (29) nur wenig bekannt. Wir haben deshalb in oben genannter Arbeit Expression und Aktivität der Transkriptionsfaktoren E2A, EBF und Pax5 analysiert, welche zentral an der Initiierung und Aufrechterhaltung des B-Zell-Differenzierungsprogramms beteiligt sind (91).

Schlüsselbefund der Pax5-, EBF- und E2A-mRNA- und Protein-Expressionsanalysen sowie der Analysen der jeweiligen Protein-DNA-Bindungsaktivitäten war der Nachweis einer ungewöhnlichen E2A-DNA-Bindungsaktivität in HRS-Zelllinien. Im Gegensatz zu non-Hodgkin-Zelllinien mit einer B-Zell-Abstammung, die eine erwartete E2A-DNA-Bindungsaktivität aus E2A-Homodimeren aufwiesen, zeigte sich in allen untersuchten HRS-Zelllinien ein schneller im Gel laufender Protein-DNA-Bindungskomplex. Weitere Analysen führten zu dem Befund einer Überexpression des Helix-Loop-Helix (HLH)-Proteins *activated B cell factor 1* (ABF-1) in HRS-Zellen. Es handelt sich dabei um einen HLH-Faktor, der als transkriptioneller Repressor wirken, mit E2A interagieren und zu einem veränderten Laufverhalten von E2A-haltigen Protein-DNA-Komplexen führen kann (92). Wir konnten zeigen, dass in HRS-Zellen ABF-1 zusammen mit E2A an das E-Box DNA-Bindungsmotiv bindet und dort als Repressor E2A-getriebener Genexpression wirken kann. Zusätzlich identifizierten wir in HRS-Zellen eine Überexpression des HLH-Proteins *inhibitor of DNA-binding 2* (ID2), das ebenfalls zu einem Funktionsverlust von E2A führen kann (93). Da der TF E2A als einer der zentralen Regulatoren des B-Zell-Expressionsprogramms bekannt ist (91) ließen unsere Daten vermuten, dass die ABF-1- und ID2-vermittelte E2A-Blockade zentral an der Auslöschung des B-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms in HRS-Zellen beteiligt ist.

Dieses Konzept konnten wir durch Transfektion von non-Hodgkin-Zellen mit ABF-1 und ID2 bestätigen. Dies führte zu einer Änderung des Laufverhaltens der E2A-DNA-Proteinkomplexe wie in

HRS-Zelllinien und resultierte funktionell nicht nur in einer verminderten Aktivität von Promoterkonstrukten B-Zell-spezifischer Gene sondern auch in einem Expressionsverlust endogener B-Zell-Gene wie z.B. *POUF2*, *CD19*, *AICDA* oder *CD79A*. In murinen B-Lymphozyten führt der Verlust von B-Zell-Transkriptionsfaktoren wie Pax5 oder E2A nicht nur zur Herunterregulation B-Zell-spezifischer Gene, sondern resultiert zudem in einer gesteigerten Expression B-Linien-fremder Gene und erlaubt die Umdifferenzierung in Zellen anderer hämatopoetischer Linien wie beispielsweise T-Zellen oder myelomonozytäre Zellen (94, 95). Wir haben postuliert, dass die funktionelle E2A-Blockade in HRS-Zellen in ähnlicher Art und Weise die „Wiedereröffnung“ eines frühen Progenitorzell-ähnlichen Genexpressionsprofils verschiedener hämatopoetischer Linien (*multilineage priming*) erlaubt. Tatsächlich ließ sich in HRS-Zelllinien sowie in HRS-Zellen eines Teils primärer HL-Patientenproben eine Expression von T-Zell-Transkriptionsfaktoren wie GATA3 und TCF7 oder des myelomonozytären Gens *CSF1R* nachweisen. Von besonderem Interesse war der Befund, dass in HRS-Zelllinien nach Rekonstitution einer E2A-Aktivität oder Herunterregulation von ABF-1 mittels siRNAs ein zumindest teilweiser Expressionsverlust B-Linien-fremder Gene zu beobachten war. Wir konnten somit einen molekularen Mechanismus beschreiben, der sowohl den Verlust der B-Zell-spezifischen Genexpression als auch die Hochregulation B-Linien-fremder Gene erklärt. Diese Arbeit hat zudem gezeigt, dass humane Lymphozyten eine hohe zelluläre Plastizität besitzen und eine solche Plastizität möglicherweise zur malignen Transformation lymphatischer Zellen beiträgt (5, 29, 96).

DOI-Verlinkung Mathas *et al.*, Nat Immunol, 2006, 7:207

<http://dx.doi.org/10.1038/ni1285>

2.2.2 Die Bedeutung des Th2-Zytokins IL-21 für HRS-Zellen und das inflammatorische Begleitfiltrat des cHL

Lamprecht, B., Kreher, S., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., **Mathas, S.** Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts T_{reg} cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood*. **2008**; 112:3339-3347.

Welche zellbiologischen Konsequenzen haben der ausgeprägte Verlust B-Zell-spezifischer Gene und die damit einhergehende Hochregulation B-Linien-fremder Gene, d.h. von Genen, die normalerweise nicht in B-Zellen, sondern anderen hämatopoetischen Zelltypen exprimiert werden, in HRS-Zellen? Wir haben postuliert, dass die Expression solcher B-Linien-fremder Gene in HRS-Zellen für Überleben und Wachstum der Zellen erforderlich ist und möglicherweise für das Fehlen von Überlebenswegen, die die Expression B-Zell-spezifischer Gene erfordern, kompensiert (29, 96). Ausgangspunkt der in *Blood* erschienenen Arbeit (97) war der Nachweis einer Expression des Zytokins IL-21 in den HRS-Zellen. Eine Expression von IL-21 war zum Zeitpunkt der Publikation nur in CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen beschrieben, nicht aber in Zellen mit einem B-Zell-Ursprung (98). In HRS-Zellen handelt es sich somit bei IL-21 um eine B-Linien-fremde Genexpression. Im Gegensatz zu IL-21 lässt sich der IL-21-Rezeptor (IL-21R) auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen, einschließlich T-, NK-, myeloischen und B-Zellen nachweisen (98). Die biologischen Effekte von IL-21 auf diese unterschiedlichen Zelltypen sind vielfältig und reichen von einer Wachstumsstimulation oder Stimulation von Immuneffektorzellen bis hin zur Apoptoseinduktion der behandelten Zellpopulation (98, 99).

In verschiedenen HRS-Zelllinien konnten wir eine aberrante, starke IL-21-Expression, sowie in allen Linien eine IL-21R Expression nachweisen. Wir konnten weiterhin zeigen, dass IL-21 zur Aktivierung des STAT3-Signalwegs in HRS-Zellen beiträgt und STAT3-Zielgene wie das Zytokin IL-6 oder das anti-apoptotische Gen MCL1 reguliert. Experimentell konnten wir dies sowohl durch Stimulation von HRS-Zelllinien mit IL-21 als auch umgekehrt durch IL-21-Blockade mittels IL-21R:Fc-Konstrukten, die zur funktionellen Inaktivierung von IL-21 führen, nachweisen. Passend zur IL-21-vermittelten Regulation von MCL1 führte die Stimulation von HRS-Zelllinien mit IL-21 zu einem Schutz vor CD95-Todesrezeptor-vermittelter Apoptose. Weiterhin konnten wir in HRS-Zellen eine zum Teil IL-21-abhängige Expression des Chemokins *macrophage-inflammatory protein-3α* (MIP-3α) beschreiben. MIP-3α induzierte eine Migration von regulatorischen T-Zellen zu HRS-Zellen und trägt somit zur Verhinderung einer effizienten Immunantwort gegen die HRS-Zellen bei. Zusammengefasst konnten wir erstmals in Tumorzellen mit einer B-Zellabstammung eine endogene IL-21-Expression nachweisen. IL-21 hat einerseits autokrin vermittelte Effekte auf die Tumorzellen selbst, beeinflusst aber zudem die Zusammensetzung des inflammatorischen Begleitfiltrats der durch das cHL-befallenen Lymphknoten. Diese Daten unterstützen unsere Hypothese, dass B-Linien-fremde Gene eine pathogenetisch wichtige Funktion in der Biologie des cHL haben.

DOI-Verlinkung Lamprecht *et al.*, Blood, 2008, 112:3339

<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-01-134783>

2.2.3 Die Derepression einer repetitiven DNA-Region führt zur Aktivierung des CSF1R-Protoonkogens in humanen Lymphomzellen

Lamprecht, B., Walter, K., Kreher, S., Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Köchert, K., Bouhrel, M.A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Jöhrens, K., Wurster, K.D., Callen, D.F., Harte, M.F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P.N., Siebert, R., Dörken, B., Bonifer, C., **Mathas, S.** Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the *CSF1R* proto-oncogene in human lymphoma. *Nature Medicine*. 2010; 16:571-579.

