

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
und der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Expressionsanalyse und funktionelle Charakterisierung  
der AP-1-Faktoren BATF und BATF3  
im anaplastischen großzelligen Lymphom**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nikolai Schleußner  
aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

*Für meinen Großvater*

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Schleussner N\***, Merkel O\*, Costanza M, Liang HC, Hummel F, Romagnani C, Durek P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens K, Niedobitek A, Griffin PR, Piva R, Sczakiel HL, Woessmann W, Damm-Welk C, Hinze C, Stoiber D, Gillissen B, Turner SD, Kaergel E, von Hoff L, Grau M, Lenz G, Dörken B, Scheidereit C, Kenner L, Janz M, Mathas S. The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2018 Sep;32(9):1994-2007. [doi: 10.1038/s41375-018-0045-9](https://doi.org/10.1038/s41375-018-0045-9). Epub 2018 Mar 28. \*, geteilte Erstautorenschaft

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>9</b>
<b>Abstract (english)</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 <i>Das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL)</i>	12
1.1.1 Epidemiologie, Klassifikation und klinisches Bild	12
1.1.2 Therapie des ALCL	13
1.1.3 Zellulärer Ursprung des ALCL	14
1.1.4 Deregulierte Signalwege und Transkriptionsfaktoren (TF) in ALCL-Zellen	15
1.2 <i>AP-1-Transkriptionsfaktoren</i>	16
1.2.1 AP-1 TF-Familie, generelle Aspekte	16
1.2.2 Struktur von JUN-, FOS- und BATF-Proteinen und Lokalisation ihrer kodierenden Gene	17
1.2.3 Regulation und Funktion von AP-1	18
1.2.4 Bedeutung von AP-1 für Wachstum, Zelltod und maligne Transformation	19
1.3 <i>BATF und BATF3</i>	23
1.3.1 Expression von BATF und BATF3	23
1.3.2 Regulation der Aktivität von BATF und BATF3	24
1.3.3 Funktionelle Charakterisierung von BATF und BATF3	25
1.4 <i>Zielstellung der Arbeit</i>	28
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1 <i>Materialien</i>	29
2.1.1 Zelllinien	29
2.1.2 Bakterienstämme	29
2.1.3 Chemikalien	30
2.1.4 Radioaktive Substanzen	31
2.1.5 Puffer	32
2.1.6 Plasmide	32
2.1.7 Oligonukleotide	33
2.1.8 Enzyme	37
2.1.9 Antikörper	37
2.1.10 Kits	38
2.1.11 Geräte	38
2.1.12 Software	39
2.2 <i>Methoden</i>	39
2.2.1 Zellkultur	39
2.2.2 Präparation von und Experimente mit RNA	42
2.2.3 Präparation von und Experimente mit DNA	42
2.2.4 Präparation von und Experimente mit Protein	46
2.2.5 Statistik	50
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1 <i>AP-1/BATF DNA-Bindungsaktivität und BATF und BATF3 Expression im ALCL</i>	51
3.2 <i>Kooperation von AP-1 mit IRF4 im ALCL</i>	55
3.3 <i>Funktionelle Charakterisierung von BATF/ BATF3/AP-1 in ALCL-Zellen</i>	60
3.3.1 Inhibition von <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> mittels siRNA-Interferenz	60

3.3.2 Inhibition von AP-1 mit einem induzierbaren System	68
3.4 ALCL zeigt eine Gen-Signatur typisch für TH17- oder type 3 innate lymphoid cells	72
3.5 Regulation der TH17/ILC3-Gene durch BATF und BATF3	73
3.6 RORC2 als mögliches therapeutisches Ziel	75
<b>4 Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1 Einführung	79
4.2 Expression von BATF und BATF3	79
4.3 AP-1-Aktivität im Bezug auf den ALK-Status	80
4.4 Die komplexe AP-1-Aktivität erschwert funktionelle Analysen	80
4.5 BATF und BATF3 beeinflussen Wachstum und Überleben von ALCL-Zellen	81
4.6 Kooperation von BATFs mit IRF4 im ALCL	82
4.7 Die Funktion von AICEs	83
4.8 Die TH17-charakteristische Gensignatur von ALCL-Zellen	83
4.9 Ähnlichkeit der ALCL- zu ILC3-Zellen	84
4.10 Therapie	85
4.11 Zusammenfassung	87
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>88</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>112</b>
<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen</b>	<b>113</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>114</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>115</b>
<b>Danksagung</b>	<b>116</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: DNA-Bindungsaktivität von AP-1 im ALCL. ....	51
Abb. 3.2: Zusammensetzung der AP-1 DNA-Bindungsaktivität an der TRE-Sequenz in ALCL Zelllinien. ....	52
Abb. 3.3: mRNA-Expression von BATF und BATF3 in Lymphomlinien. ....	53
Abb. 3.4: BATF- und BATF3-Expression auf Proteinebene in Lymphomzelllinien. ....	53
Abb. 3.5: BATF und BATF3 werden in primären ALCL-Zellen exprimiert. ....	54
Abb. 3.6: Analyse der Expression von JUNB und IRF4 auf mRNA- und Proteinebene. ....	56
Abb. 3.7: DNA-Bindungsaktivität von AP-1/IRF4-Komplexen in ALCL-Linien. ....	57
Abb. 3.8: Zusammensetzung des AP-1/IRF4-Komplexes an der AICE-Bindungssequenz. ....	58
Abb. 3.9: Interaktion von BATF oder BATF3 mit JUNB auf Proteinebene. ....	59
Abb. 3.10: Optimierung der siRNA-Interferenz zur Inhibition der Expression von <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> . ....	61
Abb. 3.11: siRNA-Interferenz von <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> führt zu Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion in K299-Zellen. ....	63
Abb. 3.12: siRNA-Interferenz von <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> führt zu Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion in Mac-1-Zellen. ....	65
Abb. 3.13: Transduktionsrate von K299- und Mac-1-Zellen nach lentiviraler Transduktion. ....	66
Abb. 3.14: Hemmung der endogenen, nicht aber der ektopen <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> -Expression durch siRNA-Interferenz. ....	67
Abb. 3.15: Ektope Expression von <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> hebt die durch <i>BATF</i> und <i>BATF3</i> siRNA-Interferenz vermittelte Zelltoxizität in ALCL-Zellen auf. ....	68
Abb. 3.16: Aufbau des Tetrazyklin-induzierbaren A-Fos-Expressionsvektors. ....	69
Abb. 3.17: Induktion von GFP nach Stimulation mit Doxyzyklin. ....	69
Abb. 3.18: Die Expression von A-Fos führt zu einem totalen Verlust der konstitutiven AP-1-Aktivität. ....	71
Abb. 3.19: Der Verlust der AP-1-Aktivität führt zu Zelltod und Wachstumsarrest im ALCL. ....	72
Abb. 3.20 ALCL-Zellen sezernieren zum Teil IL-17A, IL-17F und IL-22. ....	73
Abb. 3.21: BATF und BATF3 binden an Promotor- und Enhancerregionen von TH17- und ILC3-assoziierten Genen. ....	74
Abb. 3.22: Die unterschiedliche Größe von RORC-Isoformen RORC1 und RORC2 können im WB unterschieden werden. ....	75
Abb. 3.23: ALCL-Zelllinien exprimieren RORC2. ....	76
Abb. 3.24: Inhibition von RORC2 mithilfe von kleinmolekularen Modulatoren induziert Zelltod in ALCL. ....	77
Abb. 3.25: Die Kombination von RORC2-Inhibitoren mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib führt gesteigertem zum Zelltod von ALCL-Zellen. ....	78

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AICE</b>	<i>AP-1/IRF4-composite elements</i>
<b>AID</b>	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
<b>ALCL</b>	Anaplastisches großzelliges Lymphom
<b>ALK</b>	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
<b>ALK+</b>	ALK-positiv
<b>ALK-</b>	ALK-negativ
<b>AML</b>	Akute Myeloischer Leukämie
<b>AP-1</b>	<i>activator protein 1</i>
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATF</b>	<i>activating transcription factor</i>
<b>BL</b>	Burkitt-Lymphom
<b>bZIP</b>	<i>basic leucine zipper</i>
<b>C-ALCL</b>	<i>primary cutaneous ALCL</i>
<b>CDK</b>	<i>cyclin-dependent kinase</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i>
<b>ChIP</b>	Chromatin-Immunpräzipitation
<b>cHL</b>	Klassisches Hodgkin-Lymphom
<b>CLL</b>	chronisch lymphatische Leukämie
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CRE</b>	<i>cyclic AMP-responsive element</i>
<b>CREB</b>	<i>CRE binding</i>
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<b>Crizo</b>	Crizotinib
<b>DLBCL</b>	diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>Dox</b>	Doxyzyklin
<b>EBV</b>	Ebstein-Barr-Virus
<b>EICE</b>	<i>ETS/IRF4-composite elements</i>
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EMSA</b>	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<b>ERK</b>	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
<b>FACS</b>	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FASL</b>	Fas-Ligand
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>
<b>FDR</b>	<i>false discovery rate</i>
<b>FL</b>	follikuläres Lymphom
<b>G-CSF</b>	<i>granulocyte-colony stimulation factor</i>
<b>GSEA</b>	<i>gene set enrichment analysis</i>
<b>HRS</b>	Hodgkin-Reed-Sternberg
<b>HSL</b>	Hochsalzlyse
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL-23R</b>	IL-23 Rezeptor
<b>ILC</b>	innate lymphoide Zellen
<b>ILC3</b>	<i>type 3 innate lymphoid cells</i>

<b>INF<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IRF4</b>	<i>interferon regulatory factor 4</i>
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>JNK</b>	cJUN N-terminalen Kinase
<b>K299</b>	Karpas-299
<b>KO</b>	knock-out
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>LIF</b>	<i>leukaemia inhibiting factor</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysacchariden
<b>LTX</b>	<i>lipofectamine</i>
<b>MARE</b>	<i>MAF recognition elements</i>
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
<b>MCL</b>	Mantelzell-Lymphom
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>NES</b>	<i>normalized enrichment score</i>
<b>NHL</b>	Non-Hodgkin-Lymphom
<b>NLPHL</b>	lymphozytenprädominantes noduläres Hodgkin-Lymphom
<b>PBS</b>	<i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PI</b>	Propidiumiod
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PMBL</b>	primäres mediastinales B-Zell-Lymphom
<b>PTCL</b>	peripheres T-Zell-Lymphom
<b>PTCL-NOS</b>	PTCL– <i>not otherwise specified</i>
<b>qPCR</b>	quantitative Real-Time PCR
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase PCR
<b>sgRNA</b>	<i>single guide RNA</i>
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>STAT3</b>	<i>signal transducer and activator of transcription-3</i>
<b>TCF</b>	<i>ternary complex factors</i>
<b>Tet</b>	Tetrazyklin
<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>T<sub>FH</sub></b>	follikuläre T-Helferzelle
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>TH</b>	T-Helferzelle
<b>TH17</b>	Typ17 T-Helferzelle
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>TNFRSF</b>	<i>TNF receptor superfamily</i>
<b>T-NHL</b>	T-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
<b>TRE</b>	<i>TPA-responsive element</i>
<b>TZR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>WB</b>	Western Blot



## Kurzfassung

Das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) gehört zur Gruppe der T-Zell Non-Hodgkin-Lymphome und tritt in zwei systemischen Formen auf, dem *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) -positiven (ALK+) und ALK-negativen (ALK-) ALCL. ALK+ ALCL haben in der Regel eine gute Prognose und treten im jüngeren Alter auf, wohingegen das ALK- ALCL vermehrt bei älteren Patienten auftritt und eine schlechtere Prognose hat. Neben einer typischen Zellmorphologie bestehend aus großen, pleomorphen Zellen ist die Expression des Zelloberflächenmarkers CD30 typisch für das ALCL. Zellen des ALCL sind darüberhinaus durch ein spezifisch dereguliertes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet. Hierzu gehören eine konstitutive Aktivität des *activator protein 1* (AP-1)-Transkriptionsfaktorkomplexes sowie des *interferon regulatory factor 4* (IRF4), die beide Wachstum und Überleben der ALCL-Zellen fördern. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den AP-1-Komplex in ALCL-Zellen besser zu charakterisieren und insbesondere Expression und Funktion der AP-1-Faktoren BATF und BATF3 zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst die Expression von BATF und BATF3 in ALCL-Zelllinien und primären Patientenproben untersucht und eine differentielle Expression beider Faktoren im ALCL nachgewiesen, die, abgesehen vom klassischen Hodgkin-Lymphom, so in keiner anderen Lymphomentität vorkommt. Des Weiteren konnte eine starke Bindung von BATF und BATF3 an klassische AP-1-Bindungsmotive sowie AP-1/IRF-composite elements (AICE) gezeigt werden. Diese Bindungsaktivitäten unterscheiden das ALCL von anderen Lymphomen.

Funktionell führte die Herunterregulation von BATF und BATF3 in ALCL-Zellen mittels siRNA-Interferenz zu einer starken Wachstumshemmung sowie Zelltodinduktion. Ebenso wurde ein Tetrazyklin-induzierbares System zur globalen Inhibition der AP-1-Aktivität durch den dominant-negativen Inhibitor A-Fos etabliert, was ebenfalls zu Wachstumsarrest und Zelltod führte.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch das Zusammenspiel von BATF, BATF3 und IRF4 in ALCL-Zellen TH17- und *type 3 innate lymphoid* (ILC3-)Zell-typische Gene aktiviert werden. Neben Zytokinen wie IL-17 und IL-22 wurde eine ALCL-spezifische Expression von RORC2 identifiziert, der als einer der Schlüsselfaktoren für die TH17-/ILC3-Zelldifferenzierung gilt. Die pharmakologische Inhibition von RORC2

sowohl alleinig als auch in Kombination mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib hemmte das Wachstum von ALCL-Zellen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit eine zentrale Bedeutung von BATF-Faktoren für die ALCL-Pathogenese beschreiben und die Möglichkeit aufzeigen, TH17/ILC3-assoziierte Gene als therapeutische Zielstruktur im ALCL zu nutzen.

## Abstract

Anaplastic large cell lymphoma (ALCL) belongs to the group of T-cell non-Hodgkin-lymphoma and has two systemic subtypes, the ALK-positive and ALK-negative ALCL. Whereas the first form has its incidental peak at a younger age and a better outcome, the ALK-negative afflicts mainly older patients and has a worse overall survival.

The hallmarks of ALCL cells are large, pleomorphic cells and the expression of the cell surface marker CD30. Belonging to the hematopoietic malignancies it is characterized by another feature of this group, a dysregulated network of transcription factors. So far, it was shown that ALCL has a constitutive activity of the transcription factor complex AP-1 and a high expression of the transcription factor IRF4, which is essential for growth and survival of ALCL. The aim of this work was to better-characterize the AP-1-complex and to identify the biological function of the AP-1-proteins BATF and BATF3.

Therefore, the expression pattern of both proteins were analyzed in ALCL-cell lines and patient-derived primary material. A distinct differential expression of both proteins could be validated as well as their participation in the DNA-binding at classical AP-1-binding sites. Furthermore, it was shown that in ALCL-unknown AP-1/IRF-composite elements are co-occupied by complexes of IRF4 and AP-1 comprised of BATF and BATF3 separating ALCL from other hematological malignancies.

To further characterize the biological function of BATF and BATF3 different technical approaches were used. Genomic deletion via CRISPR/Cas9 as well as gene-specific transient mRNA-interference lead to growth inhibition and cell death of ALCL-cells. In addition, global inhibition of the AP-1-activity showed a similar result. Furthermore, BATF and BATF3 drive a gene expression that resembles the gene signature of TH17- or type 3 innate lymphoid (ILC3) cells leading to the hypothesis that a fraction of ALCL might originate from ILC3. Pursuing this the expression of characteristic TH17-/ILC3-genes was shown in ALCL-cell lines and primary material including the expression of the key transcription factor of TH17-/ILC3-differentiation RORC2.

Finally, pharmacological inhibition of RORC2 using a small molecular inhibitor alone or in combination with the ALK-antagonist crizotinib lead to growth retardation of RORC2-expressing ALCL cells.

This work demonstrated the essential function of BATF and BATF3 for ALCL and its role for the establishment of newly detected ILC3-gene signature, which could be a hint for the origin of ALCL.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL)

### 1.1.1 Epidemiologie, Klassifikation und klinisches Bild

Das anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) gehört zu den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und wurde erstmals 1985 von Harald Stein und Kollegen beschrieben<sup>1</sup>. Gemessen an der Gesamtzahl aller Lymphome ist das ALCL eine seltene Entität mit 2 % aller NHL der Erwachsenen<sup>2</sup>, wobei es aber die drittgrößte Gruppe der T-Zell Non-Hodgkin-Lymphome (T-NHL) im Erwachsenenalter darstellt<sup>3</sup>. Bei Kindern stellt das ALCL mit 10-30 % aller Lymphome dagegen die größte Gruppe der T-NHL dar<sup>4,5</sup>.

Die charakteristischen Tumorzellen des ALCL besitzen ein großzelliges, pleomorphes Aussehen und exprimieren den Oberflächenmarker CD30<sup>6</sup>.

Gegenwärtig werden in der WHO-Klassifizierung lymphatischer Neoplasien drei ALCL-Entitäten aufgeführt, die alle zu den peripheren T-Zell-Lymphomen (PTCL) gezählt werden. Neben der kutanen Form des ALCL (*primary cutaneous ALCL*, C-ALCL) werden zwei systemische Formen des ALCL unterschieden, die durch die Expression oder fehlende Expression der *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) charakterisiert sind, ALK-positive (ALK+) und ALK-negative (ALK-) ALCL<sup>7</sup>. Ursächlich für die ALK-Expression in ALK+ ALCL ist typischerweise die für ALCL spezifische Translokation t(2:5)(p23;q35). Hierbei fusioniert das Nucleophosmin-kodierende *NPM*-Gen auf Chromosom 5q35 mit dem Gen für die Rezeptortyrosinkinase *ALK* auf Chromosom 2p23, was zu einer konstitutiven ALK Expression und damit ALK-Aktivität führt<sup>8</sup>. Während der ALK-Translokation im ALK+ ALCL eine zentrale Rolle in der Lymphomentstehung zugesprochen wird<sup>9</sup>, ist die Pathogenese des ALK- ALCL unklarer, auch wenn kürzlich publizierte Studien wichtige Hinweise zur Lymphomentstehung lieferten<sup>10-12</sup>.

Die Inzidenz des ALK+ ALCL hat einen Gipfel in jüngeren Jahren (Median 30 Jahre), da häufig bei Kindern die Diagnose eines ALK+ ALCL gestellt wird. Das ALK- ALCL dagegen hat ein Durchschnittsalter von 55 Jahren<sup>13</sup>. Die Mehrzahl der Patienten ist männlich und hat bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Stadium III oder IV. Das

systemische ALCL manifestiert sich häufig in Lymphknoten, tritt aber auch extranodal in Haut, Knochen, Leber, Milz oder Knochenmark auf<sup>14-16</sup>. Klinische Symptome sind vergrößerte Lymphknoten und häufig eine sogenannte B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust<sup>13,17</sup>. Zu den veränderten Laborparametern können eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH) -Wert sowie, insbesondere bei Knochenmarkbefall, eine Anämie und Thrombozytopenie gehören<sup>13</sup>.

Die durchschnittliche 3-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit der Diagnose eines ALK<sup>+</sup> ALCL beträgt 70-90 %, wohingegen das ALK<sup>-</sup> ALCL eine Überlebensrate von 40-60 % aufweist<sup>13-15,18</sup>. Damit besitzt das ALCL insgesamt eine relativ gute Prognose, wobei die bessere Überlebensrate der ALK<sup>+</sup> ALCL-Patienten unter anderem damit erklärt wird, dass ALK<sup>+</sup> ALCL Patienten insgesamt ein jüngeres Durchschnittsalter aufweisen. Für Patienten mit einem ALK<sup>+</sup> oder ALK<sup>-</sup> ALCL älter als 40 Jahre konnte kein relevanter Unterschied in der 5-Jahres-Überlebensrate gezeigt werden<sup>13</sup>. Im Vergleich zu der Gruppe der peripheren T-Zell-Lymphomen, die nicht weiter spezifiziert sind (*peripheral T-cell-lymphoma – not otherwise specified*, PTCL-NOS), besitzt das ALCL eine insgesamt bessere Prognose<sup>13</sup>. Risikofaktoren für eine schlechtere Überlebensrate sind unter anderem die Expression von CD56<sup>19</sup>, die Expression des epithelialen Membran Antigens MUC-1<sup>20</sup> oder erhöhte Spiegel des Tumornekrosefaktor (TNF) -Rezeptor-Familienmitglieds CD30 im Serum der Patienten<sup>21</sup>.

Des Weiteren konnten Untergruppen des ALCL identifiziert werden, deren Prognose sich deutlich unterscheidet. Es konnte gezeigt werden, dass die *DUSP-IRF4* Translokationen von Chromosom 6p25 mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von bis 90 % einhergehen, wohingegen die Überexpression von *TP63* eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 17 % hat<sup>22-24</sup>.

### 1.1.2 Therapie des ALCL

Die Therapie des ALCL besteht üblicherweise aus einer Polychemotherapie, nur ggf. in Kombination mit einer Strahlentherapie. In der Regel erhalten ALCL-Patienten mehrere Zyklen einer CHOP- (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) oder CHOEP- (zusätzliche Gabe von Etoposid) Chemotherapie<sup>25</sup>. Für Therapie-refraktäre Patienten oder Patienten mit einem ALCL-Rezidiv stellt die Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation eine alternative Behandlungsoption dar<sup>26,27</sup>. Derzeit werden zudem neue Therapien untersucht, die gezielt einzelne Moleküle oder

Signalwege der ALCL-Zelle angreifen. Insbesondere die Therapie mit Brentuximab Vedotin zeigt dabei sehr gute Ergebnisse. Brentuximab Vedotin ist ein gegen CD30 gerichteter Antikörper, der mit dem Zytostatikum Monomethylauristatin E konjugiert wurde und der aufgrund der sehr guten Therapieergebnisse in der ECHELON-2 Studie in Kombination mit einer modifizierten CHOP-Chemotherapie in den USA bereits in der Erstlinientherapie zugelassen ist<sup>28-32</sup>. Weitere vielversprechende Wirkstoffe zur Therapie des ALK+ ALCL sind die Klasse der ALK-Inhibitoren, die gegenwärtig auch in der Behandlung des ALK+ nicht-kleinzelligen Lungenzellkarzinoms verwendet werden<sup>33</sup>. Der ALK-Inhibitor Crizotinib zeigt dabei auch im ALK+ ALCL eine sehr hohe Ansprechrate<sup>34-36</sup>. Crizotinib kann das ALK+ ALCL anscheinend gut unter Kontrolle halten, aber die malignen Zellen nicht komplett eradizieren, da ALCL-Patienten nach Beenden der ALK-Inhibitortherapie rasch Rezidive bekommen haben<sup>37</sup>. Die Entwicklung weiterer neuer Therapieansätze für das ALCL ist somit wichtig, um zum einen das Therapieansprechen und damit die Prognose weiter zu verbessern und zum anderen Therapiestrategien zur Eradikation residueller Lymphomzellen zu entwickeln.

### 1.1.3 Zellulärer Ursprung des ALCL

Das ALCL wird in der aktuellen Lymphomklassifikation zu den T-NHL gezählt, da in einigen Fällen T-Zell-Rezeptor (TZR) -Umlagerungen nachgewiesen wurden<sup>38,39</sup>. Allerdings wird der TZR üblicherweise in ALCL-Zellen nicht exprimiert<sup>40,41</sup>. In transgenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von NPM-ALK unter der Kontrolle des CD4-Promotors rasch zu lymphoproliferativen Erkrankungen in den Mäusen führte<sup>42</sup>. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die TZR-Expression zwar für das Verlassen des Thymus von CD4-positiven (CD4+) T-Zellen notwendig ist, aber für die Lymphomentstehung durch NPM-ALK in der Peripherie herunterreguliert werden muss<sup>43</sup>. Ein weiteres Modell, in dem die NPM-ALK-Expression vom *Lck*-Promotor abhängig ist, entwickelte T-Zelllymphome, die CD30 exprimieren<sup>44</sup>. Zudem zeigen sowohl das ALK+ als auch das ALK- ALCL einen globalen Verlust vieler typischer T-Zell-Marker, wie CD3, CD5 oder CD7<sup>17,40,45,46</sup> und exprimieren teilweise auch linienfremde Marker wie EMA oder TIA-1, anhand derer das ALCL von PTCL-NOS oder dem klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) abgegrenzt werden kann<sup>47,48</sup>. Daher ist die Einordnung des ALCL innerhalb der T-Zell-Lymphome nicht abschließend untersucht

und die Klärung des zellulären Ursprungs des ALCL weiterhin Gegenstand der Forschung.

#### 1.1.4 Deregulierte Signalwege und Transkriptionsfaktoren (TF) in ALCL-Zellen

ALK<sup>+</sup> und ALK<sup>-</sup> ALCL-Zellen besitzen viele überlappende molekulare und histologische Besonderheiten. Obwohl beide ALCL-Entitäten hinsichtlich genomischer Aberrationen divergieren<sup>49</sup> und Gen- oder mRNA-Expressionsanalysen ALK<sup>+</sup> von ALK<sup>-</sup> ALCL anhand eines differentiellen Expressionsmusters unterscheiden konnten<sup>50-52</sup>, zeigten neuere Analysen, dass das Epigenom beider Entitäten durchaus eine hohe Übereinstimmung aufweist<sup>53</sup>. Hierzu passt, dass die Unterscheidung von ALK<sup>+</sup> und ALK<sup>-</sup> ALCL anhand des Genexpressionsprofils vor allem auf einer überschaubaren und durch ALK induzierten Gensignatur beruht<sup>50</sup>.

Das ALCL ist charakterisiert durch eine hohe Expression von CD30 (auch als Ki-1 oder TNFRSF8 bezeichnet)<sup>1</sup>, einem Transmembran-Rezeptor, der zu der Familie der TNF *receptor superfamily* (TNFRSF) gehört. Die Expression von CD30 ist typisch für das ALCL und das cHL<sup>54</sup>, das zwar meistens von B-Zellen abstammt, aber viele Ähnlichkeiten mit dem ALCL aufweist<sup>55</sup>. CD30 wird unter anderem durch JUNB reguliert<sup>56</sup> und aktiviert die NF-κB und MAPK Signalkaskade<sup>57</sup>. CD30 wird physiologisch nur von aktivierten B- und T-Lymphozyten exprimiert<sup>1</sup>, daher dient der histologische Nachweis von CD30 auf ALCL oder cHL-Tumorzellen in Verbindung mit anderen Markern, zum Beispiel ALK für das ALK<sup>+</sup> ALCL oder CD15 für das HL<sup>58</sup>, als diagnostischer Marker für diese Lymphome.

Neben der Expression von CD30 ist die NPM-ALK-Translokation charakteristisch für das ALK<sup>+</sup> ALCL<sup>8</sup>. Die durch die Translokation aktivierte Tyrosinkinase ALK beeinflusst durch ihre konstitutive Aktivität nachgeschaltete Signalwege und sichert Wachstum und Überleben der ALK<sup>+</sup> ALCL-Zellen. Das onkogene Potential von NPM-ALK konnte sowohl *in-vitro*<sup>59,60</sup> als auch *in-vivo* in NPM-ALK-transgenen Mäusen gezeigt werden<sup>42,61</sup>. NPM-ALK vermittelt seinen onkogenen Effekt neben der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/AKT-Signalkaskade durch Aktivierung der Janus Kinase (JAK) und *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3)-Signalwegs und zudem auch durch die Aktivierung des MYC-Protoonkogens und von *activator protein 1* (AP-1) Transkriptionsfaktoren (TF)<sup>62-65</sup>.

Der PI3K/AKT Signalweg aktiviert in ALCL-Zellen die Proteinkinase B und führt über die Aktivierung von dem *mammalian target of rapamycin* (mTOR) zu verstärkter Proliferation durch die Expression von Zyklin D2 und durch Herunterregulation von BCL2 und p27 zu verstärktem Überleben und Resistenz gegenüber Apoptose<sup>66,67</sup>. NPM-ALK aktiviert darüberhinaus auch direkt JAK/STAT3, einerseits durch Aktivierung von JAK3, andererseits durch konstitutive Phosphorylierung von STAT3, was zu einer erhöhten Transkription von STAT3-Zielgenen führt<sup>62</sup>. Dazu gehören unter anderem die anti-apoptotisch wirkenden Gene BCL2 und Survivin<sup>68,69</sup>. Interessanterweise wurden viele im ALK+ ALCL deregulierte und teilweise von NPM-ALK kontrollierte Transkriptionsfaktoren auch für das ALK- ALCL beschrieben. Für STAT3 konnte auch in ALK- ALCL-Fällen eine starke Aktivität gezeigt werden, die durch aktivierende Mutationen in *JAK1* oder *STAT3* zustande kommt<sup>10</sup>, sodass hier von einem komplementären Mechanismus zur fehlenden ALK-vermittelten Aktivierung ausgegangen werden muss.

Auch *interferon regulatory factor 4* (IRF4) ist sowohl im ALK+ als auch im ALK- ALCL stark exprimiert und essentiell für das Überleben von ALCL-Zellen<sup>70,71</sup>. Darüber hinaus wird MYC durch IRF4 aktiviert und ist ebenfalls nicht nur auf das ALK+ ALCL beschränkt<sup>70,72</sup>.

Des Weiteren konnte AP-1 unabhängig vom ALK Status in allen ALCL Fällen als konstitutiv aktiv gezeigt werden<sup>73-75</sup>. Da dieser Transkriptionskomplex in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, wird dessen Bedeutung für das ALCL nachfolgend ausführlich besprochen, nachdem zunächst eine Einführung in die Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren gegeben wird.

## 1.2 AP-1-Transkriptionsfaktoren

### 1.2.1 AP-1 TF-Familie, generelle Aspekte

Unter der Bezeichnung AP-1 wird eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen und als Homo- oder Heterodimere an spezifische DNA-Sequenzen binden<sup>76</sup>. Allen Proteinen dieser Gruppe ist dabei ein basisches Leucin-Zipper- (*basic leucine zipper*, bZIP) Motiv gemein, das sowohl die Dimerisierung über den Leucin-Zipper mit anderen bZIP-Proteinen als auch



die Bindung der DNA mit der basischen DNA-Bindungsdomäne ermöglicht<sup>77</sup>. AP-1-Dimere können dabei je nach ihrer Zusammensetzung mit unterschiedlicher Affinität an insbesondere zwei palindromische DNA-Sequenzen binden. Ein DNA-Bindungsmotiv ist unter dem Namen *TPA-responsive element* (TRE) bekannt und besteht aus der Basensequenz 5'-TGA(C/G)TCA-3'<sup>76</sup>. Das andere DNA-Bindungsmotiv besteht aus der Basensequenz 5'-TGACGTCA-3' und ist das *cyclic AMP-responsive element* (CRE)<sup>78</sup>. An welches Bindungsmotiv das jeweilige AP-1-Dimer präferentiell bindet, wird dabei vor allem aus der Zusammensetzung dieses Dimers bestimmt<sup>79</sup>. Diese können sich dabei aus den Mitgliedern der AP-1- und der *CRE binding* und *activating transcription factor* (CREB/ATF) -Proteinfamilien bilden, deren Vertreter oben erläuterte bZIP-Struktur aufweisen. Unter den AP-1-Faktoren sind die JUN-Familie, bestehend aus c-JUN, JUNB und JUND, und die FOS-Familie, bestehend aus c-FOS, FOSB, FRA-1, FRA-2, am besten untersucht<sup>80</sup>. Weitere mit diesen AP-1-Faktoren interagierende und an TRE oder CRE bindende Faktoren sind die ATF-Familie, die sich aus den ATF-Faktoren JDP-2 und BATF, BATF2 und BATF3 zusammensetzt, und die Familie der MAF-Proteine<sup>81</sup>. An die DNA bindende Homodimere können nur von JUN-Proteinen gebildet werden, alle anderen Faktoren bilden mit unterschiedlichen Bindungspartnern und DNA-Bindungspräferenzen Heterodimere<sup>82</sup>. So binden JUN/FOS-Heterodimere mit hoher Affinität an TRE-Sequenzen<sup>83,84</sup>, wohingegen die JUN/ATF-Komplexe eher an das CRE-Motiv binden<sup>85</sup>. Des Weiteren erkennen MAF Proteine erweiterte DNA Sequenzen, die *MAF recognition elements* (MARE) genannt werden<sup>86</sup>. MARE I (5'-TGC-TGA(C/G)TCA-GCA-3) ähnelt dabei der TRE-Sequenz und MARE II (5'-TGC-TGACGTCA-GCA-3) dem CRE-Motiv. Weitere Faktoren wie JAB1 (*JUN activation domain binding protein 1*) oder p202 können darüber hinaus mit AP-1 interagieren und dessen Aktivität positiv oder negativ beeinflussen<sup>80</sup>.

Da in dieser Arbeit zwei Mitglieder der ATF-Familie mit ihren Bindungspartnern aus der JUN-Familie untersucht wurden, soll im Folgenden auf diese beiden Proteingruppen näher eingegangen werden.

### 1.2.2 Struktur von JUN-, FOS- und BATF-Proteinen und Lokalisation ihrer kodierenden Gene

Die Struktur der verschiedenen AP-1-Familienmitglieder weist sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Wie schon besprochen, besitzen alle AP-

1-Faktoren eine bZIP-Domäne, die die Dimerisierung und die spezifische DNA-Bindungsaffinität ermöglicht. Der Leucin-Zipper wird dabei aus einer hydrophoben  $\alpha$ -Helix mit einem großen Leucin-Anteil gebildet, der sich über hydrophobe Wechselwirkungen mit einem anderen Leucin-Zipper zusammenlagern kann, was die Bildung einer Superhelix zur Folge hat. Die basischen DNA-Bindungsdomänen der beiden Proteine nehmen nicht an dieser Verwindung teil, sondern ermöglichen durch ihre Gabelstellung und die Aminosäuren Asparagin, Cystein und Arginin die Bindung an die DNA<sup>77</sup>. Diese bZIP-Domäne ist in allen AP-1-Mitgliedern konserviert. Die Unterschiede bestehen in den anderen Domänen, die für die Transaktivierung von Bedeutung sind und daher Transaktivierungsdomänen genannt werden.

Die JUN-Familie besteht aus Proteinen mit einer Länge von 331 Aminosäuren (AS) (c-JUN, kodierender Genlocus 1p32.1) oder 347 AS (JUNB, Genlocus 19p13.13 sowie JUND, Genlocus 19p13.11). Neben der am C-Terminus gelegenen bZIP-Domäne besitzen diese Proteine noch drei weitere Transaktivierungsdomänen in Richtung des N-Terminus<sup>87,88</sup>. Die FOS-Familie hat zwar von der Anzahl der AS (c-FOS: 380 AS, Genlocus 14q24.3; FOSB: 338 AS, Genlocus 19q13.32; FRA-1: 271 AS, Genlocus 11q13.1 und FRA-2: 326 AS, Genlocus 2p23.2) Ähnlichkeiten zur JUN-Familie, eine Transaktivierungsdomäne besitzen aber nur c-FOS und FOSB, nicht aber FRA-1 und FRA-2, und diese ist von der bZIP-Domäne aus in Richtung des C-Terminus gelegen<sup>89</sup>. Von der ATF-Familie wird in dieser Arbeit nur die BATF-Untergruppe behandelt, weswegen im Folgenden nur diese besprochen wird. BATF2 besitzt von seiner Struktur her eine Ähnlichkeit zu den FOS-Proteinen. Mit einer Länge von 274 AS (Genlocus 11q13.1), einer in Richtung des N-Terminus gelegenen bZIP-Domäne und einer zusätzlichen, am C-Terminus gelegenen, bisher nicht näher bestimmten Domäne ähnelt es den FOS-Faktoren<sup>90</sup>. BATF und BATF3 dagegen unterscheiden sich von allen bisher besprochenen Proteinen, da sie mit einer Länge von 125 AS (Genlocus 14q24.3) und 127 AS (Genlocus 1q32.3) (BATF3) deutlich kürzer sind und auch keine Transaktivierungsdomäne besitzen<sup>91</sup>.

