

Aus dem CharitéCentrum für Tumormedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Dörken

Habilitationsschrift

Aktivierete Signalwege und Zytokinexpression in malignen Lymphomen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Stephan Kreher

Eingereicht: 02/2017

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

3. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Keller

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGEN	3
1. EINLEITUNG	6
1.1 B-Zell-Differenzierung und allgemeine Lymphompathogenese	6
1.2 Das klassische Hodgkin-Lymphom	7
1.2.1 Aktivierte Signalwege in HRS-Zellen	8
1.2.1.1 Der NF- κ B-Signaltransduktionsweg	8
1.2.1.2 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg	10
1.2.1.3 Der AP-1/CREB-Komplex	10
1.2.1.4 Der NOTCH- und PI3K/MEK-Signalweg	10
1.2.2 Die pathogenetische Bedeutung der Zytokin- und Chemokin-Expression im cHL	11
1.3 Lymphome des zentralen Nervensystems	13
1.3.1 Aktivierte Signalwege und genetische Aberrationen bei PZNSL	15
2. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG EIGENER ARBEITEN	16
2.1 Deregulierte Signalwege und Zytokinexpression in Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms	16
2.1.1 IRF5 als zentraler Regulator des Hodgkin-spezifischen Genexpressions-programmes	16
2.1.2 Die aberrante Aktivierung des Protoonkogens CSFR1 in HRS-Zellen	28
2.1.3 Die Bedeutung des aberrant exprimierten Zytokins IL-21 im cHL	40
2.2 Signalwegsaktivierung und genetische Aberrationen in T-Zell-Lymphomen	42
2.2.1 Zusammenfassende Darstellung eigener Arbeiten	51
2.3 Aktivierte Signalwege und Zytokine als diagnostische und prognostische Biomarker bei ZNS-Lymphomen	54
2.3.1 Der prognostische Einfluss von BCL-6 bei primären ZNS-Lymphomen	54
2.3.2 Die diagnostische und prognostische Bedeutung von Osteopontin im Liquor von Patienten mit ZNS-Lymphomen	62
3. DISKUSSION	70
3.1 Die hierarchische Ordnung aktivierter Signalwege und Ausbildung des inflammatorischen Phänotyps im cHL	70
3.2 Die Expression B-Linien-fremder Gene und deren funktionelle Bedeutung für die Biologie des cHL	73
3.3 Therapeutische Implikationen	74
3.4 Molekulare Biomarker bei PZNSL	76
3.4.1 Zytokine als diagnostische und prognostische Biomarker bei ZNSL	77
4. ZUSAMMENFASSUNG	80
5. LITERATURANGABEN	81
DANKSAGUNG	89
ERKLÄRUNG	90

ABKÜRZUNGEN

ABF-1	activated B cell factor 1
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AKT	Serin/Threonin Kinase 1
ALCL	Anaplastisch großzelliges T-Zell-Lymphom
AP-1	activator protein-1
ATF	activating transcription factor
BCL	B-cell CLL/lymphoma
BCR	B-cell receptor; B-Zell-Rezeptor
CARD11	caspase recruitment domain family member 11
CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3
CCR	c-c motif chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
cHL	classical Hodgkin lymphoma; klassisches Hodgkin-Lymphom
c-IAP	cellular inhibitor of apoptosis
CIITA	class II major histocompatibility complex transactivator
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
c-Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CREB	cAMP responsive element binding protein
CSF-1	colony stimulating factor-1
CSF1R	CSF-1-Rezeptor
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	C-X-C motif chemokine receptor
DHS	DNase-I-Hypersensitivitätsregion
DLBCL	diffus large B cell lymphoma; Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	deoxyribonucleic acid; Deoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
E-BOX	enhancer box
EBV	Epstein-Barr-Virus
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FGF	fibroblast growth factor
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FOXP3	forkhead box P3
FRA2	fos-related antigen 2

GBM	Glioblastoma multiforme
gc	gamma chain
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HDAC	Histondeacetylase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	human leukocyte antigen
HR	Hazard-Ratio
HRS	Hodgkin-/Reed-Sternberg
ID2	inhibitor of DNA binding 2; inhibitor of differentiation 2
Ig	Immunglobulin
IGV	immunoglobuline variable region; variable Immunglobulin-Region
IκB	inhibitor of kappa B
IKK	IκB-Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-21R	Interleukin-21-Rezeptor
IRF	interferon regulatory factor
JAK	Janus Kinase
Kb	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
LGALS	lectin, galactose binding, soluble
LP	lymphozyten-prädominant
LPS	Lipopolysaccharide
LT	lymphotoxin; Lymphotoxin
LTR	long terminal repeat
MaLR	mammalian apparent LTR retrotransposon
MALT	mucosa associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCC	mutated in colorectal cancers
MCL-1	myeloid cell leukemia 1
MEK	MAPK-Kinase
MHC	major histocompatibility complex
MIP-3α	macrophage-inflammatory protein-3α
mRNA	messenger RNA
NPM	nucleophosmin
MS	Multiple Sklerose
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
N-CoR	nuclear receptor corepressor

NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFKBIA	NF- κ B inhibitor alpha
NFKBIE	NF- κ B inhibitor epsilon
NFKBIZ	NF- κ B inhibitor zeta
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NK	natural killer
NLPHL	noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
OCT1	POU class 2 homeobox 1
OPN	Osteopontin
OS	overall survival; Gesamtüberleben
PAX5	paired box 5
PD-1	programmed cell death 1
PFS	progression-free survival; Progressions-freies Überleben
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PMNC	peripheral blood mononuclear cells; mononukleäre Blutzellen
PRDM	PR/SET domain 1; BLIMP1
PZNSL	Primäres ZNS-Lymphom
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
ROC	receiver operating characteristic
SeSy	Sézary-Syndrom
shRNA	small hairpin RNA
SPP1	secreted phosphoprotein-1
STAT	signal transducer and activator of transcription
SZNSL	Sekundäres ZNS-Lymphom
TBK	TANK binding kinase 1
TCF	T cell factor
TF	Transkriptionsfaktor
TH	T-Helfer-Lymphozyt
TH2	T-Helfer-2-Lymphozyt
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFAIP	TNF alpha induced protein
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
XBP	X-box binding protein
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZNSL	ZNS-Lymphom

1. EINLEITUNG

1.1 B-Zell-Differenzierung und allgemeine Lymphompathogenese

Maligne Lymphome sind klonale Neoplasien des lymphatischen Systems. Am häufigsten finden sich reifzellige B-Zell-Lymphome, die ihren Ursprung von gesunden B-Zellen innerhalb der normalen B-Zelldifferenzierung nehmen. Die physiologische B-Zell-Entwicklung beginnt mit der Progenitor-B-Zelle, die sich durch VDJ-Genumlagerung des Immunglobulin-Genlokus in weiteren Differenzierungsschritten zur naiven IgM⁺ IgD⁺ B-Zelle differenziert. Naive B-Zellen zirkulieren im peripheren Blut und lymphatischen System und können nach spezifischem Antigen-Kontakt zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle bzw. zur Gedächtnis-B-Zelle ausreifen. Dieser komplexe Differenzierungsprozess findet innerhalb des Keimzentrums eines Lymphfollikels statt. Durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden follikulären dendritischen Zellen differenzieren sich B-Zellen im Keimzentrum vom Zentroblast zum Zentrocyt und nachfolgend weiter zur Plasmazelle bzw. zur Gedächtnis-B-Zelle. Die Äffinitätsreifung des B-Zell-Rezeptors (BCR) durch somatische Hypermutation innerhalb der schweren und leichten variablen Immunglobulinkette (IGV) führt zur Affinitätserhöhung des BCR zum spezifischen Antigen und damit zur Effizienzerhöhung der adaptiven Immunantwort. Gleichzeitig erfolgt in einigen B-Zellen eine weitere Genumlagerung der schweren Immunglobulin-Kette, die zu einem Klassenwechsel der Immunglobuline (IgG, IgA) führt.