Das unter 2.2.2 eingeführte Konzept wurde durch die Analyse der Expression, der funktionellen Bedeutung und des Mechanismus der Deregulation des myeloischen Gens CSF1R weiter bestätigt. In der in *Nature Medicine* publizierte Arbeit (100) konnten wir in einem ersten Schritt mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen zeigen, dass die aberrante B-Linien-fremde Expression von CSF1R in HRS-Zellen zu Wachstum und Überleben dieser Zellen beiträgt. Unter anderem mit pharmakologischen CSF1R-Inhibitoren konnten wir Apoptose in HRS-, nicht aber in non-Hodgkin-Zellen auslösen. In weiteren Analysen haben wir die Regulation des *CSF1R*-Gens in HRS-Zellen aufgearbeitet. Diese Analysen erbrachten den Nachweis, dass in HRS-Zellen *CSF1R* nicht durch seinen regulären Promoter reguliert wird, sondern von einer aberrant aktivierten LTR-Region der *mammalian apparent LTR retrotransposon* (MaLR)-Familie, *THE1B*. Diese *THE1B*-Region ist spezifisch in HRS-Zellen, nicht aber in non-Hodgkin-Zellen aktiviert, wie in Kooperation mit dem Labor von C. Bonifer (Birmingham, UK) u.a. durch DNase I-Hyeresensitivitätsanalysen und Versuche mit Reporterkonstrukten nachgewiesen werden konnten. Aberrante, *THE1B*-getriebene *CSF1R*-Transkripte konnten wir nur in HRS-Zelllinien und primären cHL-Fällen sowie in einem Teil der analysierten ALCL-Patientenproben nachweisen, nicht aber in einer Vielzahl anderer gut- oder bösartiger Proben. Die Analysen des *THE1B*-Aktivierungsmechanismus zeigten, dass die Abschaltung dieser Repeatregion in non-Hodgkin-Zellen normalerweise durch Methylierung sowie vor allem durch Chromatinorganisation erfolgt. Passend zu diesem Ergebnis konnten wir in HRS-Zellen einen Expressionsverlust des epigenetischen Regulators CBFA2T3 identifizieren. Der Nachweis von einem genomischen *CBFA2T3*-Verlust in einem Teil der analysierten cHL-Patientenfälle unterstreicht die pathogenetische Bedeutung dieses Befundes. Zuletzt haben wir den Nachweis erbracht, dass die aberrante LTR-Aktivierung nicht nur auf *CSF1R*-Transkripte beschränkt ist, sondern in HRS-Zellen eine Vielzahl von Transkripten durch *THE1*-Repeats aberrant reguliert wird. Welcher Art diese Transkripte sind und welchen Effekt diese Aktivierung auf die Genexpression in HRS-Zellen hat ist derzeit unklar. Zusammengefasst haben diese Daten unsere Hypothese weiter untermauert, dass B-Linien-fremde Gene eine zentrale biologische Funktion in HRS-Zellen haben. Zudem konnten wir mit der *THE1B*-getriebenen *CSF1R*-Aktivierung einen neuen Mechanismus einer Proto-Onkogenaktivierung in humanen Tumorzellen beschreiben.

DOI-Verlinkung Lamprecht *et al.*, Nat Med, 2010, 16:571

<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2129>

2.2.4 BAY 43-9006/Sorafenib blockiert CSF1R und induziert Apoptose in HRS-Zellen

Ullrich, K., Wurster, K.D., Lamprecht, B., Köchert, K., Engert, A., Dörken, B., Janz M., **Mathas, S.** BAY 43-9006/Sorafenib blocks CSF1R activity and induces apoptosis in various classical Hodgkin lymphoma cell lines. *British Journal of Haematology*. 2011; 155:398-402.

Da CSF1R ein onkogener Tyrosinkinaserzeptor ist und die CSF1R-Blockade in HRS-Zellen zu Wachstumsarrest und Zelltod führte, stellte sich die Frage einer therapeutischen Nutzung der CSF1R-Blockade zur Behandlung des cHL, die wir in der im *British Journal of Haematology* erschienenen Publikation aufgearbeitet haben (101). Wir haben in dieser Arbeit die Wirkung des Multi-Tyrosinkinase-Inhibitors BAY 43-9006/Sorafenib auf die Aktivierung von CSF1R sowie das Überleben verschiedener HRS-Zelllinien untersucht. Wir haben für diese Arbeit BAY 43-9006 gewählt, da diese Substanz u.a. CSF1R blockiert, zur Behandlung anderer maligner Erkrankungen bereits in der Klinik eingesetzt wird und ein begrenztes Nebenwirkungsprofil aufweist (102). Durch Immunpräzipitationsexperimente konnten wir eine spezifische Blockade der CSF1R-Aktivierung durch BAY 43-9006 in HRS-Zelllinien belegen. Zudem wurde durch die BAY 43-9006-Behandlung Zelltod in HRS-Zelllinien mit einer CSF1R-Expression ausgelöst, aber nicht oder nur bei sehr hohen Konzentrationen in non-Hodgkin-Zelllinien ohne CSF1R Expression. Um eine Vorstellung von der Spezifität der Wirkung von BAY 43-9006 auf die HRS-Zelllinien zu bekommen analysierten wir Aktivität und Wirkung von BAY 43-9006 auf 42 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) in verschiedenen HRS-Zelllinien mittels eines humanen phospho-RTK-Array-Kits. Diese Analysen erbrachten den Nachweis einer nur begrenzten Zahl aktivierter RTKs in HRS-Zellen mit einer durchgehenden Blockade von insbesondere CSF1R durch BAY 43-9006, so dass zumindest von einer relativen Spezifität der Wirkung von BAY 43-9006 auf die HRS-Zelllinien über eine CSF1R-Blockade ausgegangen werden kann. In Experimenten mit einer Behandlung verschiedener HRS-Zelllinien mit BAY 43-9006 in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika wie Doxorubicin oder Vincristin, die üblicherweise in der Behandlung des cHL angewendet werden, konnten wir nachweisen, dass HRS-Zelllinien durch die Behandlung mit BAY 43-9006 gegenüber konventionellen Chemotherapeutika sensibilisiert werden. Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass die aberrante Expression B-Linien-fremder Gene in HRS-Zellen als therapeutische Zielstruktur genutzt werden kann.

DOI-Verlinkung Ullrich *et al.*, Br J Haematol, 2011, 155:398

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08685.x>

2.3 Die deregulierte Genexpression im Umfeld chromosomaler Bruchpunkte prädisponiert für die Entstehung von Translokationen im ALCL

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

Chromosomale Translokationen sind ein wesentliches Charakteristikum bösartiger Zellen und werden als zentrales, oft kausales Ereignis der Transformation von vor allem hämatopoetischen und mesenchymalen Tumoren angesehen (103). Auf molekularer Ebene führt eine Translokation entweder zur Deregulation von Genen in der Nähe eines Bruchpunkts oder aber zur Fusion von Genen beider Bruchpunkte. Im Gegensatz zur insbesondere durch moderne Hochdurchsatzverfahren rasch zunehmenden Anzahl identifizierter chromosomaler Translokationen ist nur wenig darüber bekannt, wie Translokationen *in vivo* entstehen (103, 104). Es ist offenkundig, dass DNA-Strangbrüche der in eine Translokation involvierten Chromosomen auftreten müssen. Weniger offensichtlich ist allerdings bereits, wie sich die gebrochenen chromosomalen Enden im Zellkern finden. Zur Erklärung hierfür wurden zwei unterschiedliche Hypothesen vorgeschlagen: die sogenannte "*contact-first*"-Hypothese geht davon aus, dass sich die an der Translokation beteiligten Chromosomenarme zum Zeitpunkt der DNA-Schädigung bereits in räumlicher Nähe befinden (105), wohingegen die "*breakage-first*"-Hypothese davon ausgeht, dass sich gebrochene Chromosomenarme frei im Zellkern bewegen können bis der entsprechende Translokationspartner gefunden wurde (106). Zum Zeitpunkt oben angeführter Arbeit sprachen in Säugerzellen mehr Daten für das *contact-first*-Modell als Mechanismus chromosomaler Translokationen (104, 105, 107, 108).

In oben angeführter Arbeit haben wir ALCL-Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen der Translokationsentstehung gewählt. Das ALCL wurde deshalb ausgewählt, da es sich, wie unter 1.2 ausgeführt, bei ALK⁺ und ALK⁻ ALCL um in vielen Aspekten ähnliche Lymphomtypen handelt. Wir haben in ALCL-Zellen, unabhängig vom ALK-Translokationsstatus, verschiedene deregulierte Gene mit prinzipiell transformierendem Potential identifiziert, die sowohl in ALK⁺ als auch ALK⁻ ALCL im Gegensatz zu verschiedenen non-ALCL-Lymphomen eine Deregulation zeigten. Hierzu zählen der onkogene TF FOS-related antigen 2 (FRA2; lokalisiert auf Chromosom 2p23), das HLH-Protein ID2 (2p25), sowie der onkogene Tyrosinkinase-Rezeptor CSF1R (5q33.1). Für diese Gene konnten wir sowohl in ALK⁺ als auch ALK⁻ ALCL wichtige biologische Funktionen in Hinblick auf Wachstum, Apoptoseschutz und Dedifferenzierung beschreiben. Wir haben daraufhin postuliert, dass die Deregulation dieser Gene zu einer Chromatinorganisation führt, die die Entstehung der NPM-ALK-Translokation begünstigt oder sogar erst ermöglicht. Im Einklang mit dieser Annahme konnten wir in Kooperation mit dem Labor von T. Misteli (Bethesda, USA) durch *Zweifarb-fluorescence in situ hybridization* (FISH)-Analysen unterschiedlicher Genloci-Paare auf den in die Translokation involvierten Chromosomen 5q und 2p nachweisen, dass

sich die entsprechenden Chromosomenarme auch in ALK- ALCL im Zellkern in räumlicher Nähe befinden. Zudem konnten wir durch Applikation von genotoxischem Stress auf ALK- ALCL sowie non-ALCL-Zellen nachweisen, dass nur in Zellen mit einer Deregulation bruchpunktnaher Gene die NPM-ALK-Translokation induzierbar war. Interessanterweise konnten wir in bestimmten kutanen CD30-positiven lymphoproliferativen Erkrankungen, die mit dem Auftreten von ALCL assoziiert sind, ebenfalls eine - wenn auch schwächer ausgeprägte - Deregulation Bruchpunkt-naher Gene wie FRA2 und ID2 nachweisen, was diese Assoziation auf molekularer Ebene untermauert. Diese Daten waren einer der ersten Nachweise, dass die räumliche Nähe von möglichen Translokationspartnern das Auftreten von Translokationen begünstigt, und führte zu neuen Pathogenese- und Therapie-relevanten Einsichten in Hinblick auf das ALCL.