### 1.2.3 Regulation und Funktion von AP-1

Die Regulation von AP-1-Faktoren ist komplex und wird durch eine Vielzahl an Mechanismen ermöglicht. Auf mRNA-Ebene wird dies durch die Translation der *JUN*-, *FOS*- und *ATF*-Gene und die Stabilität der mRNA erreicht<sup>92</sup>. *JUN* zeigt dabei über AP-

1-Bindungsstellen im Promotorbereich eine positive Eigenregulation<sup>93</sup>. Auf Proteinebene besitzen die Syntheserate und der Abbau der einzelnen Proteine, der sog. Turn-Over, einen großen Einfluss auf die AP-1-Funktion. Für JUNB konnte beispielsweise gezeigt werden, dass NPM-ALK die Transkription der *JUNB* mRNA erhöht<sup>63</sup>. Zudem können posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen verschiedener Serin- und Threonin-AS die Aktivität von cJUN verändern<sup>94,95</sup>. Dabei ist für die Funktion entscheidend, an welcher Stelle die Phosphorylierung stattfindet: Kommt es zu N-terminalen Phosphorylierungen, werden Zielgene induziert<sup>96</sup>, wohingegen die C-terminalen Phosphorylierungen einen proteasomalen Abbau von cJUN zur Folge hat<sup>97</sup>.

Weiterhin werden JUN Proteine durch bestimmte Kinasen, die cJUN N-terminalen Kinasen (JNK: JNK1, JNK2 und JNK3), N-terminal phosphoryliert und damit aktiviert<sup>92,98</sup>. JNKs gehören zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) und werden durch extrazelluläre Stimuli, wie zum Beispiel Zytokine, Neurotransmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren, oder physikalischen und chemischen Stress aktiviert. Danach translozieren sie in den Zellkern und können dort JUNs phosphorylieren<sup>81</sup>.

Die FOS-Familie wird hauptsächlich über die *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK) MAPK-Kaskade reguliert. Nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine translozieren die ERKs in den Nukleus und können dort *ternary complex factors* (TCFs) phosphorylieren, die nach dieser Aktivierung an *FOS* Promotoren binden können<sup>99,100</sup>. FRA-1 und FRA-2 hingegen werden direkt durch ERKs phosphoryliert. Auch die Expression von *cJUN* wird durch ERKs positiv beeinflusst.<sup>82</sup>

Zuletzt kann das Verhältnis der verschiedenen AP-1-Faktoren und die Interaktion mit anderen Co-Faktoren die Aktivität und die funktionellen Eigenschaften des AP-1-Komplex beeinflussen<sup>81</sup>.

#### 1.2.4 Bedeutung von AP-1 für Wachstum, Zelltod und maligne Transformation

AP-1 ist in viele zelluläre Prozesse involviert und besitzt vor allem einen Einfluss auf Wachstum und Zelltodregulation verschiedener Zelltypen<sup>80</sup>. In diesem Zusammenhang wurde AP-1 in Bezug auf Entzündung, Wundheilung und zellulärer Migration beschrieben<sup>81,101,102</sup>.

#### 1.2.4.1 Einfluss von AP-1 auf zelluläres Wachstum

Studien in Fibroblasten und Hepatozyten konnten einen wichtigen Einfluss von JUN- und FOS-Proteinen auf die Proliferation zeigen<sup>103</sup>, dabei besitzen die unterschiedlichen FOS-Proteine anscheinend einen zumindest teilweise redundanten Effekt<sup>104</sup>, da nur der gemeinsame knock-out von cFOS und FOSB eine verminderte Proliferationsrate zur Folge hatte<sup>105</sup>. Die Funktion der JUN-Mitglieder auf den Zellzyklus und damit auf die Proliferation ist komplex. Anfangs wurde cJUN als positiver Regulator des Zellzyklus beschrieben<sup>106,107</sup>, wohingegen JUNB und JUND die Proliferation von Fibroblasten hemmten<sup>108,109</sup>. Doch neuere Studien konnten zeigen, dass auch JUNB und JUND die Proliferation in einem positiven Sinne beeinflussen können<sup>73,109,110</sup>.

Die Kontrolle der Proliferation wird zum Teil dadurch erreicht, dass AP-1-Heterodimere aus c-JUN und FOS direkt an den *ZyklusD1*-Promotor binden und diesen aktivieren<sup>111</sup>. Zyklus D1 ist notwendig, um die Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase zu bringen<sup>112</sup>. Auch der Tumorsuppressor p53 wird durch AP-1 beeinflusst, da c-JUN ein direkter Repressor des *p53* Gens ist und zudem dessen Funktion, die Aktivierung von *p21<sup>Cip1</sup>*, auch in direkter Weise hemmt<sup>106,113</sup>. P21Cip1 ist ein Inhibitor der Zyklus-abhängigen Kinase (*cyclin-dependent kinase*, CDK), der für die antiproliferative Funktion von p53 verantwortlich ist<sup>114</sup>.

Für JUNB konnte dagegen gezeigt werden, dass es am *ZyklusD1*-Promotor als Repressor wirkt und p16INK4a aktiviert<sup>108,111</sup>, einen weiteren CDK-Inhibitor, der die Phosphorylierung von Rb verhindert und so den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase stört. Außerdem führte der Verlust von JUNB in Mäusen zu einer myeloproliferativen Erkrankung, die zu einer Blastenkrise führen kann<sup>115</sup>. Diese Daten haben anfangs eine inhibitorische Funktion von JUNB nahe gelegt, vor allem als Antagonist der Funktion von cJUN.

Weitere Studien konnten jedoch auch aktivierende Effekte von JUNB beschreiben: Zum einen kann JUNB Zyklus A aktivieren und damit die Wachstumsrate verstärken<sup>116</sup>, zum anderen kann JUNB die Effekte eines cJUN Verlustes in Mäusen aufheben und erlaubt damit eine normale Entwicklung und führt nicht zu Herz- oder Leberentwicklungsstörungen<sup>117</sup>. Zusammengefasst kann JUNB zelltyp- und differenzierungsabhängig sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken.

Zum letzten Vertreter der JUN-Familie, JUND, gibt es in der Literatur verschiedene Angaben. Einerseits zeigen immortalisierte Zellen, in denen JUND ausgeschaltet ist,

eine erhöhte Proliferation, andererseits aber wachsen primäre Fibroblasten mit einem Verlust von JUND langsamer<sup>109</sup>. Welche Rolle JUND in der Kontrolle der Proliferation und des Zellzyklus genau besitzt, kann daher noch nicht abschließend gesagt werden. JUND-vermittelte Effekte scheinen dabei aber Zelltyp-abhängig zu sein.

#### 1.2.4.2 Einfluss von AP-1 auf programmierten Zelltod

AP-1-Faktoren sind auch in die Regulation vom programmierten Zelltod (Apoptose) involviert. Hinweise hierauf lieferte der Nachweis von c-JUN- und c-FOS-Induktion in apoptotischen Neuronen des Hippocampus<sup>118</sup> und nach Einwirken von genotoxischem Stress wie UV-Bestrahlung oder alkylierende Substanzen auf HeLa S3-Zellen<sup>119,120</sup>. Auch in bestimmten, Apoptose-dominanten Entwicklungsstadien, wie der Involution der Mamma oder der Prostata nach Kastration, wurden hohe Expressionslevel von AP-1-Faktoren gefunden<sup>121,122</sup>. Weiterhin haben *in-vitro* Experimente mittels Überexpression oder Inhibition von AP-1 in verschiedenen Zelllinien gezeigt, dass AP-1 Faktoren Apoptose-induzierend wirken können<sup>123,124</sup>. In c-FOS-defizienten Mäusen wurde demonstriert, dass die durch Licht induzierte Apoptose der Retina beeinträchtigt ist<sup>125</sup>. Dies kann dadurch erklärt werden, dass AP-1 bestehend aus c-JUN nach Induktion durch JNK mehrere proapoptotisch wirkende Ziele aktiviert. Dazu gehören neben dem Fas-Liganden (FasL) und TNF- $\alpha$ <sup>126-128</sup> auch BIM, einem Mitglied der Bcl2-Familie<sup>129</sup>. Des Weiteren wird in Lebertumoren TP53 durch c-JUN reprimiert, was zu einer abgeschwächten p53 Expression und verminderter Apoptoserate führt<sup>130</sup>. Dagegen konnten andere Studien einen hemmenden Effekt auf die Apoptose nachweisen. Hepatozyten von c-Jun-defizienten Mäusen zeigen eine massive Apoptoserate<sup>131</sup>, ebenso wie der doppelte knock-out von Jnk1 und Jnk2 in bestimmten Hirnarealen eine erhöhte aber in anderen auch eine reduzierte Apoptoserate aufweist<sup>132</sup>. In T-Zellen können JUN Proteine *Bcl3* induzieren, das als Überlebensfaktor für T-Zellen unter Wachstumsfaktorentzug dient<sup>133</sup>.

Zusammenfassend ist die Rolle von AP-1 in Bezug auf die Proliferation und das Überleben von Zellen je nach Zelltyp und Differenzierungsstatus verschieden. In einem ersten Erklärungsmodell induziert AP-1 Zielgene, die entweder das Überleben und Wachstum stärken oder hemmen. Dabei gibt das Verhältnis der unterschiedlichen AP-1 Faktoren und das der induzierten Zielgene je nach Zelltyp das Signal zur Proliferation

oder Zelltod. Ein zweites Modell versucht die Funktion von AP-1 in Bezug auf Wachstum und Apoptose damit zu erklären, dass AP-1 je nach Zellkontext seine Wirkung entfaltet: In geschädigten Zellen, die sich nicht mehr teilen können, führt die AP-1 Aktivität zum schnellen Zelltod, wohingegen in proliferationsfähigen Zellen AP-1 das Wachstum stärkt.<sup>134</sup>

#### 1.2.4.3 AP-1 in der malignen Transformation

Zusätzlich zum Einfluss auf die Proliferation und Apoptose wurden Effekte von AP-1 auf die Differenzierung und maligne Transformation von Zellen beschrieben. Sowohl JUN als auch FOS wurden zuerst als virale Onkoproteine v-Jun und v-Fos im *avian sarkoma virus* 17 identifiziert<sup>135</sup>. Daher ist es nicht verwunderlich, dass den AP-1-Faktoren schon früh auch eine Rolle in Malignomen zugeschrieben wurde. In der Tat konnte gezeigt werden, dass AP-1 eine Rolle sowohl im Tumorwachstum als auch in Invasion, Metastasierung sowie der Angiogenese spielt und zudem von zahlreichen Onkogenen induziert wird. Auf der anderen Seite wurde verschiedenen AP-1 Faktoren auch eine Funktion als Tumorsuppressor nachgewiesen.<sup>82</sup> Im Folgenden soll kurz auf die Rolle der Hauptmitglieder der beiden großen AP-1 Familien eingegangen werden:

Eine Amplifikation von *cJUN* wurde in einer Untergruppe von aggressiven Sarkomen gefunden<sup>136</sup>. Auch im cHL und im ALCL wurde eine starke Expression von c-JUN und JUNB entdeckt<sup>73</sup>. In Tumoren der Haut scheint c-JUN eine wichtige Rolle für das Fortschreiten der malignen Erkrankung, nicht aber für den ersten Schritt der Transformation zu besitzen<sup>102,137,138</sup>. Im hepatozellulären Karzinom bewahrt c-JUN die Zellen vor der TNF- $\alpha$ -abhängigen Apoptose<sup>130</sup>. Auch in Tumoren des Intestinaltraktes konnte c-JUN eine Rolle zugeschrieben werden<sup>139</sup>. Sowohl c-JUN als auch JUNB können beide *in-vitro* die Angiogenese von Fibrosarkomazellen mittels der Expression von Proliferin verstärken<sup>140,141</sup>.

Eine starke Expression von JUNB wurde in der Lymphomatoiden Papulose und in kutanen Lymphomen entdeckt<sup>110,142</sup>. Aber für JUNB konnte auch eine Tumorsuppressive Wirkung beschrieben werden, da JunB-defiziente Mäuse eine myeloproliferative Erkrankung entwickeln, die bis zur Blastenkrise führen kann<sup>115</sup>. Zudem ist JUNB in den hämatopoietischen Stammzellen von Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) herunterreguliert<sup>143</sup>.

Auch für c-Fos wurde eine transformierende Wirkung beschrieben. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse mit einer Überexpression von cFos vermehrt Osteosarkome aufweisen<sup>144,145</sup>. Auch die Überexpression von Fra-1 oder Fra-2 führte zu Lungentumoren in transgenen Mäusen<sup>146</sup>. Des Weiteren stehen einige Gene, die für die Metastasierung und Angiogenese wichtig sind, unter der Kontrolle von cFOS und FRA-1. Die Matrixmetalloproteasen MMP1 und MMP3 sind hierfür Beispiele ebenso wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGFD<sup>147,148</sup>.

Ein weitere wichtige Voraussetzung für Invasion und Metastasierung von Tumoren ist die Fähigkeit zur Migration, die dadurch erreicht wird, dass Epithelzellen ihre Polarität verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen<sup>149</sup>. Auch dieser als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bekannte Vorgang steht unter der Regulation von AP-1, da sowohl c-JUN als auch c-FOS diesen induzieren können<sup>150,151</sup>. Dabei ist aber anzumerken, dass c-FOS wahrscheinlich wichtiger für die späten Stadien der Tumorgenese ist, da *in-vitro* nur die Überexpression von c-FOS invasives Wachstum hervorruft<sup>150</sup>.

Andererseits kann c-FOS aber auch als Tumorsuppressor wirken. In p53-defizienten Mäusen ermöglicht erst die Deletion von c-Fos die Ausbildung von Rhabdomyosarkomen<sup>152</sup>.

Zusammenfassend können einzelne AP-1-Faktoren und in Folge die gesamte AP-1-Aktivität je nach Zelltyp, Tumorentität und Differenzierungsgrad sowohl onkogen als auch tumorsuppressiv wirken. Dabei muss immer der genetische Hintergrund und die Expression weiterer, für eine Transformation wichtige Proteine berücksichtigt werden.

## **1.3 BATF und BATF3**

### **1.3.1 Expression von BATF und BATF3**

BATF und BATF3 werden anders als das dritte Mitglied dieser Familie, BATF2<sup>90</sup>, hauptsächlich in hämatopoietischen Zellen exprimiert<sup>153,154</sup>. Nach der initialen Beschreibung von BATF im Jahr 1995 in mit Epstein-Barr-Virus (EBV) infizierten B-Zellen<sup>155</sup>, wurde es nicht nur in B- sondern auch T-Zell-Subtypen und in hämatopoietischen Stammzellen nachgewiesen<sup>154,156,157</sup>. Dabei kommt BATF vor allem in der Differenzierung von T-Helferzellen (TH) vom Typ 17 (TH17) eine zentrale Bedeutung zu, da ohne diesen Faktor eine Ausreifung von T-Zellen zu TH17-Zellen

nicht möglich ist. In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass der knock-out (KO) von BATF zu einem völligen Fehlen von TH17-Zellen führt. Auch waren diese Mäuse gegen die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine auf TH17-Zellen basierende Autoimmunerkrankung, resistent<sup>158</sup>. Andere Zellen, auf die eine fehlende BATF-Expression einen Einfluss hat, sind die TH1-, TH2- und TH9-Zellen, sowie folliculäre T- ( $T_{FH}$ )-, und stimulierte CD8+-Zellen<sup>159-162</sup>.

BATF3 wurde das erste Mal im Jahr 2000 als transkriptioneller Inhibitor beschrieben<sup>163</sup>. Seitdem wurde es in TH1, TH2 und TH17-Zellen nachgewiesen, aber, verglichen mit BATF, in einem deutlich geringeren Expressionslevel<sup>153</sup>. In dendritischen Zellen dagegen ist BATF3 stärker als BATF exprimiert<sup>153</sup>. Dabei hat sich gezeigt, dass die Expression mit zunehmendem Reifungsstatus der Zellen zunimmt<sup>164</sup>. Wie diese beiden Faktoren selbst reguliert sind und wie sie die Zelldifferenzierung beeinflussen können, wird in den folgenden Abschnitten besprochen.

### 1.3.2 Regulation der Aktivität von BATF und BATF3

Die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren ist komplex. Sie wird auf mRNA-Ebene durch die enge Kontrolle der Translation und der mRNA-Stabilität, der post-translationalen Modifizierung und der Verfügbarkeit von Bindungspartnern oder Inhibitoren erreicht. Für BATF konnte gezeigt werden, dass die Expression entweder STAT3- oder STAT6-abhängig induziert wird<sup>165</sup>. In hämatopoietischen Stammzellen wurde nachgewiesen, dass BATF durch den *granulocyte-colony stimulation factor* (G-CSF) induziert werden kann<sup>157</sup>. Auch weitere Zytokine, Interleukin (IL)-6 und IL-4 zusammen mit *transforming growth factor*- ( $TGF$ -) $\beta$  und *leukaemia inhibiting factor* (LIF), konnten die Expression von BATF induzieren<sup>165,166</sup>. In naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte auch IL-1 die Expression von BATF erhöhen und in CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird ein solcher Effekt durch IL-12 und die Zugabe von anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern erreicht<sup>167,168</sup>. In B-Zellen induziert IL-4 die *BATF*-mRNA Expression, während die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) diese Expression verstärkt<sup>159</sup>.

Als posttranslationale Modifikationen von BATF sind die Phosphorylierungen bestimmter Serine, Threonine und Tyrosine bekannt. Bedeutungsvoll sind hierbei die AS Serin 43 (S43) und Threonin 48 (T48) des BATF-Proteins, welche in der DNA-Bindungsdomäne liegen. Die Phosphorylierung von S43 führt zu einem Verlust der



DNA-Bindungskapazität bei erhaltener Dimerisierung mit JUN-Proteinen und stellt einen Mechanismus der Regulation von BATF dar<sup>169</sup>.

Die Regulation von BATF3 muss in zukünftigen Studien analysiert werden.

### 1.3.3 Funktionelle Charakterisierung von BATF und BATF3

BATF und BATF3 wurden nach ihrer Entdeckung zuerst als Inhibitoren von AP-1 beschrieben, da gezeigt werden konnte, dass sie zwar wie FOS-Proteine mit JUN dimerisieren können, aber durch ihre fehlende Transaktivierungsdomäne anders als JUN/FOS-Dimere die AP-1-Aktivität negativ beeinflussen<sup>163,170</sup>.

#### 1.3.3.1 Korrelation von AP-1 und IRF-4

Da dieses Modell aber die vielen Auswirkungen eines BATF- oder BATF3-KO auf verschiedene T-Zellpopulationen nicht erklärte<sup>153,158</sup>, konnte daraufhin in nachfolgenden Arbeiten eine positive Beeinflussung der Transkription gezeigt werden<sup>171-174</sup>. Diese wird dadurch erreicht, dass Komplexe aus JUN/BATF oder JUN/BATF3 den Transkriptionsfaktor *interferon regulatory factor 4* (IRF4) an die DNA rekrutieren<sup>172,173</sup>. Diese AP-1/IRF4-Komplexe können spezifische DNA-Sequenzen binden und aktivieren, die sich aus der AP-1- (s.o.) und der IRF-Bindungssequenz (5'-GAAA-3') zusammensetzen und als *AP-1/IRF4-composite elements* (AICE) bezeichnet werden<sup>173</sup>. Dabei kann die IRF-Bindungsstelle entweder direkt der AP-1-Sequenz folgen (5'-GAAATGA(C/G)TCA-3') oder aber in einem Abstand von vier Basenpaaren zum AP-1-Bindungsmotiv (5'-GAAAnnnnTGA(C/G)TCA-3')<sup>172-174</sup>. Der Mechanismus der DNA-Bindung ist dabei ähnlich wie bei anderen *composite*-Komplexen, die IRF4 eingehen kann. IRF4, das selbst nur eine schwache DNA-Bindungsaffinität besitzt, ist dabei auf die Präsenz von PU.1 oder SpiB an der DNA angewiesen, um an spezifische Bindungsmotive, die sogenannten *ETS/IRF4-composite elements* (EICE), binden zu können<sup>175,176</sup>. Für die Bindung an AICEs sind BATF oder BATF3 zwingend notwendig, da ein Komplex aus JUN- und FOS-Proteinen nicht mit IRF4 interagieren kann<sup>173</sup>. Diese kooperative Aktivität kann nun eine positive transkriptionelle Aktivität von BATF und BATF3 erklären.

### 1.3.3.2 Funktion BATF und BATF3 in T- und B-Zellen

Die Ausreifung zu TH17-Zellen ist sowohl von Zytokinstimulation als auch von der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren abhängig. Wie bereits im Kapitel 1.3.1 beschrieben, zeigen BATF-knock-out (KO) Mäuse einen Fehlen der TH17-Zellen<sup>158,159</sup>. Dabei konnten weiterführende Studien zeigen, dass die Expression der Zytokine IL-6 und TGF- $\beta$ , die die TH17-Differenzierung induzieren, zwar nicht unter der Kontrolle von BATF stehen<sup>153</sup>, wohl aber die TH17-spezifischen Gene für die Aufrechterhaltung des TH17-Programms. So konnte nachgewiesen werden, dass ohne BATF die Expression des Schlüsselfaktors für die TH17-Differenzierung, ROR $\gamma$ t<sup>177</sup>, nach anfänglicher normaler Aktivierung nicht aufrechterhalten werden konnte<sup>149</sup>. Auch die Expression TH17-charakteristischer Zytokine ist von BATF abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass BATF an regulatorische Elemente der Gene *IL17A*, *IL17F*, *IL21*, *IL22* und *IL10* bindet<sup>158,174</sup>. Zudem ist die Expression des Rezeptors für IL-23 (IL-23R), einem weiteren TH17-charakteristischen Gen<sup>171</sup>, von BATF anhängig<sup>159</sup>. Interessanterweise konnte die retrovirale Expression von ROR $\gamma$ t in BATF-KO Mäusen die Expression dieser Zytokine nicht vollständig wiederherstellen, weshalb ein synergistischer Effekt dieser beiden Transkriptionsfaktoren auf die TH17-Zielgene angenommen wird<sup>158</sup>. Des Weiteren konnte eine zumindest teilweise Redundanz von BATF und BATF3 in TH17-Zellen identifiziert werden, da die retrovirale Expression von BATF3 in BATF<sup>-/-</sup> T-Zellen die IL-17 Produktion wiederherstellen konnte<sup>172</sup>.

Obwohl BATF und BATF3 auch in anderen TH-Zelltypen exprimiert wird, zeigt nur der KO von BATF einen Einfluss auf die Differenzierung der TH-Zellreihe. BATF3 dagegen scheint in anderen Untergruppen der T-Zellreihe eine kritische Funktion zu übernehmen<sup>153</sup>. In TH1-Zellen zeigte der KO von BATF einzeln oder in Kombination mit BATF3 keinen Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation oder Interferon- $\gamma$ - (INF $\gamma$ -) Produktion dieser Zellen<sup>172</sup>.

Für den Einfluss von BATF auf die Differenzierung zu TH2-Zellen gibt es gegensätzliche Veröffentlichungen. BATF-KO Mäuse hatten in einer Studie eine normale Entwicklung der TH2-Zellen<sup>160</sup>. In einem anderen Modell konnte eine Differenzierungsblockade festgestellt werden, was aber möglicherweise auf den genetischen Hintergrund der Mäuse zurückzuführen ist<sup>159</sup>. Interessanterweise zeigen Mäuse mit einem Doppel-KO von BATF und BATF3 eine verminderte Produktion von IL-4 und IL-10 der TH2-Zellen<sup>172</sup>. Auch für TH9-Zellen konnte eine Abhängigkeit von

BATF gezeigt werden, da die TH9-Differenzierung in  $BATF^{-/-}$   $CD4^{+}$ -Zellen stark beeinträchtigt war<sup>161</sup>.

Zudem spielt BATF eine wichtige Rolle in der Funktion von B-Zellen, da in immunisierten  $BATF^{-/-}$  Mäusen keine Keimzentren mehr entstehen. Dies kommt einerseits durch einen Defekt in  $T_{FH}$ -Zellen zustande, da gezeigt werden konnte, dass BATF eine direkte Wirkung auf BCL-6, cMAF und IL-4 besitzt, so dass  $BATF^{-/-}$  Mäuse einen Mangel an  $CXCR5^{+}$   $T_{FH}$ -Zellen haben<sup>160</sup>. Andererseits ist die Expression von *activation-induced cytidine deaminase* (AID), dem Enzym, das essentiell für den Isotypen-Klassenwechsel in B-Zellen ist, in  $BATF^{-/-}$  Mäusen stark reduziert<sup>159,160</sup>.

Für BATF3 konnte eine wichtige Funktion in der Entwicklung von  $CD8\alpha^{+}$  dendritischen Zellen gezeigt werden, da  $BATF3^{-/-}$  Mäuse einen Mangel an  $CD8\alpha^{+}$ -Zellen und eine Anfälligkeit für verschiedenen Viruskrankheiten aufweisen<sup>153,164</sup>.

Zusammengefasst haben BATF und BATF3 eine große Relevanz sowohl für Differenzierung als auch Funktion verschiedener Zellen der T- und B-Zell-Untergruppen<sup>91</sup>.

### 1.3.3.3 BATF und BATF3 in malignen Lymphomen

Eine Expression von BATF oder BATF3 wurde auch in verschiedenen malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems entdeckt. Eine hohe Expression von BATF3 konnte in Hodgkin-Reed-Sternberg (HRS) Zellen und in Zellen des primären mediastinalen B-Zell-Lymphoms (PMBL) gezeigt werden<sup>178-180</sup>. Veränderte Expressionslevel von BATF wurden in Patienten mit einer Zweitneoplasie nach der Diagnose eines Hodgkin-Lymphoms identifiziert<sup>181</sup>. Zudem konnte in einem transgenen Mausmodell nachgewiesen werden, dass die Überexpression von BATF zu einer lymphoproliferativen Erkrankung führt<sup>182</sup>. Ein weiteres Modell, beruhend auf Transplantation von retroviral modifizierten B-Zellen, konnte zeigen, dass die ektopische Expression von BATF3 zu B-Zell-Lymphomen führt<sup>183</sup>.

Auch im ALCL konnte eine erhöhte Expression von BATF3 identifiziert werden<sup>55,178,184</sup>. Weiterhin beschreibt eine kürzlich erschienene Studie im cHL und ALCL eine onkogene Achse aus STAT3-BATF3-MYC, die entscheidend die Proliferation und das Überleben der Zellen beeinflusst<sup>185</sup>.

## **1.4 Zielstellung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollen die Transkriptionsfaktoren BATF und BATF3 im ALCL näher charakterisiert werden. Dafür wird im ersten Teil dieser Arbeit die Expression der beiden Proteine im ALCL in Zelllinien und primären Material von ALCL-Patienten zu anderen Lymphomen verglichen.

Im nächsten Schritt sollen beide Faktoren hinsichtlich ihrer Funktion und Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren untersucht werden, um in der Folge die Bedeutung von BATFs für die Biologie von ALCL-Zellen zu klären. Dafür werden verschiedene Modelle zum Aus- bzw. Abschalten der Expression von BATF und BATF3 etabliert. Diese Analysen sollen klären, ob diese beiden Proteine eine Rolle im Wachstum und Überleben von ALCL-Zellen sind.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob BATFs bestimmte Zielgene aktivieren, um stromabwärts gelegene Signalwege identifizieren zu können. Diese Zielgene könnten dann auch Hinweise auf den bisher nicht geklärten Ursprung des ALCL geben.

Abschließend soll geklärt werden, ob diese Erkenntnisse eine Bedeutung für die Therapie des ALCL haben könnten, indem durch Manipulation dieser aktivierten Zielgene und Signalwege neue Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie beschrieben werden können.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
Karpas-299 (K299)	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>+</sup>	Fischer P, Blood (1988)
SU-DHL-1	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>+</sup>	Epstein AL, Cancer (1974)
DEL	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>+</sup>	Barbey S, Int. J. Cancer (1990)
JB6	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>+</sup>	Kadin ME, Blood (1990)
FE-PD	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>-</sup>	Del Mistro A, Leukemia (1994)
Mac-1	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>-</sup>	Kadin ME, Lab. Invest. (1988)
Mac-2A	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>-</sup>	Su IJ. Am, J. Pathol. (1989)
DL40	Anaplastisch großzelliges Lymphom, ALK <sup>-</sup>	Kubonishi I, Cancer Res. (1990)
Jurkat	Akute T-lymphoblastische Leukämie	Schneider U, Int. J. Cancer (1977)
KE-37	Akute T-lymphoblastische Leukämie	Burger R, Leuk. Res. (1999)
Molt-14	Akute T-lymphoblastische Leukämie	Drexler HG, Haematol Oncol (1989)
H9	Kutanes T-Zell-Lymphom (Sézary)	Mann DL, AIDS (1989)
HEK293	Transformierte humane embryonale Nierenzelllinie	Grakam FL, J. Gen. Virol. (1977)
HEK293T/17	HEK293-Zellen, die das <i>simian virus 40 large tumor antigen</i> exprimieren	Pear WS, PNAS (1993)

#### 2.1.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
E. coli XL1 blue	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.3 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Acrylamid 40 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#A515.1
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	#840004
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma, St. Louis, MO, USA	#9434
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#9592.2
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#K029.2
Bacto™ Trypton	Difco/BD, Sparks, MD, USA	#211705
β-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA	#M6250
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, MO, USA	#3803
Cholorquin	Sigma, St. Louis, MO, USA	#C6628
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz	# 11836153001
Cresol Rot natrium Salz	Sigma, St. Louis, MO, USA	#114480
Crizotinib	Pfizer, New York City, NY, USA	# PF-02341066
Disuccinimidyl Glutarat		
DMEM high glucose	Gibco BRL, Billings, MT, USA	# 11960-085
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#6908.2
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#8040.2
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#3054.2
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, MO, USA	#E1510
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#9065.1
Ficoll	Sigma, St. Louis, MO, USA	#F5415
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland	#S0115, Lot: 1247B
Formaldehyd	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#10321714
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#SM0310
GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder	Fermentas/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#SM0321
Glycerol	GE Healthcare, Chicago, IL, USA	#17132501
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#3908.3
GSK805	Merck Millipore, Burlington, MA, USA	#531369
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#6763
Hygromycin B	Sigma, St. Louis, MO, USA	# H3274-1G
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#6752.1
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#6781.1
Magnesiumchlorid	Sigma, St. Louis, MO, USA	#M-3634
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#8388.1
Microscint™-0	PerkinElmer, Waltham, MA, USA	#6031611
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#P-1147

Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#8563.2
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#3957.2
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#4088.2
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#2618
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#8655
Natriumpyruvat 100x	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	#11360-039
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis, MO, USA	#S6508
NP40	Calbiochem, La Jolla, CA, USA	#492016
Optimem	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	#31985070
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#26619
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	#10010-023
Penicillin-Streptomycin 100 x	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	#15140-122
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#32106
poly[d(I-C)]	Roche, Mannheim, Deutschland	# 10108812001
Ponceau-S	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#5938.1
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis, MO, USA	#P-4270
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare, Chicago, IL, USA	#17-0780-01
Protein-Assay (Bradford Reagenz)	BioRad, München, Deutschland	#500-0006
Proteinase K	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#7528.4
RPMI-1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	#31870-025
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#CN30.3
SR1903	Patrick Griffin Labor, Scripps Research Institute, FL, USA	
SR2211	Patrick Griffin Labor, Scripps Research Institute, FL, USA	
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#UN-2372
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#5429.2
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, USA	#T8787
Trypanblau	Sigma, St. Louis, MO, USA	#T6146
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland	#9127.1

#### 2.1.4 Radioaktive Substanzen

Substanz	Hersteller	Katalognummer
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	NEN, Boston, MA, USA	#NEG-513
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	NEN, Boston, MA, USA	#NET-027

## 2.1.5 Puffer

Name	Zusammensetzung
10x Shift Hybridisierungspuffer	0.5 M Tris HCl pH 8.0, 0.7 M NaCl
4x Laemmlipuffer	200 mM Tris-HCl pH 6.8, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.22 % Bromphenolblau
Gibson Assembly Reaktionspuffer	0,1 M Tris-HCL pH 7,5, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2mM dGTP/dCTP/dATP/dTTP, 10 mM DTT, 1 mM NAD
Kernextraktionspuffer A	10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 $\mu$ l NaF, 50 $\mu$ l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , ½ Tbl. cComplete Mini, ad 5l H <sub>2</sub> O
Kernextraktionspuffer C	20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20% Glycerol, 10 $\mu$ l NaF, 50 $\mu$ l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , ½ Tbl. cComplete Mini, ad 5l H <sub>2</sub> O
LB Medium	10 g Bacto-trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1l H <sub>2</sub> O
NP40-Hochsalzlysepuffer	20 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EDTA pH 8.0, 0.2 mM EGTA pH 8.0, 1 % NP40, 1x cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail / 5ml, 1 mM NaF, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
PBS	0.8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 14 mM NaCl
Protein-A-Sepharose Suspension	50 % (vol/vol) Protein-A-Sepharose in H <sub>2</sub> O
Ponceau-Färbelösung	0.1 % Ponceau in 5 % Essigsäure
TBE	0.1 M Tris, 0.1 M Borsäure, 2.5 mM EDTA
TBST	20 mM Tris (pH 7.5), 0.135 M NaCl, 0.01 % Triton-X
Western Blot Laufpuffer	50 mM Tris, 500 mM Glycin, 0.1 % SDS
Western Blot Transferpuffer	35 mM Tris, 40 mM Glycin, 0.04 % SDS, 20 % Methanol
Western Blot Waschpuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 % Triton-X100, 1 % Trockenmilchpulver

## 2.1.6 Plasmide

Plasmide	Hersteller
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pcDNA3.1_BATF	s. Methoden
pcDNA3.1_BATF3	s. Methoden
pcDNA3.1_RORC1	s. Methoden
pcDNA3.1_RORC2	s. Methoden
pEGFP-N3	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pGEM®-T Easy	Promega, Madison, WI, USA
pGag-pol	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von



	Achim Leutz, MDC, Berlin, Deutschland
pEnv	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Achim Leutz, MDC, Berlin, Deutschland
lentiCRISPR v2	Addgene, #52961, (Feng Zhang Lab, MIT, USA)
pRTS1	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Georg Bornkamm, München, Deutschland