Ausgangspunkt der Lymphomentstehung sind spezifische genetische und molekulare Veränderungen, die wichtige zellbiologische Kontrollmechanismen u.a. zur Regulation von Zellwachstum, Proliferation, Energiehaushalt und Apoptose beeinflussen. Die molekulare Pathogenese maligner Lymphome lässt sich dabei zusammenfassend auf eine aberrante Aktivierung intrazellulärer Signalwege, einer transkriptionellen und epigenetischen Dysregulation sowie auf das Entkommen einer Erkennung bzw. einer Abwehr durch das Immunsystem (Immunevasion) zurückführen [1, 2]. Viele aktivierte Signalwege in malignen Lymphomen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen B-Zellentwicklung sowie der transienten Aktivierung von B-Zellen im Rahmen einer adaptiven Immunantwort. Die aberrante Aktivierung in Lymphomzellen beruht dabei im Allgemeinen auf Mutations- oder Translokationsereignissen, die zur Aktivierung von Effektormolekülen (*gain-of-function* Mutation) oder zur Inaktivierung von Negativregulatoren (*loss-of-function* Mutation) führen [3]. Ebenso kann eine konstitutive autokrine oder parakrine Rezeptorstimulation einer deregulierten Aktivierung eines onkogenen Signalweges zugrunde liegen. Hierbei spielen verschiedene lösliche oder zellgebundene Signalmediatoren, Zytokine und Chemokine, eine wesentliche Rolle. Zytokine umfassen eine große Gruppe kleiner Proteine oder Glykoproteine,

die insbesondere im Rahmen der angeborenen und adaptiven Immunantwort vielfältige zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Aktivierung, Chemoattraktion aber auch die lokale und zeitliche Begrenzung einer Immunreaktion bis hin zum programmierten Zelltod steuern. Durch direkte Interaktion mit ihrem spezifischen zellmembran-gebundenen Rezeptor vermitteln sie auf autokrinem, parakrinem oder auch endokrinem Weg die Interaktion der verschiedenen, an einer Immunantwort beteiligten Zellen und Zelltypen.

In den letzten Jahren hat sich ein zunehmendes Verständnis der pathogenetischen Bedeutung des Tumormikroenvironments für Wachstum, Proliferation, Chemoresistenz und Immunevasion der malignen Zellen entwickelt [4, 5]. Auch hier haben Zyto- und Chemokine eine zentrale Funktion für die Ausbildung und Aufrechterhaltung des Tumormikromilieus, der Lymphom-Stromazell-Interaktion sowie der Aktivierung verschiedener, für die Tumorzellen überlebenswichtiger Signalwege.

Im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeiten habe ich mich vorwiegend mit dem klassischen Hodgkin-Lymphom sowie mit primären und sekundären Lymphomen des zentralen Nervensystems beschäftigt. Die Aktivierung onkogener Signalwege sowie die Expression spezifischer Zyto- und Chemokine haben für diese Lymphomentitäten eine zentrale pathogenetische Bedeutung, gleichzeitig aber auch eine diagnostische und prognostische Relevanz.

1.2 Das klassische Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom ist eine klonale Erkrankung der B-Zellreihe mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 2-3/100.000/Jahr [6, 7]. Generell wird zwischen dem klassischen Hodgkin-Lymphom (*classical Hodgkin lymphoma*; cHL) und dem nodulärem Lymphozyten-prädominantem Hodgkin-Lymphom (NLPHL) unterschieden. Nach histologischen Kriterien ist eine weitere Charakterisierung des cHL in insgesamt 4 Subtypen möglich, nodulär sklerosierender, *mixed cellularity*, lymphozyten-depletierter und dem lymphozyten-reichen Subtyp [8, 9].

Histologisch ist das cHL durch ein ausgedehntes inflammatorisches Begleitinfiltrat charakterisiert, welches vorwiegend aus Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, Eosinophilen, Mastzellen und dendritischen Zellen besteht [10]. Die eigentlichen Tumorzellen, welche lediglich 1-2% der Gesamttumorzellmasse ausmachen, sind die großen, einkernigen Hodgkin- sowie die häufig doppel- oder vielkernigen Reed-Sternberg-Zellen (im Folgenden als Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen oder HRS-Zellen zusammengefasst). Diese sind phänotypisch durch eine einzigartige Morphologie charakterisiert. Neben einer konsistenten Expression der Aktivierungsmarker *cluster of differentiation* (CD) 30 (CD30), CD40, des

Transkriptionsfaktors (TF) IRF4 sowie variabel CD15 zeichnen sie sich durch einen Verlust des klassischen B-Zell-Phänotyps mit fehlender Expression des BCR, wichtiger Komponenten des BCR-Signalweges sowie B-Zell-spezifischer bzw. –relevanter TF wie PU.1, Oct-2 und BOB.1 aus [11-13]. Stattdessen exprimieren sie eine Vielzahl von B-Linien fremden Markern, die normalerweise nur exklusiv innerhalb der T-Zell-Reihe, auf dendritischen Zellen, Natürlichen Killer (NK)-Zellen oder myeloischen Zellen exprimiert werden [14, 15]. Erst durch Mikrodissektion der HRS-Zellen und Nachweis einer stattgefundenen Immunglobulin-Genumlagerung (VDJ) sowie somatischen Hypermutation innerhalb der variablen Ketten konnte die Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums-B-Zelle als Ursprungszelle der HRS-Zellen identifiziert werden [16]. In ca. 25% der cHL finden sich destruktive, sog. *crippled* Mutationen, die in der Konsequenz in nicht-funktionalen IGV-Rearrangierungen resultieren und im Rahmen der physiologischen B-Zelldifferenzierung zur Apoptose der B-Zelle führen würden [6]. Daher hat sich das generelle Konzept etabliert, dass die HRS-Zellen nach Apoptose-Rescue pathogenetisch aus diesen Keimzentrums-B-Zellen hervorgehen.

Die Tumorzellen des NLPHL, die sogenannten Lymphozyten-prädominanten Zellen (LP), ähneln in ihrem Immunphänotyp vorwiegend Keimzentrums-B-Zellen und sind in der Regel CD30 und CD15 negativ [17].