DOI-Verlinkung Mathas *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106:5831

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0900912106>

3. DISKUSSION

3.1 Deregulierte Signalwege und Transkriptionsfaktoren im cHL

Ein Schwerpunkt der eigenen Forschungsarbeiten ist die Identifikation deregulierter Signalwege und TF im cHL. Ausgangspunkt dieser Arbeiten war die Beobachtung, dass in HRS-Zellen der TF NF- κ B konstitutiv aktiv ist und über die Regulation von Wachstum und Überleben sowie eines Großteils cHL-spezifischer Gene von zentraler Bedeutung für die cHL-Pathogenese ist (3, 9-12). Neben verschiedenen genomischen Läsionen in NF- κ B-aktivierenden Signalwegen trägt eine dauerhafte Aktivierung des IKK-Komplexes zu dieser NF- κ B-Aktivierung bei (64). Viele Signalwege, die zu einer IKK- und damit NF- κ B-Aktivierung führen resultieren oft in einer parallelgeschalteten Aktivierung der MAPK und damit des TF AP-1 (109). Um die IKK/NF- κ B-Aktivierungsmechanismen besser zu verstehen haben wir in initialen Arbeiten den Aktivierungsstatus der MAPK und des TF AP-1 in HRS-Zellen untersucht (20). Es zeigte sich dabei, dass HRS-Zellen in einer ungewöhnlichen Stärke eine konstitutive AP-1-DNA-Bindungsaktivität aufweisen, wohingegen eine solche Bindungsaktivität in non-Hodgkin-Zelllinien so gut wie nicht nachzuweisen war. Neben der Aktivierungsstärke ist die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes in HRS-Zellen ungewöhnlich. So ist dieser Komplex nicht wie in vielen anderen stimulierten Zelltypen aus JUN/FOS-Heterodimeren zusammengesetzt, sondern besteht vor allem aus JUN/ATF-Heterodimeren (20, 110). Vor allem die sehr starke und in allen cHL-Fällen zu findende Expression von JUN und JUNB ist dabei bemerkenswert. Durch eigene Arbeiten sowie vielfältige Studien anderer Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass AP-1 für die cHL-Pathogenese zentrale Gene wie ID2, Zyklin D2, CD30 oder GALECTIN-1 reguliert (20-22, 29). Darüber hinaus führt die Blockade der AP-1-Aktivität in HRS-Zellen zu einem Wachstumsarrest (20). In Hinblick auf die Zielgenaktivierung konnten wir einen transkriptionellen Synergismus von AP-1 mit NF- κ B nachweisen, wie beispielsweise für die Regulation des Chemokinrezeptors CCR7 oder des Zellzyklusregulators Zyklin D2 gezeigt, welche beide in HRS-Zellen ungewöhnlich stark exprimiert werden (20, 111, 112). Interessanterweise ist die Aktivierung des AP-1-Komplexes in HRS-Zellen zumindest teilweise unabhängig von einer MAPK-Aktivität (20, 67). Dies deutet auf eine rezeptornaher Verschiebung des Aktivierungsverhältnisses von MAPK und IKK zum IKK/NF- κ B-Signalweg in HRS-Zellen hin (67). Dieser in HRS-Zellen ungewöhnliche Aktivierungsmechanismus ist bisher nur teilweise verstanden. Neben einer durch das Umgebungsinfiltrat induzierten Aktivierung von MAPK in primären HRS-Zellen (4) konnten wir zeigen, dass der AP-1-Signalweg hierarchisch unterhalb einer konstitutiven IRF5-Aktivierung anzusiedeln ist (Ref. 85; siehe unten). Zudem trägt die konstitutive NF- κ B-Aktivität zur Hochregulation von JUNB in HRS-Zellen bei (20). Wie unter 1.1 und 2.2.1 ausgeführt ist in HRS-Zellen die Aktivität B-Linien-spezifischer TF funktionell blockiert (1, 29, 113). An diesem Prozess sind die E2A-Antagonisten ID2 und ABF1 und deregulierte TF wie FOXO1 beteiligt; zudem trägt eine epigenetische Abschaltung B-Linien-spezifischer TF zu diesem Prozess bei (1, 32, 114, 115).

Weiterhin zeigen HRS-Zellen eine durch verschiedene Mechanismen bedingte Aktivierung verschiedener STAT-TF, vor allem STAT3, STAT5 und STAT6 (3). Alle diese Veränderungen der TF-Landschaft in B-lymphatischen Zellen machen das cHL zu einer Erkrankung mit höchst komplexen TF-Veränderungen.

Um einen detaillierten Überblick über deregulierte TF-Aktivitäten in HRS-Zellen zu bekommen und die Mechanismen dieser aberranten TF-Aktivierungen und -Abschaltungen besser verstehen zu können, haben wir in einer vor kurzem publizierten Arbeit einen genomweiten Ansatz zur Identifikation deregulierter TF beschrieben, auf den im Folgenden eingegangen wird (85). Hierzu wurden in Kooperation mit dem Labor von C. Bonifer mittels DNase I-Verdau vergleichende Analysen von HRS- und non-Hodgkin-Zelllinien durchgeführt. Hierdurch konnten wir genomweit spezifisch in HRS-Zellen zugängliches und damit aktiviertes Chromatin identifizieren. In einem nächsten Schritt haben wir diese HRS-Zell-spezifisch aktivierten Chromatinregionen auf angereicherte TF-Bindungsmotive analysiert. Dabei zeigte sich mit Bindungsmotiven für NF- κ B-, AP-1-, STAT- und IRF-Faktoren insbesondere eine Anreicherung von normalerweise nur kurzzeitig aktivierten TF. Die bereits bekannte pathogenetische Bedeutung von NF- κ B-, AP-1- und STAT-Faktoren für das cHL (3, 85) wurde durch unsere Analysen erneut belegt. Darüberhinaus konnten wir mit dem TF IRF5 einen Faktor identifizieren, der in HRS dereguliert ist und für die Fehlregulation einer Vielzahl von zentralen pathogenetischen Aspekten des cHL verantwortlich ist. Dabei soll hier vor allem der transkriptionelle Synergismus mit NF- κ B hervorgehoben werden. Passend zu Literaturdaten, dass der TF IRF5 u.a. zusammen mit NF- κ B inflammatorische Gene wie Zytokine und Chemokine reguliert (87, 116, 117), konnten wir in HRS-Zellen einen transkriptionellen Synergismus von IRF5 und NF- κ B aufzeigen. Dieser Synergismus ist die wahrscheinlichste Erklärung für die ungewöhnlich hohe Zytokinexpression der HRS-Zellen (3, 4). Neben dem transkriptionellen Synergismus mit NF- κ B konnten wir zudem nachweisen, dass die konstitutive AP-1-Aktivität der IRF5-Aktivierung nachgeschaltet ist (85). Ein solcher transkriptioneller „crosstalk“ zwischen IRF- und AP-1-TF konnte damit erstmals in HRS-Zellen nachgewiesen werden. Ob eine in der Literatur beschriebene physikalische Interaktion zwischen IRF-TF und NF- κ B (118) in HRS-Zellen von Relevanz ist bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Zusammengefasst haben diese Analysen nicht nur zu besseren Einsichten in die transkriptionelle Regulation cHL-spezifischer Gene geführt sondern Einsichten in die Hierarchie pathogenetisch relevanter TF im HL geliefert.

3.2 Therapeutische Implikationen deregulierter Signalwege in HRS-Zellen

Die Therapie des cHL stellt mit dem Erreichen einer Heilung bei sogar dem größten Teil der Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien eine ungewöhnliche Erfolgsgeschichte dar (34). Durch die mit Polychemotherapie mit oder ohne Bestrahlung erreichten Therapieerfolge gehört das cHL zu den am besten zu behandelnden bösartigen Erkrankungen überhaupt (34). Die mit diesen Behandlungsstrategien verbundenen Nebenwirkungen sind allerdings nicht unproblematisch. Zu

nennen sind hier die in einem recht hohen prozentualen Anteil auftretende direkte Therapie-assoziierte Frühtoxizität sowie die erst nach Jahren auftretende Spättoxizität (34). Zur Frühtoxizität gehören unter anderem das Auftreten schwerer Organtoxizitäten, Infertilität und Therapie-assoziierte Mortalität, zur Spättoxizität ebenfalls Organschäden sowie insbesondere Therapie-assoziierte Zweitneoplasien (34). Aus diesen Gründen ist für das cHL die Entwicklung weniger toxischer, zielgerichteter neuer Therapiestrategien wünschenswert und notwendig (35). Ein Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war die auf der Identifikation molekularer Defekte basierende Entwicklung neuer Therapiestrategien für das cHL.