## 2.1.7 Oligonukleotide

### 2.1.7.1 Primer für semi-quantitative RT-PCR-Analysen

Name	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge
<i>GAPDH F</i>	ATGCTGGCGCTGAGTAC	258 bp
<i>GAPDH R</i>	TGAGTCCTTCCACGATAC	
<i>JUNB F</i>	TCTCTCAAGCTCGCCTCTTC	413 BP
<i>JUNB R</i>	AGGTAGCTGATGGTGGTCGT	
<i>IRF4 F</i>	GAGCCAAGCATAAAGTCTGC	476 bp
<i>IRF4 R</i>	GGGTCTGGAACTCCTCTCC	
<i>BATF F</i>	CCCAGGAGAAGTCAGGAAGG	585 BP
<i>BATF R</i>	CTTGTCCAGGCCTCTGTCTC	
<i>BATF3 F</i>	CAGCGTCCTGCAGAGGAG	383 BP
<i>BATF3R</i>	GCTGGGCAGAGGAGTGTC	
<i>AHR F</i>	TAGGCTCAGCGTCAGTTACC	380 bp
<i>AHR R</i>	GGAGACCAGTGGCTTCTTCA	
<i>CCL20 F</i>	CTCCTGGCTGCTTTGATGTC	207 bp
<i>CCL20R</i>	ATTTGCGCACACAGACAACT	
<i>IL1R1 F</i>	AGACAAGGCCTTCTCCAAGA	456 bp
<i>IL1R1 R</i>	TAAGGGCACACAAGTCCTCC	
<i>IL4R F</i>	AAAACGACCCGGCAGATTC	494 bp
<i>IL4R R</i>	CTCTTTGGCAGCCTTGTGAG	
<i>IL6R F</i>	CGGAAGACAATGCCACTGTT	374 bp
<i>IL6R R</i>	GCAGGAGAACTTCTGGGACT	
<i>IL17A F</i>	AGGCAGGAATCACAATCCCA	364 bp
<i>IL17A R</i>	CCCACGGACACCAGTATCTT	
<i>IL17F F</i>	ATCAATGAAAACCAGCGCGT	324 bp
<i>IL17F R</i>	GGTCTCTTGCTGGATGGGAA	
<i>IL18R1 F</i>	CGCCGAGTTTGAAGATCAGG	408 bp
<i>IL18R1 R</i>	CTTTTGGTGTCTGTGCCTCC	
<i>IL21R1 F</i>	CTCACCCTTACCTGGCAAGA	450 bp
<i>IL21R1 R</i>	ATAGCTCGAGTCTTTGCGGA	
<i>IL22 F</i>	ACCTTCATGCTGGCTAAGGA	384 bp
<i>IL22 R</i>	TTGCTCTGGTCAAATGCAGG	
<i>IL23R F</i>	ATACCTTCTGCAGCCGTCAT	198 bp
<i>IL23R R</i>	GCTTTTGATGTGACCTGGGG	
<i>IL26 F</i>	CGCTTTGTGGAGGACTTTCA	326 bp
<i>IL26 R</i>	TCACCTAACATGCCGTCAGT	
<i>NCR1 F</i>	TACTGCCGTCTAGACACTGC	392 BP

<i>NCR1 R</i>	AGGAACCACACTAGAGCC	
<i>NFKBIZ F</i>	TCAGGCGATTCAGAAGGGAG	482 bp
<i>NFKBIZ R</i>	CTGGCTGTTTCGTTCTCCAAG	
<i>RUNX2 F</i>	CTGTGGTACTGTCATGGCG	415 bp
<i>RUNX2 R</i>	TGCCTGGGGTCTGTAATCTG	
<i>TNFSFR8 F</i>	AGTGCTCTTCTGGGTGATCC	416 bp
<i>TNFSFR8 R</i>	CGGTGTCAGCCTTCATGATG	
<i>RORC1 F</i>	ACCGATGTGGACTTCGTTTT	414 bp
<i>RORC1 R</i>	TCCTAACCAGCACCCTTCC	
<i>RORC2 F</i>	GAGAAGGACAGGGAGCCAAG	348 bp
<i>RORC2 R</i>	TGCAGCTGTTTCTGCACTTC	

### 2.1.7.2 Primer für real-time qPCR

Name	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge
<i>HPRT F</i>	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	102 bp
<i>HPRT R</i>	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	
<i>AHR F</i>	CGTCAGTTACCTGAGAGCCAA	83 bp
<i>AHR R</i>	AGTTATCCTGGCCTCCGTTTC	
<i>BATF F</i>	ATCGTATTGCCGCCAGAAAG	98 bp
<i>BATF R</i>	TAGAGCCGCGTTCTGTTTCT	
<i>BATF3 F</i>	GTTGCTGCTCAGAGAAGTCG	117 bp
<i>BATF3 R</i>	TGTCAGCTTCCCGATCTCTC	
<i>IL1R1 F</i>	GCTCATCGTGATGAATGTGGC	140 bp
<i>IL1R1 R</i>	CAGGCCTTGTGGGTTTGT	
<i>IL6R F</i>	AGGAGGAAGCATGCTGGC	120 bp
<i>IL6R R</i>	CTGGTCAGCACGCCTCTC	
<i>IL18R1 F</i>	CGGGGACGCCTCTCTGAA	129 bp
<i>IL18R1 R</i>	TGTGGGGACGTGAAGTACAAG	
<i>IL26 F</i>	CCTTAGGCAGAAATTGAGCCAC	134 bp
<i>IL26 R</i>	TATCCAGTTCCTGATGGCTTTGT	
<i>RORC2 F</i>	TGAGAAGGACAGGGAGCCAAG	88 bp
<i>RORC2 R</i>	TCCCCACAGATTTTGCAAGGG	

### 2.1.7.3 Primer für Chromatin-Immunpräzipitationen

Name	Sequenz (5' → 3')	Position (TSS=1)	Effizienz (%)
<i>IL12RB1_ChIP_SP1</i>	TGCCTTAGGGATGGGCTGTG	-21	105,6
<i>IL12RB1_ChIP_RP1</i>	GTCCCCACTCCGGAACACAT	-118	
<i>IL17A_ChIP_SP3</i>	GACCATGAGCTGGAGCCTGT	-28731	107,1
<i>IL17A_ChIP_RP3</i>	TGGGGGAAGTAGGAGTGGCA	-28639	
<i>IL18R1_ChIP_SP1</i>	AGAAGGCATTCTGTCCATGTCCT	4315	106,7
<i>IL18R1_ChIP_RP1</i>	CTCCAGTGACTCTCGGGTGC	4412	
<i>IL1R1_ChIP_SP4</i>	TCATGATTTTGTGGGTTGATGAGGC	-16611	107,6
<i>IL1R1_ChIP_RP4</i>	GTGGCTGTCTGGCTACAACCTG	-16532	

<i>IL22_ChIP_SP1</i>	CCCCCATACAACACCAGAGCA	-2959	91,6
<i>IL22_ChIP_RP1</i>	GCCCCTGATGGACCAAGCAT	-3073	
<i>IL23R_ChIP_SP1</i>	GGTCAGGGCTCTGCTGACAT	-98	86,3
<i>IL23R_ChIP_RP1</i>	TTCCTCACTGCCTGCCTGTC	-20	
<i>IL23R_ChIP_SP4</i>	TCTGCCGATGGCTGCTTAGAA	5487	118
<i>IL23R_ChIP_RP4</i>	AGCTTGAATCCAGGGGTTTGAGTA	5636	
<i>IL26_ChIP_SP1</i>	AGGGAAGTACCAGATAAGACTTGGT	-5598	91,6
<i>IL26_ChIP_RP1</i>	ACCACAGATGCAGCAGTAGAGA	-5671	
<i>IL4R_ChIP_SP1</i>	TTCATCCTCTTCGGTGTGATGCT	4243	116,6
<i>IL4R_ChIP_RP1</i>	GCGGGAAAGCACCCAAAGAT	4319	
<i>IL4R_ChIP_SP3</i>	GCGTCCGTTCTTGCCTTTCC	4645	99,5
<i>IL4R_ChIP_RP3</i>	TGGCTTTAGCGCAGACCTCA	4791	
<i>REF_chr4_SP1</i>	TGCAGGGGCAAGCATATTCA	na	94,4
<i>REF_chr4_RP1</i>	GGAGATAAAGCTGGGCGACA	na	
<i>Ref_chr12_SP3</i>	TGCCTTAGTTTTGTTGGTCCT	na	101,4
<i>Ref_chr12_RP3</i>	GTTGGGAGAAAATGCACGGTTA	na	

#### 2.1.7.4 Oligonukleotide für Klonierungen

##### pcDNA3.1(+) - Plasmide

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>BATF</i> BamHI s	GCGGATCCGCCGCCATGCCTCACAGCTCCGACAGC
<i>BATF</i> XhoI as	CTCCAGTCAGGGCTGGAAGCGCGGGG
<i>BATF3</i> BamHI s	GCGGATCCGCCGCCACCATGTGCGCAAGGGC
<i>BATF3</i> XhoI as	CTCCAGTCATCGGGGCAAGCAGC
<i>RORC1</i> EcoRI s	GGAATTCGCCACCATGGACAGGGCCCCACAGAG
<i>RORC</i> XhoI as	CTCGAGTCACTTGGACAGCCCCAC
<i>RORC2</i> EcoRI s	GGAATTCGCCACCATGAGAACACAAATTGAAG

##### pRTS1 - Plasmide

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>A-Fos</i> XbaI s	GCTCTAGAAAGCTCCACCATGGACTACAAG
<i>A-Fos</i> XbaI as	GCTCTAGAGAAGCTTGAATTAATCAGG

##### lentivirale Plasmide

Name	Sequenz (5' → 3')
<i>BATF</i> s	ACACCGGTGCCACCATGGACTACAAGGATGA
<i>BATF</i> as	ACTCTAGAGGGCTGGAAGCGCGGGGAGCT
<i>BATF3</i> s	ACACCGGTGCCGCCACCATGTGCGCAA
<i>BATF3</i> as	ACTCTAGATCGGGGCAAGCAGCCGGCCAC
<i>oligo1</i> s	GTTGTAATGAGCACACAAAAG
<i>oligo1</i> as	AATTCTTTTGTGTGCTCATTTACAACAT

oligo2 s	CTAGCGGATCCGTTGTATCTAGAA
oligo2 as	GATCTTCTAGATAACAACGGATCCG
pSK s	GTTTAAACAACATACGAGCCGGAAGCATAAA
pSK as	CGACATCTCCGGCTTGTTCAGCAGAGAGAAGTTTGTGCGC CGGATCCCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGT
EGFP/EBFP s	CTTCTCTCTGCTGAAACAAGCCGGAGATGTCGAAGAGAATCC TGGACCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
EGFP/EBFP as	GTCGACTTAACGCGT TTA CT TGTACAGCTCGTCCA
WPRES	GAGCTGTACAAGTAAACGCGTTAAACGCGTTAAGTCGACAATCA
WPRES	TTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTTTAAACGGGCCCTGCTAG AGATTTTC

### 2.1.7.5 Accell siRNAs für Gen-Inhibierung

gene symbol	5'-sequence-3'
siBATF #2	GAAAGAUGCUCUCAAAGUCCCA
siBATF #3	GCUCUACGCAAGGAGAUCA
siBATF #4	GUAUUAAAGAAAGAUGCUCU
siBATF3 #1	CUCUAGAAUUUGGAUAAUA
siBATF3 #2	CAGAGAAGUCGGAAGAAGC
Non-targeting siRNA #1	Catalog item: D-001910-01-50
Non-targeting siRNA #2	Catalog item: D-001910-02-50

### 2.1.7.1 Oligonukleotide für Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

Name	Sequenz (5' → 3')
AICE_Bcl11b - sense	AGCTTAGTGCAGAAATGAGTCAGAGATCAAAGAAG
AICE_Bcl11b - antisense	AGCTCTTCTTTGATCTCTGACTCATTCTGCACTA
AICE - sense	AGCTCTTGCCTTAGAGGTTTCGGGATGACTAATACTGT A
AICE - antisense	AGCTTACAGTATTAGTCATCCCGAAACCTCTAAGGCAA G
AICE_IL12RB - sense	AGCTGCTTTTGCTTTCACTTTGACTGGCCTGGAGACAA TGAGTT
AICE_IL12Rb - antisense	AGCTAACTCATTGTCTCCAGGCCAGTCAAAGTGAAAGC AAAAGC
AP-1- sense	AGCTAGCATGAGTCAGACAC
AP-1- antisense	AGCTGTGTCTGACTCATGCT
Sp1- sense	AGCTATTTCGATCGGGGCGGGGCGAGC
Sp1- antisense	AGCTGCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT

## 2.1.8 Enzyme

Name	Hersteller	Katalognummer
BamHI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#ER0051
DreamTaq™ Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#EP0701
EcoRI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#ER02771
FastAP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#EF0654
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#F530L
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#EL0014
XbaI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#ER0681
XhoI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	#ER0691

## 2.1.9 Antikörper

Name	Hersteller	Katalognummer	Experiment
anti-BATF	Cell Signaling	#8638S	WB, ChIP
anti-BATF	Santa Cruz Biotechnology	#sc-100974	SS, Co-IP, IHC
anti-BATF3	R&D Systems	#AF7437	WB, ChIP
anti-BATF3	Santa Cruz Biotechnology	#sc-162246	SS, IHC
anti-BATF3	Santa Cruz Biotechnology	sc-398902	WB, Co-IP
anti-β-actin	Sigma Adrich	#A5316	WB
anti-FLAG M2	Sigma Adrich	#F1804	WB
anti-FRA2	Santa Cruz Biotechnology	#sc-604	SS
anti-IRF4	Santa Cruz Biotechnology	#sc-6059	WB, SS
anti-JUNB	Cell Signaling	#3753	ChIP
anti-JUNB	Santa Cruz Biotechnology	#sc-46	WB, SS
anti-JUNB	Santa Cruz Biotechnology	#sc-5052	Co-IP
anti-JUNB	Santa Cruz Biotechnology	#sc-8051	WB
anti-PARP1	Santa Cruz Biotechnology	#sc-8007	WB
anti-RORC	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dan Littman, New York, USA		WB
Maus IgG1 Isotypkontrolle	R&D Systems	#MAB002	SS, Co-IP
Kaninchen IgG Isotypkontrolle	R&D Systems	AB-105-c	SS

## 2.1.10 Kits

Name	Hersteller	Katalognummer
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Indianapolis, IN, USA	#11483188001
AnnexinV-FITC/PI Kit	Bender MedSystems, Wien, Österreich	#BMS500FI
ECL	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden	#RPN2132
IL-17A DuoSet ELISA kit	R&D Systems	#DY317
IL-17F DuoSet ELISA kit	R&D Systems	#DY1335B
IL-22 DuoSet ELISA kit	R&D Systems	#DY782
Invisorb® Spin Plasmid Mini Two	Stratec, Birkenfeld, Deutschland	#1010140300
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Stratec, Birkenfeld, Deutschland	#1020110300
NucleoBond® Xtra Midi / Maxi	Macherey-Nagel	#740414
pGEM®Teasy cloning Kit	Promega, Madison, WI, USA	#TM042
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA	#4367659
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland	#79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	#74106
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, CA, USA	#D4007

## 2.1.11 Geräte

Name	Hersteller
Avanti J-26 XP Zentrifuge	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Bioruptor™	Diagenode, Liège, Belgien
C1000 Thermal Cycler	BioRad, München, Deutschland
CURIX 60 Filmentwickler	AGFA, Mortsel, Belgien
DU®640 spectrophotometer	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Duomax 1030, Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
FACSAria™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSCantoll™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gene Pulser™ II Xcell	BioRad, München, Deutschland
Heraeus Pico17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MIC magnetic induction cycler	Bio Molecular Systems, Upper Coomera, QLD, Australien
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

## 2.1.12 Software

Name	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San José, CA, USA
FACS Diva	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FlowJo 9	FlowJo LLC, Ashland, OR, USA
Graph Pad Prism	Graph Pad Software, San Diego, CA, USA
RStudio	RStudio Inc., Boston, MA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in RPMI-1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem (30 min bei 56° C) fötalen Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 1 mM Natriumpyruvat bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dieses Medium wird in dieser Arbeit als Standardmedium bezeichnet. Die Zelldichte dabei betrug je nach Zelllinie 1x10<sup>5</sup> bis 1x10<sup>6</sup> Zellen pro ml. Bei den gekennzeichneten Experimenten wurden 1 µg/ml Doxyzyklin (Dox), die RORC Inhibitoren SR1903, SR2211 und GSK805, der ALK Inhibitor Crizotinib (Crizo) oder als Kontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben.

#### 2.2.1.2 Transiente Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion wurden 1-5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 500 µl OPTI-MEM I Medium aufgenommen und mithilfe eines GenePulser™ II XCell Geräts und unter spezifischen Bedingungen (K299: 50 µF, 500 V; FE-PD: 500 µF, 250 V; Hek293: 950 µF 180 V) elektroporiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden 40 µg Expressionsplasmid verwendet und die Zellen nach der Elektroporation für 5 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden sie in Standardmedium überführt. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Co-Transfektion von pEGFP-N3 und anschließender durchflusszytometrischer Analyse mithilfe eines FACSCantoII™ ermittelt. Dafür wurden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT), in PBS gewaschen und in PBS/Propidiumiodid (PI)

aufgenommen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACSCantoII™ verwendet.

### 2.2.1.3 Lentivirale Transduktion

Für die lentivirale Transduktion wurden die Zellen zu einer Dichte von  $8 \times 10^5$  Zellen pro 2 ml Standardmedium in einer 6-well Platte ausgesät, 2-4 ml lentiviraler Überstand dazugegeben und 90 min mit 800 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in Standardmedium ausgesät und für weitere Analysen genutzt.

### 2.2.1.4 Generierung von A-Fos exprimierenden Zellen

Für die Generierung von A-Fos induzierbaren Zellen wurden FE-PD-Zellen wie oben beschrieben mit 40 µg pRTS1\_AFos elektroporiert und 24 h später mit 110 µg/ml Hygromycin B für 21 bis 28 Tage kultiviert. Für die funktionelle Charakterisierung der globalen AP-1-Inhibition wurden die Zellen mit 1 µg/ml Doxzyklin stimuliert und anschließend GFP<sup>+</sup>-Zellen durchflusszytometrisch mithilfe eines FACSAria™ aufgereinigt. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen in PBS mit 10 % FCS aufgenommen und bei entsprechenden Wellenlängen die gewünschten Populationen aufgereinigt und anschließend für weitere Analysen in Standardmedium aufgenommen. Für die transiente Expression von A-Fos wurden K299-Zellen mit 40 µg CMV\_AFos und 5 µg pEGFP-N3 elektroporiert (s.o.) und nach 48 bzw. 72 h wurden GFP-positive Zellen durchflusszytometrisch mit einem FACSAria™ aufgereinigt.

### 2.2.1.5 RNA-Interferenz mittels small interfering RNA (siRNA)

*Gen-silencing* Experimente wurden mit siRNAs der Firma Dharmacon durchgeführt. K299-, Mac-1- und Mac-2A-Zellen wurden passiv mit 500-750 nM siRNA transfiziert. Dafür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml in RPMI-1640 mit 1 % FCS und Penicillin und Streptomycin ausgesät und für 72 Stunden kultiviert. Danach wurden die Effizienz des *gen-silencings* mittels Western Blot überprüft und die weiteren funktionellen Analysen in Standardmedium durchgeführt.



### 2.2.1.6 Bestimmung der Apoptoserate mittels AnnexinV-FITC/PI-Analyse

Für die Analyse der Apoptoserate wurde das AnnexinV-FITC/PI Kit der Firma Bender MedSystems nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und in 200 µl Bindungspuffer mit AnnexinV-FITC (1:40) und PI (1:20) für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Doppelt negative Zellen wurden als lebend, AnnexinV positive Zellen als apoptotisch und PI positive Zellen als spätapoptotisch/tot definiert.

### 2.2.1.7 Bestimmung der Proliferationsrate mittels [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbau

Für die Analyse der Proliferationsrate wurde ein indirektes Verfahren gewählt, das den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbau während der Zellteilung in neu synthetisierte DNA misst. Dafür wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 200 µl Standardmedium pro well einer 96-well Platte gegeben. Für die jeweils letzten 18 - 24 Stunden dieser Kultur wurde 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Thymidin pro well hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei -20° C eingefroren, wodurch es zur Zelllyse kommt. Daraufhin wurden die Ansätze auf eine UniFilter©-96,GF/C© Filterplatte geerntet und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden pro well 20 µl Microsint© 0 hinzugegeben, die Platten versiegelt und im Tri-Carb 2800TR Liquid Scintillation Analyzer gemessen.

### 2.2.1.8 Analyse von Zelltod durch RORC Inhibition

Für die Inhibition von RORC wurden die kleinmolekularen Modulatoren SR1903 und SR2211 aus dem Labor von Patrick Griffin und GSK805 (Calbiochem) verwendet. Die Zellen wurden in Standardmedium mit 5 µM der entsprechenden Inhibitoren für die angegebene Zeit kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Lebendigkeit analysiert. Für die Kombinationsversuche mit Crizotinib wurden 7,5 µM der entsprechenden RORC-Inhibitoren und 25 nM Crizotinib in Standardmedium verwendet. Die Analyse der Apoptoseraten erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben.

## 2.2.2 Präparation von und Experimente mit RNA

### 2.2.2.1 RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wurde das *RNeasy Mini Kit* des Herstellers Qiagen nach Angaben des Herstellers benutzt. Die zu analysierenden Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen, zentrifugiert und anschließend die RNA nach Protokoll präpariert. Alle Proben wurden mit dem *RNase Free DNase Set* verdaut, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden. Präparierte RNA wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80° C gelagert.

### 2.2.2.2 Synthese von cDNA

Für die cDNA Synthese wurde das *1st Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Roche nach Angaben des Herstellers benutzt. Für die Synthese wurden in der Regel 1 µg RNA und die Oligo-dT Primer benutzt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20° C gelagert.

## 2.2.3 Präparation von und Experimente mit DNA

### 2.2.3.1 Klonierung

#### 2.2.3.1.1 pcDNA3.1(+) Plasmide

Für die Klonierung von Expressionsplasmiden wurden *BATF* mit den Primern „*BATF* BamHI s“ und „*BATF* XhoI as“ und *BATF3* mit den Primern „*BATF3* BamHI s“ und „*BATF3* XhoI as“ (s. Kap. 2.1) aus cDNA der Linie K299 mittels PCR amplifiziert und die Fragmente nach Auftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Gleichzeitig wurde das pcDNA3.1(+) Plasmid mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI verdaut und ebenfalls aufgereinigt. Anschließend wurden die *BATF*- und *BATF3*-Fragmente mithilfe der T4 DNA Ligase in das pcDNA3.1(+) ligiert und die Plasmide als pcDNA3.1\_*BATF* bzw. pcDNA3.1\_*BATF3* bezeichnet.

Für die Klonierung der *RORC* Plasmide (pcDNA3.1\_*RORC1* und pcDNA3.1\_*RORC2*) wurden für *RORC1* die Primer „*RORC1* EcoRI s“ und „*RORC* XhoI as“ und für *RORC2* die Primer „*RORC2* EcoRI s“ und ebenfalls „*RORC* XhoI as“ verwendet. Nach Amplifikation mittels PCR aus cDNA der Zelllinie K299, Auftrennung mittels Gelelektrophorese und Aufreinigung wurden die Fragmente in pcDNA3.1(+), das vorher mit EcoRI und XhoI verdaut wurde, mithilfe der T4 DNA Ligase ligiert.

#### 2.2.3.1.2 pRTS1-Plasmide

Für die Generierung eines TET-induzierbaren A-Fos exprimierenden Plasmids wurde A-Fos mit den Primern „A-Fos XbaI s“ und „A-Fos XbaI as“ aus einem auf CMV500 basierenden A-Fos Expressionsplasmid<sup>186</sup> amplifiziert, aufgereinigt und mittels der XbaI-Schnittstellen in ein pUC19-Plasmid eingebracht, das zusätzlich SfiI-Restriktionsschnittstellen aufweist (pUC19\_SfiI). Anschließend wurde aus dieser Zwischenstufe das A-Fos Fragment mittels SfiI-Verdau mobilisiert und in das pRTS1 Plasmid mittels T4 DNA-Ligase kloniert.

#### 2.2.3.1.3 Lentivirale Plasmide

Die Klonierungen der lentiviralen Plasmide wurden von Henrike Lisa Sczakiel durchgeführt. Als Grundlage wurde das lentiCRISPRv2-Plasmid von Feng Zhang verwendet. Um eine erfolgreiche Transduktion des Plasmids sichtbar machen zu können, wurde in einem ersten Schritt der Abschnitt des lentiCRISPRv2-Plasmids, der für die Puromycin Resistenz kodiert, durch einen EGFP- bzw. EBFP-Reporter mittels Gibson-Assembly ersetzt. Dafür wurden zuerst die Fragmente für EGFP bzw. EBFP, WPRE und pSK mit den gleichnamigen Primern (s. Materialien) amplifiziert und anschließend mittels *DpnI* Verdau von Ausgangs-DNA befreit. Anschließend wurden die Gibson-Assembly mit 15 ng/kb des entsprechenden Fragments, 800 U Tag Ligase, 0,08 U T5 Exonuklease und 0,4 U Phusion DNA Polymerase im Gibson Assembly Reaktionspuffer für eine Stunde bei 50° C inkubiert.

Im zweiten Schritt wurden in die nun hergestellten lentiCRISPRv2-EGFP und -EBFP-Plasmide der Abschnitt für das sgRNA-scaffold mittels Verdau mit PacI und EcoRI eliminiert, indem anschließend ein nicht-kodierendes Oligo (Oligo1) an diese Stelle kloniert wurde. Anschließend wurden diese Plasmide (lentiCRISPRv2-EBFP/EGFP-Oligo1) mit XbaI und BamHI verdaut, um den Cas9-kodierenden Abschnitt zu eliminieren. An diese Stelle wurde dann das Oligo2 mittels T4 Ligase ligiert. Die neu klonierten Vektoren wurden lentiCRISPRv2-EGFP/EBFP-empty benannt. Anschließend wurden *BATF* und *BATF3* aus den o.g. pcDNA3.1\_BATF bzw. pcDNA3.1\_BATF3 mit den Primern „BATF s“ und „BATF as“ bzw. „BATF3 s“ und „BATF3 as“ amplifiziert, aufgereinigt und mittels AgeI und XbaI in die Vektoren kloniert. Alle Konstrukte wurden mittels Sequenzierung verifiziert.

### 2.2.3.2 Sequenzierung

Alle Plasmide und DNA-Fragmente wurden von der Firma LGC Genomics Berlin Sanger sequenziert.

### 2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von PCR-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden die PCR Produkte mit 5 µl Cresol Rot in ein 1% Agarose Gel gegeben, das zusätzlich 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Anschließend wurde eine Spannung von 80-140 V angelegt und das Gel für etwa 30-90 min laufen gelassen. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurde ein Größenmarker (100 bp plus oder 1 kb *ladder*) verwendet. Die aufgetrennten Banden wurde anschließend mithilfe von UV Licht dargestellt und, falls erforderlich, ausgeschnitten.

### 2.2.3.4 DNA-Extraktion

Um das jeweilige Fragment aus der Agarose zu bergen, wurde das *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* nach Angaben des Herstellers benutzt

### 2.2.3.5 Verdau und Dephosphorylierung von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden die Restriktionsenzyme nach den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Puffern verwendet und bei 37° C für eine 1 h inkubiert. Im Falle einer nachfolgenden Dephosphorylierung wurde anschließend thermosensible Alkalische Phosphatase (AP) hinzugegeben und für weitere 30 min bei 37° C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der AP fand bei 75° C für 5 min statt.

### 2.2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA Fragmenten in Vektoren wurde die jeweiligen verdauten DNA Fragmente und Vektoren zusammen mit der T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16° C inkubiert.

### 2.2.3.7 Transformation von *E. coli XL1 blue*

Für die Transformation von kompetenten *E. coli XL1 blue* Zellen wurden 5 µl des entsprechenden Ligationsproduktes verwendet. Dieses wurde mit 50 µl E-Coli XL1-Blue Zellen gemischt, für 10 min auf Eis belassen und dann 40 s bei 42° C Hitze behandelt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min auf Eis belassen und mit 500 µl LB Medium ohne Antibiotikum für 40-60 min bei 37° C (bzw. 30° C für die pRTS1-Konstrukte) und 180 rpm inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien bei 1200 rpm für 2 min zentrifugiert und anschließend auf Agar Platten mit Ampicillin ausgesät und über Nacht bei 37° C (bzw. 30° C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien für weitere Experimente gepickt. Für größere Volumina („Mini-Präp“) wurden die Einzelkolonien ausgewählt, in 2 ml LB Medium mit Ampicillin gegeben und für 8-16 h bei 37° C (bzw. 30° C) inkubiert. Für größere Ansätze („Midi-/Maxi-Präp“) wurde dieser Mini-Ansatz mit LB-Medium mit Ampicillin auf bis zu 250 ml aufgefüllt und wiederum bei o.g. Bedingungen inkubiert.

### 2.2.3.8 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus 2 ml („Mini-Präp“) mithilfe des *Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits* und aus 150-250 ml Bakterienkultur mithilfe des *NucleoBond® Xtra Midi bzw. Maxi Kits* nach Angaben des Herstellers präpariert.

### 2.2.3.9 Reverse-Transkriptase *polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Für die Analysen mittels RT-PCR wurden 1 µg der entsprechenden cDNA und jeweils 1 µl der jeweiligen Primer (10 mmol/l) (s. Kap. 2.1) verwendet. Zudem wurden 1 µl dNTPs (10 mM) und 0,25 µl DreamTag™ Polymerase (5 U/µl) verwendet. Anschließend wurde das Zielvolumen von 50 µl mit der Zugabe von destilliertem H<sub>2</sub>O erreicht und anschließend die RT-PCR mithilfe eines *C1000 Thermal Cyclers* durchgeführt. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurde die *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* nach Angaben des Herstellers benutzt.

### 2.2.3.10 Quantitative *Real-Time* PCR (qPCR)

Für die qPCR wurde die jeweilige cDNA 1:20 verdünnt und anschließend mithilfe des *SYBR™ Green PCR Master Mix* in einem *MIC magnetic induction cyclers* analysiert.

### 2.2.3.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Analysen wurden zusammen mit Linda van Hoff und Eva Kärgel aus dem Labor von Claus Scheidereit am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin durchgeführt. Für die Analysen wurde ein modifiziertes Protokoll der Firma Millipore verwendet. Die angegebenen Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend mithilfe der *two-step cross-linking* Methode fixiert. Dafür wurden die Zellen für 30 min mit 2 mM Disuccinimidylglutarat und anschließend mit 1 % Formaldehyd für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA und 1 % SDS lysiert und mithilfe eines Bioruptor Plus in 13 Zyklen bei hoher Intensität und Zyklusdauer von jeweils 30 s Ultraschall und 30 s Pause sonifiziert. Dann wurde für eine Stunde eine Präclearance mit Protein Sepharose A bei 4° C durchgeführt und nach Zentrifugation in den Überstand die jeweiligen Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Konzentration der Antikörper gegen BATF und JUNB wurde nach Angaben des Herstellers eingestellt (1:50 Verdünnung). Für den BATF3 Antikörper wurde eine Konzentration von 27 µg/1x10<sup>7</sup> Zellen verwendet. Am nächsten Morgen wurde Sepharose A hinzugegeben und für eine Stunde bei 4° C rotieren gelassen. Im Anschluss wurden die Immunkomplexe in mehrmaligen Zentrifugier- und Waschschrinen gereinigt und in 1 % SDS mit 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> eluiert. Daraufhin wurden die Aufhebung des *Cross-linkings*, die RNase- und Proteinase K-Behandlungen sowie die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die qPCR Analysen wurden in Triplikaten mit der ChIP-DNA, den jeweiligen Primern (s. Kap. 2.1) und GoTag® qPCR Master Mix durchgeführt. Als Referenz wurden Primer für Sequenzen auf den Chromosomen 4 und 12, die zwischen Genen liegen und keine Transkriptionsfaktoren rekrutieren, und als Kontrolle 4 ng Input DNA verwendet.

## 2.2.4 Präparation von und Experimente mit Protein

### 2.2.4.1 Präparation von Gesamtprotein

Für die Präparation von Gesamtprotein wurde die Hochsalzlyse (HSL) verwendet. Dafür wurden die Zellen bei 1200 rpm und RT für 5 min zentrifugiert und nach einem Waschschrin mit PBS in NP40-HSL Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und

im Anschluss für 10 min bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich nun das Gesamtprotein befand, wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -80° C gelagert.

#### 2.2.4.2 Präparation von Kernprotein

Für die Präparation von Kernproteinen wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren und Waschen in Kernlysepuffer A aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert, was zu einer Zellschwellung führt. Im Anschluss wurden 5 µl NP-40 hinzugegeben und die Zellen für 10 s auf einem Vortexschüttler gemixt, wodurch es zur Zerstörung der Zellmembran kommt. Danach wurden die Ansätze für 30 s bei 14000 rpm und 4° C zentrifugiert, um die Kerne zu pelletieren. Diese Pellets wurden dann in 40 µl Kernlysepuffer C aufgenommen und 30 min bei 4° C geschüttelt. Im letzten Schritt wurde nach Zentrifugation bei 14000 rpm der Überstand, in dem sich nun die Kernproteine befinden, abgenommen und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80° C gelagert.<sup>73</sup>

#### 2.2.4.3 Bradford-Test

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der jeweiligen Gesamt- und Kernproteinpräparationen wurde der Bradford-Test verwendet. Dafür wurde das *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und im Anschluss eine Standardkurve mit 0 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl und 10 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml) hergestellt. Dann wurden jeweils 2 µl der Gesamt- und Kernprotein-Ansätze hinsichtlich ihrer Absorption in einem DU@640 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm untersucht und mithilfe der Standardkurve die Konzentration bestimmt.

#### 2.2.4.4 Co-Immunopräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurden 1000 µg Gesamtprotein der jeweiligen Zelllinien verwendet. Im ersten Schritt wurde die Konzentration von NaCl im HSL-Puffer mittels Verdünnung mit HSL-Puffer ohne NaCl auf 150 mmol eingestellt. Anschließend wurde eine Präclearance mit Sepharose A durchgeführt. Dafür wurden 25 µl der Sepharose

zum Ansatz gegeben und für 1 h bei 4° C unter ständiger Rotation inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Sepharose wurden 2 µg der jeweiligen Antikörper in den Überstand hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei 4° C unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 25 µl Sepharose A hinzugegeben und erneut für 1 h bei 4° C rotieren gelassen. Daraufhin wurde der Sepharose-Antikörper-Protein Komplex bei 1200 rpm für 1 min bei 4° C zentrifugiert und mehrmals mit Co-IP Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde 4x Laemmli Puffer hinzugegeben und die Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt.

#### 2.2.4.5 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden 20-60 µg Gesamtprotein oder 10-30 µg Kernprotein verwendet. Die Proteinlysate wurden mit 4x Laemmli Puffer und H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20-40 µl eingestellt. Im Anschluss wurden diese Ansätze bei 95° C für 5 min denaturiert, auf ein je nach Größe der zu analysierenden Proteine 8-12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 80-120 V für 45 bis 120 min laufen gelassen.

#### 2.2.4.6 Western Blot (WB) und Immundetektion

Die Proteine wurden nach der SDS-Gelelektrophorese mithilfe eines SemiDry-Systems auf eine Nitrocellulose-Membran mithilfe des WB Transferpuffers übertragen. Dafür wurde eine Spannung von 20 V für 40-60 min angelegt. Danach wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt und mit WB-Waschpuffer für 60 min bei RT geblockt. Im Anschluss wurde der jeweilige Erst-Antikörper in Verhältnissen von 1:200 bis 1:1000 in WB-Waschpuffer verdünnt und die Membran damit über Nacht bei 4° C unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit WB-Waschpuffer für jeweils 10 min bei RT wurde der Zweitantikörper in einem Verhältnis von 1:5000 bzw. 1:10000 in WB-Waschpuffer hinzugegeben und für 40-60 min bei leichtem Schütteln und RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels des ECL-Kits, CL-Xposure Filmen und einem Crurix 60 Filmentwickler.