In ca. der Hälfte der cHL findet sich in den HRS-Zellen eine Epstein-Barr-Virus-Infektion (EBV) mit Expression der EBV-Proteine EBV *nuclear antigen* (EBNA1) und *latent membrane protein* (LMP) 1 und 2A, so dass eine Infektion mit EBV in mutmaßlich pathogenetischem Zusammenhang in einem relevanten Anteil aller Hodgkin-Lymphome gesehen werden kann [18].

1.2.1 Aktivierte Signalwege in HRS-Zellen

1.2.1.1 Der NF- κ B-Signaltransduktionsweg

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl molekularer Veränderungen in den HRS-Zellen nachgewiesen werden, die mit der physiologischen zellulären B-Zelldifferenzierung interferieren, ein gesteigertes Zellwachstum und Proliferation koordinieren und damit zur malignen Transformation der ursprünglichen B-Zelle beitragen. An erster Stelle ist hier die konstitutive Aktivierung des *nuclear factor kappa B* (NF- κ B)-Signalweges zu nennen [19, 20]. Die TF-Familie NF- κ B besteht aus den Untereinheiten p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel. Gebunden als Homo- oder Heterodimere werden sie in ihrer inaktiven Form durch den *Inhibitor kappa B* ($\text{I}\kappa\text{B}$) im Cytoplasma zurückgehalten. Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung des NF- κ B-Signalweges führt über die Aktivierung der Kinase IKK zur Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}$, welches daraufhin proteasomal degradiert wird. Die liberierten NF- κ B-Homo- oder -Heterodimere translozieren als aktiver Komplex in den Zellkern und induzieren durch die

Bindung regulatorischer Gensequenzen die Expression einer Vielzahl verschiedener Zielgene [21, 22].

Neben diesem klassischen, kanonischen Aktivierungsweg, der vornehmlich die Heterodimere p50/p65 betrifft, existiert ein alternativer Signalweg, der im cHL ebenfalls konstitutiv aktiviert ist [23-25]. Dieser nicht-kanonische Signalweg wird über verschiedene Oberflächenrezeptoren wie CD40, Lymphotoxin (LT)-Rezeptor und Toll-like-Rezeptoren (TLR) aktiviert. Die jeweilige Rezeptorstimulation führt dabei zur Aktivierung der NF- κ B *inducing kinase* (NIK), welche wiederum IKK α aktiviert. Der aktivierte IKK α -Komplex phosphoryliert p100 innerhalb von p100-RelB-Dimeren. Die nachfolgende partielle Degradation von p100 in p52 führt zu aktiven p52-RelB-Dimeren, welche in den Zellkern translozieren und die Expression entsprechender Zielgene induzieren.

Die konstitutive Aktivierung des kanonischen und nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweges in den HRS-Zellen beeinflusst maßgeblich die Biologie des cHL. Über die Expression proliferationsfördernder bzw. antiapoptotischer Faktoren wie Cyclin D2, A1, c-IAP2 oder BCL-XL vermitteln sie Wachstum und Überleben der Lymphomzellen [20, 22]. Die experimentelle Inhibition des NF- κ B-Signalweges führt dabei zur Reduktion der Proliferation sowie Apoptose-Induktion der HRS-Zellen [19, 22, 26, 27]. Durch die Vielzahl induzierter proinflammatorischer und immunregulatorischer Zyto- und Chemokine bildet die konstitutive NF- κ B-Aktivität zudem die Grundlage für den einzigartigen inflammatorischen Phänotyp der HRS-Zellen und das klassische histologische Erscheinungsbild des cHL [21, 28, 29].

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an genetischen Veränderungen in den HRS-Zellen charakterisiert, die in der Konsequenz eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zur Folge haben. So lassen sich in ca. 10-20% der cHL Mutationen in den Genen für *NFKBIA* und *NFKBIE* detektieren, die durch die Einfügung eines präterminalen Stop-Codons zum Verlust eines funktionellen I κ B α - oder I κ B ϵ -Moleküls führen [30-33]. Weiterhin lassen sich in ca. 40% aller cHL inaktivierende Mutationen im Gen *TNFAIP3* identifizieren, welches für den *Inhibitor of NF- κ B A20* kodiert [34, 35]. Zusätzliche genetische Aberrationen betreffen u.a. eine genomische Amplifikation des *REL* Gens [36, 37] sowie *MAP3K14 (NIK)* [38, 39].

Neben den genannten genetischen Aberrationen wird eine para- oder autokrine Stimulation verschiedener Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-Familie wie CD30, CD40 oder *receptor activator of NF- κ B (RANK)* angenommen, die zur Aktivierung bzw. zur verstärkten Stimulation des aktivierten NF- κ B-Signalweges führen [40, 41]. Viele dieser Oberflächenrezeptoren und deren Liganden weisen in den HRS-Zellen eine starke Überexpression mit mutmaßlich konstitutiv-aktivierter Rezeptorstimulation auf [29, 41, 42].

1.2.1.2 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

Ein weiterer, konstitutiv-aktivierter Signalweg in HRS-Zellen ist der JAK/STAT-Signalweg, der durch verschiedene Zytokine und deren spezifische membrangebundene Rezeptoren aktiviert wird. Eine Zytokin-induzierte Zytokinrezeptorstimulation führt dabei zur Aktivierung verschiedener Januskinasen (JAK), die die in der Signalkaskade nachgeschalteten *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Faktoren phosphorylieren und damit aktivieren. Im humanen System sind insgesamt 4 JAK- und sieben STAT-Proteine bekannt. Die phosphorylierungsabhängige STAT-Aktivierung führt zur Ausbildung aktiver STAT-Dimere, die in den Zellkern translozieren und spezifische, regulatorische DNA-Bindungs-elemente transaktivieren. Eine Vielzahl an Arbeiten konnte die konstitutive Aktivierung von STAT3, STAT5a, STAT5b und STAT6 in den HRS-Zellen und deren pathogenetische Bedeutung für Wachstum und Überleben nachweisen [43-46]. Verschiedene genetische Aberrationen in den HRS-Zellen lassen sich in Zusammenhang mit der konstitutiven JAK/STAT-Aktivierung bringen. In ca. 20 % lässt sich eine chromosomale Amplifizierung des *JAK2*-Genlokus nachweisen [47, 48]. Zudem zeigen sich in 40% der cHL-Fälle inaktivierende Mutationen in den Genen für *SOCS1* und *PTPN1*, wichtigen negativen Regulatoren des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges [49, 50].

1.2.1.3 Der AP-1/CREB-Komplex

Als weitere wichtige Transkriptionsfaktorfamilie ist der AP-1/CREB-Komplex konstitutiv in den HRS-Zellen aktiviert. Aktive AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexe bestehen aus Dimeren von Proteinen der JUN- und FOS-Familie. Insbesondere die Transkriptionsfaktoren c-Jun, JUNB und ATF3 sind in einem hohen Maße in den HRS-Zellen exprimiert und bilden untereinander transkriptionell aktive Proteinkomplexe aus [51, 52]. Verschiedene Arbeiten konnten dabei zeigen, dass die konstitutive AP-1-Aktivität die Expression wichtiger Zielgene wie *CD30* oder *LGALS1* (*Galectin-1*) induziert und maßgeblich zum Wachstum und Überleben der HRS-Zellen beiträgt [51-54].