Die konstitutive Aktivität des TF NF- κ B stellt, wie unter 1.1 ausgeführt, einen zentralen molekularen Defekt der HRS-Zellen und damit ein Ziel möglicher zielgerichteter Therapiestrategien dar. Wir haben uns damit beschäftigt, die konstitutive Aktivität des IKK-Komplexes als Ziel solcher Therapiestrategien zu evaluieren. Unter den in Hinblick auf eine Blockade des IKK-Komplexes und damit der NF- κ B-Aktivität getesteten Substanzen stellten sich Arsen-Derivate als besonders effektiv heraus (68). Arsenderivate können durch Interaktion mit der Aktivierungsdomäne von IKK β die Aktivierung des IKK-Komplexes effektiv unterbinden (70). Trotz der bekannten karzinogenen Wirkung (119) haben sich Arsen-Derivate als wirksame und sichere Medikamente zur Behandlung bestimmter bösartiger Erkrankungen herausgestellt (120). Die Behandlung von HRS-Zelllinien mit Arsenderivaten führte zur Zeit- und Dosis-abhängigen Induktion von Zelltod durch Apoptose. Wir konnten in den HRS-Zellen nachweisen, dass Arsen den IKK-Komplex blockiert, zur Blockade der konstitutiven NF- κ B-Aktivität führt und letztendlich Zelltod in HRS-Zelllinien auslöst. Diese Effekte konnten wir ebenfalls in einem Mausmodell mit xenotransplantierten HRS-Zelllinien *in vivo* nachweisen. Dabei führt die Behandlung mit Arsen nicht nur zu einer Wachstumsverlangsamung, sondern auch zu einer raschen Remission größerer xenotransplantierte Tumore. Diese Daten zeigen, dass die Blockade des IKK-Komplexes eine wirksame Strategie zur Behandlung des cHL darstellen könnte. Interessanterweise lassen sich in der Literatur Fallberichte zur Behandlung von cHL-Patienten mit Arsenderivaten und einem teilweise sehr guten Ansprechen finden (71, 121). Zu bedenken ist hierbei sicherlich, dass in einem Teil der cHL-Fälle Mutationen der I κ B-Proteine zu finden sind (3, 13, 14), durch die in einem Teil der HRS-Zellen die Wirksamkeit von Substanzen, die über den IKK-Komplex wirken, abgeschwächt werden könnte. Experimentell konnten wir in der Tat zeigen, dass Zelllinien mit Mutationen der I κ B-Proteine I κ B α und I κ B ϵ weniger sensitiv gegenüber einer Arsen-induzierten Apoptoseinduktion waren. Neben der Blockade von NF- κ B führt die Behandlung von Zellen mit Arsenderivaten zu einer Aktivierung von MAPK/JNK (122), wobei die Aktivierung von JNK in vielen Zelltypen mit einer Apoptoseinduktion einhergeht. Insbesondere JNK ist im cHL nicht oder nur abgeschwächt aktiv (20, 67), und eine Arsen-vermittelte JNK-Aktivierung trägt möglicherweise zur effektiven Apoptoseinduktion in den HRS-Zellen bei. Das genaue Verständnis der Aktivierungsmechanismen von u.a. NF- κ B kann möglicherweise für die Entwicklung neuer NF- κ B-

Inhibitoren genutzt werden, die gezielt in malignen Zellen aktiv sind. Eine solche Strategie konnte kürzlich für das Plasmozytom entwickelt werden (123).

Weiterhin soll in diesem Teil der Arbeit auf die sich aus der Dedifferenzierung der HRS-Zellen ergebenden therapeutischen Konsequenzen eingegangen werden. Wie unter 1.1, 2.2.2-4 ausgeführt vermittelt die aberrante Expression B-Linien-fremder Gene alternative Überlebenssignalwege für die HRS-Zellen. Neben dem IL-21/IL-21R-System konnten wir dies insbesondere für die aberrante CSF-1/CSF1R-Expression in HRS-Zellen zeigen, auf das hier näher eingegangen werden soll. CSF1R ist ein onkogener Tyrosinkinaserzeptor, für den ein transformierendes Potential in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen wurde (124). In HRS-Zellen ist die aberrante CSF1R-Aktivierung unter anderem als Konsequenz der E2A-Blockade anzusehen und resultiert aus einer aberranten Aktivierung repetitiver DNA-Elemente (29, 42). Wir konnten experimentell CSF1R auf verschiedenen Ebenen blockieren, was zu einem Wachstumsarrest und zum Zelltod von HRS-Zelllinien führte. Neben dem Einsatz neuartiger, CSF1R-spezifischer *small compound*-Inhibitoren (42) haben wir dabei den Effekt bereits klinisch eingesetzter Tyrosinkinaseinhibitoren auf HRS-Zelllinien untersucht (101). Neben CSF1R sind in HRS-Zellen verschiedene andere RTKs aktiviert (125, 126). Wir sind deshalb davon ausgegangen, dass eine inhibitorische Wirkung auf weitere RTKs als therapeutischer Vorteil anzusehen ist, und haben deshalb den Effekt des Breitspektrum-RTK-Inhibitors BAY 43-9006/Sorafenib (127) (102) auf HRS-Zellen untersucht. Die Behandlung von HRS-Zellen mit BAY 43-9006 blockierte effizient die CSF1R-Aktivität in HRS-Zellen und resultierte in einer Induktion von Zelltod. Interessanterweise zeigte der klinische Einsatz von BAY 43-9006 in refraktären Lymphompatienten insbesondere im cHL ein Ansprechen (128). Diese Effekte basieren möglicherweise nicht nur auf einer CSF1R-Blockade der HRS-Zellen selbst, sondern auch auf einer Wirkung auf Makrophagen im umgebenden Infiltrat der HRS-Zellen, die mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht werden (129). Neben Sorafenib wurden in weiteren klinischen Studien die CSF1R-Inhibitoren PLX3397 und JNJ-40346527 in cHL-Patienten getestet, was in einem Teil der Patienten mit therapierefraktärer fortgeschrittener Erkrankung zu einem Therapieansprechen führte (130, 131).

Zusammengefasst zeigen die hier beschriebenen Beispiele, wie die Identifikation molekularer Defekte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien für lymphatische Neoplasien beitragen kann.

3.3 Alterationen der E2A-Aktivität als Defekt lymphatischer Neoplasien

Es ist ein immer noch gültiges Konzept, dass sich der Prozess der malignen Transformation verschiedenster Zelltypen unter anderem aus einer Kombination von Defekten zusammensetzt, durch die einerseits Dedifferenzierungsprozesse in Gang gesetzt und andererseits Wachstum und Schutz vor Zelltod vermittelt werden (132). In den hier vorgestellten Arbeiten konnten wir nachweisen, dass Alterationen des Transkriptionsfaktors E2A, einem zentralen Differenzierungsfaktor lymphatischer Zellen (91), in verschiedenen lymphatischen Neoplasien zu finden sind. Konkret haben wir

funktionelle oder genomische Alterationen von E2A im cHL, ALCL, PEL und SeSy identifiziert (29, 58, 133, 134). Im cHL wird E2A durch die aberrante Expression seiner Antagonisten ID2 und ABF1 inhibiert (29, 96). ID2 blockiert E2A durch Bildung von Heterodimeren, die aufgrund der fehlenden DNA-Bindungsdomäne von ID2 nicht mehr an die DNA binden können (93), wohingegen ABF-1 als transkriptioneller Repressor zwar die Bindung von E2A-ABF-1-Heterodimeren an E-Box-Bindungsmotive, nicht aber eine transkriptionelle Aktivierung entsprechender Gene zulässt (92). Es konnte gezeigt werden, dass die hohe ID2-Expression in HRS-Zellen durch die konstitutive AP-1-Aktivität vermittelt wird, was zudem durch genomische Alterationen des *ID2*-Genlokus begünstigt wird (29, 113). Der Mechanismus, der zur aberranten ABF-1-Expression in HRS-Zellen führt ist derzeit unklar. Interessant ist jedoch, dass ABF-1 initial aus EBV-positiven lymphoblastoiden Zelllinien kloniert wurde (92), und die EBV-Infektion mit der Pathogenese des cHL in Verbindung gebracht wurde (3, 25). In PEL-Zellen, die durch eine EBV- und HHV8-Infektion gekennzeichnet sind zeigte sich ebenfalls eine Überexpression von ID2 und, wenngleich schwächer ausgeprägt, ABF-1 als Ursache der fehlenden E2A-DNA-Bindungsaktivität (133).