#### 2.2.4.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für die Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktor-Komplexen wurde das EMSA Verfahren verwendet. Dafür wurden radioaktiv markierte doppelsträngige DNA-Oligonukleotide hergestellt, die die jeweilige Transkriptionsfaktor-Bindungssequenz enthalten (s. Kap. 2.1). Hierzu wurden zuerst komplementäre einzelsträngigen Oligonukleotide hybridisiert, indem jeweils 10 µg der Oligos in 50 µl Shift-Hybridisierungspuffer gemischt, für 10 min auf 95° C erhitzt und über Nacht auf RT abgekühlt gelassen wurden. Im Anschluss erfolgte die radioaktive Markierung mittels Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP in den AGCT-Übergang. Dafür wurden 1,25 µl des hybridisierten Oligos zusammen mit 2,5 µl 10x Klenowpuffer, 4 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml), 1,8 µl dNTPs (1mM; ohne CTP), 1µl Klenow-Enzym (5000 U/ml) und 14,45 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurde nicht eingebautes [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP mithilfe von *Quick Spin*-Säulen nach Angaben des Herstellers entfernt.

Der EMSA wurde mit 2-5 µg Kernprotein der jeweiligen Zelllinie durchgeführt. Dafür wurden die Kernextrakte mit 10 µl 2x Shiftpuffer, 1 µl DTT (100 mM), 1 µl BSA (10 mg/ml), 1 µl poly dIdC (2 µg/µl) und ca. 20000 cpm des jeweiligen radioaktiv markierten Oligos gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf Reaktionsvolumen von 20 µl eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min bei RT inkubiert und in einem 5 % Acrylamidgel und 1x TBE als Laufpuffer mittels Gelelektrophorese bei 180 – 240 V aufgetrennt. Danach wurde das Gel auf ein Whatmanpapier mithilfe von Unterdruck bei 75° C für 45 – 60 min übertragen. Die Darstellung der Komplexe erfolgte mit CL-Xposure Filmen und einem Crurix 60 Filmentwickler. Dafür wurden die Filme bei -80° C mehrere Stunden bis Tage belichtet. Für *Supershift*-Analysen wurde den Kernproteinen 1 – 3 µl des jeweiligen Antikörpers zugesetzt.

#### 2.2.4.8 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Ioannis Anagnostopoulos und Michael Hummel vom Institut für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die beschriebenen Fälle stammen aus dem Referenzzentrum der Charité und die Diagnosen wurden nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gestellt. Für die Färbungen wurden Schnitte von Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material verwendet. Für die BATF- und BATF3- Färbungen

wurden Antikörper von SantaCruz (sc-100974 und sc-162246) verwendet. Die Detektion von gebundenem Antikörper erfolgte mit APAAP (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) und Fast Red der Firma Dako.

#### 2.2.4.9 *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Für die Messung von sezerniertem Protein wurden die DuoSet Kits der Firma R&D nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Überstand der Zelllinien wurde gewonnen, indem  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml ausgesät wurden und der Überstand 48 h später eingesammelt wurde. Die optische Dichte wurde photometrisch bei 450 nm in einem FLUOstar OPTIMA gemessen. Eine Korrektur für optische Fehler der Platten wurde bei 570 nm durchgeführt.

#### 2.2.4.10 Cytospin

Für das Aufbringen von Zellen auf Objektträger wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ l PBS aufgenommen und bei 500 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei RT getrocknet.

### 2.2.5 Statistik

Die Statistischen Analysen wurden mithilfe der Programme R v2.9.1 (<http://www.r-project.org/>), RStudio und Graph Pad Prism durchgeführt. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Graph Pad Prism angewendet. Für die Daten aus den Experimenten zu Proliferation, Wachstum und Apoptose wurden die Daten in Gruppen zusammengefasst und anschließend ein Welch-Test durchgeführt.

p-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant betrachtet. Ergebnisse sind als arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler (SEM, *standard mean of error*) dargestellt, soweit nicht anders angegeben.

### 3 Ergebnisse

Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe haben eine starke Aktivierung der AP-1-Transkriptionsfaktoren im ALCL gezeigt<sup>73-75</sup>. Um diese Aktivierung umfassender zu verstehen und weil inzwischen neue Wirkungsmechanismen der AP-1 Faktoren beschrieben wurden<sup>172-174</sup>, sind in der vorliegenden Arbeit Expression und funktionelle Konsequenzen der AP-1-Faktoren BATF und BATF3 im ALCL untersucht wurden.

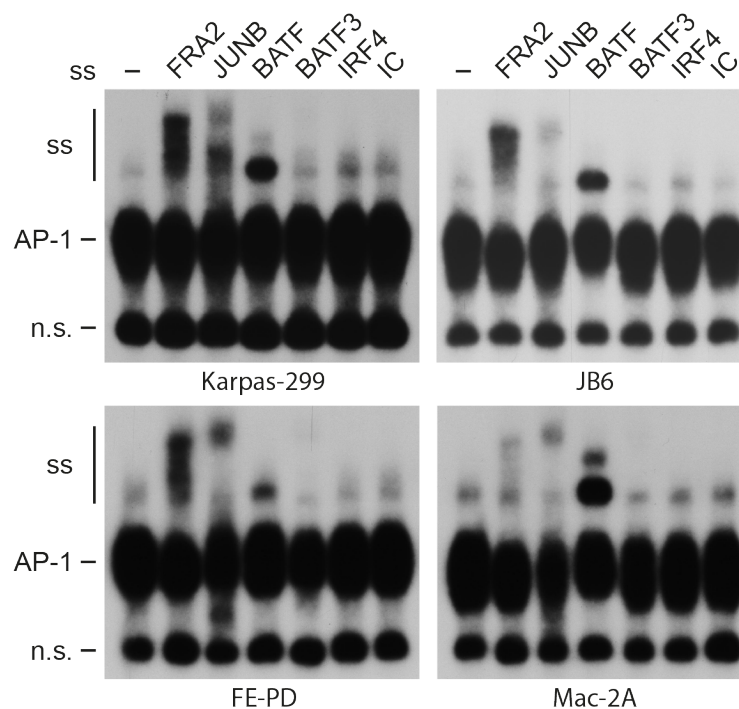
#### 3.1 AP-1/BATF DNA-Bindungsaktivität und BATF und BATF3 Expression im ALCL

Die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 im ALCL wurde mithilfe von EMSAs an der TRE-Sequenz, dem klassischen AP-1-Bindungsmotiv, untersucht. Dafür wurden Kernpräparationen von ALCL-Zelllinien (ALK+ ALCL: K299, SU-DHL-1, DEL, JB6; ALK-ALCL: FE-PD, Mac-1, Mac-2A, DL-40) und nicht-ALCL T-Zell-Leukämie- (Jurkat, KE-37, Molt-14) oder -Lymphomlinien (H9) analysiert. Dabei bestätigte sich die von unserer Arbeitsgruppe schon früher beschriebene starke differentielle Aktivität von AP-1-Komplexen an der TRE-Bindungsstelle in allen ALCL-Linien<sup>73</sup>, welche nicht in den nicht-ALCL T-Zelllinien (in der Folge vereinfachend als T-Zelllinien benannt) nachgewiesen werden konnte (**Abb. 3.1**).



**Abb. 3.1: DNA-Bindungsaktivität von AP-1 im ALCL.** EMSAs wurden mit 3 µg Kernextrakten von ALCL-Zelllinien (K299, SU-DHL-1, DEL, JB6, FE-PD, Mac-1, Mac-2A, DL-40), akuten lymphoblastischer T-Zell-Leukämie-(ALL) Zelllinien (Jurkat, KE-37, Molt-14) und einer kutanen T-Zell-Lymphomlinie (H9) durchgeführt. Als radioaktiv-markiertes DNA-Oligonukleotid wurde die TRE-Bindungssequenz des humanen Kollagenase Promotors verwendet. Die Analyse von SP-1 diente ebenso wie das Darstellen des ungebundenen DNA-Oligos (freie Probe) als Kontrolle.

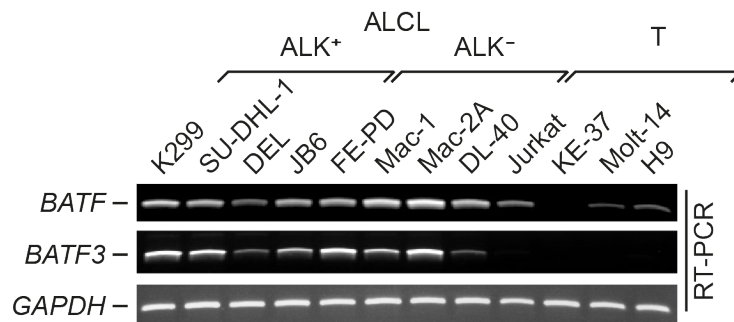
Um einen genaueren Einblick in die ALCL-spezifische Zusammensetzung des AP-1-Komplexes zu erhalten und die Frage der Aktivität und Bindung von BATF und BATF3 an die TRE-Sequenz in ALCL-Zellen zu beantworten, wurden *Supershift*-Analysen durchgeführt. Dafür wurden EMSA-Analysen mit gegen FRA-2, JUNB, BATF, BATF3 und IRF4 gerichteten Antikörpern durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der AP-1-Komplex nicht nur aus den schon bekannten FRA-2 und JUN-Proteinen gebildet wird, sondern dass auch BATF einen starken Anteil an der DNA-Bindung hat. BATF3 dagegen konnte nur in geringem Maße nachgewiesen werden. IRF4 ist nicht an der Bindung von AP-1 an der TRE-Sequenz beteiligt (**Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2: Zusammensetzung der AP-1 DNA-Bindungsaktivität an der TRE-Sequenz in ALCL Zelllinien.** *Supershift*-Analysen der ALCL Zelllinien wurden mit 3 µg Kernextrakten und verschiedenen Antikörpern gegen AP-1-Proteine (FRA-2, JUNB, BATF, BATF3) und IRF4, sowie einer Isotyp-Kontrolle (IC) durchgeführt. Als radioaktiv markierte Sonde, wurde wie in Abb. 3.1 die TRE-Sequenz genutzt. Die Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend radiographisch dargestellt. (SS – *Supershift*-Komplex; n.s. – unspezifische Bande)

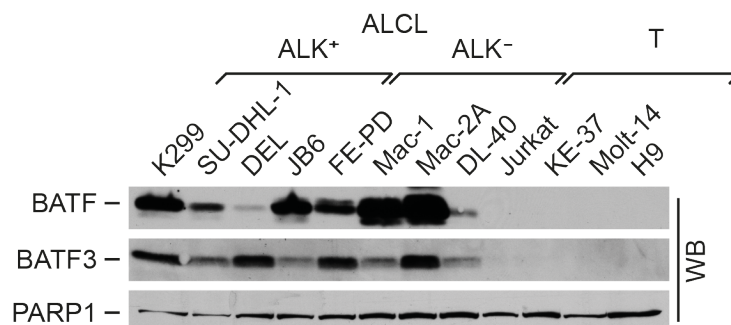
Die DNA-Bindungsaktivitäten von BATF und, wenn auch deutlich schwächer, BATF3 ließen darauf schließen, dass beide TF in ALCL-Zellen exprimiert sind. Daher erfolgte im nächsten Schritt die Expressionsanalyse dieser Faktoren in den Zelllinien. Für die Analyse auf mRNA-Ebene wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine differentielle Expression beider Faktoren. *BATF* ist in allen ALCL-Linien stark exprimiert, aber auch in den anderen T-Zelllinien, wenn auch in deutlich schwächerem Maß,

nachweisbar. Dagegen ist die Expression von *BATF3* nur auf die ALCL-Linien beschränkt und konnte nicht in den anderen Linien nachgewiesen werden (**Abb. 3.3**).



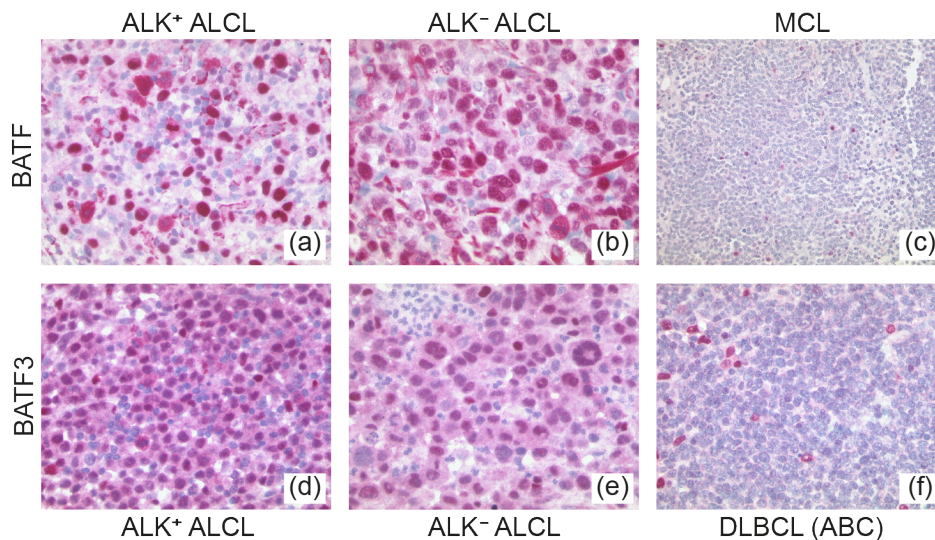
**Abb. 3.3: mRNA-Expression von BATF und BATF3 in Lymphomlinien.** Die cDNA von ALCL- und T-Zelllinien wurde mittels RT-PCR und spezifischen Primern hinsichtlich ihrer Expression von *BATF* und *BATF3* untersucht. Die Analyse von *GAPDH* diente als Kontrolle.

Um die Expression auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden WB-Analysen durchgeführt. Dafür wurden Kernextrakte der ALCL- und T-Zelllinien mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die unterschiedlichen Proteine mithilfe von Antikörpern dargestellt. Die differentielle Expression von *BATF* und *BATF3* konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden. Dabei zeigte sich eine starke (Zelllinien K299, JB6, FE-PD) oder sehr starke (Mac-1 und Mac-2A) *BATF*-Expression in den meisten ALCL-Zelllinien. Die Zelllinien SU-DHL-1, DEL und DL-40 zeigten im Vergleich hierzu eine schwächere Proteinexpression von *BATF*, die aber immer deutlich höher als in den T-Zelllinien war. *BATF3* konnte mittels WB in allen ALCL-Linien nicht aber in den Kontroll-Linien nachgewiesen werden. Hierbei zeigten lediglich die Linien SU-DHL-1, JB6, Mac-1 und DL-40 eine etwas geringere Expression. Insgesamt konnten die mRNA Analysen damit auf Proteinebene bestätigt werden (**Abb. 3.4**).



**Abb. 3.4: BATF- und BATF3-Expression auf Proteinebene in Lymphomzelllinien.** 30 µg Kernextrakte der ALCL- und T-Zelllinien wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mithilfe von spezifischen Antikörpern gerichtet gegen *BATF* und *BATF3* im Immunoblot untersucht. Die Analyse von *PARP1* diente als Ladungskontrolle.

Um die Ergebnisse der *in-vitro* Analysen auch in primären Lymphomproben zu bestätigen, wurden Lymphknotenbiopsien im Hinblick auf die Expression von BATF und BATF3 untersucht. Diese Analysen wurden von den Pathologen Ioannis Anagnostopoulos und Michael Hummel vom Institut für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Dabei zeigte sich eine nukleäre Lokalisation beider Transkriptionsfaktoren (**Abb. 3.5**).



**Abb. 3.5: BATF und BATF3 werden in primären ALCL-Zellen exprimiert.** Repräsentative Färbungen von primären Lymphomen (ALK+, ALK- ALCL, Mantelzell-Lymphom (MCL) und Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)) mittels Immunhistochemie mit Antikörper gegen BATF (oben) und BATF3 (unten).

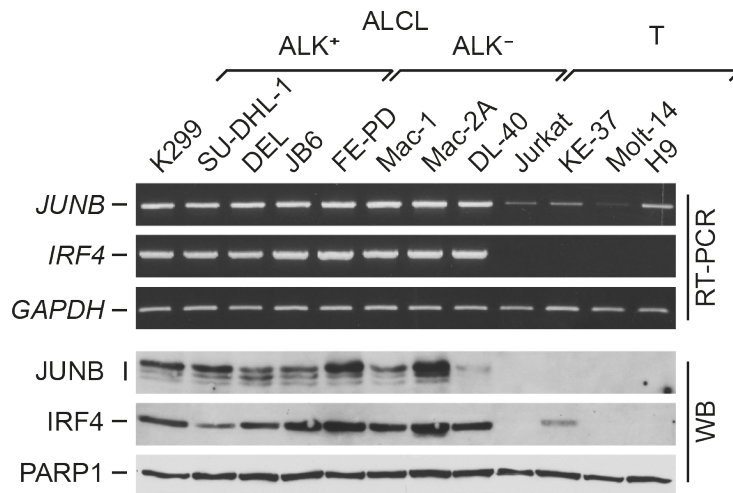
Hinsichtlich BATF zeigten von den 70 nicht-ALCL B- und T-Zell-Lymphomen keines der Mantelzelllymphome (MCL, 0 von 7), keines der folliculären Lymphome (FL, 0 von 11) und keines der Burkitt-Lymphome (BL, 0 von 11) eine Expression. Im diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) zeigten drei Viertel der Fälle (15 von 20) eine gemischte Anzahl von BATF-gefärbten Zellen. Alle Fälle der getesteten chronisch lymphatischen Leukämien (CLL, 9 von 9), der PTCL-NOS (9 von 9) und des nodulären Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms (NLPHL, 2 von 2) wiesen eine Expression von BATF auf. Bemerkenswert war eine starke Anfärbung von BATF in allen ALCL (16 von 16) und allen cHL (8 von 8), was die *in-vitro* Daten bestätigte.

Die Expression von BATF3 dagegen war beschränkt auf wenige Lymphome. Lediglich ein CLL von den 69 analysierten Fällen (10 MCL, 11 FL, 8 BL, 20 DLBCL, 9 CLL, 9 PTCL-NOS, 2 NLPHL) zeigte eine Anfärbung für BATF3. Dagegen waren alle ALCL (16 von 16) und cHL-Proben (8 von 8) positiv für BATF3.

Zusammenfassend zeigen die Experimente eine starke differentielle Überexpression von sowohl BATF als auch BATF3 im ALCL. Anhand der Analyse primärer Lymphomfälle konnte festgestellt werden, dass die gleichzeitige Expression beider Faktoren ein Alleinstellungsmerkmal des ALCL und des cHL ist. Die Beteiligung von BATF und BATF3 an der Bildung von AP-1-Komplexen ließ die Vermutung nach weiteren Bindungspartnern aufkommen, die im Folgenden beantwortet werden soll.

### **3.2 Kooperation von AP-1 mit IRF4 im ALCL**

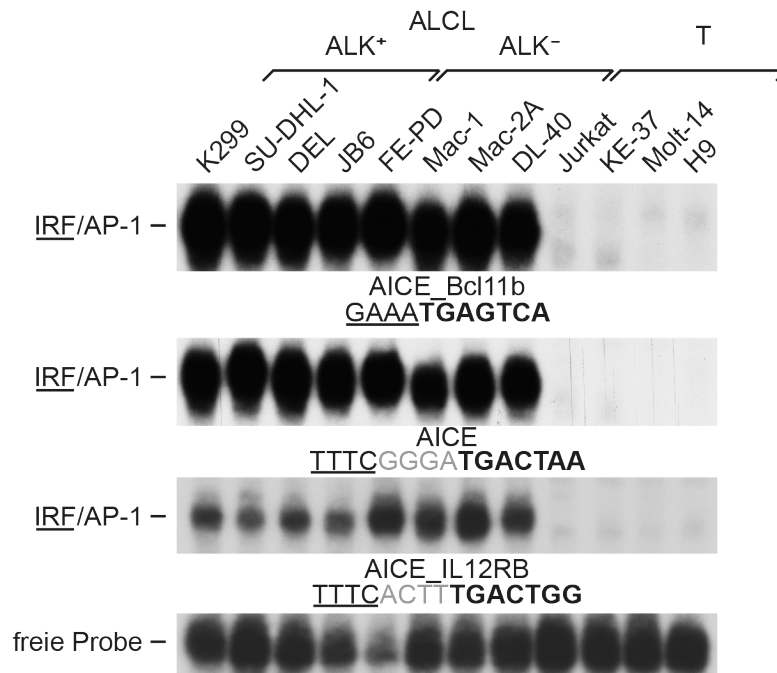
Da kürzlich veröffentlichte Studien gezeigt haben, dass AP-1-Komplexe, bestehend aus BATF oder BATF3 und JUN mit IRF4 interagieren und bestimmte DNA-Sequenzen erkennen<sup>171-174</sup>, stellte sich die Frage, ob auch im ALCL eine solche Kooperation dieser Transkriptionsfaktoren zu finden ist. Dafür wurde die Expression von JUNB und IRF4 in den ALCL-Zelllinien zuerst auf mRNA-Ebene analysiert. Dabei zeigte sich, dass beide Transkriptionsfaktoren differentiel exprimiert werden. JUNB konnte ausschließlich und mit starker Expression in allen ALCL Linien, aber nur schwach in den T-Zelllinien nachgewiesen werden. Auch IRF4 wird, abgesehen von KE-37-Zellen, nur in den ALCL-Zellen exprimiert. Um diese Ergebnisse auch auf Proteinebene zu validieren, wurden Kernextrakte der Zelllinien mittels WB auf die Expression von JUNB und IRF4 getestet. Hierbei konnte ein hohes Expressionsniveau beider Faktoren in den ALCL-Linien gezeigt werden, wobei in den T-Zelllinien JUNB nicht und IRF4 nur in der Linie KE-37 nachgewiesen werden konnte. Somit konnten die Ergebnisse der mRNA-Analysen verifiziert und vorangegangene Arbeiten meiner Gruppe und Literaturdaten zu JUNB und IRF4 im ALCL bestätigt werden<sup>70,71,73</sup> (**Abb. 3.6**).



**Abb. 3.6: Analyse der Expression von JUNB und IRF4 auf mRNA- und Proteinebene.** Oben: Die cDNA von ALCL und T-Zelllinien wurde mittels RT-PCR auf die Expression von *JUNB* und *IRF4* untersucht. Die Analyse von *GAPDH* diente als Kontrolle. Unten: 30 µg Protein-Kernextrakte der ALCL- und nicht-ALCL-T-Zelllinien wurden mittels WB gelelektrophoretisch aufgetrennt und JUNB und IRF4 mittels Immunoblot dargestellt. Die Analyse von PARP1 diente als Kontrolle.

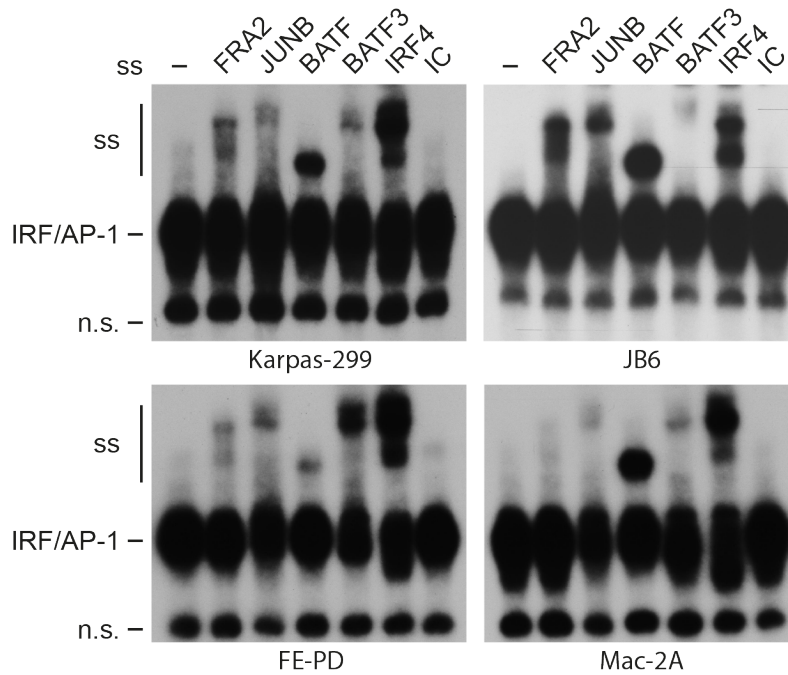
Zusammenfassend haben die Daten bisher gezeigt, dass ALCL-Zellen neben JUNB und IRF4 auch spezifisch und stark die AP-1/ATF-Faktoren BATF und BATF3 exprimieren. Es sollte deshalb im nächsten Schritt die Frage beantwortet werden, ob diese Transkriptionsfaktoren im ALCL miteinander interagieren und der Komplex aus selbigen spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten AICEs, erkennen und binden kann. Um diese Hypothese zu validieren, wurden EMSA-Analysen mit Kernextrakten der ALCL- und T-Zelllinien zusammen mit DNA-Oligonukleotiden aus den Promotorbereichen der Gene *CTLA4*, *IL12RB* und *BCL11B*, die AICEs beinhalten<sup>173</sup>, durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine starke, differentielle Aktivität an den untersuchten AICE-Bindungssequenzen in allen ALCL- im Vergleich zu den T-Zelllinien. Dabei spielte es keine Rolle, ob zwischen der AP-1- und der IRF-Bindungssequenz ein Abstand aus vier Basenpaaren bestand oder beide Bindungssequenzen direkt nebeneinander lagen. Die T-Zelllinien wiesen dagegen keine Aktivität an diesen Bindungsmotiven auf. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass AICE-Bindungsmotive im ALCL besetzt sind und eine Kooperation von AP-1-Faktoren mit IRF4 im ALCL wahrscheinlich ist (**Abb. 3.7**).





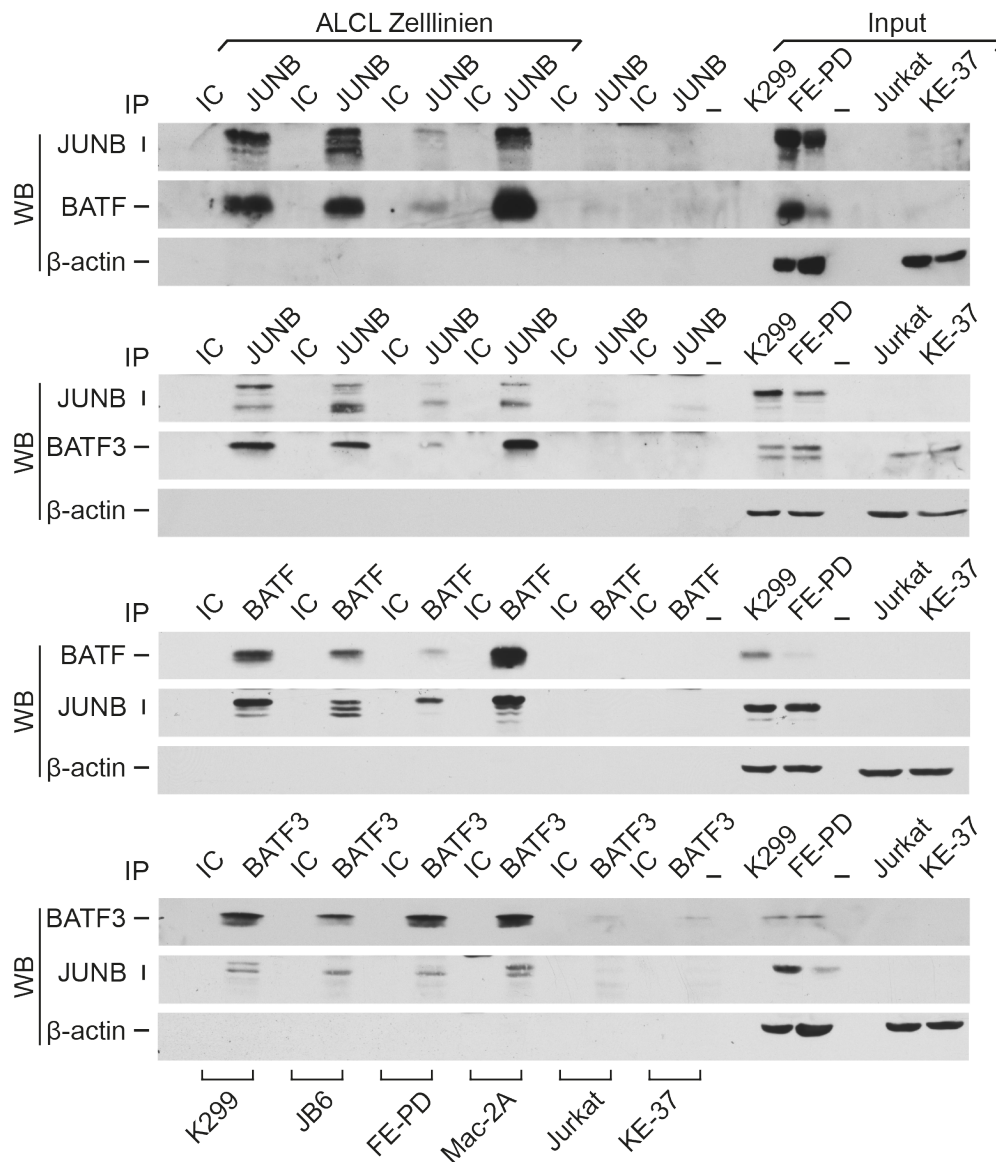
**Abb. 3.7: DNA-Bindungsaktivität von AP-1/IRF4-Komplexen in ALCL-Linien.** 3 µg Kernextrakt der ALCL und T-Zelllinien wurden im EMSA untersucht. Als radioaktiv-markierte DNA-Oligonukleotide wurden AICE-Bindungssequenzen sowohl mit als auch ohne Nukleotid-*Spacer* zwischen den IRF4- und AP-1-Bindungssequenzen, aus den Promotoren der Gene *CTLA4*, *IL12RB* und *BCL11B* verwendet. Das IRF-Motiv ist unterstrichen und das AP-1-Motiv fett dargestellt. Die zwischen der IRF- und AP-1-Bindungssequenz liegenden Basen sind grau gefärbt. Die Ansätze wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend radiographisch dargestellt. Das ungebundene DNA-Oligonukleotid (freie Probe) ist als Kontrolle dargestellt.

Um diese Vermutung bestätigen zu können und einen tieferen Einblick in das Zusammenspiel von AP-1 und IRF4 zu bekommen, wurden *Supershift*-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Kernextrakte von ALCL-Linien mittels EMSA und gegen AP-1-Faktoren und IRF4-gerichteten Antikörpern untersucht. Dabei konnte beispielhaft an der AICE\_BCL11b-Bindungssequenz in zwei ALK<sup>+</sup> (K299 und JB6) und zwei ALK<sup>-</sup> (FE-PD und Mac-2A) ALCL-Zelllinien nachgewiesen werden, dass die DNA-bindenden Komplexe aus FRA-2, JUNB, BATF, BATF3 und IRF4 bestehen. Die Bindungsaktivität von FRA-2 war schwächer im Vergleich zum klassischen TRE AP-1-Bindungsmotiv und zwischen den einzelnen Linien zeigte sich eine etwas unterschiedliche Bindungsaktivität von BATF und BATF3 (**Abb. 3.8**).



**Abb. 3.8: Zusammensetzung des AP-1/IRF4-Komplexes an der AICE-Bindungssequenz.** ALCL-Zelllinien wurden mittels *Supershift*-Analysen untersucht. Jeweils 3 µg Kernextrakt wurden mit verschiedenen Antikörpern (s. Abb. 3.2) und der AICE-Bindungssequenz des *BCL11B*-Promotors analysiert. Dabei dienten Ansätze ohne Antikörper und mit Isotyp-Antikörper (IgG), als Kontrollen. Der Komplex aus AP-1 und IRF4 ist als AP-1/IRF4 und der jeweilige *Supershift*-Komplex mit SS bezeichnet. Eine unspezifische Bande (n.s.) ist dargestellt.

Um mögliche Protein-Protein-Interaktionen von IRF4 und AP-1-Faktoren zu untersuchen, wurden Ko-Immünpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden jeweils zwei ALK<sup>+</sup> und zwei ALK<sup>-</sup> ALCL-Linien mit zwei T-Zelllinien verglichen. Die Ko-Immünpräzipitation von JUNB, dem nach Literaturlage Hauptinteraktionspartner von BATF-Faktoren<sup>173</sup>, zeigte, dass in den ALCL-Linien sowohl BATF als auch BATF3 mit JUNB direkt interagieren und einen heterodimeren Komplex bilden. (**Abb. 3.9**). Eine Ko-Immünpräzipitation mit IRF4 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.9: Interaktion von BATF oder BATF3 mit JUNB auf Proteinebene.** Gesamtproteinlysate von ALCL- und T-Zelllinien wurde mittels Ko-Immünpräzipitation (IP) untersucht. Dazu wurde jeweils ein spezifischer Antikörper gerichtet gegen JUNB, BATF oder BATF3 dem Lysat hinzugefügt, über Nacht inkubiert und danach gelektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wurde anschließend im Immunoblot mit Antikörpern gegen JUNB, BATF und BATF3 untersucht. Die Färbung gegen das jeweilige präzipitierte Protein, das Darstellen der unbehandelten Lysate (input) und des Immunoblots gegen  $\beta$ -actin dienten als Kontrollen. Das Erstellen dieser Blots wurde mit Hilfe von F. Hummel erstellt.

Zusammengefasst zeigten diese Experimente im ALCL eine direkt Interaktion von BATF bzw. BATF3 mit JUNB, sowie eine gemeinsame Bindung dieser AP-1-Faktoren zusammen mit IRF4 an entsprechende *composite*-Bindungssequenzen wie AICEs. Die funktionellen Konsequenzen dieser DNA-Bindungsaktivität werden im nächsten Abschnitt untersucht.

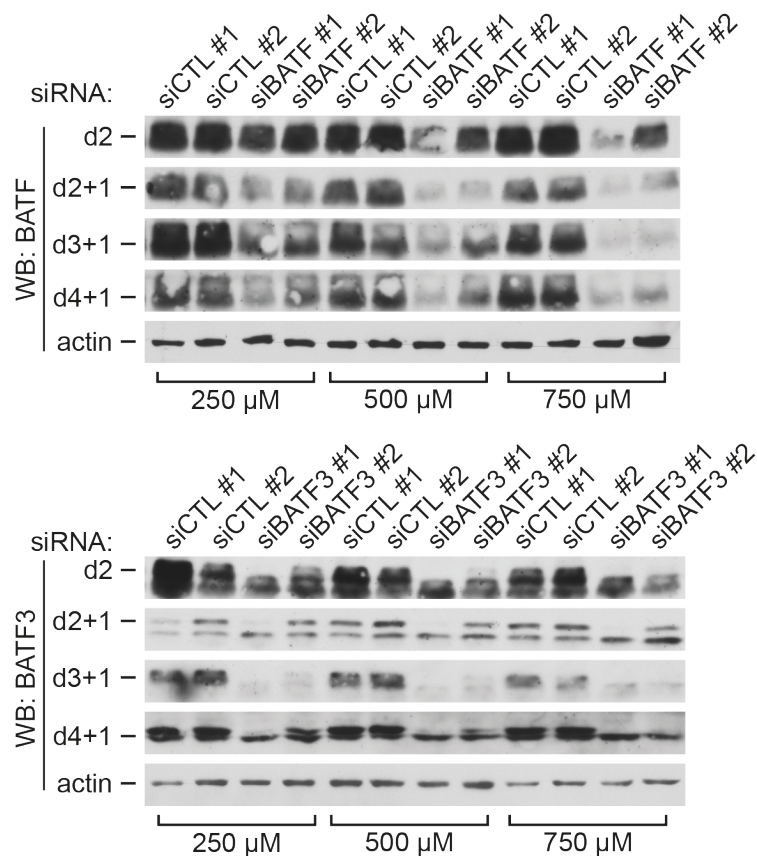
### 3.3 Funktionelle Charakterisierung von BATF/ BATF3/AP-1 in ALCL-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung von BATF und BATF3 im ALCL näher zu untersuchen, wurde ein knock-down auf mRNA-Ebene mit *small interfering RNA* (siRNA) ausgeführt. Hierfür wurden exemplarisch jeweils eine ALK+ (K299) und eine ALK- ALCL-Zelllinie (Mac-1) untersucht.