1.2.1.4 Der NOTCH- und PI3K/MEK-Signalweg

Neben der konstitutiven Aktivierung von NF- κ B, des JAK/STAT- sowie des AP-1/CREB-Signalweges geben verschiedene Arbeiten Hinweise auf eine konstitutive Aktivierung des NOTCH- [55-58] und des PI3K/MEK-Signalweges [59-61]. Die NOTCH-Aktivierung wird dabei wahrscheinlich über den Liganden jagged 1 induziert, der von Zellen des Tumormikroenvironments exprimiert wird [56].

PI3K/MEK wird durch eine Vielzahl externer Stimuli und spezifischer Ligand-Rezeptor-

Interaktionen aktiviert (z. Bsp. über CD40, CD30, RANK). In HRS-Zellen lässt sich eine konstitutive Phosphorylierung von AKT als Zeichen der chronischen PI3K/AKT-Aktivierung nachweisen. Die therapeutische Inhibition von AKT führt im Zelllinienmodell zur Apoptoseinduktion [60, 62].

1.2.2 Die pathogenetische Bedeutung der Zytokin- und Chemokin-Expression im cHL

Zytokine und Chemokine sind Proteine mit kleinem Molekulargewicht, die insbesondere bei der Interaktion verschiedener Zellen vielfältige Funktionen übernehmen. Die konstitutive Expression einer einzigartigen Vielfalt verschiedenster Zytokine, darunter Interleukin (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, CD30L, CD40L und RANKL sowie einer Vielzahl verschiedener Chemokine, u.a. RANTES/CCL5, Eotaxin, TARC/CCL17 oder MIP-3 α /CCL20, ist ein wesentliches Charakteristikum der HRS Zellen [29, 63-68]. Dieses pathogenetisch einzigartige Mikromilieu charakterisiert den inflammatorischen Phänotyp der HRS-Zellen und bildet die Grundlage für das spezifische histopathologische Erscheinungsbild des cHL.

Die verschiedenen Zyto- und Chemokine aktivieren sowohl autokrin als auch parakrin wichtige zelluläre Signalwege innerhalb der HRS-Zellen und tragen damit zur Proliferation und Apoptoseinhibition bei [66, 69-72]. Auch durch eine direkte Zell-Zell-Interaktion mit den HRS-Zellen über membranständige Rezeptoren und deren Liganden (z. Bsp CD40/CD40L) werden antiapoptotische und proliferative Signalwege aktiviert.

Zytokine aktivieren bspw. den NF- κ B- oder JAK/STAT-Signalweg. So führt das Zytokin IL-21 rezeptorabhängig zur konstitutiven Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 und STAT5 [43, 46]. Das Zytokin IL-13 stimuliert über eine auto- oder parakrine Bindung an den IL13-Rezeptor den JAK-/STAT-Signalweg und vermittelt über die nachgeschaltete Phosphorylierung und Aktivierung von STAT6 Proliferation und Überleben der HRS-Zellen [44, 66, 68]. Für eine Vielzahl weiterer Zytokine wurde eine rezeptor-spezifische Stimulation und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege in HRS-Zellen beschrieben [66, 72-76].

Gleichzeitig stimulieren und regulieren Zyto- und Chemokine über eine parakrine Aktivierung das zelluläre Mikromilieu der HRS-Zellen und die Interaktion mit Zellen des reaktiven Begleitinfiltrates [77]. Den Großteil dieses zellulären Begleitinfiltrates bilden CD4-positive T-Zellen vom TH2-Helferzell-Typ sowie regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die über verschiedene, von HRS-Zellen exprimierte Chemokine wie RANTES, TARC oder CCL20 rekrutiert werden [67, 74, 78, 79]. Eosinophile Zellen werden über die Chemokine RANTES, IL-5, IL-9, CCL28, GM-CSF und CCL11 attrahiert [29, 65, 80] und tragen über die Interaktion mit CD30L zur

Stimulation von CD30 in den HRS-Zellen bei [70]. Über IL-8 werden neutrophile Zellen rekrutiert. Die Bindegewebevermehrung wird über die Stimulation von Fibroblasten getriggert, die wiederum über Zytokine wie IL-13, TNF α , TNF β sowie FGF attrahiert werden.

Über die ausgeprägte Zytokin- und Chemokin-vermittelte Interaktion zwischen HRS- und Zellen des inflammatorischen Begleitinfiltrates werden nicht nur proliferative und antiapoptotische Signalwege in den HRS-Zellen aktiviert, sondern gleichzeitig ein zelluläres Mikromilieu geschaffen, welches eine effektive *Immune-Escape*-Nische für die HRS-Zellen schafft [77]. *Immune-Escape*-Mechanismen umfassen zum einen die Rekrutierung und Förderung der Differenzierung von T_{reg}-Zellen, die ihrerseits zytotoxische T-Zellen inhibieren und damit einen wesentlichen Arm der Antitumoraktivität des Immunsystems blockieren. Andererseits können verschiedene lösliche und membrangebundene Faktoren zytotoxische T- und NK-Zellen direkt inhibieren. Wiederum spielen dabei verschiedene Zyto- und Chemokine eine bedeutende Rolle. Die Expression der Chemokine CCL5, CCL17 und CCL22 durch HRS-Zellen führt zur Attraktion von TH2- und T_{reg}-Zellen [65, 67, 81], das exprimierte Zytokin IL-7 induziert zudem die Differenzierung naiver CD4+ T-Zellen in FOXP3+ T_{reg}-Zellen [76, 82]. Die konstitutive Expression immunsuppressiver Zytokine wie TGF β , IL-10 oder Galectin-1 inhibieren insbesondere zytotoxische T-Zellen [53, 83, 84]. Membranständige Proteine wie CD95L, PD-L1 und -L2 vermitteln über eine direkte Ligand-Rezeptor-Interaktion proapoptotische bzw. inhibitorische Signale an zytotoxische T-Zellen [53, 85-88].

Eine Reihe von genetischen Läsionen innerhalb der HRS-Zellen beeinflussen die Expression sowie funktionelle Aktivität der MHC-vermittelten Antigenpräsentation und führen als Konsequenz zu einer verminderten Immunerkennung. In 70% der analysierten cHL ließen sich inaktivierende Mutationen im Gen für β 2-Mikroglobulin, einer wichtigen Komponente des MHC-I-Komplexes, nachweisen. Dies führt zu einer verminderten oder gar gänzlich fehlenden MHC-I-Expression auf den HRS-Zellen [89]. Das Gen für den MHC-Klasse-II Transaktivator (*CIITA*) ist in ca.15% aller cHL in chromosomale Translokationen involviert, was häufig zu dessen Inaktivierung und damit verminderten MHC-II-Expression führt [90]. Weiterhin lassen sich regelmäßig chromosomale Amplifikationen im Bereich 9p24.1 nachweisen. Innerhalb der betroffenen Region findet sich nicht nur das Gen für *JAK2* (als zentralen Faktor des JAK/STAT-Signalweges) sondern auch die Gene für *PD-L1* und *PD-L2*, welche insbesondere bei der Interaktion mit aktivierten T-Zellen im Rahmen der Immunsurveillance eine wichtige Rolle spielen.