In T-Zellen besteht die E-Box-Bindungsaktivität in der Regel aus E2A-HEB-Heterodimeren (135). Erwartungsgemäß konnten wir eine so zusammengesetzte E-Box-Bindungsaktivität in den von uns untersuchten T-Zell-Leukämie-Linien nachweisen (58). Im Gegensatz dazu zeigten ALCL-Zelllinien, ähnlich wie HRS-Zelllinien, einen weitgehenden Verlust einer solchen E-Box-Bindungsaktivität. Ursächlich für die fehlende E2A-Aktivität identifizierten wir eine ungewöhnlich starke Expression von ID2, zumindest teilweise vermittelt durch Zugewinne des *ID2*-Genlokus im größten Teil der analysierten ALCL-Patientenfälle (58). In Übereinstimmung mit einer postulierten Funktion von E2A als Tumorsuppressor in lymphatischen Zellen konnten wir weiterhin mit dem von T-Zellen abstammenden SeSy eine bösartige lymphatische Erkrankung nachweisen, die durch den genomischen Verlust von *E2A* auf 19p13.3 gekennzeichnet ist (134). Zusammen mit aus der Literatur bekannten rekurrenten Translokationen des *E2A*-Genlokus in B-Zell-Leukämien, der Begünstigung von T-Zell-Leukämien durch eine TAL1/SCL-vermittelte E2A-Blockade sowie Daten aus Mausmodellen kann von einer Funktion von E2A als Tumorsuppressor in humanen lymphatischen Zellen ausgegangen werden (136-139). Die Komplexität und Abhängigkeit eines solchen Effekts vom Zelltyp und jeweiligen Differenzierungsstadium spiegelt sich darin wider, dass E2A als Onkogen im Burkitt-Lymphom beschrieben wurde (140).

Funktionell treibt E2A eine Vielzahl von Genen, die für die Initiierung und Aufrechterhaltung des B- und T-lymphatischen Differenzierungsprogramms essentiell sind (91, 135). Passend hierzu zeigen HRS-, ALCL- und PEL-Zellen tiefgreifende Änderungen des lymphatischen Differenzierungsprogramms (8, 57, 141), ein unter lymphatischen Neoplasien ungewöhnliches Phänomen mit stärkster Ausprägung im cHL. Welche Konsequenzen hat der Verlust einer E2A-Aktivität in den genannten lymphatischen Neoplasien? In HRS- und ALCL-Zellen ist die blockierte E2A-Aktivität als eine der Hauptursachen für die Auslöschung des B-Zell-spezifischen bzw. für die

Herunterregulation des T-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms anzusehen (29, 58). Neben dieser Deregulation Linien-spezifischer Gene führt eine E2A-Rekonstitution in PEL-Zelllinien sowie in SeSy-Zellen zu Apoptoseinduktion und Proliferationsarrest (133). Diese Resultate stimmen mit komplementären, in Mausmodellen generierten Daten überein, in denen E2A nicht nur zentraler Bestandteil eines regulatorischen Netzwerks zur Regulation lymphatischer Genexpression ist, sondern der Verlust von E2A zum Auftreten aggressiver Lymphome führt (139). Zudem löst eine E2A-Rekonstitution in diesen murinen transformierten Zellen Apoptose und Wachstumsarrest aus (142). Obwohl der molekulare Mechanismus dieser Effekte derzeit nicht komplett verstanden ist konnten bereits u.a. durch eigene Arbeiten interessante E2A-regulierte Zielgene identifiziert werden, die möglicherweise als therapeutische Zielstrukturen genutzt werden können. Darunter sind in erster Linie MYC, CDK6 und Komponenten des Ras-Signalwegs zu nennen (134). Passend zu insbesondere der hohen MYC-Expression in diesen Lymphomentitäten ist der Tumorsuppressor p53 durch verschiedene Mechanismen in diesen Lymphomen teilweise inaktiv (143, 144). Die Aufarbeitung einer möglichen Nutzung dieser Gene als therapeutische Zielstrukturen sollte das Ziel zukünftiger Studien sein.

Im cHL findet sich, wie unter 2.2.1 ausführlich dargestellt, die stärkste Ausprägung einer funktionellen E2A-Blockade, die einem so gut wie kompletten E2A-Funktionsverlust entspricht. In murinen lymphatischen Zellen konnte gezeigt werden, dass eine ähnliche Störung Linien-spezifischer Transkriptionsfaktoren nicht nur zu einem Identitätsverlust der entsprechenden lymphatischen Zellen führt, sondern eine Dedifferenzierung im Sinne einer Rückdifferenzierung auf ein frühes hämatopoetisches Vorläuferzellstadium einleitet. Dies konnte beispielsweise für den Verlust der TF E2A und Pax5 sogar in reifen lymphatischen Zellen gezeigt werden (94, 145). In diesen Modellen erlaubte die Inaktivierung von E2A oder Pax5 die Reaktivierung von im Laufe der B-Zell-Differenzierung unterdrückten alternativen Differenzierungswegen, wie denen von myeloischen oder T-lymphatischen. Dieser Prozess trägt zur malignen Transformation bei, wie am Beispiel des Auftretens von Progenitorzelltumoren nach Pax5-Inaktivierung in murinen B-Zellen gezeigt wurde (145). Basierend auf oben angeführten Daten haben wir postuliert, dass die funktionelle E2A-Blockade in HRS-Zellen neben dem Verlust des B-Zell-spezifischen Genexpressionsprogramms zu einer Reaktivierung von normalerweise in B-Zellen unterdrückten alternativen Linienprogrammen führt und damit eine Erklärung für den ungewöhnlichen Phänotyp der HRS-Zellen darstellt (5, 96). Wir konnten in HRS-Zellen belegen, dass es durch die Hochregulation von ABF-1 und ID2 und dem damit einhergehenden funktionellen E2A-Verlust zur Induktion B-Linien-fremder Gene wie T-Zell-Transkriptionsfaktoren (GATA3, TCF-1, T-bet) und myeloischen Genen wie CSF1R kommt (29).

Neben der auf diesen Befunden basierenden molekularen Erklärung des ungewöhnlichen Phänotyps der HRS-Zellen haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die auf dem Verlust der E2A-Aktivität basierende Reprogrammierung des B-Zell-Genexpressionsprogramms - und die damit einhergehende Generierung des ungewöhnlichen Phänotyps - nicht nur ein Epiphänomen der HL-Entstehung ist, sondern einen zentralen Prozess der malignen Transformation der HRS-Zellen und

damit der HL-Pathogenese darstellt (96). Konzeptuell ist bisher nur teilweise verstanden, wie die von B-Zellen abstammenden HRS-Zellen ohne Expression des BCR überleben können, da dieser normalerweise für das Überleben von B-Zellen unabdingbar ist. Mechanistisch konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass solche B-Zellen durch die Aktivierung geeigneter Signalwege wie beispielsweise des PI3K-Signalwegs unabhängig von einer BCR-Expression überleben können (146). In Hinblick auf HRS-Zellen sind wir von der Überlegung ausgegangen, dass B-Linien-fremde Gene und assoziierte Signalwege den Verlust des BCR auf HRS-Zellen kompensieren und alternative Überlebenssignale vermitteln können. Dieses Konzept haben wir in HRS-Zellen für das normalerweise nur in bestimmten T- und NK-Zellpopulationen exprimierte IL-21/IL-21R-System sowie das physiologischerweise auf myeloische Zellen beschränkte CSF-1/CSF1R-System belegt (97, 100).

Für die aberrante CSF1R-Expression auf HRS-Zellen konnten wir einen für Protoonkogene neuartigen Regulationsmechanismus in bösartigen Zellen aufdecken (42, 100). Ausgehend von der Beobachtung, dass in HRS-Zellen weder der normalerweise in myeloischen Zellen genutzte *CSF1R*-Promoter noch das entsprechende Enhancer-Element im ersten Intron Orte des *CSF1R*-Transkriptionsstarts sind, identifizierten wir ein oberhalb des kanonischen Promoters gelegenes regulatorisches LTR-Element als treibenden Promoter (100). Dies ist ein sehr ungewöhnlicher Befund, da solche repetitiven DNA-Elemente normalerweise epigenetisch stillgelegt werden (147). Die aberrante Aktivierung von LTRs wird mit der Entstehung verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht, die pathogenetische Relevanz einer solchen LTR-Aktivierung war zum Zeitpunkt unserer Arbeit allerdings unklar (148). Vereinbar mit einer normalerweise epigenetischen Kontrolle von LTR-Elementen zeigen HRS-Zellen durch genomische Alterationen und aberrante Methylierung regulatorischer Elemente den Verlust des epigenetischen Schlüsselregulators CBFA2T3 (auch als ETO2 bekannt) (100). Wir konnten nachweisen, dass es durch eine Chromatin-Umorganisation, die zumindest teilweise durch den CBFA2T3-Verlust vermittelt wird, sowie die konstitutive Aktivierung der TF NF- κ B und AP-1 zur LTR-getriebenen CSF1R-Aktivierung in HRS-Zellen kommt. Die hohe Spezifität der LTR-*CSF1R*-Transkripte für das cHL sowie die Apoptoseinduktion in HRS-Zellen nach Blockade der CSF1R-Aktivität in HRS-Zellen zeigen die diagnostische und therapeutische Relevanz dieser Befunde, die in zukünftigen Studien weiter untersucht werden muss.

Zusammengefasst konnten wir in den angeführten Arbeiten zeigen, dass Alterationen der Aktivität des TF E2A in verschiedenen lymphatischen Neoplasien zu finden sind und E2A in diesen Lymphomentitäten zentrale biologische Funktionen als Tumorsuppressor ausübt. Unsere Daten lassen zudem den Schluss zu, dass die Aufarbeitung der molekular- und zellbiologischen Konsequenzen der E2A-Inhibition zur Entwicklung neuer Therapiestrategien für diese Lymphomtypen genutzt werden kann.