#### 3.3.1 Inhibition von *BATF* und *BATF3* mittels RNA-Interferenz

In diesem experimentellen Ansatz wurde die Expression von *BATF* und *BATF3* mithilfe von siRNAs gestört, um Einblicke in die biologische Relevanz dieser beiden Faktoren im ALCL zu erhalten.

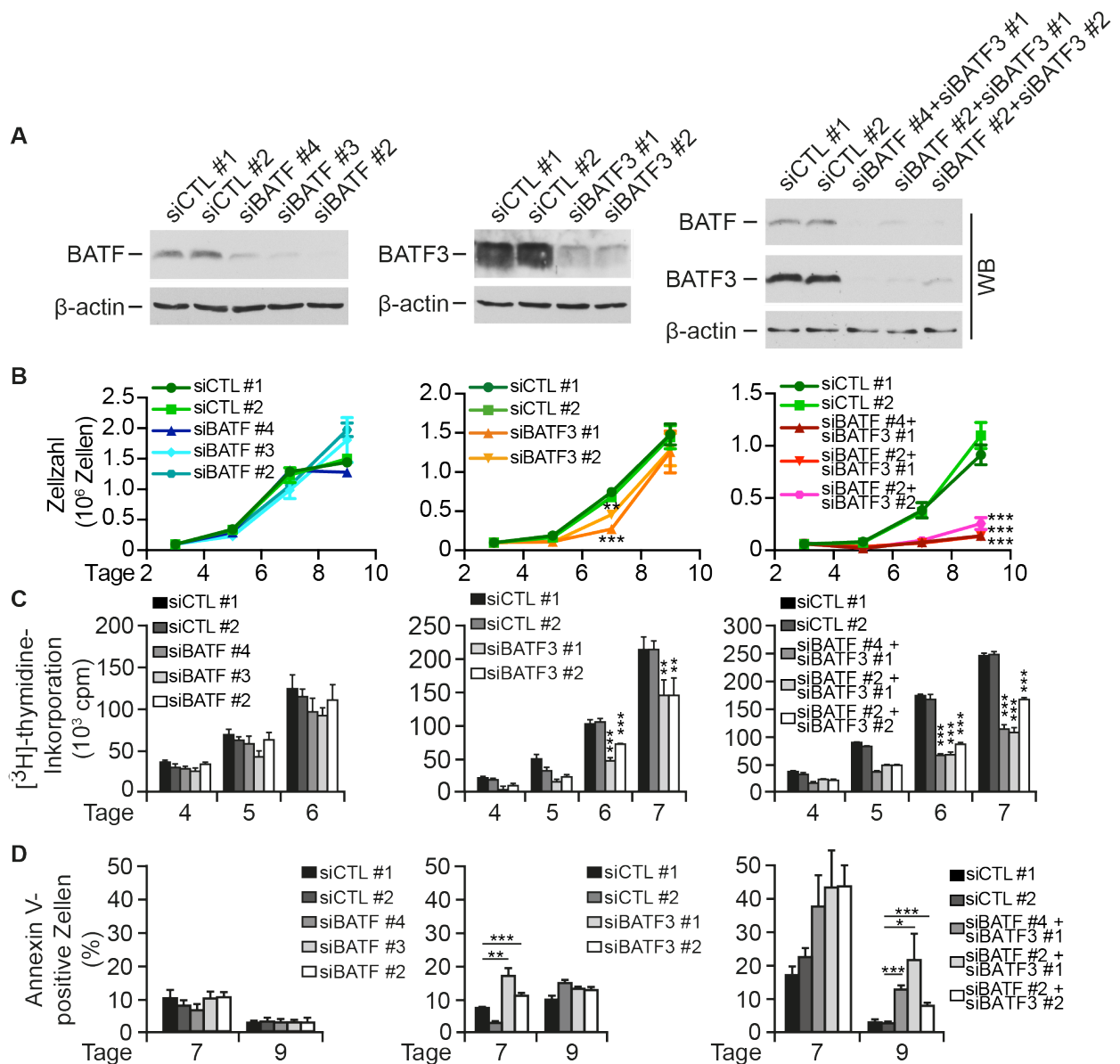
Zuerst wurden die ideale Menge und der beste Zeitpunkt der jeweiligen siRNA-Interferenzen auf die Proteinexpression bestimmt. Dazu wurden Mac-2A-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen der siRNAs über mehrere Tage inkubiert. Nach zwei bis fünf Tagen wurden die Zellen geerntet und nach Präparation von Gesamtproteinextrakten die Expressionsniveaus von BATF und BATF3 mittels Immunoblot analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Expression beider Proteine in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationsdauer der siRNA zwar nicht vollständig, aber gut inhibiert werden kann (**Abb. 3.10**).



**Abb. 3.10: Optimierung der siRNA-Interferenz zur Inhibition der Expression von *BATF* und *BATF3*.** Mac-2A-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen (250  $\mu$ M bis 750  $\mu$ M) von siRNAs gegen *BATF* (Blots oben) oder *BATF3* (Blots unten) über mehrere Tage inkubiert. Tag 0 ist hierbei der Start der siRNA-Zugabe und die Zahl hinter dem Plus (+1) beschreibt die Länge der Zeit der Zellkultur unter normalen Serumbedingungen nach siRNA Behandlung unter Serumentzug. Die Expression von *BATF* und *BATF3* wurde mittels Immunoblot analysiert. Die Analyse von  $\beta$ -actin diene als Kontrolle. Das Erstellen dieser Blots wurde mit Hilfe von S. Lusatis erstellt.

Mit für jede Linie optimierten Bedingungen (500  $\mu$ M bzw. 700  $\mu$ M siRNA; 3 Tage Inkubation mit 1 % FCS) wurden als nächstes die Effekte des knock-downs von *BATF* und *BATF3* allein oder in Kombination auf die ALCL-Zelllinien untersucht. Dafür wurden sowohl K299- als auch Mac-1-Zellen mit siRNAs gegen *BATF* und *BATF3* behandelt und nach dreitägiger Inkubationszeit hinsichtlich der Expression von *BATF* und *BATF3*, Proliferation und Apoptose analysiert. In K299-Zellen konnte der knock-down von *BATF* und *BATF3* sowohl im alleinigen als auch im kombinierten Ansatz im Western Blot bestätigt werden (**Abb. 3.11A**). Funktionell wurde die Proliferation der Zellen durch das Herunterregulieren von *BATF* alleine nicht und von *BATF3* nur leicht vermindert. Durch die Inhibition beider Gene hingegen konnte eine starke Hemmung der Proliferation sowohl in der Zellzahl als auch durch  $^3$ [H]-Thymidineinbau gezeigt werden (**Abb. 3.11B**

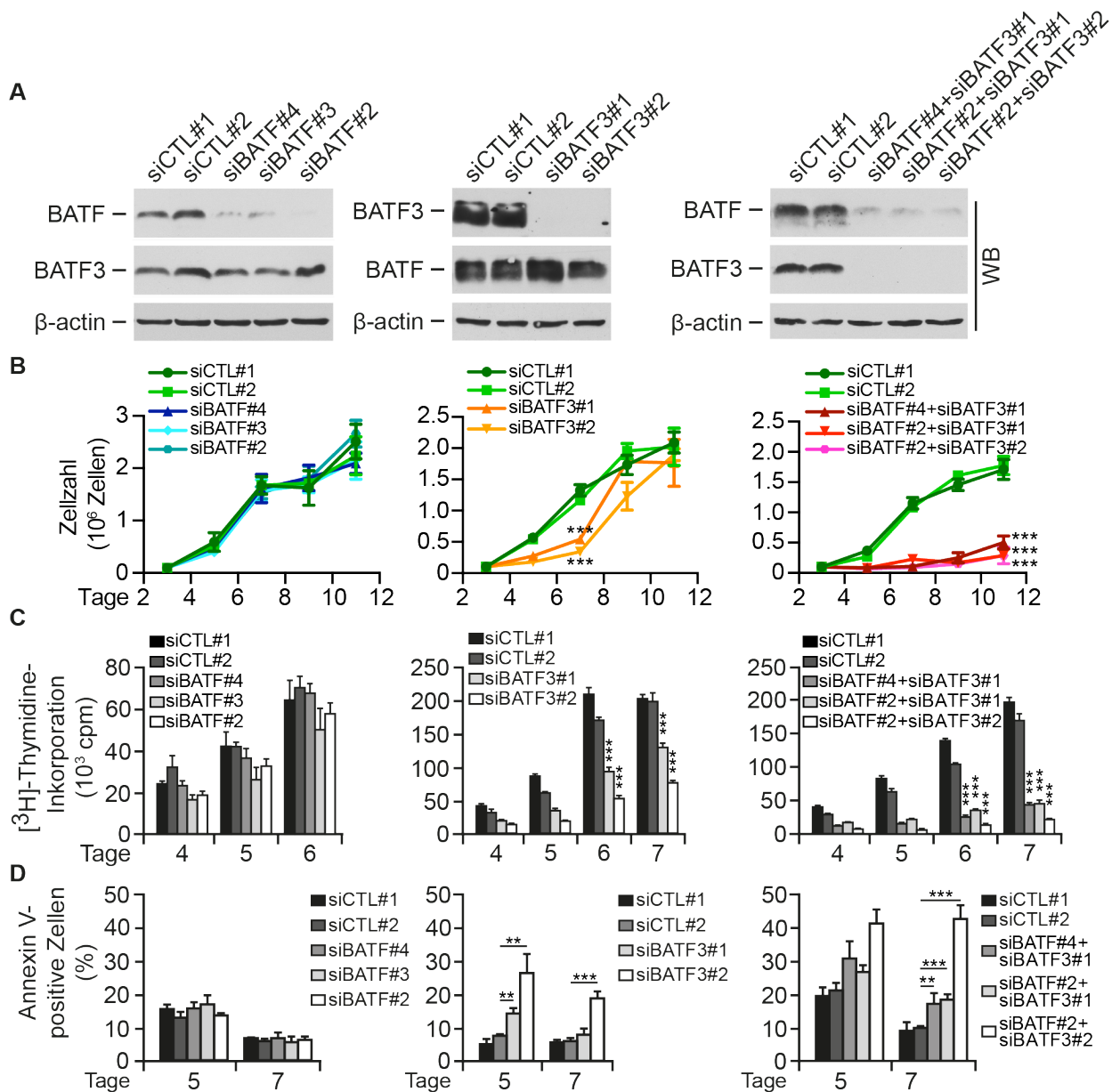
**und C).** Des Weiteren wurde die Apoptose-Induktion durch Färbung mit einem gegen Annexin-V-gerichteten Antikörper in der Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigte die gegen *BATF* gerichtete siRNA keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen, wohingegen die siRNA gegen *BATF3* eine leichte Zelltodinduktion nach sieben Tagen zeigte. Der kombinierte knock-down beider Proteine hatte eine höhere Apoptoserate zur Folge (**Abb. 3.11D**).



**Abb. 3.11: siRNA-Interferenz von *BATF* und *BATF3* führt zu Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion in K299-Zellen.** K299-Zellen wurden jeweils drei Tage mit jeweils 500  $\mu\text{M}$  Kontroll siRNAs (siCTL #1 und siCTL #2), mit siRNAs gegen *BATF* (siBATF #2, siBATF #3 und siBATF #4) oder *BATF3* (siBATF3 #1 und siBATF3 #2) oder in Kombination behandelt und anschließend weiterführende Experimente durchgeführt. **(A)** Die Reduktion der Expression von *BATF* und *BATF3* wurde mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern gegen *BATF* und *BATF3* am dritten Tag nach siRNA Zugabe untersucht. Die Analyse von  $\beta$ -actin diente als Kontrolle. **(B)** Am Tag 3 nach siRNA-Zugabe wurden 100.000 Zellen ausgesät und jeden zweiten Tag optisch mithilfe eines Mikroskops gezählt. Die Zellzahl der lebenden Zellen ist über die Zeit dargestellt. **(C)** Nach vier bis sieben Tagen nach Zugabe der siRNAs wurden die Zellen zusätzlich mit  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert und 24 h später der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in neu synthetisierte DNA vermessen. Der Thymidineinbau ist angegeben in counts per minute (cpm). **(D)** Die Zellen wurden am siebten bzw. neunten Tag nach siRNA-Zugabe durchflusszytometrisch auf Annexin-V-FITC / PI analysiert. Der Anteil Annexin-V-positiver Zellen aller gemessenen Zellen ist in Prozent angegeben. Es ist jeweils eines von drei Experimenten dargestellt. Alle statistischen Analysen wurden mit einem Welch-Test durchgeführt. \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$

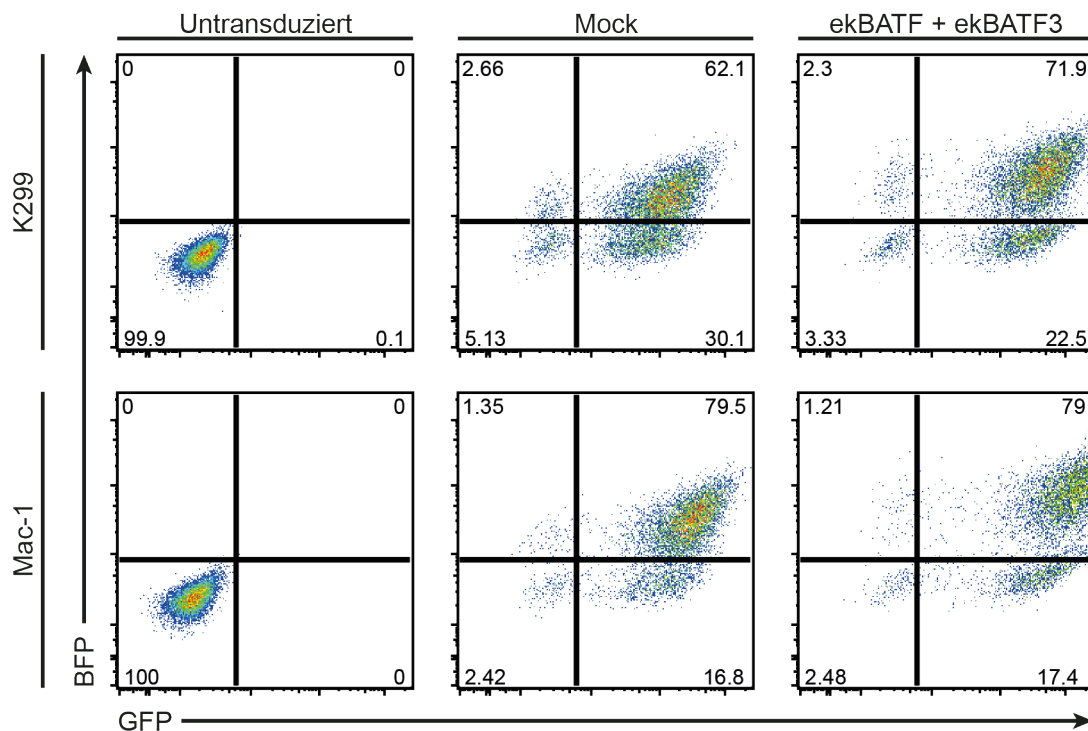
Die untersuchten Mac-1-Zellen gaben ein ähnliches Bild ab. Die Expression von *BATF* und *BATF3* alleine oder in Kombination konnte erfolgreich herunterreguliert werden (**Abb. 3.12A**). Der knock-down von *BATF* alleine zeigte keine signifikante Hemmung des Wachstums, wohingegen die Inhibition von *BATF3* ein leicht vermindertes Wachstum und eine leichte Apoptoseinduktion in den ersten Tag nach Transfektion aufwies. Der doppel-knock-down von *BATF* und *BATF3* dagegen hatte eine massive Wachstumseinschränkung mit einer stark verminderten Proliferation und starker Apoptoseinduktion zur Folge, was auf die funktionelle Bedeutung dieser beiden Proteine für das Überleben von ALCL-Zellen hinweist (**Abb. 3.12B-D**).





**Abb. 3.12: siRNA-Interferenz von *BATF* und *BATF3* führt zu Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion in Mac-1-Zellen.** Mac-1-Zellen wurden jeweils drei Tage mit jeweils 500  $\mu$ M bzw. 700  $\mu$ M Kontroll siRNAs (siCTL #1 und siCTL #2), mit siRNAs gegen *BATF* (siBATF #2, siBATF #3 und siBATF #4) oder *BATF3* (siBATF3 #1 und siBATF3 #2) alleine oder in Kombination behandelt und anschließend weiterführende Experimente durchgeführt. **(A)** Die Reduktion der Expression von *BATF* und *BATF3* wurde mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern gegen *BATF* und *BATF3* am dritten Tag nach siRNA Zugabe untersucht. Die Analyse von  $\beta$ -actin diente als Kontrolle. **(B)** Am Tag 3 nach siRNA-Zugabe wurden 100.000 Zellen ausgesät und jeden zweiten Tag optisch mithilfe eines Mikroskops gezählt. Die Zellzahl der lebenden Zellen über die Zeit ist dargestellt. **(C)** Nach vier bis sieben Tagen nach Zugabe der siRNAs wurden die Zellen zusätzlich mit [ $^3$ H]-Thymidin inkubiert und 24 h später der Einbau von [ $^3$ H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA vermessen. **(D)** Die Zellen wurden am fünften bzw. siebten Tag nach siRNA Zugabe durchflusszytometrisch auf Annexin V FITC / PI analysiert. Der Anteil Annexin-V-positiver Zellen aller gemessenen Zellen ist in Prozent angegeben. Es ist jeweils eines von drei Experimenten dargestellt. Alle statistischen Analysen wurden mit einem Welch-Test durchgeführt. \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$

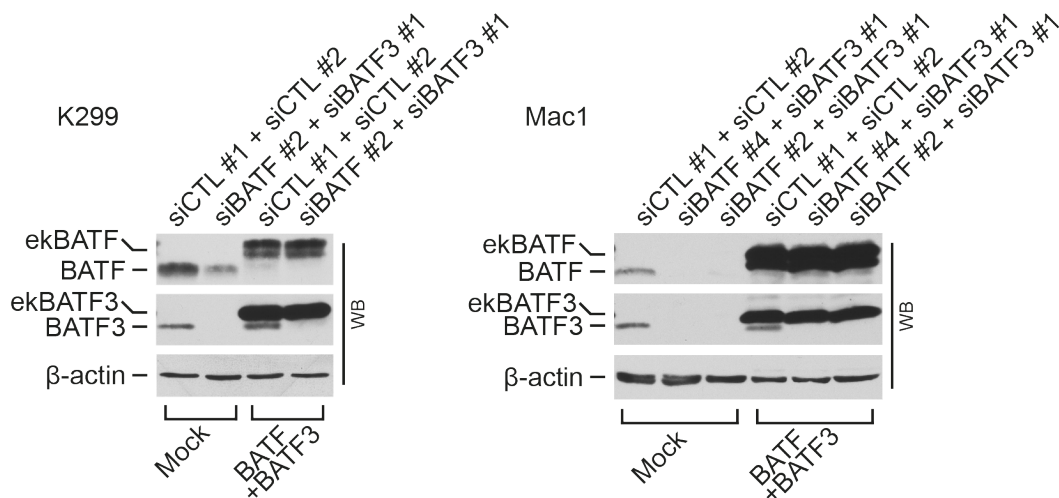
Dass die beobachtete Toxizität spezifisch für den knock-down von *BATF* und *BATF3* ist, wurde mithilfe von Zellen überprüft, in denen diese beiden Proteine parallel zum knock-down ektopt exprimiert wurden. Damit sollte geprüft werden, ob die ektope Expression von *BATF* oder *BATF3* die Effekte des jeweiligen knock-downs aufheben kann. Dafür wurden K299- und Mac-1-Zellen lentiviral mit ektoptem *BATF* und *BATF3* ausgestattet. Die Klonierungen der Vektoren wurden von Henrike Lisa Sczakiel durchgeführt. Die lentiviralen Vektoren wurden dabei so designed, dass die beiden Kandidatengene *BATF* und *BATF3* über ein P2A-Peptid mit jeweils GFP (*BATF*) oder BFP (*BATF3*) fusioniert sind. Dies erlaubte den prozentualen Anteil der transduzierten Zellen in der Durchflusszytometrie zu analysieren. Dabei zeigte sich eine sehr hohe Transduktionsrate der doppel-positiven GFP<sup>+</sup>BFP<sup>+</sup>-Zellen von bis 80% (**Abb. 3.13**).



**Abb. 3.13: Transduktionsrate von K299- und Mac-1-Zellen nach lentiviraler Transduktion.** K299- und Mac-1-Zellen wurden lentiviral mit einem Kontrollvirus (Mock) oder einem Virus, der für das humane *BATF* oder *BATF3* kodiert (ek*BATF* und ek*BATF3*), ausgestattet und anschließend durchflusszytometrisch auf die Expression der beiden Marker Proteine GFP (*BATF*) und BFP (*BATF3*) untersucht.

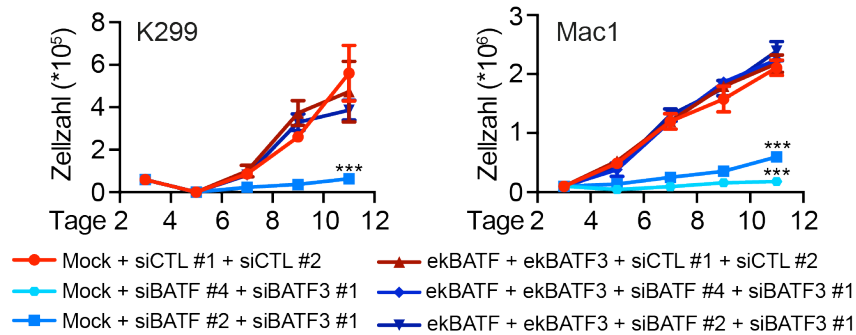
Im Western Blot sind vorteilhafterweise die ektopten Proteine daran zu erkennen, dass sie etwas größer als die endogenen Proteine sind, da das P2A-Peptid die Eigenschaft besitzt, sich selbst zu spalten, und dadurch einige Aminosäuren an den jeweiligen Teilen des nun gespaltenen Fusionsproteins angehängt bleiben. Die mit *BATF* und

*BATF3* ausgestatteten K299- und Mac-1-Zellen wurden - wie in Abb. 3.11 und 3.12. - mit siRNAs gegen *BATF* und *BATF3* behandelt. Dabei richteten sich die siRNAs gegen die in 5'-untranslatierten Bereiche der beiden Gene, so dass nur die endogenen, nicht aber die ekto-exprimierten Proteine herunterreguliert wurden. Die Transduktion der Zellen sowie die Interferenz der Proteine wurden im Western Blot überprüft. Dabei zeigte sich, dass nur die Expression der endogenen Proteine durch die siRNAs gehemmt wurde (**Abb. 3.14**).



**Abb. 3.14: Hemmung der endogenen, nicht aber der ektoen *BATF* und *BATF3*-Expression durch siRNA-Interferenz.** K299- und Mac-1-Zellen wurden lentiviral mit einem Kontrollvirus (Mock) oder einem Virus, der für das humane *BATF* oder *BATF3* kodiert (ek*BATF* und ek*BATF3*), ausgestattet und anschließend mit ungerichteten siRNAs (siCTL #1 und siCTL #2) oder einer Kombination aus siRNAs gegen *BATF* (si*BATF* #2 und si*BATF* #4) und *BATF3* (si*BATF3* #1) behandelt, die gegen den untranslatierten Bereich der jeweiligen mRNA gerichtet sind. Die ektope Expression und die siRNA-Interferenz von *BATF* und *BATF3* wurde mittels Western Blot analysiert. Die Analyse von  $\beta$ -actin diente als Kontrolle. Zu beachten ist die Herunterregulation der endogenen, nicht aber der ekto-exprimierten Proteine sowie das veränderte Laufverhalten von ekto exprimiertem *BATF* und *BATF3* aufgrund des fusionierten P2A-Rests nach entsprechender P2A-Spaltung.

Nachfolgend wurde das Wachstum dieser Zellen über die Zeit untersucht. Es zeigte sich, dass die Hemmung der Proliferation durch den gemeinsamen knock-down von *BATF* und *BATF3* komplett umkehrbar ist, wenn die Zellen vorher ekto mit *BATF* und *BATF3* ausgestattet wurden. Diese Zellen wiesen die gleiche Wachstumsgeschwindigkeit wie Zellen auf, die nur mit Kontroll-siRNAs behandelt wurden (**Abb. 3.15**).



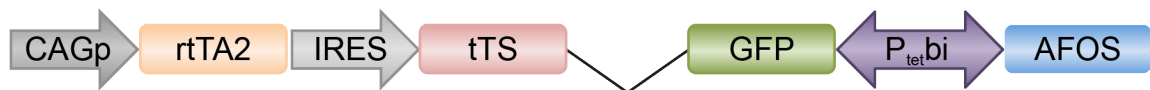
**Abb. 3.15: Ektope Expression von *BATF* und *BATF3* hebt die durch *BATF* und *BATF3* siRNA-Interferenz vermittelte Zelltoxizität in ALCL-Zellen auf.** 100.000 der in Abb. 3.19 beschriebenen Zellen wurden am Tag 3 nach siRNA-Zugabe ausgesät und jeden zweiten Tag optisch mithilfe eines Mikroskops nach Trypan-Färbung gezählt. Die Zahl lebender Zellen wurde über die Zeit dargestellt. Alle statistischen Analysen wurden mit einem Welch-Test durchgeführt. \*\*\*,  $P < 0,001$

Zusammengefasst konnte mit diesem System die Bedeutung von *BATF* und *BATF3* für das Wachstum und Überleben der Zellen belegt werden. Allerdings besteht der AP-1-Komplex nicht nur aus *BATF*- und *BATF3*-Proteinen, sondern aus vielen verschiedenen Transkriptionsfaktoren und der knock-down einzelner Faktoren ist für die Aktivität des Gesamtkomplexes oft schwer zu beurteilen. Deshalb wurde im nächsten Schritt ein weiteres System genutzt, um die AP-1-Aktivität global zu blockieren.

### 3.3.2 Induzierbare Inhibition von AP-1 mittels A-Fos

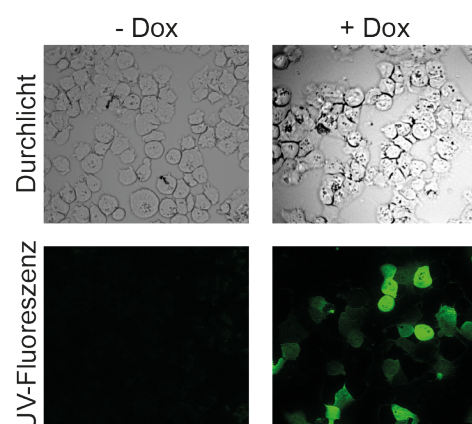
Einige AP-1-Mitglieder können sich teilweise gegenseitig ergänzen oder ersetzen und sind häufig, wie auch im Fall des ALCL, gleichzeitig exprimiert. Daher kann die vollständige Inhibition von AP-1 dem knock-down einzelner Faktoren im Hinblick auf die Analyse biologisch relevanter Konsequenzen überlegen sein. Für die folgenden Experimente wurde deshalb ein Ansatz gewählt, bei dem nicht nur ein bestimmter AP-1-Faktor herunterreguliert, sondern die gesamte AP-1-Aktivität mithilfe eines dominant-negativen Inhibitors gehemmt wird. Dieser Inhibitor, A-Fos, besitzt eine ähnliche Struktur wie andere AP-1-Faktoren und enthält die für die Dimerisierung essentielle *leucine zipper* (bZIP)-Domäne des FOS-Proteins. Im Gegensatz zu FOS wurde aber die basische DNA-Bindungsdomäne gegen eine saure, amphipatische Sequenz ausgetauscht. So kann A-Fos zwar weiterhin über die bZIP-Domäne Heterodimere mit JUN- und anderen AP-1-Proteinen eingehen, aber die saure Sequenz interagiert mit der basischen DNA-Bindungsdomäne anderer AP-1-Faktoren und stabilisiert diesen Komplex, so dass das Heterodimer nicht mehr an die DNA binden kann<sup>186</sup>.

Um die Auswirkungen der AP-1-Inhibition direkt untersuchen zu können, wurde ein Tetrazyklin-induzierbares Genexpressions-System (pRTS) gewählt (LIT), in dem das *gene of interest* nur in Anwesenheit von Tetrazyklin (Tet) exprimiert wird. Die Tet-Abhängigkeit der Zielgenexpression wird dadurch erreicht, dass sowohl ein Tet-kontrollierter Aktivator der Transkription (rtTA) und ein Tet-kontrollierter Repressor der Transkription (tTS) gleichzeitig aktiv sind und nur in Anwesenheit von Doxyzyklin der rtTA/tTS-abhängigen Promoter ( $P_{tet,bi}$ ) aktiviert wird<sup>187</sup>. Da dieser Promotor eine bidirektionale Ausrichtung hat, kann die Expression des Zielgens mit einem in äquimolarer Menge exprimierten Reporter kontrolliert werden. In diesen Vektor wurde der Inhibitor A-Fos hineinkloniert (pRTS\_AFos) und als Reporter diente GFP (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Aufbau des Tetrazyklin-induzierbaren A-Fos-Expressionsvektors.** Der durch Tet kontrollierte Aktivator der Transkription (rtA2) ist ebenso wie der durch Tet kontrollierte Repressor der Transkription (rTS) unter die Kontrolle des Chiken  $\beta$ -actin Promotors (CAGp) gestellt. Dabei ist rTS über eine internal ribosomal entry site (IRES) verbunden. Der bidirektionale rtTA/tTS-abhängige Promotor ( $P_{tet,bi}$ ) kontrolliert sowohl die Expression von A-Fos als auch die von GFP und ist nur in Anwesenheit von Tet aktiv.

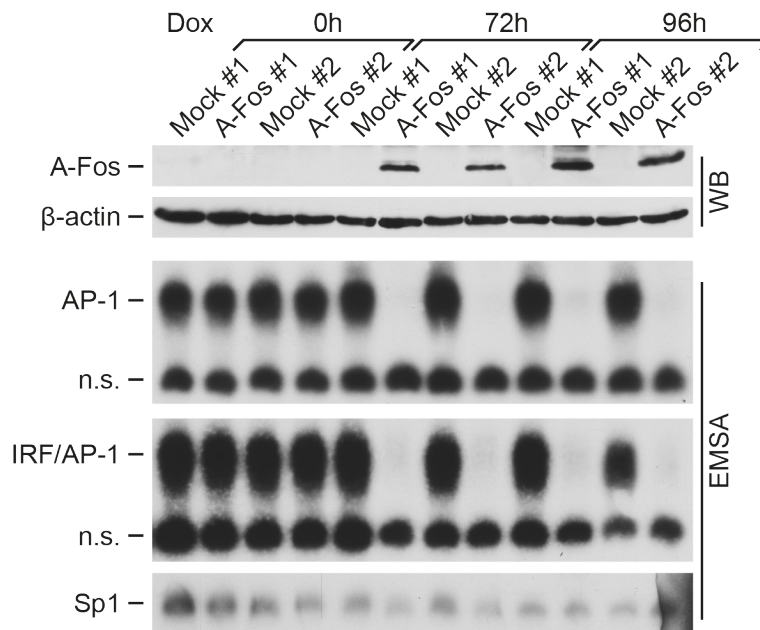
Die erfolgreiche Transfektion von Zellen als auch die Tet-Induzierbarkeit des Vektors mit dem Nachweis von GFP konnte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden. Die Effizienz der Transfektion betrug dabei in etwa 50% (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Induktion von GFP nach Stimulation mit Doxyzyklin.** Mit pRTS\_A-Fos transfizierte FE-PD-Zellen wurden 48 Stunden nach Doxyzyklin-Behandlung geerntet, auf einen Träger aufgebracht und mittels Durchlicht-Mikroskopie (oben) oder mittels Fluoreszenz-Mikroskopie auf das Vorhandensein GFP-positiver Zellen untersucht (unten).

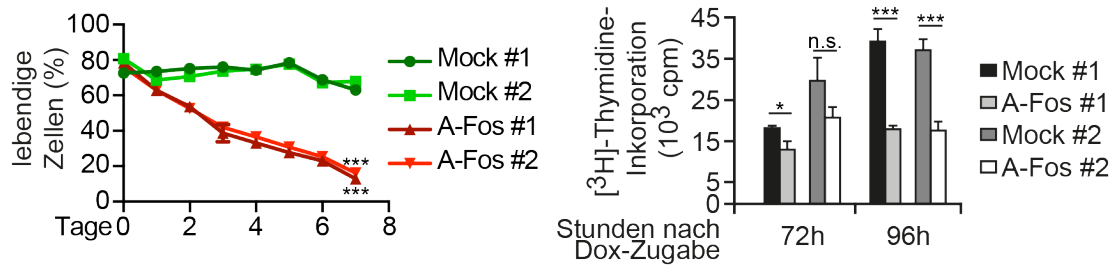
Für die folgenden Experimente wurden FE-PD-Zellen mit dem pRTS-Vektor entweder mit A-Fos oder einer Leervariante (Mock) als Negativkontrolle transfiziert. Nach zweiwöchiger Selektion mit Hygromycin wurden die Zellen mit Doxyzyklin stimuliert und GFP-positive Zellen nach 72 bzw. 96 Stunden durchflusszytometrisch aufgereinigt. Anschließend wurde ein Teil der Zellen geerntet und hinsichtlich der Expression von A-Fos sowie der AP-1-Aktivität untersucht. Der andere Teil der Zellen wurde mit Hinblick auf die Proliferation und das Überleben analysiert.

Die Analyse von Gesamtzellextrakten im Western Blot zeigte, dass nach 72-stündiger Doxyzyklin-Stimulation A-Fos in den zwei gezeigten Ansätzen gut exprimiert wurde. Nach 96-stündiger Induktion zeigte sich eine noch stärkere Expression. In unstimulierten Zellen konnte dagegen A-Fos nicht nachgewiesen werden. Mittels EMSA konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Doxyzyklin und der daraus folgenden Expression von A-Fos sowohl die AP-1- als auch die AP-1/IRF4-Bindungsaktivität komplett inhibiert wird. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen 72 oder 96 Stunden stimuliert wurden. Somit zeigt dieses System zum einen eine hervorragende Induzierbarkeit von A-Fos, zum anderen eine komplette Inhibition der AP-1-Aktivität allein und mit seinem Kooperationspartner IRF4 (**Abb. 3.18**).