1.3 Lymphome des zentralen Nervensystems

ZNS-Lymphome (ZNSL) sind aggressive Lymphome des zentralen Nervensystems mit Lymphommanifestationen innerhalb des Hirnparenchyms, des Rückenmarkes, intraokulär, der Hirnnerven sowie der Meningen. Generell wird dabei zwischen primären ZNS-Lymphomen (PZNSL), die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ausschließlich innerhalb des ZNS lokalisiert sind (systemische Rezidive sind im Verlauf möglich, aber selten) und sekundären ZNS-Lymphomen (SZNSL) die einen ZNS-Befall eines systemischen Lymphoms darstellen und bereits bei der Erstdiagnose und erst im Rezidiv auftreten können [91-93].

PZNSL sind insgesamt seltene Lymphomentitäten mit einer Inzidenz von ca. 0,47/100.000/Jahr [94]. In den letzten Jahren ist eine ansteigende Inzidenzrate insbesondere mit zunehmendem Alter der Patienten zu verzeichnen [94].

Histologisch lassen sich PZNSL in ca. 95% der Fälle den diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) zuordnen. Nahezu alle PZNSL zeichnen sich durch eine Expression der B-Zell-Marker CD19, CD20, CD22 und CD79A aus. Die Mehrheit der Fälle ist durch einen aktivierten B-Zell-Phänotyp mit Expression des transkriptionellen Repressors BCL-6 (60-80%) sowie des Transkriptionsfaktors MUM1/IRF4 (90%) gekennzeichnet [95, 96]. Ein weiteres Charakteristikum ist die häufig sehr hohe Wachstumsfraktion mit Ki-67-Antigen-Expression von mehr als 90% [97].

Auch bei den SZNSL lassen sich mehrheitlich aggressive Lymphome vom Typ DLBCL oder Burkitt-Lymphome nachweisen [98, 99]. Niedrig-maligne B-Zell-Lymphome oder T-Zell-Lymphome des ZNS finden sich hingegen nur sehr selten.

Klinisch präsentieren sich Patienten mit ZNSL i. d. R. mit unspezifischen Symptomen wie psychomotorischer Verlangsamung und kognitiven Störungen wie Konzentrations- und Gedächtnisverlust. Hinzu kommen fokale-neurologische Störungen wie Hemiparesen, Kopfschmerzen und in seltenen Fällen epileptische Anfälle [92, 100, 101]. Der klinische Verlauf ist häufig durch eine sich rasch progredient entwickelnde Beschwerdesymptomatik als klinisches Korrelat zum raschen Lymphomwachstum und der aggressiven Tumorbilogie der ZNSL charakterisiert. Bildmorphologisch stellen sich ZNSL in der Kontrastmittel-gestützten Magnetresonanztomographie i.d.R. als stark und relativ homogen kontrastmittelaufnehmenden Tumor mit relativ wenig Umgebungsödem dar [102]. Bei immunkompetenten Patienten findet sich ein multifokaler Lymphombefall nur in ca. einem Drittel der Patienten, bei immuninkompetenten Patienten (HIV/AIDS oder Patienten unter medikamentöser Immunsuppression) in nahezu allen Fällen [102]. In ca. 15-20 % der PZNSL lässt sich zudem ein leptomeningealer Lymphombefall nachweisen [103]. Eine intraokuläre Lymphommanifestation tritt in 10-20 % aller Patienten mit PZNSL auf und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [104].

Die Diagnosestellung von ZNSL basiert im Allgemeinen auf der MR-basierten bildgebenden Diagnostik und der histopathologischen Analyse des stereotaktisch oder im Rahmen einer (sub-)totalen Resektion entnommenen Tumorgewebes. Im Falle einer meningealen Lymphomaussaat kann eine diagnostische Liquorpunktion mit zytomorphologischer und immunzytologischer Charakterisierung sowie molekularer Klonalitätsanalyse zur Diagnosesicherung beitragen [103, 105, 106]. Eine diagnostische Schwierigkeit stellt eine Vorbehandlung der Patienten mit Steroiden dar. Die steroid-induzierte Apoptose der Lymphomzellen führt nicht selten zu einer erheblich eingeschränkten Auswertbarkeit des entnommenen Lymphommaterials [107].

Die Therapie von PZNSL basiert heutzutage im Wesentlichen auf einer Hochdosis-Methotrexat-haltigen Polychemotherapie mit zusätzlicher Anwendung verschiedener ZNS-gängiger Zytostatika wie Cytarabin, Ifosfamid, Etoposid, Carmustin oder Thiotepa sowie dem CD20-Antikörper Rituximab [92, 108]. Jüngere Patienten werden häufig bei entsprechendem Therapieansprechen mittels Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation konsolidiert [109, 110]. Eine Ganzhirnradiatio wird aufgrund des fehlenden Einflusses auf das Gesamtüberleben sowie der im Verlauf auftretenden strahlen-assoziierten kognitiven Einschränkungen meist erst im Rezidiv bzw. nach Ausschöpfen der chemotherapeutischen Optionen erwogen [111].

Trotz der zunehmend effektiver werdenden Chemotherapieschemata und der Prognose-Verbesserung insbesondere von jüngeren Patienten bleibt die Gesamtprognose von Patienten mit PZNSL insgesamt ungünstig mit einem mittleren Progressions-freien Überleben (PFS) von durchschnittlich 12(-24) Monaten und einem Gesamtüberleben (OS) von etwa 3 Jahren [92, 112]. Ein Langzeitüberleben von mehr als 5 Jahren bzw. eine Heilung erreichen nur wenige Patienten [112-114]. Bisher etablierte Prognosefaktoren, die mit einem schlechteren Gesamtüberleben bei Patienten mit PZNSL assoziiert sind, sind die klinischen Charakteristika eines fortgeschrittenen Lebensalters sowie ein niedriger Karnofsky-Performance-Score. Beide Charakteristika werden im *Memorial Sloan Kettering Cancer Center Prognose Score* (MSKCC-Score) zusammengefasst [115]. Eine weitere klinische Risikostratifizierung ist nach dem IELSG-Score (*International Extranodal Lymphoma Study Group Score*) unter Einschluß der Faktoren Alter, ECOG Performance Status, erhöhte Laktatdehydrogenase im Serum (LDH), eine erhöhte Liquor-Proteinkonzentration und eine Lymphombeteiligung tiefer Hirnstrukturen, möglich [116].

1.3.1 Aktivierte Signalwege und genetische Aberrationen bei PZNSL

Verschiedene Arbeiten belegen eine konstitutive Aktivierung und wichtige pathogenetische Bedeutung des NF- κ B-Signalweges in PZNSL. In diesem Zusammenhang lässt sich in den Lymphomzellen eine verstärkte Expression von Faktoren des NF- κ B-Komplexes, verschiedener NF- κ B-regulierender und NF- κ B-Zielgene sowie eine konstitutive Kernlokalisierung der NF- κ B-Untereinheit p50 nachweisen [117-119]. Weiterhin zeigen sich Amplifikationen des *MALT1*-Gens (37%), aktivierende Mutationen im *CARD11*- (16-29%) und *MYD88*-Gen (50-86%) sowie in 10% auch inaktivierende Mutationen im *TFNIP3*-Gen, die in Zusammenhang mit einer konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalweges stehen [119-124]. Zusätzlich wurden in ca. 20% der PZNSL Mutationen im Gen für *CD79B*, einer wichtigen Komponente des BCR nachgewiesen [125]. Dies weist auf eine kooperierende Aktivierung der BCR-assoziierten Signalwege und dem NF- κ B-Signalweg in PZNSL hin.