3.4 Einsichten in die Pathogenese des ALCL

Wie in der Einleitung ausgeführt, stammt das ALCL von T-Zellen ab. Insgesamt ist die Prognose des ALCL im Vergleich zum cHL deutlich schlechter, zudem ist die Pathogenese des ALCL nur schlecht verstanden. Beim ALK⁺ ALCL ist die Entstehung der Translokation t(2;5)(p23;q35) mit dem resultierenden onkogenen Fusionsprotein NPM-ALK als ein zentral an der Pathogenese beteiligtes Ereignis anzusehen (48). Im ALK⁻ ALCL ist bisher ein vergleichbares pathogenetisches Ereignis nicht bekannt. In den eigenen Forschungsarbeiten ist neben dem cHL ein weiterer Forschungsschwerpunkt die ALCL-Entstehung. Dies ist unter anderem deshalb der Fall, da das cHL und das ALCL biologische Gemeinsamkeiten aufweisen, die in dieser Art und Weise nicht zwischen dem cHL und anderen Lymphomentitäten zu finden sind. Hierzu gehören beispielsweise die hohe Expression des TNFR-Familienmitglieds CD30 oder der Verlust des jeweiligen Phänotyps der entsprechenden Ursprungszelle (siehe Einleitung). In den eigenen Forschungsarbeiten konnten verschiedene molekulare Defekte in ALCL nachgewiesen werden, die für die Entstehung des ALCL relevant sind. Neben dem cHL ist das ALCL die zweite Lymphomentität, in der wir eine starke konstitutive Aktivierung des TF AP-1 nachweisen konnten (20). Es zeigte sich dabei eine in so gut wie allen ALCL-Fällen nachzuweisende JUNB-Überexpression, zudem ist für ALCL-Zellen die Expression von c-JUN charakteristisch. AP-1 schützt ALCL-Zellen vor Zelltod und reguliert eine Vielzahl ALCL-charakteristischer Gene, was die zentrale Bedeutung der AP-1-Aktivität für das ALCL unterstreicht. Neben JUNB ist die aberrante Expression des AP-1-Faktors FRA2 für das ALCL charakteristisch, und die resultierenden JUNB-FRA2-Heterodimere sind in so gut wie allen ALCL-Zellen zu finden (58). Die pathogenetische Relevanz der konstitutiven AP-1-Aktivität wird dadurch untermauert, dass sowohl für JUNB als auch FRA2 genomische Alterationen der entsprechenden Genloci beschrieben wurden (58, 149). In ALK⁺ ALCL trägt zudem NPM-ALK über die Aktivierung von JNK/MAPK zur JUNB-Hochregulation bei (150). Ob eine Blockade von JNK oder MAPK und damit auch AP-1 als Therapiestrategie für ALCL genutzt werden kann bleibt Untersuchungen in zukünftigen Studien vorbehalten.

Im Gegensatz zur AP-1-Aktivität zeigen sich in Hinblick auf NF- κ B deutliche Unterschiede zwischen ALK⁺ und ALK⁻ ALCL. Während ALK⁻ ALCL eine mit HRS-Zellen vergleichbare NF- κ B-Expression aufweisen, fehlt in ALK⁺ ALCL-Zellen eine solche Aktivierung klassischer NF- κ B-Komponenten (59, 60). Dies wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass NPM-ALK die Aktivierung klassischer NF- κ B-Faktoren unterdrückt (60). Gleichwohl ist übergreifend in beiden ALCL-Entitäten eine Aktivierung von NF- κ B p50-Homodimeren nachzuweisen (59). Ursächlich für diese Aktivierung zeigen ALCL eine Überexpression von BCL3, das strukturelle Ähnlichkeit mit I κ B-Proteinen hat sowie die NF- κ B-Aktivität über Bindung an p50 oder p52 modulieren und in lymphatischen Zellen antiapoptotisch wirken kann (151-153). Die Aktivierung von BCL3-Zielgenen in ALCL sowie genomische Alterationen des BCL3-Genlokus lassen eine biologisch wichtige Funktion von BCL3 in ALCL-Zellen vermuten (59). Die genaue Bedeutung der BCL3-Expression in ALCL ist derzeit allerdings unklar.

In weiteren Arbeiten haben wir verschiedene spezifisch in ALCL deregulierte Gene identifiziert, die in der Nähe der möglichen chromosomalen Bruchpunkte der Chromosomenarme 2p und 5q liegen, die beide in die Entstehung der t(2;5)(p23;q35) involviert sind. Wir konnten zeigen, dass diese Gene unabhängig vom jeweiligen Translokationsstatus der ALCL-Zellen gleichermaßen dereguliert sind, d.h. dass weder in ALCL-Zelllinien noch primären ALCL-Fällen relevante Unterschiede in der Expression dieser Gene zwischen ALK+ und ALK- ALCL-Zellen zu beobachten waren. Wie unter 2.3 ausgeführt, gehören zu diesen Genen ID2, FRA2 und CSF1R (58). Für jedes dieser Gene konnten wir wichtige biologische Funktionen in ALCL-Zellen aufzeigen. Erwähnenswert ist vor allem, dass die starke ID2-Expression zum bekannten Verlust T-Zell-spezifischer Gene in ALCL (57) beiträgt, dass mit FRA2 eine weitere deregulierte Komponente des AP-1-Komplexes in ALCL identifiziert wurde, der in ALCL zum Überleben und zur Deregulation charakteristischer Zielgene beiträgt (20, 154, 155), und dass die Blockade des onkogenen Tyrosinkinase-Rezeptors CSF1R in ALCL zum Zelltod führte (100). Wir haben zudem nachgewiesen, dass sich auch in ALCL-Zellen ohne t(2;5)(p23;q35) die Chromosomenarme 2p und 5q im Zellkern in räumlicher Nähe zueinander befinden, und diese Nähe die Entstehung der t(2;5)(p23;q35)-Translokation begünstigt (58). Über die Mechanismen der Entstehung der t(2;5)(p23;q35)-Translokation ist nur wenig bekannt. Wir haben postuliert, dass die Deregulation der genannten Bruchpunkt-nahen Gene Voraussetzung für die Entstehung der t(2;5)(p23;q35) ist.

ALK+ und ALK- ALCL lassen sich histomorphologisch so gut wie nicht voneinander unterscheiden (44). Allerdings sind insbesondere der klinische Verlauf sowie die Altersverteilung beider ALCL-Entitäten unterschiedlich (44), was in der aktuellen WHO-Klassifikation zur Einteilung der ALCL in ALK+ und ALK- ALCL als (wenn auch vorläufige) eigenständige Lymphomentitäten führte (56). Neben dem unterschiedlichen klinischen Verlauf unterscheiden sich beide ALCL-Entitäten in Hinblick auf genomische Aberrationen (52). Hervorzuheben ist hier, dass ALK- ALCL insgesamt ein deutlich heterogeneres Muster genomischer Aberrationen zeigen als ALK+ ALCL, in denen neben t(2;5)(p23;q35) generell nur recht wenig genomische Aberrationen zu finden sind (52). Allerdings werden bei ansonsten recht ähnlichem Expressionsprofil Unterschiede im Genexpressionsmuster in beiden ALCL-Entitäten vor allem durch NPM-ALK-induzierte Signalwege vermittelt (55). Die von uns erhobenen Daten lassen vermuten, dass ALK+ und ALK- ALCL trotz der genannten Unterschiede biologisch verwandte Erkrankungen sind, was in zukünftigen Studien weiter aufzuarbeiten bleibt.

Zusammengefasst zeigen die dargestellten Arbeiten, wie die Aufarbeitung von in Lymphomzellen deregulierten Signalwegen und Transkriptionsfaktoren nicht nur neue Pathogenese-relevante Einsichten für die jeweiligen Lymphomentitäten liefert, sondern auch zu neuen Therapiestrategien führen kann.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Schwerpunkt der eigenen wissenschaftlichen Arbeiten ist die Erforschung der Pathogenese reifzelliger lymphatischer Neoplasien. Es ist das Ziel dieser Arbeiten, molekulare und/oder genomische Schlüsseldefekte zu identifizieren, um zum einen die Pathogenese dieser Erkrankungen besser verstehen zu können und zum anderen, basierend auf entsprechenden Defekten, zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln. Fokus der eigenen Arbeiten ist dabei insbesondere die Analyse deregulierter Transkriptionsfaktoren und Signalwege sowie deren Rolle für Wachstum, Schutz vor Zelltod sowie Störung zellulärer Differenzierungsprogramme. Im Rahmen dieser Arbeiten konnten insbesondere Schlüsselbefunde der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL), des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL) sowie des Sézary-Syndroms, einer Sonderform kutaner T-Zell-Lymphome, erhoben werden. Insbesondere wurde im cHL und ALCL u.a. die pathogenetisch wichtige aberrante AP-1-Aktivität beschrieben, und es wurden Mechanismen der Apoptoseresistenz oben genannter Lymphomentitäten aufgearbeitet. Darüber hinaus konnten wir einen Mechanismus der ungewöhnlichen Dedifferenzierung der Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen beschreiben, der auf der funktionellen Blockade B-Linien-spezifischer Transkriptionsfaktoren beruht. Basierend auf dieser Arbeit wurde ein Konzept der Reprogrammierung der HRS-Zellen entwickelt, welches neben einer möglichen prognostischen und therapeutischen Relevanz zur Identifizierung eines neuen Mechanismus der Onkogenaktivierung über *long-terminal-repeat*-Elemente der DNA führte. Wir konnten zudem aufzeigen, dass sich am cHL erhobene Befunde und Konzepte auf andere Lymphomentitäten wie beispielsweise das primäre Effusionslymphom übertragen lassen. Im Hinblick auf einen möglichen translationalen Ansatz konnten, basierend auf den identifizierten molekularen Defekten, bereits vielversprechende *in vitro*- und teilweise *in vivo*-Untersuchungen u.a. mit Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitoren, Arsenderivaten oder CSF1R-blockierenden Substanzen durchgeführt werden. Letztendlich ist es das Ziel der eigenen Arbeiten, einen Beitrag zur Entwicklung zielgerichteter und wenig toxischer Therapiestrategien zur Behandlung maligner Lymphome zu leisten.