**Abb. 3.18: Die Expression von A-Fos führt zu einem totalen Verlust der konstitutiven AP-1-Aktivität.** FE-PD-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Tet-abhängigen A-Fos Vektor (A-Fos) oder einem Kontrollvektor (Mock) ausgestattet und 72 bzw. 96 Stunden mit Doxyzyklin induziert. Anschließend wurden die Gesamtzell-extrakte dieser Zellen auf die Expression von A-Fos im WB analysiert. Die Analyse von  $\beta$ -actin diente als Kontrolle. Dieselben Gesamtzell-extrakte wurden mittels EMSA auf die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 und AP-1/IRF4 Komplexen untersucht. Hierfür wurden die TRE-site und die AICE\_Bcl11b-site verwendet. Die Analyse von Sp1 diente als Kontrolle. Zwei unabhängige Experimente (#1 und #2) sind gezeigt. Das Erstellen dieser Blots wurde mit Hilfe von S. Lusatis erstellt.

Im Folgenden wurden die Effekte der A-Fos-vermittelten AP-1-Inhibition auf die Proliferation und das Überleben der FE-PD-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich ein starker Wachstumsarrest in den A-Fos-stimulierten Zellen schon nach einem Tag. Die Analysen nach 96-stündiger Doxyzyklin-Behandlung zeigten dabei ausgeprägteren Effekt. PI-Färbungen und anschließende *fluorescence-activated cell sorting-* (FACS-) Analysen über Zeit zeigten eine starke Toxizität durch A-Fos, die das Überleben der Zellen massiv beeinträchtigt (**Abb. 3.19**).



**Abb. 3.19: Der Verlust der AP-1-Aktivität führt zu Zelltod und Wachstumsarrest im ALCL.** FE-PD-Zellen, ausgestattet mit dem Tet induzierbarem A-Fos Expressions- oder einem Kontroll-Vektor (Mock), wurden 72 Stunden nach Doxyzyklin Induktion auf lebende, GFP positive Zellen durchflusszytometrisch angereichert und täglich die Zellviabilität nach PI Färbung mittels Durchflusszytometer gemessen und über die Zeit dargestellt (links). 48 Stunden nach Anreicherung (nach 72 bzw. 96 Stunden Induktion mit Doxyzyklin) wurden die Zellen mit <sup>3</sup>[H]-Thymidin inkubiert und 24 h später der Einbau von <sup>3</sup>[H]-Thymidin in neu synthetisierte DNA vermessen. Zwei unabhängige Experimente (#1 und #2) sind gezeigt. Alle statistischen Analysen wurden mit Welch-Test durchgeführt. \*\*,  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0,001$ ; n.s., nicht signifikant

Zusammengefasst wurde bisher gezeigt, dass ALCL-Zellen ohne die konstitutive Aktivität von BATF und BATF3 oder von AP-1 nicht überleben können und das Zellwachstum massiv eingeschränkt ist. Im Folgenden wurden mögliche Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren im ALCL untersucht.

### 3.4 ALCL zeigt eine Expression von Genen, die typisch für TH17- oder *type 3 innate lymphoid cells (ILC3)* sind

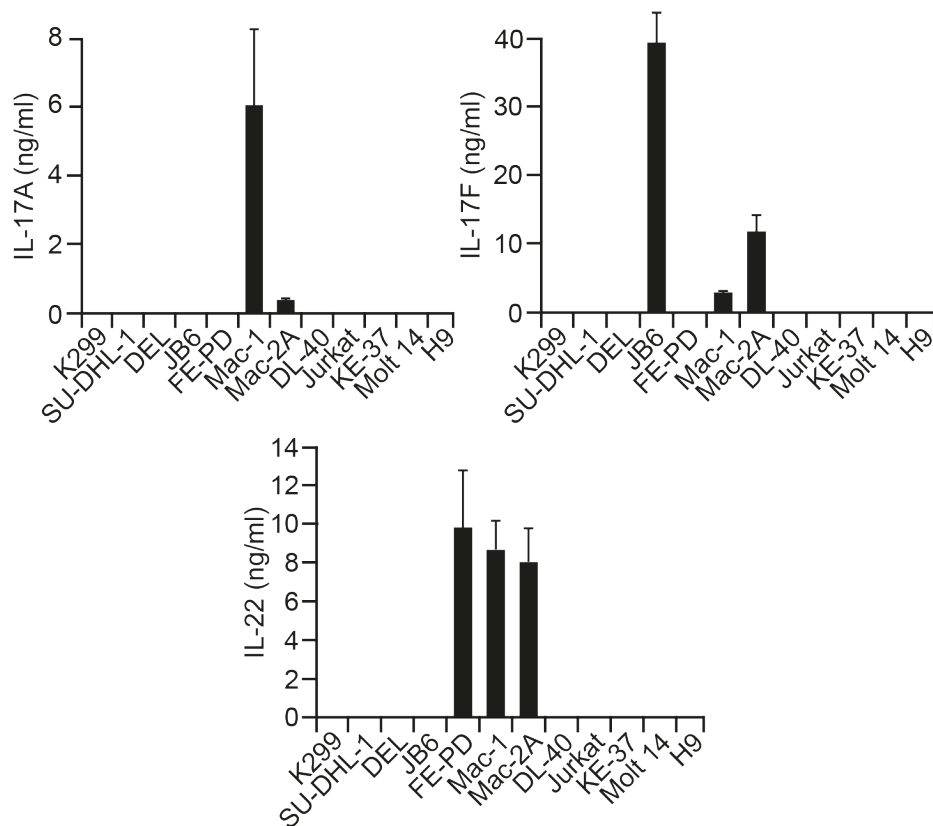
Da bisher gezeigt werden konnte, dass die AP-1-Faktoren BATF und BATF3 im ALCL exprimiert sind und konstitutiv in ALCL-Zellen an spezifische DNA-Bindungsstellen binden sowie das Ausschalten dieser Gene zu Wachstumsarrest und Zelltod führt, wurde nach möglichen Zielgenen dieser Transkriptionsfaktoren gesucht.

Wie schon in der Einleitung beschrieben bilden BATFs Heterodimere mit JUN-Proteinen<sup>173</sup>. In der Literatur werden diese Komplexe zusammen mit STAT3 und IRF4 als Schlüsselregulatoren in der TH17-Zelldifferenzierung beschrieben<sup>171</sup>. Da neben den gezeigten Proteinen auch STAT3 und IRF4 im ALCL stark exprimiert und aktiviert sind<sup>70,188</sup>, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ALCL-Zellen eine Expression von TH17-Markergenen aufweisen.

Um eine solche Genexpression nachzuweisen, wurden die TH17/ILC3-spezifischen Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-22 mittels *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) analysiert. Dafür wurden Überstände von den ALCL- und T-Zelllinien nach 48 Stunden Inkubationszeit abgenommen und untersucht. Hierbei zeigte sich für IL-17A,



dass die Linien Mac-1 und Mac-2A dieses Zytokin sezernieren. Ein ähnliches Bild zeigte sich für IL-17F, da es in den Überständen der Zellen JB6, Mac-1 und Mac-2A detektiert werden konnte. Auch das für ILC3-Zellen typische Zytokin IL-22 konnte in den Linien FE-PD, Mac-1 und Mac-2A nachgewiesen werden (**Abb. 3.20**).

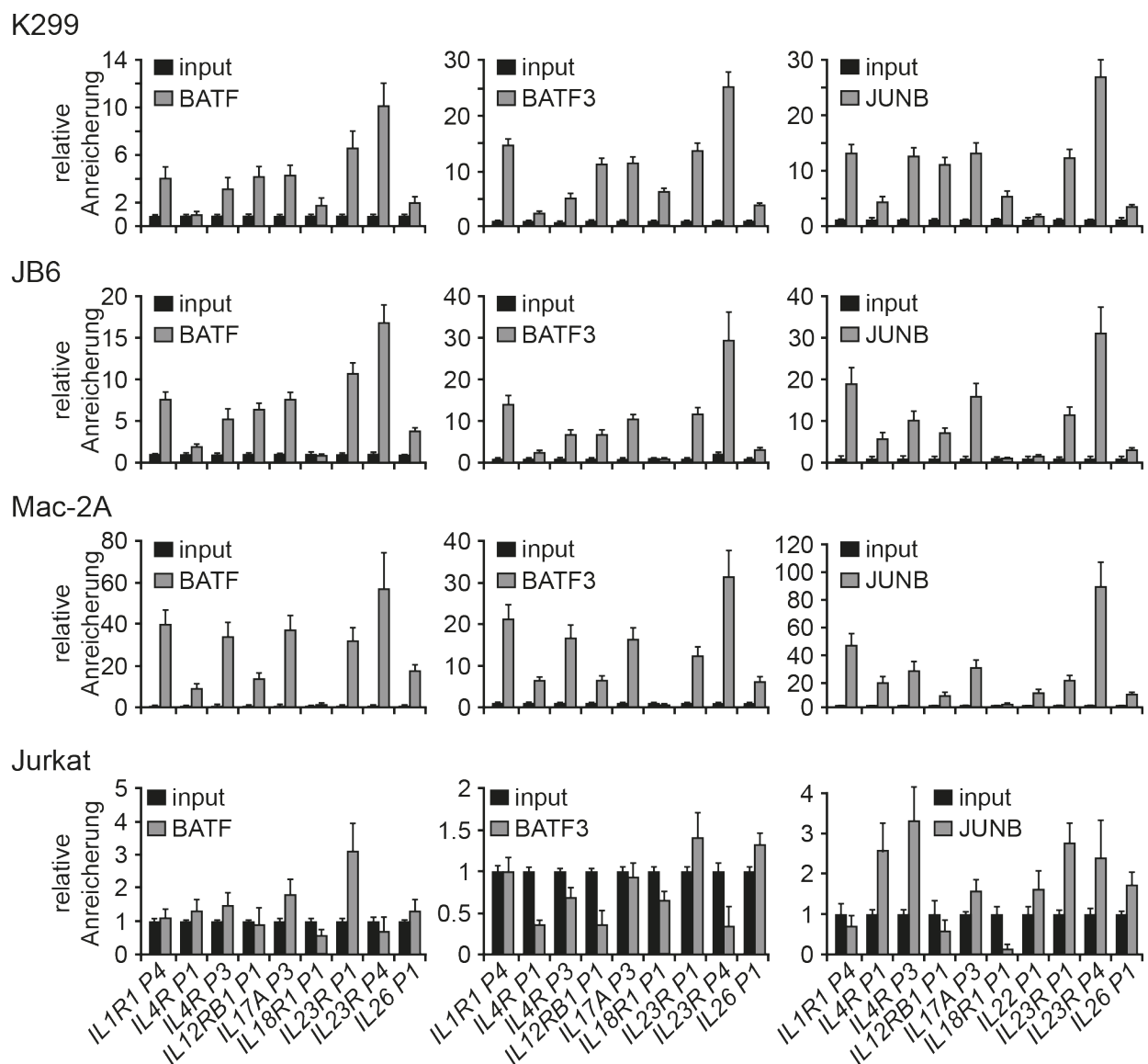


**Abb. 3.20 ALCL-Zellen sezernieren zum Teil IL-17A, IL-17F und IL-22.** Die Überstände von ALCL- (K299, SU-DHL-1, DEL, JB6, FE-PD, Mac-1, Mac-2A, DL-40) und T-Zelllinien (Jurkat, KE-37, Molt-14, H9) wurden mittels ELISA auf die Sekretion von IL-17A, IL-17F und IL-22 untersucht. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

### 3.5 Regulation der TH17/ILC3-Gene durch BATF und BATF3

In meiner Arbeitsgruppe konnte neben den genannten Zytokinen nachgewiesen werden, dass ALCL-Zellen in der globalen Analyse von Genexpressionsprofilen eine Gensignatur für TH17-Zellen sowie, noch ausgeprägter, für ILC3-Zellen besitzen<sup>189</sup>. Somit konnte bis hierher eine starke Expression und Aktivität des AP-1/BATF/BATF3/IRF4-Moduls sowie die Expression TH17-/ILC3-spezifischer Gene nachgewiesen werden, nicht aber deren Abhängigkeit voneinander. Um einen Hinweis auf eine direkte Regulation der TH17/ILC3-Gene durch BATF- und BATF3-TF zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit Eva Kärgel und Linda von Hoff aus der

Arbeitsgruppe von Claus Scheidereit am MDC Berlin Chromatin-Immunpräzitationen (ChIP)-Analysen von BATF, BATF3 und JUNB durchgeführt. Dafür wurden die drei ALCL-Linien K299, JB-6 und Mac-2A und als Kontrolle die T-Zelllinie Jurkat mit entsprechenden Antikörpern untersucht. Diese Analysen erbrachten den Nachweis einer spezifischen DNA-Präzitation von Promotor- oder Enhancer-Regionen der Gene für *IL1R1*, *IL4R*, *IL12RB*, *IL17A*, *IL18R1*, *IL22*, *IL23R* und *IL26* mittels Antikörper gegen BATF, BATF3 und JUNB in allen ALCL-Linien, die in den Jurkat-Zellen nicht gesehen werden konnte (**Abb. 3.21**).



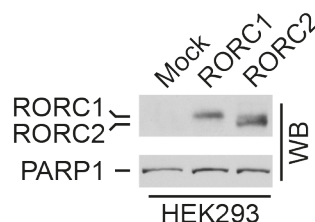
**Abb. 3.21: BATF und BATF3 binden an Promotor- und Enhancerregionen von TH17- und ILC3-assoziierten Genen.** Chromatinimmunopräzitationen (ChIP) von K299-, JB6-, Mac-2A- und Jurkat-Zellen. Der Input und die mit Antikörpern gegen BATF, BATF3 und JUNB präzipitierte DNA wurden mittels qPCR mit spezifischen Primern für die Promotor- oder Enhancerregionen der genannten Gene analysiert. Die Daten von zwei Experimenten wurden kombiniert und der Mittelwert  $\pm$  SEM ist gezeigt.

Auch wenn man mit diesen ChIP-Analysen keine funktionellen Aussagen über eine entsprechende Genregulation treffen kann, da die ChIP-Analysen nur den Nachweis einer Bindung eines TF an eine regulatorische DNA-Region erbringen, passen sie gut zu einer BATF-/BATF-vermittelten Regulation dieser Gene. Diese konnte in meiner Arbeitsgruppe auch nachgewiesen werden<sup>189</sup>.

In der abschließenden Versuchsreihe soll ein weiterer Marker der TH17- bzw. ILC3-Zellen in ALCL-Zellen untersucht werden.

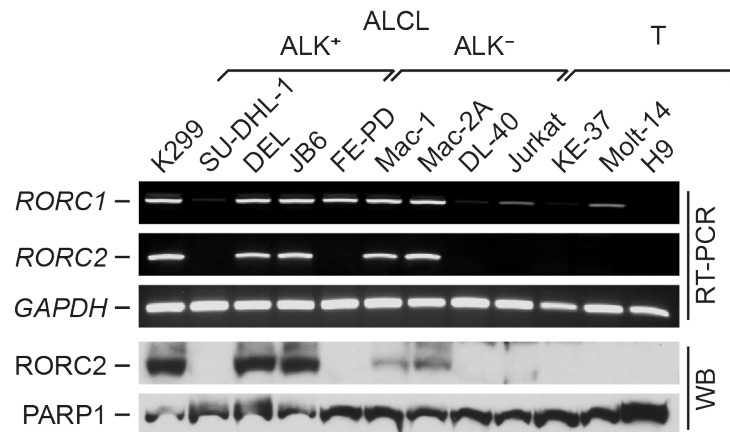
### 3.6 RORC2 als mögliches therapeutisches Ziel im ALCL

RORC2 ist einer der Schlüsselfaktoren für die Differenzierung von TH17- und ILC3-Zellen<sup>177</sup>. Dieser Transkriptionsfaktor gehört zur Gruppe der *nuclear orphan receptors*, zu der auch RORC1 gehört. Da beide Faktoren große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und sich nur in einer kurzen alternativen 5'-Kodierungssequenz unterscheiden, die auf Proteinebene einen Unterschied im N-Terminus von drei Aminosäuren ausmacht, gibt es keine verfügbaren RORC2-spezifischen Antikörper. Daher wurde als erstes getestet, ob beide Proteine im Immunoblot zu unterscheiden sind. Dafür wurden Expressionsplasmide für *RORC1* und *RORC2* generiert und in HEK293-Zellen transfiziert. Die Analyse von Gesamtzellextrakten dieser Zellen mittels WB bestätigte, dass RORC2 ein um etwa 2 kDa kleineres Molekulargewicht besitzt und beide Proteine eindeutig identifiziert werden können (**Abb. 3.22**). Genutzt wurde für die Detektion ein von Dan Littman (New York) freundlicherweise überlassener Antikörper.



**Abb. 3.22: Die unterschiedliche Größe von RORC-Isoformen RORC1 und RORC2 können im WB unterschieden werden.** HEK293-Zellen wurden mittels Elektroporation mit einem Kontrollplasmid (Mock) oder Plasmiden, die für *RORC1* oder *RORC2* kodieren, transfiziert. 30 µg Kernextrakt dieser Zellen wurde anschließend im WB mit einem Antikörper, der sowohl RORC1 als auch RORC2 erkennt<sup>190</sup>, untersucht. Die Analyse von PARP1 diente als Kontrolle.

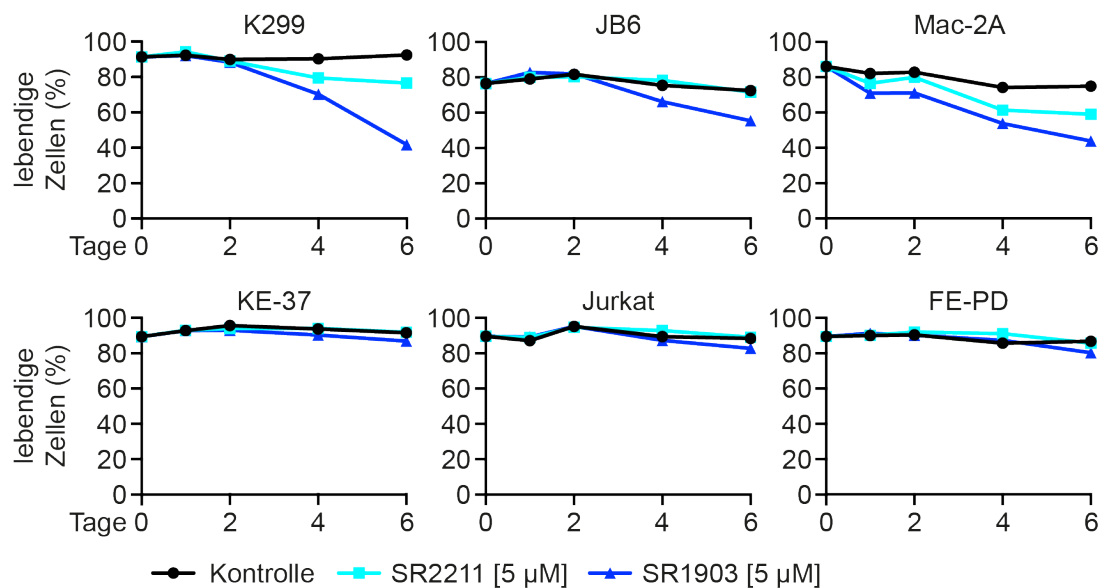
Im nächsten Schritt wurden die ALCL-Linien hinsichtlich ihrer Expression von *RORC* auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. *RORC1* ist zwar auch in den T-Zelllinien exprimiert, allerdings deutlich stärker in den ALCL-Zelllinien. Zudem konnte in fünf der acht ALCL-Linien eine *RORC2*-Expression nachgewiesen werden. Lediglich in SU-DHL-1, FE-PD und DL-40 zeigte sich keine *RORC2*-Expression. Auch keine der T-Zelllinien zeigte eine Expression von *RORC2*. Um dieses Ergebnis auch auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Gesamtzellextrakte dieser Zellen in WB Analysen untersucht. Dabei konnte das Bild der RT-PCR und damit die Expression von *RORC2* in den fünf ALCL-Linien bestätigt werden (**Abb. 3.23**). Zusammengefasst wurde damit das ALCL als erstes *RORC2*-exprimierendes Lymphom identifiziert.



**Abb. 3.23: ALCL-Zelllinien exprimieren RORC2.** Oben: Die cDNA von ALCL- und T-Zelllinien wurde mit spezifischen Primern für *RORC1* und *RORC2* mittels RT-PCR untersucht. Die Analyse von *GAPDH* diente als Kontrolle. Unten: 30 µg Kernextrakte der Linien wurden im WB mit einem spezifischen Antikörper für RORC untersucht. Die Analyse von PARP1 diente als Ladekontrolle.

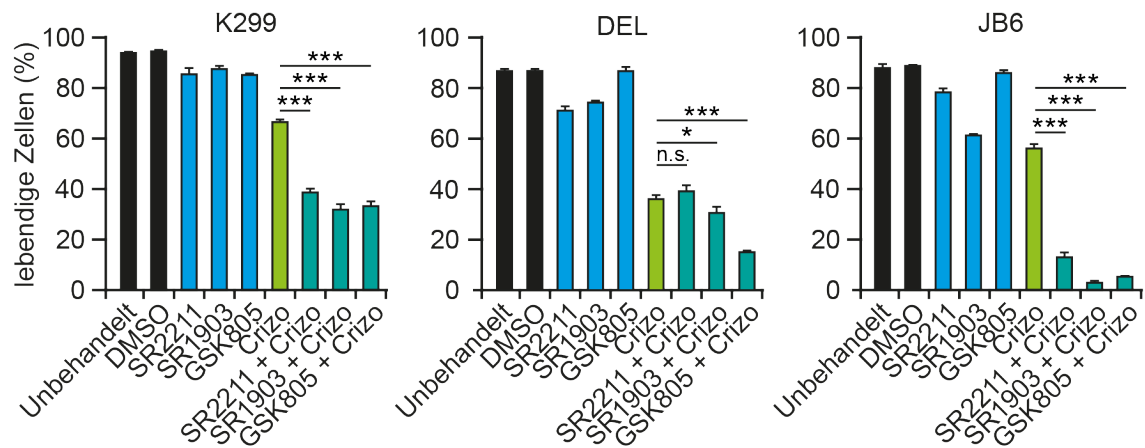
Gegen die Mitglieder der RORC-Familie wurden Inhibitoren und negative Modulatoren entwickelt<sup>191,192</sup>. Um *RORC2* als mögliches therapeutisches Ziel im ALCL zu identifizieren, wurden ALCL- und T-Zelllinien mit den RORC-Inhibitoren SR2211 und SR1903 behandelt, die freundlicherweise von Patrick Griffin (Florida) überlassen wurden. Die ALCL-Zelllinien K299, JB6 und Mac-2A zeigten unter Behandlung mit den Inhibitoren im Vergleich zu den Kontrollen eine über die Zeit verringerte Viabilität. Dagegen konnte kein Effekt auf Zellen festgestellt werden, die keine oder nur eine geringe RORC-Expression haben. KE-37-Zellen mit fehlender und Jurkat-Zellen mit nur geringer RORC-Expression sowie FE-PD-Zellen mit starker RORC-1 aber fehlender

RORC2-Expression wurden durch die Inhibitoren in ihrem Überleben nicht beeinflusst (**Abb. 3.24**).



**Abb. 3.24: Inhibition von RORC2 mithilfe von kleinemolekularen Modulatoren induziert Zelltod in ALCL.** Drei Zelllinien, die RORC2 exprimieren (K299, JB6 und Mac-2A), wurden ebenso wie drei RORC2 negative Linien (KE-37, Jurkat, FE-PD) mit 5 µM der RORC Inhibitoren SR1903 und SR2211 oder der DMSO-Kontrolle behandelt und die Zellviabilität wurde nach Färbung mit PI durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil lebender Zellen der Gesamtpopulation ist über die Zeit dargestellt. Eines von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Für das ALK+ ALCL gibt es mit dem ALK-Tyrosinkinase-Inhibitor Crizotinib prinzipiell eine wirksame Therapieoption<sup>34</sup>, die offensichtlich aber nicht zu einer Lymphomeradikation und dauerhafter Heilung der ALCL-Patientin führt<sup>37</sup>. Es wurde deshalb eine Einzel- oder Kombinationsbehandlung mit Crizotinib und/oder RORC-Inhibitoren in den ALCL-Zellen getestet, die sowohl ALK+ sind als auch RORC2 exprimieren. Für diese Experimente kamen somit K299-, DEL- und JB6-Zellen in Frage. Crizotinib und die RORC-Inhibitoren SR221, SR1903 und GSK805 wurden dabei in Konzentrationen eingesetzt, die für sich allein nur eine geringe Letalität auf die Zellen besitzen. Die Kombination von sowohl ALK- als auch RORC-Inhibitor zeigte dabei eine deutliche Steigerung der Letalität gegenüber den Ansätzen mit nur einem Wirkstoff (**Abb. 3.25**).



**Abb. 3.25: Die Kombination von RORC2-Inhibitoren mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib führt zu gesteigertem Zelltod von ALCL-Zellen.** Die ALK+ Zelllinien K299, DEL und JB6 wurden jeweils mit 7,5  $\mu$ M RORC Inhibitor (SR1903, SR2211 oder GSK805) oder 25 nM Crizotinib (Crizo) alleine oder in Kombination behandelt. Nach Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil lebender Zellen an der Gesamtpopulation am Tag 2 der Behandlung ist gezeigt. Die Experimente wurden im Triplikate durchgeführt, gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Eines von drei identischen Experimenten ist dargestellt. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$

Zusammenfassend beschreibt dieser Abschnitt in einem Teil der ALCL-Zellen den Nachweis des TH17/ILC3-spezifischen Transkriptionsfaktors RORC2, dessen alleinige Inhibition zur moderaten Zelltodinduktion führt und dessen Inhibition der Wirkung einer ALK-Inhibition deutlich verstärkt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einführung

Transkriptionsfaktoren und deren Netzwerke spielen in hämatopoietischen Neoplasien eine entscheidende Rolle, da die Deregulierung dieser eng kontrollierten Netzwerke mit der Entstehung verschiedener Leukämien und Lymphome assoziiert ist<sup>193,194</sup>. Das ALCL ist eines der Beispiele für eine lymphatische Neoplasie mit einer Vielzahl von spezifisch deregulierten Transkriptionsfaktoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivität und die Zusammensetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 im ALCL näher charakterisiert und dessen Auswirkung auf das Wachstum und Überleben in ALCL-Zellen beschrieben. Dabei konnten den zur AP-1-Familie zugehörigen Proteinen BATF und BATF3 eine zentrale Rolle in diesem Transkriptionsfaktorkomplex zugeordnet und frühere Studien zu AP-1 im ALCL bestätigt werden<sup>73-75</sup>. Zudem wurde eine Kooperation dieser Proteine mit IRF4 nachgewiesen und verschiedene Zielgene des BATF/AP-1-Komplexes identifiziert und deren Expression im ALCL validiert. Die pharmakologische Inhibition von RORC2, eines dieser Zielgene, konnte als möglicher neuer Angriffspunkt in der Therapie des ALCL identifiziert werden. Des Weiteren konnte aufgrund dieser Ergebnisse eine Hypothese zum nicht sicher geklärten zellulären Ursprungs des ALCL aufgestellt werden.

### 4.2 Expression von BATF und BATF3

Neben anderen deregulierten Transkriptionsfaktoren wie NOTCH1, STAT3 und MYC<sup>70,188,195</sup> weist das ALCL eine konstitutive AP-1-Aktivität auf, die unter anderem auf der starken Expression und Aktivität der AP-1-Faktoren JUN, JUNB und FRA-2 beruht<sup>73</sup>. Die vorliegende Arbeit konnte nun belegen, dass AP-1 im ALCL facettenreicher und komplexer ist als bisher aufgezeigt. Die AP-1-Faktoren BATF und BATF3 erweitern nicht nur das Spektrum der Zusammensetzungen des AP-1-Komplexes, sondern auch der möglichen Kooperationspartner im ALCL. AP-1 ist auch in anderen hämatologischen Entitäten aktiv<sup>82</sup> und eine differentielle Expression von BATFs im ALCL konnten frühere Arbeiten zeigen<sup>55,184</sup>, die unter anderem das ALCL

anhand der BATF3-Expression von anderen PTCLs unterscheiden konnten und eine Expression von BATF im ALCL zeigen konnten<sup>185,196</sup>. Parallel zur hier beschriebenen Arbeit wurden die Aktivität von BATFs vor allem im cHL und im ALCL ausführlicher aufgearbeitet. In der hier vorgelegten Arbeit konnte dargelegt werden, dass die gleichzeitige Expression von BATF und BATF3 eine Besonderheit des ALCL unter den lymphatischen Neoplasien darstellt. Nur im cHL, das neben der konstitutiven AP-1-Aktivität viele ähnliche histologische und molekulare Eigenschaften wie das ALCL aufweist<sup>73,75,195</sup>, konnten ebenfalls beide Proteine nachgewiesen werden<sup>185</sup>.

### **4.3 AP-1-Aktivität im Bezug auf den ALK-Status**

Obwohl die gegenwärtige WHO-Klassifikation das ALK+ und ALK- ALCL als getrennte Entitäten aufführt<sup>7</sup>, konnte in diesen beiden Entitäten kein Unterschied bezüglich des Expressionsmusters von BATF und BATF3 oder der DNA-Bindungsaktivität von AP-1 nachgewiesen werden. Das ist insbesondere dahingehend interessant, da NPM-ALK die Expression des AP-1-Faktors JUNB induzieren kann<sup>197,198</sup>. Diese Daten stützen das von meiner Gruppe aufgestellte Konzept, dass sowohl das ALK+ als auch das ALK- ALCL ein gemeinsames Grundprinzip der Krankheitsentstehung aufweisen<sup>53,199</sup>. Unzweifelhaft induziert NPM-ALK eine Vielzahl von Signalwegen und nachfolgende Genexpressionsänderungen<sup>50,51</sup>, allerdings finden sich in ALK- ALCL-Fällen komplementär aktivierte Signalwege und globale Analysen der Genom-Methylierungen von ALK+ und ALK- ALCL unterstützen das Konzept eines gemeinsamen Wegs der Pathogenese<sup>53</sup>.

### **4.4 Die komplexe AP-1-Aktivität erschwert funktionelle Analysen**

AP-1 Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer bZIP-Domäne, die es ihnen erlaubt, zusammen mit anderen bZIP-Proteinen zu dimerisieren und bestimmte DNA-Bindungsmotive zu erkennen<sup>82</sup>. Dabei können sich sowohl Homodimere bestehend aus JUN-Proteinen oder Heterodimere aus Mitgliedern der verschiedenen AP-1-Familien bilden, so dass es eine Vielzahl möglicher Zusammensetzungen des aktiven AP-1-Komplexes gibt<sup>81</sup>. Damit BATFs die Transkription beeinflussen können, müssen sie mit anderen AP-1-Faktoren interagieren, wofür sie Heterodimere mit insbesondere JUN oder JUNB eingehen können<sup>91</sup>, die beide im ALCL stark exprimiert sind<sup>73,200</sup>. Des



Weiteren kann dieser Komplex durch verschiedene Kofaktoren beeinflusst werden und je nach zellulärem Kontext die Transkription bestimmter Zielgene aktivieren oder hemmen<sup>82,102</sup>. Hinzu kommt, dass die Funktion von AP-1 je nach Zelltyp und Differenzierungsstatus unterschiedlich ist<sup>82,201</sup>, sodass AP-1 insgesamt sowohl im Hinblick auf seine Zusammensetzung als auch seine Funktion hochkomplex ist. Daher ist die funktionale Analyse eines oder mehrerer einzelner AP-1-Faktoren schwierig. Zudem muss man sicherlich zwischen einer konstitutiven AP-1-Aktivität, wie sie zum Beispiel im ALCL oder cHL gegeben ist<sup>73</sup>, und einer unter normalen physiologischen Bedingungen transienten Aktivität unterscheiden.

#### **4.5 BATF und BATF3 beeinflussen Wachstum und Überleben von ALCL-Zellen**

In dieser Arbeit wurden mehrere experimentelle Ansätze gewählt, um die oben beschriebenen Hindernisse in der Analyse von AP-1-Faktoren zu umgehen und die Funktion von BATF/BATF3/AP-1 im Hinblick auf Wachstum und Überleben im ALCL zu untersuchen.

Hierzu wurde die Expression von BATF und BATF3 auf mRNA-Ebene gehemmt. Dafür wurden siRNAs sowohl einzeln als auch in Kombination genutzt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass insbesondere die kombinierte Herunterregulation von *BATF* und *BATF3* zu einer starken Wachstumshemmung und einem stark beeinträchtigtem Überleben führt, wohingegen die Inhibition nur eines Faktors nur moderate oder keine Effekte zeigte. Diese Daten stimmen mit in meiner Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten überein, in denen mittels genomischer Deletion von *BATF* und *BATF3* mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems eine Wachstumshemmung der deletierten Zellen nachgewiesen wurde. Interessanterweise konnten keine Zellklone mit einer kombinierten Deletion von BATF und BATF3 hergestellt werden, was auf eine essentielle Bedeutung beider Faktoren für das Wachstum von ALCL-Zellen spricht.

Da die verschiedenen BATFs sich gegenseitig ergänzen und ersetzen können, wie vorangegangene Arbeiten<sup>91,172</sup> und die Hochregulation des jeweiligen anderen Proteins nach CRISPR/Cas9-Deletion zeigen<sup>189</sup>, ist es demnach wahrscheinlich nicht ausreichend, nur eines der BATF-Proteine in einem Zellsystem zu inhibieren, wenn mehrere BATF-Familienmitglieder in diesem System exprimiert sind. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde daher die gesamte AP-1-Aktivität mittels eines

dominanten AP-1-Repressors, A-Fos, gehemmt. Dieser besitzt die Eigenschaft, mit JUN-Proteinen Dimere zu bilden, aber die transkriptionelle Aktivität des Komplexes komplett zu blockieren<sup>186</sup>. Nach einer solchen Inhibition von AP-1 zeigten die Zellen eine stark verminderte Proliferation und ein massiv beeinträchtigt Überleben, was die Ergebnisse einer transienten Inhibition bestätigt<sup>73</sup>. Zusammengenommen zeigen diese Versuche ein starkes onkogenes Potential von BATF und BATF3 im ALCL, da der Verlust von beiden Proteinen zu verminderter Proliferation und Zelltod führt. Auch in zwei Mausmodellen konnte diese onkogene Wirkung gezeigt werden: Die Überexpression von Batf in T-Zellen transgener Mäuse führte zu einer lymphoproliferativen Erkrankung<sup>182</sup>, während die Expression von BATF3 in murinen B-Lymphozyten nach Transplantation in Rag1-defiziente Mäuse B-Zell-Lymphome induzierte<sup>183</sup>.