Als rekurrente genetische Aberration bei PZNSL lässt sich häufig ein Verlust der Chromosomenregion 6p21 nachweisen [126, 127]. In dieser Region befinden sich z. Bsp. der *human leukocyte antigen* (HLA)-Lokus, das Gen für einen wichtigen Regulator der B-Zell-Differenzierung und Tumorsuppressor *PRDM1* sowie für den NF- κ B-Inhibitor *TNFAIP3* (A20) [128-132]. Weiterhin lassen sich rekurrente Translokationen mit Involvement des *BCL-6*-Gens (30%), eine Amplifikation des 3q12.3/*NFKBIZ*-Lokus (83%), Amplifikationen sowie Translokationen des *PD-L1*- oder *PD-L2*-Genlokus sowie Punktmutationen u.a. in den Genen *CD95* (20%), *PAX5* (60%), *TTF* (70%), *PIM1* (50-70%), *CMYC* (60%), *PRDM1* (19%), *ETV6* (21%) und *IRF4* (29%) nachweisen [120, 124, 131, 133]. In ca. 75% der PZNSL findet sich eine epigenetische Inaktivierung bzw. ein biallelischer Verlust des *CDKN2A*-Gens, einem wichtigen Zellzyklus-Regulator [118, 123, 134-136]. Zusammenfassend lässt der Nachweis der o.g. genetischen Aberrationen auf eine wichtige Rolle des BCR-, TLR- und NF- κ B-Signaltransduktionsweges bei der Pathogenese von PZNSL schließen.

Verschiedene Arbeiten weisen weiterhin auf eine konstitutive Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges sowie auf die pathogenetische Bedeutung verschiedener Zyto- und Chemokine im PZNSL hin. In diesem Zusammenhang wurde eine verstärkte Expression von JAK1 und STAT6 sowie der Zytokine IL-4 und IL-10 nachgewiesen [137-142]. Darüber hinaus konnten verschiedene Studien in PZNSL eine starke Expression der Chemokine CXCL12 und CXCL13 sowie der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7 zeigen [141-144]. Einige kleinere Arbeiten inklusive der unserer eigenen Arbeitsgruppe wiesen für eine erhöhte Konzentration des Zytokins IL-10 bzw. des Chemokins CXCL13 eine diagnostische und prognostische Bedeutung bei PZNSL nach [139, 140, 144].

2. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG EIGENER ARBEITEN

2.1 Deregulierte Signalwege und Zytokinexpression in Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms

2.1.1 IRF5 als zentraler Regulator des Hodgkin-spezifischen Genexpressionsprogrammes

Kreher, S.*, Bouhlel, M.A.*, Cauchy, P., Lamprecht, B., Li, S., Grau, M., Hummel, F., Köchert, K., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Hummel, M., Hiscott, J., Wenzel, S.S., Lenz, P., Schneider, M., Küppers, R., Scheidereit, C., Giefing, M., Siebert, R., Rajewsky, K., Lenz, G., Cockerill, P.N., Janz, M., Dörken, B., Bonifer, C., Mathas, S.. Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. ***Proceedings of the National Academy of Science USA, 2014***; 111(42): p. E4513-22.
*, geteilte Erstautorenschaft

Das Ziel der in der Fachzeitschrift *Proceedings of the National Academy of Science* publizierten Arbeit [145] war die Identifizierung weiterer, für die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms relevanter Signalwege und transkriptioneller Faktoren. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um C. Bonifer aus Birmingham, Großbritannien, konnten wir dabei den Transkriptionsfaktor IRF5 als zentralen Regulator des Hodgkin-spezifischen Genexpressionsprogrammes identifizieren. Im Rahmen einer unvoreingenommenen Herangehensweise erfolgte zunächst eine genomweite Charakterisierung von DNaseI-Hypersensitivitätsregionen (DHSs) in verschiedenen Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien. Aufgrund der geringen Abundanz der HRS-Zellen in primärem Lymphomgewebe wurden die Analysen in gut etablierten Zelllinien durchgeführt [14, 146]. Durch eine vergleichende Analyse der DHSs in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Zelllinien konnten genomweit Hodgkin-spezifische DHSs identifiziert werden, die, vor allem bei distalen, nicht-Promoter-Regionen, transkriptionell cis-regulatorischen DNA-Bereichen entsprechen. Die Analyse konservierter Transkriptionsfaktorbindungsstellen innerhalb dieser cHL-spezifischen DHSs ergab neben Bindungsstellen für die induzierbaren Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B und STAT eine signifikante Überrepräsentation von *interferon regulatory factor* (IRF)-Bindungsstellen. Expressionsanalysen der bekannten humanen IRF-Faktoren (IRF1-9) zeigten neben der bekannten Überexpression von IRF4 eine starke und nahezu exklusive Expression von IRF5 in den Hodgkin-Zelllinien auf mRNA und Proteinebene. Immunhistologische Färbungen an primärem Lymphomgewebe bestätigten den Befund der nahezu exklusiven IRF5-Expression

in primären HRS-Zellen im Vergleich zu verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen (DLBCL, Burkitt-Lymphom, Follikuläres Lymphom, nodale und extranodale Marginalzonenlymphome, chronisch lymphatische Leukämie, Multiples Myelom, Mantelzelllymphom, lymphoblastisches Lymphom). In einer Reihe nachfolgender molekular- und zellbiologischer Experimente konnten wir zeigen, dass IRF5 in den Hodgkin-Zellen transkriptionell aktiv ist und maßgeblich die Ausbildung des Hodgkin-spezifischen Genexpressionsmusters inklusive die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Zyto- und Chemokine koordiniert. Nach Inhibition der IRF5-Aktivität in den Hodgkin-Zellen mittels eines dominant-negativen IRF5-Konstruktes (DNIRF5-4D) zeigte sich eine reduzierte Expression von IL-13, IL-6 und RANTES auf mRNA- oder Proteinebene. In Kombination mit einer NF- κ B-Blockade durch Expression eines trunkierten κ B α (κ B $\alpha\delta$ N) zeigte sich zudem eine synergistische Aktivität von IRF5 und NF- κ B. DNA-Reporter-Assays bestätigten diesen Synergismus am Beispiel der Transaktivierung des RANTES-Promoters. Weiterhin konnte eine verminderte Proliferation und verstärkte Apoptoserate der Hodgkin-Zellen nach Reduktion der IRF5-Expression mittels spezifischer small-interfering (si)RNAs gegen IRF5 nachgewiesen werden. In verschiedenen *gain-of-function* Experimenten wurde die konstitutive Aktivierung von IRF5 und NF- κ B durch Transfektion einer konstitutiv-aktiven Variante von IRF5 (IRF5-4D) und IKK β (IKK β [EE]) in Non-Hodgkin-Zellen sowie primären murinen B-Zellen imitiert. Die synergistische Aktivität beider Faktoren induzierte dabei eine Vielzahl verschiedener, cHL-charakteristischer Zyto- und Chemokine wie IL-6, IL-13, TNF α , RANTES und CXCL11. In zellulären Migrationsexperimenten konnte dabei eine verstärkte Chemoattraktion mononukleärer Zellen zu den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Neben der synergistischen Induktion verschiedener proinflammatorischer Gene zeigten sich in den transfizierten primären murinen B-Zellen HRS-Zell-charakteristische Änderungen des Genexpressionsmusters, darunter die Herunterregulation B-Zell-spezifischer Faktoren und Transkriptionsfaktoren wie *AICDA*, *EBF1*, *PRDM1*, *XBP1* und des epigenetischen Regulators *CBFA2T3*. Weiterhin zeigte sich eine Expressionsinduktion der E2A-Antagonisten *ABF1* und *ID2*, der AP-1/CREB-Transkriptionsfaktoren *JUN*, *JUNB* und *ATF* sowie des klassischen Hodgkin-Markers *CD30*. Der Vergleich der Mikroarray-basierten Genexpressionsprofile zeigte eine signifikante Änderung des Genexpressionsprofiles der transfizierten Zellen hin zu einem cHL-charakteristischen Genexpressionsmuster. Im Einklang mit der Expressionsinduktion von *JUN*, *JUNB* und *ATF3* durch IRF5 konnte im elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA) die für HRS-Zellen charakteristische, konstitutive AP-1-Aktivität detektiert werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der publizierten Arbeit die zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors IRF5 bei der Ausbildung des Hodgkin-Lymphom-charakteristischen Genexpressionsprofiles und dem damit verbundenen inflammatorischen Phänotyp der HRS-Zellen.