5. LITERATURANGABEN

1. Küppers R, Engert A, & Hansmann ML (2012) Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 122(10):3439-3447.
2. Pileri SA, et al. (2002) Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol* 55(3):162-176.
3. Küppers R (2009) The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 9(1):15-27.
4. Steidl C, Connors JM, & Gascoyne RD (2011) Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol* 29(14):1812-1826.
5. Mathas S (2007) The pathogenesis of classical Hodgkin's lymphoma: a model for B-cell plasticity. *Hematol Oncol Clin North Am* 21(5):787-804.
6. Küppers R & Rajewsky K (1998) The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 16:471-493.
7. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, & Rajewsky K (1996) Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184(4):1495-1505.
8. Schwering I, et al. (2003) Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101(4):1505-1512.
9. Bargou RC, et al. (1996) High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 87(10):4340-4347.
10. Bargou RC, et al. (1997) Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100(12):2961-2969.
11. Hinz M, et al. (2002) Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* 196(5):605-617.
12. Hinz M, et al. (2001) Constitutive NF-kappaB 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.
13. Emmerich F, et al. (2003) Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 201(3):413-420.
14. Emmerich F, et al. (1999) Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94(9):3129-3134.
15. Jungnickel B, et al. (2000) Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* 191(2):395-402.
16. Kato M, et al. (2009) Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459(7247):712-716.
17. Rui L, et al. (2010) Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell* 18(6):590-605.
18. Joos S, et al. (2000) Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* 60(3):549-552.
19. Gunawardana J, et al. (2014) Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat Genet* 46(4):329-335.
20. Mathas S, et al. (2002) Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J* 21(15):4104-4113.
21. Juszczynski P, et al. (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.
22. Watanabe M, et al. (2003) AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 163(2):633-641.
23. Jundt F, et al. (2002) Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99(9):3398-3403.
24. Jundt F, et al. (2008) Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 22(8):1587-1594.
25. Hjalgrim H, et al. (2003) Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 349(14):1324-1332.
26. Thorley-Lawson DA (2001) Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1(1):75-82.
27. Portis T, Dyck P, & Longnecker R (2003) Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 102(12):4166-4178.
28. Schmitz R, et al. (2009) TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* 206(5):981-989.
29. Mathas S, et al. (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.
30. Rassidakis GZ, et al. (2002) CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *J Clin Oncol* 20(5):1278-1287.
31. Foss HD, et al. (1999) Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood* 94(9):3108-3113.
32. Ushmorov A, et al. (2006) Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 107(6):2493-2500.
33. Ehlers A, et al. (2008) Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype. *Leukemia* 22(4):835-841.
34. Borchmann P, Eichenauer DA, & Engert A (2012) State of the art in the treatment of Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol* 9(8):450-459.
35. Batlevi CL & Younes A (2013) Novel therapy for Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013:394-399.
36. Younes A (2014) Brentuximab vedotin for the treatment of patients with Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 28(1):27-32.
37. Küppers R, Schneider M, & Hansmann ML (2013) Laser-based microdissection of single cells from tissue sections and PCR analysis of rearranged immunoglobulin genes from isolated normal and malignant human B cells. *Methods Mol Biol* 971:49-63.
38. Irsch J, et al. (1998) Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17):10117-10122.

39. Diehl V, *et al.* (1985) Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. *Cancer Surv* 4(2):399-419.
40. Kanzler H, *et al.* (1996) 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.
41. Mader A, *et al.* (2007) U-H01, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res* 119(3-4):204-210.
42. Lamprecht B, Bonifer C, & Mathas S (2010) Repeat-element driven activation of proto-oncogenes in human malignancies. *Cell Cycle* 9(21):4276-4281.
43. Steidl C, *et al.* (2011) MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 471(7338):377-381.
44. Stein H, *et al.* (2000) CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 96(12):3681-3695.
45. Morris SW, *et al.* (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263(5151):1281-1284.
46. Kaneko Y, *et al.* (1989) A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. *Blood* 73(3):806-813.
47. Hallberg B & Palmer RH (2013) Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer* 13(10):685-700.
48. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, & Inghirami G (2008) The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 8(1):11-23.
49. Christensen JG, *et al.* (2007) Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 6(12 Pt 1):3314-3322.
50. Gambacorti Passerini C, *et al.* (2014) Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients. *J Natl Cancer Inst* 106(2):djt378.
51. Gambacorti-Passerini C, Messa C, & Pogliani EM (2011) Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 364(8):775-776.
52. Boi M, *et al.* (2013) PRDM1/BLIMP1 is commonly inactivated in anaplastic large T-cell lymphoma. *Blood* 122(15):2683-2693.
53. Merkel O, *et al.* (2010) Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(37):16228-16233.
54. Tabbo F, Ponzoni M, Rabadan R, Bertoni F, & Inghirami G (2013) Beyond NPM-anaplastic lymphoma kinase driven lymphomagenesis: alternative drivers in anaplastic large cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* 20(4):374-381.
55. Eckerle S, *et al.* (2009) Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 23(11):2129-2138.
56. Mason DY, *et al.* (2008) in *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*, eds Swerdlow SH, *et al.* (2008) WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. (International Agency for Reserach on Cancer, Lyon, France), pp 317-319.
57. Bonzheim I, *et al.* (2004) Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood* 104(10):3358-3360.
58. Mathas S, *et al.* (2009) Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in ALCL. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(14):5831-5836.
59. Mathas S, *et al.* (2005) Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 106(13):4287-4293.
60. Horie R, *et al.* (2004) The NPM-ALK oncoprotein abrogates CD30 signaling and constitutive NF-kappaB activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell* 5(4):353-364.
61. Ferreri AJ, Govi S, Pileri SA, & Savage KJ (2013) Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative. *Crit Rev Oncol Hematol* 85(2):206-215.
62. Ait-Tahar K, *et al.* (2006) B and CTL responses to the ALK protein in patients with ALK-positive ALCL. *Int J Cancer* 118(3):688-695.
63. Pro B, *et al.* (2012) Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 30(18):2190-2196.
64. Krappmann D, *et al.* (1999) Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 18(4):943-953.
65. Stein B, *et al.* (1993) Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* 12(10):3879-3891.
66. Herber B, Truss M, Beato M, & Muller R (1994) Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9(4):1295-1304.
67. Habelhah H, *et al.* (2004) Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB. *EMBO J* 23(2):322-332.
68. Mathas S, *et al.* (2003) Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. *Blood* 102(3):1028-1034.
69. Hinz M & Scheidereit C (2014) The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO Rep* 15(1):46-61.
70. Kapahi P, *et al.* (2000) Inhibition of NF-kappa B activation by arsenite through reaction with a critical cysteine in the activation loop of Ikappa B kinase. *J Biol Chem* 275(46):36062-36066.
71. Hendrick AC & Burton EF (1937) A Case of Hodgkin's Disease Treated with Colloidal Elemental Arsenic. *Can Med Assoc J* 36(5):519-520.
72. Adachi M, *et al.* (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* 11(3):294-300.
73. Davidson WF, Giese T, & Fredrickson TN (1998) Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 187(11):1825-1838.
74. Hennino A, Berard M, Krammer PH, & Defrance T (2001) FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 193(4):447-458.
75. Takahashi Y, Ohta H, & Takemori T (2001) Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14(2):181-192.
76. Lenardo M, *et al.* (1999) Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17:221-253.