#### **4.6 Kooperative Bindung von BATFs und IRF4 an AICEs im ALCL**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BATFs im ALCL mit IRF4 kooperieren und gemeinsam bestimmte DNA-Sequenzen, sie sogenannten AICEs, erkennen und binden können. Der Transkriptionsfaktor IRF4 ist im ALCL stark exprimiert und essentiell für das Überleben von ALCL-Zellen<sup>70,71,202,203</sup>. Eine Kooperation von BATFs mit IRF4 wird dadurch ermöglicht, dass das IRF-Bindungsmotiv (GAAA) in direkter Nachbarschaft zum AP-1-Bindungsmotiv liegt und der AP-1-Komplex, vor allem bestehend aus JUN und BATF, IRF4 an die DNA rekrutieren kann. Dabei beeinflussen sich beide Faktoren gegenseitig und verstärken die DNA-Bindungsaffinität ihres jeweiligen Partners<sup>172-174</sup>. Interessanterweise sind nur wenige Aminosäuren an der direkten Protein-Protein-Interaktion beteiligt<sup>172</sup>, so dass die Kooperation durch die Bindung an die DNA stabilisiert werden könnte. Diese Arbeit konnte nun zeigen, dass im ALCL sowohl BATF als auch BATF3 an der kooperativen Bindung mit IRF4 an die DNA beteiligt sind. Obwohl eine gemeinsame Bindung mittels EMSA auf DNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, ließ sich keine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen AP-1/BATF und IRF4 nachweisen, was wahrscheinlich an den bekannten, schwachen Wechselwirkungen zwischen AP-1 und IRF4 liegt<sup>174</sup>. Auch in einer Massenspektrographie-Analyse im cHL konnte nur eine nicht signifikante Anreicherung von IRF4 im BATF3-Immunopräzipitat nachgewiesen werden<sup>185</sup>.

## 4.7 Funktionelle Bedeutung von AICEs

Aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne von BATF und BATF3 galten beide Transkriptionsfaktoren lange als Inhibitoren der AP-1-Aktivität<sup>154,155,163,170</sup>. Barbara Schraml *et al.* konnten aber zeigen, dass BATF eine wichtige Rolle in der Differenzierung von TH17-Zellen besitzt, da *Batf*<sup>-/-</sup> Mäuse zwar eine normale TH1- und TH2-Differenzierung, jedoch keine Ausbildung von TH17-Zellen aufweisen<sup>158</sup>. In der Folge konnte geklärt werden, dass die Kooperation von BATF mit IRF4 für die positive transkriptionelle Aktivität von BATF verantwortlich und für die Differenzierung von TH17-Zellen essentiell ist<sup>171,173,174</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen BATFs füreinander funktionell kompensieren können, um die Differenzierung von TH17- und CD8+ dendritischen Zellen zu ermöglichen<sup>172</sup>.

## 4.8 Die TH17-charakteristische Gensignatur von ALCL-Zellen

TH17-Zellen wurden erst vor wenigen Jahren als Untergruppe der CD4<sup>+</sup> Effektorzellen identifiziert und besitzen eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort und der Abwehr gegen körperfremde Pathogene<sup>204</sup>. Lange Zeit herrschte die Vorstellung, dass naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen sich entweder in TH1-Zellen, die sich durch eine hohe Produktion von INF $\gamma$  und die Abwehr gegen Bakterien auszeichnen, oder in TH2-Zellen differenzieren können, die vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren und in der Abwehr gegen Parasiten und dem Isotypenswitch von B-Zellen eine Rolle spielen<sup>205</sup>. In der jüngsten Vergangenheit wurde aber noch eine weitere Untergruppe identifiziert, die sich in Abhängigkeit von den auf sie einwirkenden Zytokinen differenziert und sich durch eine Produktion von IL-17 von TH1- und TH2-Zellen unterscheidet<sup>206,207</sup>.

Diese Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17-Zellen wird durch ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren reguliert, die gemeinsam das transkriptionelle Programm von TH17-Zellen initiieren. Die Schlüsselposition dabei nimmt ROR $\gamma$ t ein, da viele Expressionsmarker von TH17-Zellen, wie die Expression des IL-23R oder des Chemokinrezeptors CCR6, und die Sekretion der charakteristischen Interleukine von ROR $\gamma$ t abhängen<sup>177,208</sup>. ROR $\gamma$ t allein reicht aber nicht aus, naive T- zu TH17-Zellen zu differenzieren, sondern benötigt weitere Transkriptionsfaktoren, die innerhalb dieses Netzwerks kooperieren<sup>171</sup>. Dazu gehören STAT3, IRF4, I $\kappa$ B $\zeta$  und BATF, welche an der Induktion von TH17-Genen wie IL-17A und ROR $\gamma$ t selbst beteiligt sind<sup>158,209-211</sup>. Auch

für den AP-1-Faktor JUNB konnte eine bedeutende Rolle in der Differenzierung von TH17-Zellen beschrieben werden, da JUNB die Bindung von BATF an die DNA des RORC-Locus erleichtert und JunB-defiziente Mäuse keine TH17-Zellen ausbilden können<sup>212,213</sup>. TH17-Zellen sezernieren im Vergleich zu TH1- und TH2-Zellen ein eigenes Zytokinprofil und produzieren neben den namensgebenden IL-17A und IL-17F andere charakteristische Interleukine wie IL-21, IL-22 und IL-26. Außerdem besitzen sie eine starke Expression von spezifischen Rezeptoren, zu denen AHR, CCR6, IL-22R und IL-23R gehören<sup>214</sup>.

Einige dieser TH17 assoziierten Gene, wie *AHR*, *IL17*, *IL22*, *IL26* und *RORC* wurden bereits im ALK+ ALCL beschrieben oder werden sogar wie im Fall von IL-17 durch die von *NPM-ALK* induzierte MicroRNA miR-135b getrieben<sup>215-217</sup>. Diese Arbeit konnte jedoch darlegen, dass sich die Expression von TH17-Genen nicht nur auf das ALK+ ALCL beschränkt, sondern auch ein Merkmal des ALK- ALCL ist<sup>189</sup>. Dies korreliert nicht nur mit der in dieser Arbeit gezeigten Expression von den Transkriptionsfaktoren BATF und BATF3, sondern auch mit den anderen für die TH17-Differenzierung notwendigen Faktoren STAT3, JUNB und IRF4<sup>62,71,73,218</sup>. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Teil dieser TH17-assoziierten Genexpression von AP-1 und BATFs abhängig sind, da deren *Promotor*- oder *Enhancer*-Regionen von BATF und BATF3 besetzt sind. Zudem führt die Deletion von *BATF* und *BATF3* in ALCL-Zellen zu einer verminderten Expression von TH17-Genen<sup>189</sup>. Daher konnte diese Arbeit eine TH17-Signatur nicht nur im ALK+ sondern auch für das ALK- ALCL aufzeigen und eine Abhängigkeit dieser von BATFs nachweisen.

#### **4.9 Ähnlichkeit der ALCL- zu ILC3-Zellen**

Interessanterweise überlappt die Gensignatur von TH17-Zellen mit der von ILC3-Zellen<sup>219</sup>. Diese Zellen gehören zu den innatens lymphoiden Zellen (ILC) und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Dabei besitzen sie eine wichtige Rolle in der schnellen Abwehr gegen Mikroorganismen und in der Homöostase von Geweben<sup>220</sup>. Im Unterschied zu T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems bilden diese Zellen keine somatisch rekombinierten T- oder B-Zell-Rezeptoren aus, sondern werden von Stresssignalen, Zytokinen oder mikrobiellen Partikeln aktiviert. Allerdings können sie ähnlich wie die adaptiven T-Zellen ihrer Funktion nach in Effektor- und Helferzellen

unterteilt werden: Die länger bekannten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ähneln dabei den zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Zellen, da sie ebenfalls abnormale Zellen erkennen und eliminieren können<sup>221</sup>. Die drei Gruppen der Helfer ILCs (ILC1, ILC2 und ILC3) entsprechen in ihrer Funktion und ihrem Zytokinprofil den Untergruppen der TH-Zellen (TH1, TH2 und TH17)<sup>222</sup>. ILC1-Zellen besitzen Aufgaben in der Abwehr gegen intrazelluläre Bakterien<sup>220</sup>, wogegen ILC2-Zellen ähnlich wie TH2-Zellen IL-5 und IL-13 produzieren und wichtig für die parasitäre Abwehr sind<sup>223,224</sup>. ILC3-Zellen sind für die Abwehr gegen extrazelluläre Mikroorganismen von Bedeutung und spielen eine Rolle in der Entwicklung von Peyer-Plaques und in Autoimmunerkrankungen wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Psoriasis<sup>225</sup>. Sie befinden sich vor allem in Tonsillen und der Lamina propria des Intestinaltraktes und exprimieren ebenso wie TH17-Zellen ein charakteristisches Zytokinprofil aus IL-17, IL-22 und IL-26 und typische Rezeptoren wie AHR und ROR $\gamma$ t<sup>226</sup>.

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass das Expressionsprofil von ALCL-Zellen nicht nur zu Th17-Zellen passt, sondern auch mit dem von ILC3-Zellen. Dies ist insbesondere dahingehend interessant, dass weiterhin über die Ursprungszelle des ALCL diskutiert wird. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass ALCL-Zellen in einem Teil der Fälle keinen funktionstüchtigen TZR aufweisen<sup>41,43</sup>, was für den postulierten CD4-Ursprung des ALCL sehr ungewöhnlich wäre. Neben dem fehlenden TZR-Rearrangement wäre die ALCL-spezifische Expression von Faktoren wie ROR $\gamma$ t, AHR, IL-22 und IL-17 auch mit einem Ursprung des ALCL in ILC3-Zellen vereinbar<sup>216,227</sup>. Um diese Hypothese bestätigen zu können, sind weitere Studien erforderlich, die zum Beispiel analysieren könnten, ob weitere Schlüsselfaktoren und Signalwege von ILC3- und ALCL-Zellen geteilt werden. Sollte sich diese Hypothese nicht bestätigen, legt diese Arbeit nahe, dass die deregulierten Transkriptionsfaktoren im ALCL ein Transkriptionsprogramm initiieren oder stimulieren, das dem von ILC3- bzw. TH17-Zellen ähnelt.

#### **4.10 Implikationen für neue Therapieansätze des ALCL**

Neben diesen Erkenntnissen zu deregulierten Transkriptionsfaktoren und der möglichen Ursprungszelle des ALCLs liefert diese Arbeit Ansätze für neue zielgerichtete Therapien für das ALCL. Dies ist insbesondere für die Gruppe der ALK- ALCL-Patienten wichtig,

da diese insgesamt eine schlechtere Prognose besitzen<sup>15</sup>. Neben dem bereits erfolgreich in klinischen Studien getestetem gegen CD30 gerichteten Antikörper-Medikamenten-Konjugat Brentuximab vedotin<sup>32,228</sup>, zeigt die Gruppe der ALK-Inhibitoren eine gute Ansprechrate in ALK+ ALCL-Patienten<sup>36</sup>. Allerdings ist bisher keiner der vier für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom zugelassenen Wirkstoffe Crizotinib, Ceritinib, Alectinib und Brigatinib<sup>229-232</sup> für die Behandlung des ALCLs zugelassen. Sie werden derzeit aber in klinischen Studien untersucht<sup>233,234</sup>. Neue Ansatzpunkte für Medikamente in bisher nicht berücksichtigten Signalwegen würden daher das Spektrum der gerichteten Therapien im ALCL erweitern. Diese Arbeit beschreibt die Inhibition von RORC2, dem Schlüsselprotein in der Entwicklung von TH17-Zellen, als mögliches Ziel, da kleinmolekulare RORC-Inhibitoren das Überleben von ALCL-Zellen, nicht aber von den Kontrollzellen beeinträchtigen. Interessanterweise werden RORC-Inhibitoren derzeit in klinischen Studien getestet<sup>235</sup>, da TH17-Zellen mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht werden<sup>236,237</sup>. Die Inhibition von TH17-Zellen und ihrer Funktion könnte eine deregulierte Entzündungsreaktion hemmen. Daher werden auch Antikörper gegen die Effektorzytokine von TH17-Zellen entwickelt. Dazu gehören unter anderem IL-17A bzw. IL-17F und IL-26<sup>214,238</sup>, gegen die derzeit teilweise schon neutralisierende Antikörper in klinischen Studien getestet werden<sup>239,240</sup>. Die Expression von IL-17 und IL-26 sowohl in ALCL-Zelllinien als auch in primärem Patientenmaterial<sup>189</sup> und die negativen Serومتiter für IL-17A in Remission<sup>216</sup> lassen darauf schließen, dass diese Antikörper auch in der Therapie des ALCL eine Anwendung finden könnten. Des Weiteren könnten die Serومتiter für diese Cytokine auch prognostisch relevant sein<sup>216</sup>. Klarheit darüber werden zukünftige Studien bringen. Dass auch trotz der guten Ansprechrate des ALK+ ALCL auf Behandlung mit ALK-Inhibitoren neue bzw. ergänzende Therapien in diesem Therapieansatz nötig sind, ist daraus abzuleiten, dass ALK-Inhibitoren zwar das ALCL kontrollieren<sup>36</sup>, aber die Zellen anscheinend nicht komplett eradizieren können. Gambacorti-Passerini *et al.* konnten zeigen, dass nach Absetzen von Crizotinib in kompletter Remission das ALCL innerhalb kürzester Zeit rezidiert<sup>37</sup>. Daher sind hierbei ergänzende Therapien notwendig, um auch mögliche „schlafende“ ALCL-Zellen eliminieren zu können. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Kombination aus Crizotinib mit RORC-Inhibitoren die Wirkungen beider Einzelstoffe verstärkt und die Toxizität auf ALCL-Zellen erhöht.

## **4.11 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit konnte die Komplexität und funktionelle Bedeutung des AP-1-Komplexes im ALCL weiter charakterisiert und aufgezeigt werden, dass die AP-1-Faktoren BATF und BATF3 für Wachstum und Überleben von ALCL-Zellen essentiell ist. Des Weiteren konnten Zielgene des BATF/AP-1-Komplexes in ALCL-Zellen identifiziert werden, die einen Hinweis auf die mögliche Abstammung des ALCL von ILC3-Zellen geben könnten. Zudem wurde ein neuer potentieller Ansatzpunkt für die Pharmakotherapie des ALCLs beschrieben, was in der Zukunft zu neuen Behandlungsoptionen für ALCL-Patienten führen könnte.

## Literaturverzeichnis

1. Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985 Oct;66(4):848–58.
2. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997 Jun 1;89(11):3909–18.
3. Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J. Clin. Oncol.* 2008 Sep 1;26(25):4124–30.
4. Greer JP, Kinney MC, Collins RD, Salhany KE, Wolff SN, Hainsworth JD, Flexner JM, Stein RS. Clinical features of 31 patients with Ki-1 anaplastic large-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 1991 Apr;9(4):539–47.
5. Mora J, Filippa DA, Thaler HT, Polyak T, Cranor ML, Wollner N. Large cell non-Hodgkin lymphoma of childhood: Analysis of 78 consecutive patients enrolled in 2 consecutive protocols at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. *Cancer*. 2000 Jan 1;88(1):186–97.
6. Stein H, Foss HD, Dürkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, Pileri S, Falini B. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000 Dec 1;96(12):3681–95.
7. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90. PMID: PMC4874220
8. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994 Mar 4;263(5151):1281–4.
9. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nature Publishing Group*; 2008 Jan;8(1):11–23.
10. Crescenzo R, Abate F, Lasorsa E, Tabbo F, Gaudio M, Chiesa N, Di Giacomo F, Spaccarotella E, Barbarossa L, Ercole E, Todaro M, Boi M, Acquaviva A, Ficarra E, Novero D, Rinaldi A, Tousseyn T, Rosenwald A, Kenner L, Cerroni L, Tzankov A, Ponzoni M, Paulli M, Weisenburger D, Chan WC, Iqbal J, Piris MA, Zamo A, Ciardullo C, Rossi D, Gaidano G, Pileri S, Tiacci E, Falini B, Shultz LD, Mevellec L, Vialard JE, Piva R, Bertoni F, Rabadan R, Inghirami G, European T-Cell Lymphoma Study Group, T-Cell Project: Prospective Collection of Data in Patients with Peripheral T-Cell Lymphoma and the AIRC



5xMille Consortium “Genetics-Driven Targeted Management of Lymphoid Malignancies.” Convergent mutations and kinase fusions lead to oncogenic STAT3 activation in anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2015 Apr 13;27(4):516–32. PMID: PMC5898430

11. Feldman AL, Dogan A, Smith DI, Law ME, Ansell SM, Johnson SH, Porcher JC, Ozsan N, Wieben ED, Eckloff BW, Vasmatazis G. Discovery of recurrent t(6;7)(p25.3;q32.3) translocations in ALK-negative anaplastic large cell lymphomas by massively parallel genomic sequencing. *Blood*. American Society of Hematology; 2011 Jan 20;117(3):915–9. PMID: PMC3035081
12. Mereu E, Pellegrino E, Scarfò I, Inghirami G, Piva R. The heterogeneous landscape of ALK negative ALCL. *Oncotarget*. Impact Journals; 2017 Mar 14;8(11):18525–36. PMID: PMC5392347
13. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, Ullrich F, Jaffe ES, Connors JM, Rimsza L, Pileri SA, Chhanabhai M, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood*. American Society of Hematology; 2008 Jun 15;111(12):5496–504.
14. Falini B, Pulford K, Pucciarini A, Carbone A, De Wolf-Peeters C, Cordell J, Fizzotti M, Santucci A, Pelicci PG, Pileri S, Campo E, Ott G, Delsol G, Mason DY. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood*. 1999 Nov 15;94(10):3509–15.
15. Schmitz N, Trümper L, Ziepert M, Nickelsen M, Ho AD, Metzner B, Peter N, Loeffler M, Rosenwald A, Pfreundschuh M. Treatment and prognosis of mature T-cell and NK-cell lymphoma: an analysis of patients with T-cell lymphoma treated in studies of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood*. 2010 Nov 4;116(18):3418–25.
16. Brugières L, Deley MC, Pacquement H, Meguerian-Bedoyan Z, Terrier-Lacombe MJ, Robert A, Pondarré C, Leverger G, Devalck C, Rodary C, Delsol G, Hartmann O. CD30(+) anaplastic large-cell lymphoma in children: analysis of 82 patients enrolled in two consecutive studies of the French Society of Pediatric Oncology. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3591–8.
17. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugières L, Terrier-Lacombe MJ, Haralambieva E, Pulford K, Pileri S, Morris SW, Mason DY, Delsol G. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):2076–84.
18. Berge ten RL, de Bruin PC, Oudejans JJ, Ossenkoppele GJ, van der Valk P, Meijer CJLM. ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma demonstrates similar poor prognosis to peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Histopathology*. 2003 Nov;43(5):462–9.
19. Suzuki R, Kagami Y, Takeuchi K, Kami M, Okamoto M, Ichinohasama R, Mori

- N, Kojima M, Yoshino T, Yamabe H, Shiota M, Mori S, Ogura M, Hamajima N, Seto M, Suchi T, Morishima Y, Nakamura S. Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):2993–3000.
20. Rassidakis GZ, Goy A, Medeiros LJ, Jiang Y, Thomaidis A, Remache Y, Cabanillas F, Sarris AH, Gilles F. Prognostic significance of MUC-1 expression in systemic anaplastic large cell lymphoma. *Clin. Cancer Res*. 2003 Jun;9(6):2213–20.
  21. Zinzani PL, Pileri S, Bendandi M, Buzzi M, Sabattini E, Ascani S, Gherlinzoni F, Magagnoli M, Albertini P, Tura S. Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients. *J. Clin. Oncol*. 1998 Apr;16(4):1532–7.
  22. King RL, Dao LN, McPhail ED, Jaffe ES, Said J, Swerdlow SH, Sattler CA, Ketterling RP, Sidhu JS, Hsi ED, Karikehalli S, Jiang L, Gibson SE, Ondrejka SL, Nicolae A, Macon WR, Dasari S, Parrilla Castellar E, Feldman AL. Morphologic Features of ALK-negative Anaplastic Large Cell Lymphomas With DUSP22 Rearrangements. *Am. J. Surg. Pathol*. 2016 Jan;40(1):36–43. PMID: PMC4834837
  23. Parrilla Castellar ER, Jaffe ES, Said JW, Swerdlow SH, Ketterling RP, Knudson RA, Sidhu JS, Hsi ED, Karikehalli S, Jiang L, Vasmatazis G, Gibson SE, Ondrejka S, Nicolae A, Grogg KL, Allmer C, Ristow KM, Wilson WH, Macon WR, Law ME, Cerhan JR, Habermann TM, Ansell SM, Dogan A, Maurer MJ, Feldman AL. ALK-negative anaplastic large cell lymphoma is a genetically heterogeneous disease with widely disparate clinical outcomes. *Blood*. American Society of Hematology; 2014 Aug 28;124(9):1473–80. PMID: PMC4148769
  24. Shustov A, Soma L. Anaplastic Large Cell Lymphoma: Contemporary Concepts and Optimal Management. *Cancer Treat. Res. Cham: Springer International Publishing*; 2019;176(25):127–44.
  25. Cederleuf H, Bjerregård Pedersen M, Jerkeman M, Relander T, d'Amore F, Ellin F. The addition of etoposide to CHOP is associated with improved outcome in ALK+ adult anaplastic large cell lymphoma: A Nordic Lymphoma Group study. *British Journal of Haematology*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2017 Sep;178(5):739–46.
  26. Dhawale TM, Shustov AR. Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Peripheral T/NK-cell Lymphomas: A Histology-Specific Review. *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 2017 Apr;31(2):335–57.
  27. Smith SM, Burns LJ, van Besien K, Lerademacher J, He W, Fenske TS, Suzuki R, Hsu JW, Schouten HC, Hale GA, Holmberg LA, Surenda A, Freytes CO, Maziarz RT, Inwards DJ, Gale RP, Gross TG, Cairo MS, Costa LJ, Lazarus HM, Wiernik PH, Maharaj D, Laport GG, Montoto S, Hari PN. Hematopoietic cell transplantation for systemic mature T-cell non-Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol*. American Society of Clinical Oncology; 2013 Sep 1;31(25):3100–9.

PMCID: PMC3753702

28. Francisco JA, Cervený CG, Meyer DL, Mixan BJ, Klussman K, Chace DF, Rejniak SX, Gordon KA, DeBlanc R, Toki BE, Law C-L, Doronina SO, Siegall CB, Senter PD, Wahl AF. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood*. American Society of Hematology; 2003 Aug 15;102(4):1458–65.
29. Younes A, Bartlett NL, Leonard JP, Kennedy DA, Lynch CM, Sievers EL, Forero-Torres A. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society; 2010 Nov 4;363(19):1812–21.
30. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, Matous J, Ramchandren R, Fanale M, Connors JM, Yang Y, Sievers EL, Kennedy DA, Shustov A. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 2012 Jun 20;30(18):2190–6.
31. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, Matous J, Ramchandren R, Fanale M, Connors JM, Fenton K, Huebner D, Pinelli JM, Kennedy DA, Shustov A. Five-year results of brentuximab vedotin in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. American Society of Hematology; 2017 Dec 21;130(25):2709–17. PMCID: PMC5746164
32. Horwitz S, O'Connor OA, Pro B, Illidge T, Fanale M, Advani R, Bartlett NL, Christensen JH, Morschhauser F, Domingo-Domenech E, Rossi G, Kim WS, Feldman T, Lennard A, Belada D, Illés A, Tobinai K, Tsukasaki K, Yeh S-P, Shustov A, Hüttmann A, Savage KJ, Yuen S, Iyer S, Zinzani PL, Hua Z, Little M, Rao S, Woolery J, Manley T, Trümper L, ECHELON-2 Study Group. Brentuximab vedotin with chemotherapy for CD30-positive peripheral T-cell lymphoma (ECHELON-2): a global, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet.* 2019 Jan 19;393(10168):229–40. PMCID: PMC6436818
33. Golding B, Luu A, Jones R, Vilorio-Petit AM. The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Mol. Cancer*. BioMed Central; 2018 Feb 19;17(1):52–15. PMCID: PMC5817728
34. Gambacorti-Passerini C, Messa C, Pogliani EM. Crizotinib in anaplastic large-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society; 2011 Feb 24;364(8):775–6.
35. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, Rolland D, Balis FM, Maris JM, Weigel BJ, Ingle AM, Ahern C, Adamson PC, Blaney SM. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):472–80. PMCID: PMC3730818

36. Gambacorti-Passerini C, Farina F, Stasia A, Redaelli S, Ceccon M, Mologni L, Messa C, Guerra L, Giudici G, Sala E, Mussolin L, Deeren D, King MH, Steurer M, Ordemann R, Cohen AM, Grube M, Bernard L, Chiriano G, Antolini L, Piazza R. Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 4 ed. 2014 Feb;106(2):djt378.
37. Gambacorti-Passerini C, Mussolin L, Brugières L. Abrupt Relapse of ALK-Positive Lymphoma after Discontinuation of Crizotinib. *N. Engl. J. Med.* Massachusetts Medical Society; 2016 Jan 7;374(1):95–6.
38. Corao DA, Biegel JA, Coffin CM, Barr FG, Wainwright LM, Ernst LM, Choi JK, Zhang PJ, Pawel BR. ALK expression in rhabdomyosarcomas: correlation with histologic subtype and fusion status. *Pediatr. Dev. Pathol.* 1st ed. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2009 Jul;12(4):275–83.
39. Herbst H, Tippelmann G, Anagnostopoulos I, Gerdes J, Schwarting R, Boehm T, Pileri S, Jones DB, Stein H. Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma: dissociation between phenotype and genotype. *Leuk. Res.* 1989;13(2):103–16.
40. Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, Hummel M, Stein H. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood.* 1996 Nov 15;88(10):4005–11.
41. Bonzheim I, Geissinger E, Roth S, Zettl A, Marx A, Rosenwald A, Müller-Hermelink HK, Rüdiger T. Anaplastic large cell lymphomas lack the expression of T-cell receptor molecules or molecules of proximal T-cell receptor signaling. *Blood.* American Society of Hematology; 2004 Nov 15;104(10):3358–60.
42. Chiarle R, Gong JZ, Guasparri I, Pesci A, Cai J, Liu J, Simmons WJ, Dhall G, Howes J, Piva R, Inghirami G. NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood.* American Society of Hematology; 2003 Mar 1;101(5):1919–27.
43. Malcolm TIM, Villarese P, Fairbairn CJ, Lamant L, Trinquand A, Hook CE, Burke GAA, Brugières L, Hughes K, Payet D, Merkel O, Schiefer A-I, Ashankyty I, Mian S, Wasik M, Turner M, Kenner L, Asnafi V, Macintyre E, Turner SD. Anaplastic large cell lymphoma arises in thymocytes and requires transient TCR expression for thymic egress. *Nat Commun.* Nature Publishing Group; 2016;7:10087. PMID: PMC4729925
44. Shoumariyeh K, Schneider N, Poggio T, Veratti P, Ehrenfeld S, Redhaber DM, Khan R, Pfeifer D, Klingenberg C, Kreutmair S, Rudelius M, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Illert AL, Duyster J, Miething C. A novel conditional NPM-ALK-driven model of CD30+ T-cell lymphoma mediated by a translational stop cassette. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2019 Nov 21;7:645–10.
45. Krenacs L, Wellmann A, Sorbara L, Himmelmann AW, Bagdi E, Jaffe ES, Raffeld M. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular

- origin. *Blood*. 1997 Feb 1;89(3):980–9.
46. Hapgood G, Savage KJ. The biology and management of systemic anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):17–25.
  47. Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas. Diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am. J. Pathol.* 1988 Jan;130(1):59–70.
  48. Felgar RE, Salhany KE, Macon WR, Pietra GG, Kinney MC. The expression of TIA-1+ cytolytic-type granules and other cytolytic lymphocyte-associated markers in CD30+ anaplastic large cell lymphomas (ALCL): correlation with morphology, immunophenotype, ultrastructure, and clinical features. *Hum. Pathol.* 1999 Feb;30(2):228–36.
  49. Salaverria I, Beà S, Lopez-Guillermo A, Lespinet V, Pinyol M, Burkhardt B, Lamant L, Zettl A, Horsman D, Gascoyne R, Ott G, Siebert R, Delsol G, Campo E. Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *British Journal of Haematology*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2008 Mar;140(5):516–26.
  50. Lamant L, de Reyniès A, Duplantier M-M, Rickman DS, Sabourdy F, Giuriato S, Brugières L, Gaulard P, Espinos E, Delsol G. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood*. American Society of Hematology; 2007 Mar 1;109(5):2156–64.
  51. Merkel O, Hamacher F, Laimer D, Sift E, Trajanoski Z, Scheideler M, Egger G, Hassler MR, Thallinger C, Schmatz A, Turner SD, Greil R, Kenner L. Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Academy of Sciences*; 2010 Sep 14;107(37):16228–33. PMID: PMC2941277
  52. Boi M, Stathis A, Zucca E, Inghirami G, Bertoni F. Genetic alterations in systemic nodal and extranodal non-cutaneous lymphomas derived from mature T cells and natural killer cells. *Cancer Sci.* 3rd ed. Wiley/Blackwell (10.1111); 2012 Aug;103(8):1397–404.
  53. Hassler MR, Pulverer W, Lakshminarasimhan R, Redl E, Hacker J, Garland GD, Merkel O, Schiefer A-I, Simonitsch-Klupp I, Kenner L, Weisenberger DJ, Weinhaeusel A, Turner SD, Egger G. Insights into the Pathogenesis of Anaplastic Large-Cell Lymphoma through Genome-wide DNA Methylation Profiling. *Cell Rep.* 2016 Oct 4;17(2):596–608. PMID: PMC6066089
  54. Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaad M, Diehl V. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*. 1982 Sep 2;299(5878):65–7.
  55. Eckerle S, Brune V, Doring C, Tiacci E, Bohle V, Sundström C, Kodet R, Paulli M, Falini B, Klapper W, Chaubert AB, Willenbrock K, Metzler D, Bräuninger A,

- Kuppers R, Hansmann ML. Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2009 Nov;23(11):2129–38.
56. Watanabe M, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, Umezawa K, Kadin ME, Abraham LJ, Watanabe T, Horie R. JunB induced by constitutive CD30-extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase signaling activates the CD30 promoter in anaplastic large cell lymphoma and reed-sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2005 Sep 1;65(17):7628–34.
  57. Horie R, Watanabe T, Morishita Y, Ito K, Ishida T, Kanegae Y, Saito I, Higashihara M, Mori S, Kadin ME, Watanabe T. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2002 Apr 11;21(16):2493–503.
  58. Wasielewski von R, Mengel M, Fischer R, Hansmann ML, Hübner K, Franklin J, Tesch H, Paulus U, Werner M, Diehl V, Georgii A. Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology; 1997 Oct;151(4):1123–30. PMID: PMC1858022
  59. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 1998 Dec;18(12):6951–61. PMID: PMC109278
  60. Kuefer MU, Look AT, Pulford K, Behm FG, Pattengale PK, Mason DY, Morris SW. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood*. 1997 Oct 15;90(8):2901–10.
  61. Zhang Q, Wei F, Wang HY, Liu X, Roy D, Xiong Q-B, Jiang S, Medvec A, Danet-Desnoyers G, Watt C, Tomczak E, Kalos M, Riley JL, Wasik MA. The potent oncogene NPM-ALK mediates malignant transformation of normal human CD4(+) T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* American Society for Investigative Pathology; 2013 Dec;183(6):1971–80. PMID: PMC5745542
  62. Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2002 Feb 7;21(7):1038–47.
  63. Staber PB, Vesely P, Haq N, Ott RG, Funato K, Bambach I, Fuchs C, Schauer S, Linkesch W, Hrzenjak A, Dirks WG, Sexl V, Bergler H, Kadin ME, Sternberg DW, Kenner L, Hoefler G. The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling. *Blood*. American Society of Hematology; 2007 Nov 1;110(9):3374–83.

64. Wellmann A, Doseeva V, Butscher W, Raffeld M, Fukushima P, Stetler-Stevenson M, Gardner K. The activated anaplastic lymphoma kinase increases cellular proliferation and oncogene up-regulation in rat 1a fibroblasts. *FASEB J.* 1997 Oct;11(12):965–72.
65. Turner SD, Tooze R, Maclennan K, Alexander DR. Vav-promoter regulated oncogenic fusion protein NPM-ALK in transgenic mice causes B-cell lymphomas with hyperactive Jun kinase. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2003 Oct 30;22(49):7750–61.
66. Gu T-L, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood.* American Society of Hematology; 2004 Jun 15;103(12):4622–9.
67. Rassidakis GZ, Feretzaki M, Atwell C, Grammatikakis I, Lin Q, Lai R, Claret F-X, Medeiros LJ, Amin HM. Inhibition of Akt increases p27Kip1 levels and induces cell cycle arrest in anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* American Society of Hematology; 2005 Jan 15;105(2):827–9. PMID: PMC1382060
68. Piva R, Pellegrino E, Mattioli M, Agnelli L, Lombardi L, Boccalatte F, Costa G, Ruggeri BA, Cheng M, Chiarle R, Palestro G, Neri A, Inghirami G. Functional validation of the anaplastic lymphoma kinase signature identifies CEBPB and BCL2A1 as critical target genes. *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2006 Dec;116(12):3171–82. PMID: PMC1636692
69. Amin HM, McDonnell TJ, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, Leventaki V, Das P, Rassidakis GZ, Cutler C, Medeiros LJ, Lai R. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G(1) cell cycle arrest in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2004 Jul 15;23(32):5426–34.
70. Weilemann A, Grau M, Erdmann T, Merkel O, Sobhiafshar U, Anagnostopoulos I, Hummel M, Siegert A, Hayford C, Madle H, Wollert-Wulf B, Fichtner I, Dörken B, Dirnhofer S, Mathas S, Janz M, Emre NCT, Rosenwald A, Ott G, Lenz P, Tzankov A, Lenz G. Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2014 Oct 30.
71. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, Pacini R, Alunni C, Natali-Tanci L, Ugolini B, Sebastiani C, Cattoretti G, Pileri S, Dalla-Favera R, Stein H. 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.* 2000 Mar 15;95(6):2084–92.
72. Raetz EA, Perkins SL, Carlson MA, Schooler KP, Carroll WL, Virshup DM. The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase fusion protein induces c-Myc expression in pediatric anaplastic large cell lymphomas. *Am. J. Pathol.* 2002 Sep;161(3):875–83. PMID: PMC1867246
73. Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mehta-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-kappa B. *EMBO J.* 2002 Aug 1;21(15):4104–13. PMID: PMC126136

74. Mathas S, Kreher S, Meaburn KJ, Jöhrens K, Lamprecht B, Assaf C, Sterry W, Kadin ME, Daibata M, Joos S, Hummel M, Stein H, Janz M, Anagnostopoulos I, Schrock E, Misteli T, Dörken B. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Acad Sciences*; 2009 Apr 7;106(14):5831–6. PMID: PMC2667034
75. Janz M, Hummel M, Truss M, Wollert-Wulf B, Mathas S, Jöhrens K, Hagemeyer C, Bommert K, Stein H, Dörken B, Bargou RC. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by high constitutive expression of activating transcription factor 3 (ATF3), which promotes viability of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2006 Mar 15;107(6):2536–9.
76. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell.* 1987 Jun 19;49(6):729–39.
77. Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature.* Nature Publishing Group; 1995 Jan 19;373(6511):257–61.
78. Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Academy of Sciences*; 1986 Sep;83(18):6682–6. PMID: PMC386573
79. Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2390–400.
80. Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997 Apr;9(2):240–6.
81. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* 2004 Dec 1;117(Pt 25):5965–73.
82. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2003 Nov;3(11):859–68.
83. Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell.* 1988 Dec 2;55(5):917–24.
84. Ryseck RP, Bravo R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene.* 1991 Apr;6(4):533–42.
85. Chinenov Y, Kerppola TK. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene.* *Nature*



- Publishing Group; 2001 Apr 30;20(19):2438–52.
86. Kurokawa H, Motohashi H, Sueno S, Kimura M, Takagawa H, Kanno Y, Yamamoto M, Tanaka T. Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*. 2009 Dec;29(23):6232–44. PMID: PMC2786689
  87. Angel P, Smeal T, Meek J, Karin M. Jun and v-jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner. *New Biol*. 1989 Oct;1(1):35–43.
  88. Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2001 Apr 30;20(19):2365–77.
  89. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur. J. Cancer*. 2005 Nov;41(16):2449–61.
  90. Su Z-Z, Lee S-G, Emdad L, Lebdeva IV, Gupta P, Valerie K, Sarkar D, Fisher PB. Cloning and characterization of SARI (suppressor of AP-1, regulated by IFN). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Academy of Sciences*; 2008 Dec 30;105(52):20906–11. PMID: PMC2634918
  91. Murphy TL, Tussiwand R, Murphy KM. Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jul;13(7):499–509.
  92. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem*. 1995 Jul 14;270(28):16483–6.
  93. Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell*. 1988 Dec 2;55(5):875–85.
  94. Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T. Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*. 1991 Feb 8;64(3):573–84.
  95. Baker SJ, Kerppola TK, Luk D, Vandenberg MT, Marshak DR, Curran T, Abate C. Jun is phosphorylated by several protein kinases at the same sites that are modified in serum-stimulated fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 1992 Oct;12(10):4694–705. PMID: PMC360396
  96. Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*. Nature Publishing Group; 1991 Dec 12;354(6353):494–6.
  97. Fuchs SY, Dolan L, Davis RJ, Ronai Z. Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene*. 1996 Oct 3;13(7):1531–5.
  98. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000 Oct 13;103(2):239–52.

99. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*. 1995 Jul 21;269(5222):403–7.
100. Treisman R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1994 Feb;4(1):96–101.
101. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol. Rev.* Munksgaard International Publishers; 2005 Dec;208(1):126–40.
102. Shaulian E. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell. Signal.* 2010 Jun;22(6):894–9.
103. Behrens A, Sibilio M, David J-P, Möhle-Steinlein U, Tronche F, Schütz G, Wagner EF. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7):1782–90. PMID: PMC125360
104. Brüsselbach S, Möhle-Steinlein U, Wang ZQ, Schreiber M, Lucibello FC, Müller R, Wagner EF. Cell proliferation and cell cycle progression are not impaired in fibroblasts and ES cells lacking c-Fos. *Oncogene*. 1995 Jan 5;10(1):79–86.
105. Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME. Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 1998 Sep;18(9):5609–19. PMID: PMC109145
106. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Möhle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner EF. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes & Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999 Mar 1;13(5):607–19. PMID: PMC316508
107. Wisdom R, Johnson RS, Moore C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J.* 1999 Jan 4;18(1):188–97. PMID: PMC1171114
108. Passegué E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* EMBO Press; 2000 Jun 15;19(12):2969–79. PMID: PMC203376
109. Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol. Cell.* 2000 Nov;6(5):1109–19.
110. Rassidakis GZ, Thomaidis A, Atwell C, Ford R, Jones D, Claret F-X, Medeiros LJ. JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis. *Mod. Pathol.* Nature Publishing Group; 2005 Oct;18(10):1365–70. PMID: PMC1382062
111. Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J.* 2000 May 2;19(9):2056–68. PMID: PMC305681

112. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1672–7.
113. Shaulian E, Schreiber M, Piu F, Beeche M, Wagner EF, Karin M. The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*. 2000 Dec 8;103(6):897–907.
114. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. Nature Publishing Group; 2000 Nov 16;:307–10.
115. Passegué E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Möhle-Steinlein U, Wagner EF. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):21–32.
116. Andrecht S, Kolbus A, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M. Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J. Biol. Chem*. 2002 Sep 27;277(39):35961–8.
117. Passegué E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat. Genet*. Nature Publishing Group; 2002 Feb;30(2):158–66.
118. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature*. Nature Publishing Group; 1993 May 13;363(6425):166–9.
119. Devary Y, Gottlieb RA, Lau LF, Karin M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 1991 May;11(5):2804–11. PMID: PMC360059
120. Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1998 Jun 30;851:139–46.
121. Marti A, Jehn B, Costello E, Keon N, Ke G, Martin F, Jaggi R. Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene*. 1994 Apr;9(4):1213–23.
122. Buttyan R, Zakeri Z, Lockshin R, Wolgemuth D. Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol. Endocrinol*. 1988 Jul;2(7):650–7.
123. Bossy-Wetzel E, Bakiri L, Yaniv M. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J*. 1997 Apr 1;16(7):1695–709. PMID: PMC1169773
124. Preston GA, Lyon TT, Yin Y, Lang JE, Solomon G, Annab L, Srinivasan DG, Alcorta DA, Barrett JC. Induction of apoptosis by c-Fos protein. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 1996 Jan;16(1):211–8. PMID: PMC230994
125. Hafezi F, Steinbach JP, Marti A, Munz K, Wang ZQ, Wagner EF, Aguzzi A, Remé CE. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of

- photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat. Med.* 1997 Mar;3(3):346–9.
126. Eichhorst ST, Müller M, Li-Weber M, Schulze-Bergkamen H, Angel P, Krammer PH. A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 2000 Oct;20(20):7826–37. PMID: PMC86378
  127. Kolbus A, Herr I, Schreiber M, Debatin KM, Wagner EF, Angel P. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 2000 Jan;20(2):575–82. PMID: PMC85135
  128. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol. Cell.* 1998 Mar;1(4):543–51.
  129. Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron.* 2001 Mar;29(3):629–43.
  130. Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David J-P, Rath M, Wagner EF. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell.* 2003 Jan 24;112(2):181–92.
  131. Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*. Nature Publishing Group; 1993 Sep 9;365(6442):179–81.
  132. Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA. The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron.* 1999 Apr;22(4):667–76.
  133. Rebollo A, Dumoutier L, Renauld JC, Zaballos A, Ayllón V, Martínez-A C. Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology (ASM); 2000 May;20(10):3407–16. PMID: PMC85633
  134. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* Nature Publishing Group; 2002 May;4(5):E131–6.
  135. Vogt PK. Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group; 2002 Jun;2(6):465–9.
  136. Mariani O, Brennetot C, Coindre J-M, Gruel N, Ganem C, Delattre O, Stern M-H, Aurias A. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer Cell.* 2007 Apr;11(4):361–74.
  137. Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH,

- Spiegelman BM. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell*. 1995 Sep 8;82(5):721–32.
138. Zenz R, Scheuch H, Martin P, Frank C, Eferl R, Kenner L, Sibilio M, Wagner EF. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev. Cell*. 2003 Jun;4(6):879–89.
139. Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*. Nature Publishing Group; 2005 Sep 8;437(7056):281–5.
140. Bossy-Wetzel E, Bravo R, Hanahan D. Transcription factors junB and c-jun are selectively up-regulated and functionally implicated in fibrosarcoma development. *Genes & Development*. 1992 Dec;6(12A):2340–51.
141. Toft DJ, Rosenberg SB, Bergers G, Volpert O, Linzer DI. Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Nov 6;98(23):13055–9. PMID: PMC60823
142. Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. American Society of Hematology; 2003 Feb 15;101(4):1513–9.
143. Steidl U, Rosenbauer F, Verhaak RGW, Gu X, Ebralidze A, Otu HH, Klippel S, Steidl C, Bruns I, Costa DB, Wagner K, Aivado M, Kobbe G, Valk PJM, Passegué E, Libermann TA, Delwel R, Tenen DG. Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells. *Nat. Genet.* Nature Publishing Group; 2006 Nov;38(11):1269–77.
144. Wang ZQ, Grigoriadis AE, Möhle-Steinlein U, Wagner EF. A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *EMBO J.* European Molecular Biology Organization; 1991 Sep;10(9):2437–50. PMID: PMC452939
145. Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF. Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J. Cell Biol.* The Rockefeller University Press; 1993 Aug;122(3):685–701. PMID: PMC2119671
146. Risse-Hackl G, Adamkiewicz J, Wimmel A, Schuermann M. Transition from SCLC to NSCLC phenotype is accompanied by an increased TRE-binding activity and recruitment of specific AP-1 proteins. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 1998 Jun 11;16(23):3057–68.
147. Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou VE, Johnson R, Spiegelman BM. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J.* European Molecular Biology Organization; 1994 Jul 1;13(13):3094–103. PMID: PMC395200
148. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, Bussolino

- F, Oliviero S. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Academy of Sciences*; 1999 Aug 17;96(17):9671–6. PMID: PMC22268
149. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell*. 2008 Jun;14(6):818–29.
  150. Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M, Beug H. Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell*. 1992 Dec 24;71(7):1103–16.
  151. Fialka I, Schwarz H, Reichmann E, Oft M, Busslinger M, Beug H. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J. Cell Biol. The Rockefeller University Press*; 1996 Mar;132(6):1115–32. PMID: PMC2120757
  152. Fleischmann A, Jochum W, Eferl R, Witowsky J, Wagner EF. Rhabdomyosarcoma development in mice lacking Trp53 and Fos: tumor suppression by the Fos protooncogene. *Cancer Cell*. 2003 Dec;4(6):477–82.
  153. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science. American Association for the Advancement of Science*; 2008 Nov 14;322(5904):1097–100. PMID: PMC2756611
  154. Williams KL, Nanda I, Lyons GE, Kuo CT, Schmid M, Leiden JM, Kaplan MH, Taparowsky EJ. Characterization of murine BATF: a negative regulator of activator protein-1 activity in the thymus. *Eur. J. Immunol*. 2001 May;31(5):1620–7.
  155. Dorsey MJ, Tae HJ, Sollenberger KG, Mascarenhas NT, Johansen LM, Taparowsky EJ. B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family. *Oncogene*. 1995 Dec 7;11(11):2255–65.
  156. Hasegawa H, Utsunomiya Y, Kishimoto K, Tange Y, Yasukawa M, Fujita S. SFA-2, a novel bZIP transcription factor induced by human T-cell leukemia virus type I, is highly expressed in mature lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996 May 6;222(1):164–70.
  157. Wang J, Sun Q, Morita Y, Jiang H, Gross A, Lechel A, Hildner K, Guachalla LM, Gompf A, Hartmann D, Schambach A, Wuestefeld T, Dauch D, Schrezenmeier H, Hofmann W-K, Nakauchi H, Ju Z, Kestler HA, Zender L, Rudolph KL. A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):1001–14.
  158. Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee W-L, Smith WAE, Solomon B, Sahota G, Sim J, Mukasa R, Cemerski S, Hatton RD, Stormo GD, Weaver CT, Russell JH, Murphy TL, Murphy KM. The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17

- differentiation. *Nature*. 2009 Jul 16;460(7253):405–9. PMID: PMC2716014
159. Betz BC, Jordan-Williams KL, Wang C, Kang SG, Liao J, Logan MR, Kim CH, Taparowsky EJ. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *J. Exp. Med.* Rockefeller Univ Press; 2010 May 10;207(5):933–42. PMID: PMC2867277
  160. Ise W, Kohyama M, Schraml BU, Zhang T, Schwer B, Basu U, Alt FW, Tang J, Oltz EM, Murphy TL, Murphy KM. The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):536–43. PMID: PMC3117275
  161. Jabeen R, Goswami R, Awe O, Kulkarni A, Nguyen ET, Attenasio A, Walsh D, Olson MR, Kim MH, Tepper RS, Sun J, Kim CH, Taparowsky EJ, Zhou B, Kaplan MH. Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation; 2013 Nov;123(11):4641–53. PMID: PMC3809790
  162. Kurachi M, Barnitz RA, Yosef N, Odorizzi PM, Dilorio MA, Lemieux ME, Yates K, Godec J, Klatt MG, Regev A, Wherry EJ, Haining WN. The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2014 Apr;15(4):373–83. PMID: PMC4000237
  163. Iacobelli M, Wachsman W, McGuire KL. Repression of IL-2 promoter activity by the novel basic leucine zipper p21SNFT protein. *J. Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):860–8.
  164. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2012 Dec;13(12):1145–54. PMID: PMC3644874
  165. Senga T, Iwamoto T, Humphrey SE, Yokota T, Taparowsky EJ, Hamaguchi M. Stat3-dependent induction of BATF in M1 mouse myeloid leukemia cells. *Oncogene*. 2002 Nov 21;21(53):8186–91.
  166. Koch S, Mousset S, Graser A, Reppert S, Übel C, Reinhardt C, Zimmermann T, Rieker R, Lehr HA, Finotto S. IL-6 activated integrated BATF/IRF4 functions in lymphocytes are T-bet-independent and reversed by subcutaneous immunotherapy. *Sci Rep*. 2013;3:1754. PMID: PMC3639449
  167. Ikeda S, Saijo S, Murayama MA, Shimizu K, Akitsu A, Iwakura Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF- $\beta$ -induced Foxp3 expression. *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists; 2014 Feb 15;192(4):1449–58.
  168. Kuroda S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Takayanagi H, Iwai Y. Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011 Sep 6;108(36):14885–9. PMID: PMC3169148
  169. Deppmann CD, Thornton TM, Utama FE, Taparowsky EJ. Phosphorylation of

- BATF regulates DNA binding: a novel mechanism for AP-1 (activator protein-1) regulation. *Biochem. J.* Portland Press Limited; 2003 Sep 1;374(Pt 2):423–31. PMID: PMC1223616
170. Echlin DR, Tae HJ, Mitin N, Taparowsky EJ. B-ATF functions as a negative regulator of AP-1 mediated transcription and blocks cellular transformation by Ras and Fos. *Oncogene.* Nature Publishing Group; 2000 Mar 30;19(14):1752–63.
  171. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, Agarwal A, Huang W, Parkurst CN, Muratet M, Newberry KM, Meadows S, Greenfield A, Yang Y, Jain P, Kirigin FK, Birchmeier C, Wagner EF, Murphy KM, Myers RM, Bonneau R, Littman DR. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* 2012 Oct 12;151(2):289–303. PMID: PMC3503487
  172. Tussiwand R, Lee W-L, Murphy TL, Mashayekhi M, Wumesh KC, Albring JC, Satpathy AT, Rotondo JA, Edelson BT, Kretzer NM, Wu X, Weiss LA, Glasmacher E, Li P, Liao W, Behnke M, Lam SSK, Aurthur CT, Leonard WJ, Singh H, Stallings CL, Sibley LD, Schreiber RD, Murphy KM. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature.* 2012 Oct 25;490(7421):502–7. PMID: PMC3482832
  173. Glasmacher E, Agrawal S, Chang AB, Murphy TL, Zeng W, Vander Lugt B, Khan AA, Ciofani M, Spooner CJ, Rutz S, Hackney J, Nurieva R, Escalante CR, Ouyang W, Littman DR, Murphy KM, Singh H. A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. *Science.* 2012 Nov 16;338(6109):975–80.
  174. Li P, Spolski R, Liao W, Wang L, Murphy TL, Murphy KM, Leonard WJ. BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature.* 2012 Oct 25;490(7421):543–6. PMID: PMC3537508
  175. Brass AL, Kehrl E, Eisenbeis CF, Storb U, Singh H. Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes & Development.* 1996 Sep 15;10(18):2335–47.
  176. Eisenbeis CF, Singh H, Storb U. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes & Development.* 1995 Jun 1;9(11):1377–87.
  177. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006 Sep 22;126(6):1121–33.
  178. Brune V, Tiacci E, Pfeil I, Döring C, Eckerle S, van Noesel CJM, Klapper W, Falini B, Heydebreck von A, Metzler D, Bräuninger A, Hansmann M-L, Küppers R. Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J. Exp. Med.* 2008 Sep 29;205(10):2251–68. PMID: PMC2556780



179. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, Chan WC, Zhao T, Haioun C, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Campo E, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Connors JM, Braziel R, Grogan TM, Fisher RI, Miller TP, LeBlanc M, Chiorazzi M, Zhao H, Yang L, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Staudt LM. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J. Exp. Med.* 2003 Sep 15;198(6):851–62. PMID: PMC2194208
180. Schwering I, Bräuninger A, Distler V, Jesdinsky J, Diehl V, Hansmann M-L, Rajewsky K, Küppers R. Profiling of Hodgkin's lymphoma cell line L1236 and germinal center B cells: identification of Hodgkin's lymphoma-specific genes. *Mol. Med. The Feinstein Institute for Medical Research*; 2003 Mar;9(3-4):85–95. PMID: PMC1430727
181. Lorenzo Y, Provencio M, Lombardía L, Díaz R, Silva J, Herrera M, García JM, Peña C, García V, Romero J, Domínguez G, Bonilla F. Differential genetic and functional markers of second neoplasias in Hodgkin's disease patients. *Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research*; 2009 Aug 1;15(15):4823–8.
182. Logan MR, Jordan-Williams KL, Poston S, Liao J, Taparowsky EJ. Overexpression of Baff induces an apoptotic defect and an associated lymphoproliferative disorder in mice. *Cell Death Dis.* 2012;3(5):e310. PMID: PMC3366083
183. Weiser C, Petkova MV, Rengstl B, Döring C, Laer von D, Hartmann S, Küppers R, Hansmann M-L, Newrzela S. Ectopic expression of transcription factor BATF3 induces B-cell lymphomas in a murine B-cell transplantation model. *Oncotarget.* 2018 Mar 23;9(22):15942–51. PMID: PMC5882309
184. Piva R, Agnelli L, Pellegrino E, Todoerti K, Grosso V, Tamagno I, Fornari A, Martinoglio B, Medico E, Zamo A, Facchetti F, Ponzoni M, Geissinger E, Rosenwald A, Müller-Hermelink HK, De Wolf-Peeters C, Piccaluga PP, Pileri S, Neri A, Inghirami G. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J. Clin. Oncol. American Society of Clinical Oncology*; 2010 Mar 20;28(9):1583–90.
185. Lollies A, Hartmann S, Schneider M, Bracht T, Weiß AL, Arnolds J, Klein-Hitpass L, Sitek B, Hansmann ML, Kuppers R, Weniger MA. An oncogenic axis of STAT-mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia. Nature Publishing Group*; 2017 Jun 29;66(1):848–101.
186. Olive M, Krylov D, Echlin DR, Gardner K, Taparowsky E, Vinson C. A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J. Biol. Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18586–94.
187. Bornkamm GW, Berens C, Kuklik-Roos C, Bechet J-M, Laux G, Bachl J,

- Korndoerfer M, Schlee M, Hölzel M, Malamoussi A, Chapman RD, Nimmerjahn F, Mautner J, Hillen W, Bujard H, Feuillard J. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*; 2005;33(16):e137–7. PMID: PMC1201338
188. Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, Karras JG, Levy DE, Inghirami G. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat. Med. Nature Publishing Group*; 2005 Jun;11(6):623–9.
189. Schleußner N, Merkel O, Costanza M, Liang H-C, Hummel F, Romagnani C, Durek P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens K, Niedobitek A, Griffin PR, Piva R, Sczakiel HL, Woessmann W, Damm-Welk C, Hinze C, Stoiber D, Gillissen B, Turner SD, Kaergel E, Hoff von L, Grau M, Lenz G, Dörken B, Scheidereit C, Kenner L, Janz M, Mathas S. The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia. Nature Publishing Group*; 2018 Mar 28;12(9):933–2007. PMID: PMC6127090
190. Voo KS, Wang Y-H, Santori FR, Boggiano C, Wang Y-H, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu Y-J. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 Mar 24;106(12):4793–8. PMID: PMC2653560
191. Kumar N, Lyda B, Chang MR, Lauer JL, Solt LA, Burris TP, Kamenecka TM, Griffin PR. Identification of SR2211: a potent synthetic ROR $\gamma$ -selective modulator. *ACS Chem. Biol.* 2012 Apr 20;7(4):672–7. PMID: PMC3331898
192. Xiao S, Yosef N, Yang J, Wang Y, Zhou L, Zhu C, Wu C, Baloglu E, Schmidt D, Ramesh R, Lobera M, Sundrud MS, Tsai P-Y, Xiang Z, Wang J, Xu Y, Lin X, Kretschmer K, Rahl PB, Young RA, Zhong Z, Hafler DA, Regev A, Ghosh S, Marson A, Kuchroo VK. Small-molecule ROR $\gamma$ t antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms. *Immunity.* 2014 Apr 17;40(4):477–89. PMID: PMC4066874
193. Rui L, Schmitz R, Ceribelli M, Staudt LM. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol. Nature Publishing Group*; 2011 Sep 20;12(10):933–40.
194. Shaffer AL, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*; 2012;30(1):565–610.
195. Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3398–403.
196. Agnelli L, Mereu E, Pellegrino E, Limongi T, Kwee I, Bergaggio E, Ponzoni M, Zamo A, Iqbal J, Piccaluga PP, Neri A, Chan WC, Pileri S, Bertoni F, Inghirami G, Piva R, European T-cell Lymphoma Study Group. Identification of a 3-gene model as a powerful diagnostic tool for the recognition of ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma. *Blood. American Society of Hematology*; 2012 Aug 9;120(6):1274–81.

197. Leventaki V, Drakos E, Medeiros LJ, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Claret FX, Rassidakis GZ. NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1621–30.
198. Laimer D, Dolznig H, Kollmann K, Vesely PW, Schlederer M, Merkel O, Schiefer A-I, Hassler MR, Heider S, Amenitsch L, Thallinger C, Staber PB, Simonitsch-Klupp I, Artaker M, Lagger S, Turner SD, Pileri S, Piccaluga PP, Valent P, Messana K, Landra I, Weichhart T, Knapp S, Shehata M, Todaro M, Sexl V, Höfler G, Piva R, Medico E, Ruggeri BA, Cheng M, Eferl R, Egger G, Penninger JM, Jaeger U, Moriggl R, Inghirami G, Kenner L. PDGFR blockade is a rational and effective therapy for NPM-ALK-driven lymphomas. *Nat. Med. Nature Publishing Group*; 2012 Nov;18(11):1699–704.
199. Roukos V, Mathas S. The origins of ALK translocations. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2015 Jun 1;7:260–8.
200. Schiefer A-I, Vesely P, Hassler MR, Egger G, Kenner L. The role of AP-1 and epigenetics in ALCL. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2015 Jun 1;7:226–35.
201. Atsaves V, Zhang R, Ruder D, Pan Y, Leventaki V, Rassidakis GZ, Claret FX. Constitutive control of AKT1 gene expression by JUNB/CJUN in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma: a novel crosstalk mechanism. *Leukemia. Nature Publishing Group*; 2015 Nov;29(11):2162–72. PMID: PMC4633353
202. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I, Miura K, Harada S, Kikuchi M, Komatsu H, Banno S, Wakita A, Nakamura S, Eimoto T, Ueda R. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*. 2000 Mar;14(3):449–56.
203. Feldman AL, Law M, Remstein ED, Macon WR, Erickson LA, Grogg KL, Kurtin PJ, Dogan A. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia. Nature Publishing Group*; 2009 Mar;23(3):574–80. PMID: PMC2656414
204. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*; 2009;27(1):485–517.
205. Mosmann TR, Yokota T, Kastelein R, Zurawski SM, Arai N, Takebe Y. Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). *J. Immunol*. 1987 Mar 15;138(6):1813–6.
206. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med*. 2003 Dec 15;198(12):1951–7. PMID: PMC2194162
207. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol. Nature Publishing Group*; 2005 Nov;6(11):1133–41. PMID: PMC1618871

208. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2008 Jun;9(6):641–9. PMID: PMC2597394
209. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008 Jan;28(1):29–39. PMID: PMC2587175
210. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* Nature Publishing Group; 2010 Apr 29;464(7293):1381–5.
211. Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2007 Sep;8(9):958–66.
212. Hasan Z, Koizumi S-I, Sasaki D, Yamada H, Arakaki N, Fujihara Y, Okitsu S, Shirahata H, Ishikawa H. JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun.* Nature Publishing Group; 2017 May 30;8:15628. PMID: PMC5460000
213. Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2017 Dec 12;7(1):17402. PMID: PMC5727176
214. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* 2007 Dec;19(6):652–7. PMID: PMC2288775
215. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, Vose JM, McKeithan T, Kucuk C, Geng H, Deffenbacher K, Smith L, Dybkaer K, Nakamura S, Seto M, Delabie J, Berger F, Loong F, Au WY, Ko Y-H, Sng I, Armitage JO, Chan WC, International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* American Society of Hematology; 2010 Feb 4;115(5):1026–36. PMID: PMC2817630
216. Savan R, McFarland AP, Reynolds DA, Feigenbaum L, Ramakrishnan K, Karwan M, Shirota H, Klinman DM, Dunleavy K, Pittaluga S, Anderson SK, Donnelly RP, Wilson WH, Young HA. A novel role for IL-22R1 as a driver of inflammation. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):575–84. PMID: PMC3031481
217. Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2011 Dec 22;118(26):6881–92.

218. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Yared MA, Tsioli P, Leventaki V, Schmitt-Graeff A, Herling M, Amin HM, Lai R. Differential expression and clinical significance of tyrosine-phosphorylated STAT3 in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2003 Sep 1;9(10 Pt 1):3692–9.
219. Koues OI, Collins PL, Cella M, Robinette ML, Porter SI, Pyfrom SC, Payton JE, Colonna M, Oltz EM. Distinct Gene Regulatory Pathways for Human Innate versus Adaptive Lymphoid Cells. *Cell.* 2016 May 19;165(5):1134–46. PMID: PMC4874868
220. McKenzie ANJ, Spits H, Eberl G. Innate lymphoid cells in inflammation and immunity. *Immunity.* 2014 Sep 18;41(3):366–74.
221. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer.* 1975 Aug 15;16(2):230–9.
222. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2011 Jan;12(1):21–7.
223. Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J-I, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* Nature Publishing Group; 2010 Jan 28;463(7280):540–4.
224. Price AE, Liang H-E, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eislely CJ, Erle DJ, Locksley RM. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. National Academy of Sciences;* 2010 Jun 22;107(25):11489–94. PMID: PMC2895098
225. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews;* 2012;30(1):647–75.
226. Montaldo E, Juelke K, Romagnani C. Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur. J. Immunol.* Wiley-Blackwell; 2015 Aug;45(8):2171–82.
227. Bard JD, Gelebart P, Anand M, Amin HM, Lai R. Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia.* Nature Publishing Group; 2008 Aug;22(8):1595–603. PMID: PMC3429118
228. Berger GK, McBride A, Lawson S, Royball K, Yun S, Gee K, Bin Riaz I, Saleh AA, Puvvada S, Anwer F. Brentuximab vedotin for treatment of non-Hodgkin lymphomas: A systematic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2017 Jan;109:42–50. PMID: PMC5218629
229. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu Y-L, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D, Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD,

- Jänne PA. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society*; 2013 Jun 20;368(25):2385–94.
230. Shaw AT, Engelman JA. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society*; 2014 Jun 26;370(26):2537–9.
231. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ, Cetnar J, West H, Camidge DR, Socinski MA, Chiappori A, Mekhail T, Chao BH, Borghaei H, Gold KA, Zeaiter A, Bordogna W, Balas B, Puig O, Henschel V, Ou S-HI, study investigators. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Feb;17(2):234–42. PMID: PMC4752892
232. Kim D-W, Tiseo M, Ahn M-J, Reckamp KL, Hansen KH, Kim S-W, Huber RM, West HL, Groen HJM, Hochmair MJ, Leighl NB, Gettinger SN, Langer CJ, Paz-Ares Rodríguez LG, Smit EF, Kim ES, Reichmann W, Haluska FG, Kerstein D, Camidge DR. Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase II Trial. *J. Clin. Oncol.* 2017 Aug 1;35(22):2490–8.
233. Richly H, Kim TM, Schuler M, Kim D-W, Harrison SJ, Shaw AT, Boral AL, Yovine A, Solomon B. Ceritinib in patients with advanced anaplastic lymphoma kinase-rearranged anaplastic large-cell lymphoma. *Blood. American Society of Hematology*; 2015 Sep 3;126(10):1257–8. PMID: PMC4559938
234. Takeuchi K, Togashi Y, Kamihara Y, Fukuyama T, Yoshioka H, Inoue A, Katsuki H, Kiura K, Nakagawa K, Seto T, Maemondo M, Hida T, Harada M, Ohe Y, Nogami N, Yamamoto N, Nishio M, Tamura T. Prospective and clinical validation of ALK immunohistochemistry: results from the phase I/II study of alectinib for ALK-positive lung cancer (AF-001JP study). *Ann. Oncol.* 2016 Jan;27(1):185–92. PMID: PMC4684157
235. Pandya VB, Kumar S, Sachchidanand, Sharma R, Desai RC. Combating Autoimmune Diseases With Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor- $\gamma$  (ROR $\gamma$  or ROR $\gamma$ c) Inhibitors: Hits and Misses. *J. Med. Chem. American Chemical Society*; 2018 Jul 30;61(24):10976–95.
236. Guendisch U, Weiss J, Ecoeur F, Riker JC, Kaupmann K, Kallen J, Hintermann S, Orain D, Dawson J, Billich A, Guntermann C. Pharmacological inhibition of ROR $\gamma$ t suppresses the Th17 pathway and alleviates arthritis in vivo. Ashour HM, editor. *PLoS ONE.* 2017;12(11):e0188391. PMID: PMC5695821
237. Bronner SM, Zbieg JR, Crawford JJ. ROR $\gamma$  antagonists and inverse agonists: a patent review. *Expert Opin Ther Pat. Taylor & Francis*; 2017 Jan;27(1):101–12.
238. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron J-C, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol. Nature Publishing Group*; 2007 Sep;8(9):950–7.

239. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CEM, Papp K, Puig L, Nakagawa H, Spelman L, Sigurgeirsson B, Rivas E, Tsai T-F, Wasel N, Tying S, Salko T, Hampele I, Notter M, Karpov A, Helou S, Papavassilis C, ERASURE Study Group, FIXTURE Study Group. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N. Engl. J. Med. Massachusetts Medical Society*; 2014 Jul 24;371(4):326–38.
240. Griffiths CEM, Reich K, Lebwohl M, van de Kerkhof P, Paul C, Menter A, Cameron GS, Erickson J, Zhang L, Secrest RJ, Ball S, Braun DK, Osuntokun OO, Heffernan MP, Nickoloff BJ, Papp K, UNCOVER-2 and UNCOVER-3 investigators. Comparison of ixekizumab with etanercept or placebo in moderate-to-severe psoriasis (UNCOVER-2 and UNCOVER-3): results from two phase 3 randomised trials. *Lancet*. 2015 Aug 8;386(9993):541–51.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nikolai Schleußner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Expressionsanalyse und funktionelle Charakterisierung der AP-1-Faktoren BATF und BATF3 im anaplastischen großzelligen Lymphom* [*Expression and functional characterization of the AP-1-factors BATF and BATF3 in anaplastic large cell lymphoma*] selbstständig und ohne nicht offen gelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift



## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Nikolai Schleußner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. **Schleussner N\***, Merkel O\*, Costanza M, Liang HC, Hummel F, Romagnani C, Durek P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens K, Niedobitek A, Griffin PR, Piva R, Sczakiel HL, Woessmann W, Damm-Welk C, Hinze C, Stoiber D, Gillissen B, Turner SD, Kaergel E, von Hoff L, Grau M, Lenz G, Dörken B, Scheidereit C, Kenner L, Janz M, Mathas S. The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2018 Sep;32(9):1994-2007. doi: 10.1038/s41375-018-0045-9. Epub 2018 Mar 28. \*, geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen:

Herr Schleußner hatte als gleichberechtigter Erstautor mit Olaf Merkel erheblichen Anteil an den praktischen Laborarbeiten sowie an dem Konzept der Veröffentlichung, erstellte die Abbildungen und verfasste zusammen mit den Ko-Autoren das Manuskript. Alle von Herrn Schleußner direkt durchgeführten Arbeiten sind in der Promotionsschrift ausgeführt. Zu den von ihm durchgeführten praktischen Arbeiten der Publikation gehören die EMSA- und Expressionsanalysen sowie Co-Immunpräzipitationen aus Fig. 1, die siRNA-vermittelte Interferenz der Genexpression aus Fig. 2, die globale Inhibition der AP-1-Aktivität aus Fig. 3, die Genexpression der TH17/ILC3-Gene und der Doppel-knock-out von BATF und BATF3 aus Fig. 4 und die Expressionsanalysen und die Behandlung der Zelllinien mittels Inhibitoren aus Fig. 6. Zusätzlich war er an den praktischen Arbeiten aller *Supplementary Figures* beteiligt.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

1. **Schleussner N\***, Merkel O\*, Costanza M, Liang HC, Hummel F, Romagnani C, Durek P, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens K, Niedobitek A, Griffin PR, Piva R, Sczakiel HL, Woessmann W, Damm-Welk C, Hinze C, Stoiber D, Gillissen B, Turner SD, Kaergel E, von Hoff L, Grau M, Lenz G, Dörken B, Scheidereit C, Kenner L, Janz M, Mathas S. The AP-1-BATF and -BATF3 module is essential for growth, survival and TH17/ILC3 skewing of anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2018 Sep;32(9):1994-2007. doi: [10.1038/s41375-018-0045-9](https://doi.org/10.1038/s41375-018-0045-9). Epub 2018 Mar 28. \*, geteilte Erstautorenschaft
2. von Hoff L, Kärgel E, Franke V, McShane E, Schulz-Beiss KW, Patone G, **Schleussner N**, Kolesnichenko M, Hübner N, Daumke O, Selbach M, Akalin A, Mathas S, Scheidereit C. Autocrine LTA signaling drives NF-κB and JAK-STAT activity and myeloid gene expression in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2019 Mar 28;133(13):1489-1494. doi: [10.1182/blood-2018-08-871293](https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-871293). Epub 2019 Jan 29.

## Danksagung

Der größte Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Stephan Mathas für die Begleitung dieser Promotion und sein Vertrauen in mich. Seine unermüdliche Unterstützung, detailreichen Erklärungen und Ratschläge sowie die vielen Hilfestellungen führten mich durch die gesamte Zeit. Seine Freude an und seine Leidenschaft für die Wissenschaft, seine Aufmerksamkeit für kleinste Details und unsere intensiven und humorvollen Diskussionen entfachten in mir selbst eine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten.

Herr PD Dr. med. Martin Janz begleitete mich kontinuierlich mit vielen Hilfestellungen sowie zahlreichen Anregungen und Ideen. Simone Lusatis, Brigitte Wollert-Wulf und Sandra Wegener leisteten exzellente und tatkräftige technische Unterstützung in vielen gemeinsamen Stunden im Labor ebenso wie Franziska Hummel und Ute Nitschke mit ihrer technischen Assistenz.

Dr. rer. nat. Wiebke Winkler verdanke ich zahlreiche Ideen aus unseren Diskussionen und Henrike Lisa Sczakiel viele Hilfestellungen und Anregungen. Mariantonia Costanza unterstützte mich tatkräftig bei der Publikation.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Björn Lamprecht für seine herzliche Aufnahme in das Labor und eine exzellente Einarbeitung in die experimentelle Arbeit.

Zudem gilt mein Dank allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Janz/Mathas (ehemals Fachgruppe Dörken) für eine schöne Zeit und angenehme Atmosphäre im Labor. Zusätzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernd Dörken für seine Unterstützung sowie für die Aufnahme in sein Labor.

Dr. rer. nat. Eva Kärgel und Dr. rer. nat. Linda von Hoff sowie Ass. Prof. Doz. Dr. Olaf Merkel waren eine große Hilfe bei der Erstellung der Publikation.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich einen besonderen Dank aussprechen, da sie mich immer unterstützt und mir jederzeit den Rücken gestärkt haben.