Kreher, S., Bouhlej, M.A., Cauchy, P., Lamprecht, B., Li, S., Grau, M., Hummel, F., Köchert, K., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Hummel, M., Hiscott, J., Wenzel, S.S., Lenz, P., Schneider, M., Küppers, R., Scheidereit, C., Giefing, M., Siebert, R., Rajewsky, K., Lenz, G., Cockerill, P.N., Janz, M., Dörken, B., Bonifer, C., Mathas, S.. Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2014; 111(42): p. E4513-22.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1406985111>

2.1.2 Die aberrante Aktivierung des Protoonkogens CSFR1 in HRS-Zellen

Lamprecht, B.*, Walter, K.*, **Kreher, S.***, Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Köchert, K., Bouhleh, M.A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Jöhrens, K., Wurster, K.D., Callen, D.F., Harte, M.F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P.N., Siebert, R., Dörken, B., Bonifer, C., and Mathas, S. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. ***Nature Medicine*, 2010**; 16(5): p. 571-9, 1p following 579, *geteilte Erstautorenschaft

Neben dem charakteristischen inflammatorischen Phänotyp und dem Verlust des B-Zell-spezifischen Genexpressionsmusters zeichnen sich HRS-Zellen durch die Expression einer Vielzahl B-Linien-fremder Gene aus [14, 147]. Deren Bedeutung für die Pathogenese des cHL ist nicht geklärt, wobei eine alternative Aktivierung proliferationsfördernder und antiapoptotischer Signalwege hypothetisch plausibel erscheint. Im Rahmen der in der Fachzeitschrift *Nature Medicine* publizierten Arbeit hat unsere Arbeitsgruppe die aberrante Expression sowie die funktionelle Bedeutung des myeloischen Proto-Onkogens *colony-stimulating factor 1 receptor* (CSF1R) im cHL untersucht [148]. Der CSF1R gehört zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen und reguliert nach Aktivierung durch seinen Liganden CSF1 die Differenzierung und Aktivität von Makrophagen. Bereits in früheren Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe eine konstitutive Expression von CSF1R in verschiedenen Hodgkin-Lymphomzelllinien nachweisen [14]. In Erweiterung dazu konnten wir nun zeigen, dass neben dem CSF1R auch der Ligand CSF1 selektiv in den Hodgkin-Zelllinien exprimiert wird und zu einer autokrinen CSF1R-Stimulation führt. Die therapeutische Blockade des autokrinen CSF1R-Signaling durch ein rekombinantes CSF1R:Fc-Decoy-Rezeptorprotein, welches CSF1 bindet und neutralisiert, führte in der Zelllinie KMH-2 zu einer verminderten Zellproliferation. Zelllinien mit niedriger CSF1-Expression und mutmaßlich nicht maximal aktiviertem CSF1R konnten durch Stimulation mit rekombinantem CSF1 zur Zellproliferation angeregt werden. Eine Behandlung mit synthetischen CSF1R-Inhibitoren führte in diesem Zusammenhang zum selektiven Zelltod der Hodgkin-Zelllinien im Vgl. zu den Non-Hodgkinzelllinien, die weder CSF1 noch CSF1R exprimieren. Diese Daten belegen, dass die B-Linienfremde Expression des CSF1R mit autokriner Rezeptorstimulation wichtige Überlebenssignale innerhalb der HRS-Zellen steuert.

Eine wichtige Frage dabei war, welche transkriptionellen Regulationsmechanismen die B-Linienfremde Expression von *CSF1R* in den HRS-Zellen steuern. In myeloischen Zellen wird die *CSFR1*-Expression über die Transaktivierung des *CSFR1*-Promoters und über einen intronischen Enhancer reguliert [149]. Die cis-regulatorische Aktivität beider DNA-Bereiche

wird über den Transkriptionsfaktor PU.1 gesteuert, der in Hodgkin-Zellen jedoch nicht exprimiert wird [150]. In einer Reihe nachfolgender Experimente konnten wir zeigen, dass die Transkription des *CSF1R*-Gens in den Hodgkin-Zellen nicht vom klassischen Transkriptionsstart innerhalb des Promoters, sondern von einem ca. 6,2 kb oberhalb gelegenen cis-regulatorischen Element beginnt und zu einer längeren, alternativen Splice-Variante des *CSFR1*-Transkriptes führt. Diese längere Transkriptvariante ließ sich vergleichend mit verschiedenen Non-Hodgkin-B-Zelllinien und primären CD33-positiven myeloischen Zellen spezifisch nur in den Hodgkin-Lymphomzelllinien und primärem Hodgkin-Lymphomgewebe nachweisen. Die nähere genomische Charakterisierung dieses alternativen Transkriptionsstartes ergab, dass in diesem Bereich eine retrovirale *long-terminal-repeat* Region (LTR) der MaLR-Familie lokalisiert ist, die als alternativer Promoter die Transkription dieses alternativen *CSFR1*-Transkriptes (LTR-*CSFR1*-Transkript) steuert. LTR-Bereiche innerhalb des humanen Genoms stammen von evolutiv zurückliegenden retroviralen Infektionen und werden normalerweise epigenetisch deaktiviert [151]. Wir konnten zeigen, dass dieser LTR in den Hodgkin-Lymphomzellen epigenetisch aktiviert ist. Durch Expressionsanalysen wichtiger epigenetischer Faktoren wie N-COR, DNMTs und HDACs konnten wir die epigenetische Derepression dieses LTR-Bereiches in den Hodgkin-Zellen in Zusammenhang mit dem Expressionsverlust des wichtigen epigenetischen Regulators CBFA2T3 bringen. CBFA2T3 fungiert als transkriptioneller Repressor innerhalb eines Multiproteinkomplexes [152] und steuert die epigenetische Inaktivierung verschiedener DNA-Bereiche. Im Vergleich mit verschiedenen Non-Hodgkin-B-Zelllinien und primären Non-Hodgkin-Lymphomen zeigten Hodgkin-Zelllinien und primäre HRS-Zellen keine Expression von CBFA2T3 auf mRNA und Proteinebene. Der funktionelle Zusammenhang zwischen dem Verlust der CBFA2T3-Expression, der epigenetischen Derepression des LTR und der Transkription des LTR-getriebenen, alternativen *CSFR1*-Transkriptes konnte hierbei durch eine experimentelle Reduktion der CBFA2T3-Expression in Non-Hodgkin-Zellen nachgewiesen werden. Durch Einbringen spezifischer, gegen CBFA2T3-gerichteter *short-hairpin*-RNAs (shRNA) und gleichzeitiger Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der den LTR transaktiviert, konnte die Transkription des Hodgkin-spezifischen LTR-*CSFR1*-Transkriptes induziert werden. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die epigenetische LTR-Derepression im cHL nicht auf den *CSFR1*-Lokus begrenzt ist, sondern genomweit stattfindet.