77. Straus SE, *et al.* (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98(1):194-200.
78. Müschen M, Rajewsky K, Kronke M, & Küppers R (2002) The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol* 23(2):75-80.
79. Defrance T, Casamayor-Palleja M, & Krammer PH (2002) The life and death of a B cell. *Adv Cancer Res* 86:195-225.
80. Maggio EM, Van Den Berg A, de Jong D, Diepstra A, & Poppema S (2003) Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 162(1):29-35.
81. Re D, Hofmann A, Wolf J, Diehl V, & Staratschek-Jox A (2000) Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95. *Exp Hematol* 28(1):31-35.
82. Mathas S, *et al.* (2004) c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 199(8):1041-1052.
83. French LE & Tschopp J (2002) Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* 12(1):51-55.
84. Irmeler M, *et al.* (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388(6638):190-195.
85. Kreher S, *et al.* (2014) Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(42):E4513-4522.
86. Falini B, *et al.* (2000) A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 95(6):2084-2092.
87. Takaoka A, *et al.* (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434(7030):243-249.
88. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, & Taniguchi T (2008) The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 26:535-584.
89. Lin R, Yang L, Arguello M, Penafuerte C, & Hiscott J (2005) A CRM1-dependent nuclear export pathway is involved in the regulation of IRF-5 subcellular localization. *J Biol Chem* 280(4):3088-3095.
90. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, & Karin M (1999) Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284(5412):309-313.
91. Busslinger M (2004) Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 22:55-79.
92. Massari ME, *et al.* (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.
93. Kee BL (2009) E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol* 9(3):175-184.
94. Ikawa T, Kawamoto H, Wright LY, & Murre C (2004) Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity* 20(3):349-360.
95. Mikkola I, Heavey B, Horcher M, & Busslinger M (2002) Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297(5578):110-113.
96. Janz M, Dörken B, & Mathas S (2006) Reprogramming of B lymphoid cells in human lymphoma pathogenesis. *Cell Cycle* 5(10):1057-1061.
97. Lamprecht B, *et al.* (2008) Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3 α . *Blood* 112(8):3339-3347.
98. Spolski R & Leonard WJ (2007) Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26:57-79.
99. Monteleone G, Fina D, Caruso R, & Pallone F (2006) New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 22(4):361-364.
100. Lamprecht B, *et al.* (2010) Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med* 16(5):571-579, 571p following 579.
101. Ullrich K, *et al.* (2011) BAY 43-9006/Sorafenib blocks CSF1R activity and induces apoptosis in various classical Hodgkin lymphoma cell lines. *Br J Haematol* 155(3):398-402.
102. Kumar R, *et al.* (2009) Myelosuppression and kinase selectivity of multikinase angiogenesis inhibitors. *Br J Cancer* 101(10):1717-1723.
103. Mitelman F, Johansson B, & Mertens F (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7(4):233-245.
104. Meaburn KJ, Misteli T, & Soutoglou E (2007) Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 17(1):80-90.
105. Nikiforova MN, *et al.* (2000) Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 290(5489):138-141.
106. Aten JA, *et al.* (2004) Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* 303(5654):92-95.
107. Soutoglou E, *et al.* (2007) Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 9(6):675-682.
108. Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, & Misteli T (2003) Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 34(3):287-291.
109. Karin M, Liu Z, & Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):240-246.
110. Janz M, *et al.* (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.
111. Bai M, *et al.* (2004) Proliferation profile of classical Hodgkin's lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol Inc* 17(11):1338-1345.
112. Höpken UE, *et al.* (2002) Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. *Blood* 99(4):1109-1116.
113. Renne C, *et al.* (2006) Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 169(2):655-664.
114. Vogel MJ, *et al.* (2014) FOXO1 repression contributes to block of plasma cell differentiation in classical Hodgkin Lymphoma. *Blood* pii: blood-2014-07-590570. [Epub ahead of print]
115. Overbeck BM, *et al.* (2012) ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and down-regulated in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 97(10):1612-1614.
116. Barnes BJ, *et al.* (2004) Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J Biol Chem* 279(43):45194-45207.

117. Genin P, Algarte M, Roof P, Lin R, & Hiscott J (2000) Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF-kappa B and IFN-regulatory factor transcription factors. *J Immunol* 164(10):5352-5361.
118. Krausgruber T, et al. (2010) IRF5 is required for late-phase TNF secretion by human dendritic cells. *Blood* 115(22):4421-4430.
119. Chen CJ, Chen CW, Wu MM, & Kuo TL (1992) Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br J Cancer* 66(5):888-892.
120. Lo-Coco F, et al. (2013) Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 369(2):111-121.
121. Hosein PJ, et al. (2012) A multicenter phase II study of darinaparsin in relapsed or refractory Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 87(1):111-114.
122. Cavigelli M, et al. (1996) The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J* 15(22):6269-6279.
123. Tornatore L, et al. (2014) Cancer-Selective Targeting of the NF-kappaB Survival Pathway with GADD45beta/MKK7 Inhibitors. *Cancer Cell* 26(4):495-508.
124. Roussel MF, et al. (1987) Transforming potential of the c-fms proto-oncogene (CSF-1 receptor). *Nature* 325(6104):549-552.
125. Renné C, Willenbrock K, Küppers R, Hansmann ML, & Bräuninger A (2005) Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 105(10):4051-4059.
126. Renné C, et al. (2007) The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 120(11):2504-2509.
127. Wilhelm SM, et al. (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19):7099-7109.
128. Kumar S, et al. (2010) Phase 1 Trial of Sorafenib and Everolimus In Patients with Lymphoma or Multiple Myeloma. *52th ASH-Meeting Abstract 2802*.
129. Steidl C, et al. (2010) Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 362(10):875-885.
130. Moskowitz CH, et al. (2012) CSF1R Inhibition by PLX3397 in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: Results From a Phase 2 Single Agent Clinical Trial *54th ASH-Meeting Abstract 1638*.
131. von Tresckow B, et al. (2013) A Multicenter, Phase 1/2 Study of JNJ-40346527, a Colony Stimulating Factor-1 Receptor (CSF-1R) Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *ISHL-9, Abstract P135*.
132. Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-674.
133. Lietz A, et al. (2007) Loss of bHLH transcription factor E2A activity in primary effusion lymphoma confers resistance to apoptosis. *Br J Haematol* 137(4):342-348.
134. Steininger A, et al. (2011) Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *J Exp Med* 208(8):1585-1593.
135. Rothenberg EV, Moore JE, & Yui MA (2008) Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8(1):9-21.
136. O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C, & Kelliher M (2004) TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell* 5(6):587-596.
137. Inaba T, et al. (1992) Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science* 257(5069):531-534.
138. Aspland SE, Bendall HH, & Murre C (2001) The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* 20(40):5708-5717.
139. Bain G, et al. (1997) E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17(8):4782-4791.
140. Schmitz R, et al. (2012) Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490(7418):116-120.
141. Klein U, et al. (2003) Gene expression profile analysis of AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL) suggests a plasmablastic derivation and identifies PEL-specific transcripts. *Blood* 101(10):4115-4121.
142. Schwartz R, Engel I, Fallahi-Sichani M, Petrie HT, & Murre C (2006) Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26):9976-9981.
143. Lamprecht B, et al. (2012) The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sezary syndrome. *Br J Dermatol* 167(2):240-246.
144. Janz M, Stühmer T, Vassilev LT, & Bargou RC (2007) Pharmacologic activation of p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Leukemia* 21(4):772-779.
145. Cobaleda C, Jochum W, & Busslinger M (2007) Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449(7161):473-477.
146. Srinivasan L, et al. (2009) PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* 139(3):573-586.
147. Maksakova IA, Mager DL, & Reiss D (2008) Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cell Mol Life Sci* 65(21):3329-3347.
148. Druker R & Whitelaw E (2004) Retrotransposon-derived elements in the mammalian genome: a potential source of disease. *J Inherit Metab Dis* 27(3):319-330.
149. Mao X, et al. (2003) Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 101(4):1513-1519.
150. Staber PB, et al. (2007) The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood* 110(9):3374-3383.
151. Bours V, et al. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72(5):729-739.
152. Ong ST, et al. (1998) Lymphadenopathy, splenomegaly, and altered immunoglobulin production in BCL3 transgenic mice. *Oncogene* 16(18):2333-2343.
153. Mitchell TC, et al. (2001) Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat Immunol* 2(5):397-402.
154. Laimer D, et al. (2012) PDGFR blockade is a rational and effective therapy for NPM-ALK-driven lymphomas. *Nat Med* 18(11):1699-1704.
155. Atsaves V, et al. (2014) The oncogenic JUNB/CD30 axis contributes to cell cycle deregulation in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol* 167(4):514-523.

DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle insbesondere Prof. Dr. Bernd Dörken für die anregenden Diskussionen, die großzügige Unterstützung, und die Entfaltungsmöglichkeiten danken, ohne die meine bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten nicht möglich gewesen wären. Besonders danke ich Dr. Martin Janz für die langjährige enge, konstruktive und freundschaftliche Zusammenarbeit, die nicht nur die Entwicklung sondern auch die Umsetzung vieler Ideen ermöglicht hat. Claus Scheiderei danke ich für die langjährige vertraute Zusammenarbeit und die Einführung in die molekulare Analyse von Transkriptionsfaktoren, auf die ich immer wieder gerne zurückgreife. Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen langjährigen Mitarbeitern Franziska Hummel, Dr. Björn Lamprecht und Dr. Stephan Kreher, ohne deren Einsatz viele Projekte nicht hätten durchgeführt werden können. Auch den anderen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Labors möchte ich danken, darunter (ohne Anspruch auch Vollständigkeit) Dr. Karl Köchert, Simone Lusatis, Brigitte Wollert-Wulf, Ute Nitschke, Dr. Kurt Bommert, Dr. Kathrin D. Wurster, Dr. Katrin Ullrich, und Dr. Shuang Li. Für anregende Diskussionen und die gute Zusammenarbeit danke ich Prof. Dr. Ioannis Anagnostopoulos, Prof. Dr. Michael Hummel und Prof. Dr. Harald Stein, ebenso Prof. Dr. Reiner Siebert, Prof. Dr. Ralf Küppers und Prof. Klaus Rajewsky. Ich möchte mich zudem bei Prof. Dr. Constanze Bonifer für die äußerst konstruktive, produktive und immer wieder unterhaltsame Zusammenarbeit bedanken. Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt und mich immer wieder zum Nachdenken über die Vereinbarkeit von Familie und Beruf angeregt hat.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

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.

Berlin, 08.12.2014

Dr. med. Stephan Mathas