Zusammenfassend konnten wir in der Arbeit nachweisen, dass die Expression des myeloischen Proto-Onkogens *CSF1R* in HRS-Zellen durch epigenetische Derepression eines LTR induziert, durch autokrine Stimulation mit dem Liganden CSF1 aktiviert wird und wichtige Überlebenssignale in HRS-Zellen vermittelt.

Lamprecht, B., Walter, K., Kreher, S., Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Köchert, K., Bouhlej, M.A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Jöhrens, K., Wurster, K.D., Callen, D.F., Harte, M.F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P.N., Siebert, R., Dörken, B., Bonifer, C., and Mathas, S. Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nature Medicine*, 2010; 16(5): p. 571-9, 1p following 579

<https://doi.org/10.1038/nm.2129>

2.1.3 Die Bedeutung des aberrant exprimierten Zytokins IL-21 im cHL

Lamprecht, B., **Kreher, S.**, Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., Mathas, S. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. **Blood, 2008**; 112(8): p. 3339-47.

Zur Identifikation weiterer B-Linien-fremder Gene und deren funktionelle Charakterisierung hat unsere Arbeitsgruppe die Bedeutung des aberrant exprimierten Zytokins IL-21 im cHL untersucht [46, 153]. IL-21 gehört zur IL-2-Zytokinfamilie, welche den *common gamma-chain-Rezeptor* (gc) und nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege aktiviert. IL-21 wird vornehmlich in verschiedenen CD4+ T-Zellsubpopulationen und NK-Zellen, nicht aber innerhalb des physiologischen B-Zell-Kompartimentes, exprimiert [154]. Nach Bindung an den IL-21-Rezeptor, welcher auf verschiedenen lymphatischen und myeloischen Zellen exprimiert wird, aktiviert IL-21 nachgeschaltete Signalwege und reguliert – abhängig vom involvierten Zelltyp - Zellproliferation, Überleben, Differenzierung sowie unterschiedliche immunologische Effektorfunktionen [155]. So aktiviert IL-21 bspw. Zellen des Darmepithels, das Chemokin *macrophage-inflammatory protein MIP3a* (CCL20) zu bilden, welches über den Chemokinrezeptor CCR6 immunregulatorische Zellen und insbesondere T_{reg}-Zellen an den Ort des Entzündungsgeschehens führt [156-158].

Durch mRNA- und Proteinexpressionsanalysen an verschiedenen Zelllinien konnten wir zeigen, dass ein relevanter Anteil untersuchter Hodgkin-Lymphomzelllinien im Vergleich zu Non-Hodgkin-Zelllinien IL-21 aberrant exprimieren. Der zugehörige IL-21-Rezeptor wurde hingegen auf nahezu allen untersuchten Zelllinien konstitutiv gebildet. Nach Behandlung der Hodgkin-Zelllinien L428, HDLM-2 und L1236, die den IL-21-Rezeptor, nicht aber IL-21 selbst exprimieren, zeigte sich eine konsistente Phosphorylierung und Aktivierung des STAT3-Signalweges, verbunden mit der Induktion bekannter STAT3-Zielgene wie *IL-6* und *MCL1* [159]. Durch Zugabe eines rekombinanten IL-21-R:Fc-Fusionsproteins, welches IL-21 neutralisiert, konnte in der Zelllinie KMH-2, welche sowohl IL-21 als auch den IL-21-R exprimiert, die konstitutive STAT3-Phosphorylierung/-Aktivierung inhibiert werden. Vereinbar mit der reduzierten STAT3-Aktivität zeigte sich nach IL-21-Blockade eine verminderte Expression von *IL-6* und *MCL1*. Als funktionelle Konsequenz des aberrant aktivierten IL-21/IL21-R-Signalweges konnten wir in der Hodgkin-Zelllinie HDLM-2 eine IL-21-dosisabhängige Protektion vor CD95-induzierter Apoptose nachweisen. In Ausweitung der Expressionsanalysen IL-21-relevanter Zielgene zeigte sich zudem – wie bereits für Zellen des Darmepithels beschrieben [156] - eine konstitutive Expression des Chemokins MIP-3 α in 5 von 7 untersuchten Hodgkin-Zelllinien. Die MIP-3 α -mRNA-Expression konnte dabei in der

Zelllinie KM-H2 durch Zugabe des neutralisierenden IL-21-R:Fc-Fusionsproteins reduziert werden. Nach Bestätigung der MIP-3 α -Sekretion mittels MIP-3 α -ELISA des Kulturüberstandes stellte sich die Frage, inwieweit die IL-21-induzierte Expression von MIP-3 α eine funktionelle Bedeutung für die Ausbildung des cHL-charakteristischen Begleitinfiltrates und insbesondere für die Rekrutierung immunsuppressiver T_{reg}-Zellen besitzt [160]. Hierfür führten wir mit Kulturüberständen der MIP-3 α -exprimierenden Hodgkin-Zelllinien verschiedene zelluläre Migrationsexperimente durch, die zusammenfassend eine vermehrte MIP-3 α -induzierte Rekrutierung peripherer mononukleärer Zellen (PMNCs) zeigten. Die immunzytologische Charakterisierung der PMNCs wies insbesondere die verstärkte Migration von CCR6⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ CD127^{lo}-Zellen, also T_{reg}-Zellen, nach.

Immunhistologische Expressionsanalysen an primärem Lymphomgewebe bestätigten die nahezu exklusive Expression von IL-21 und MIP-3 α im cHL im Vgl. zu anderen Lymphomentitäten.

Zusammenfassend konnten wir in der Arbeit zeigen, dass die aberrante Expression von IL-21 im cHL zur Aktivierung von STAT3 und nachgeschalteter STAT3-Zielgene führt und Hodgkin-Zellen vor CD95-induzierter Apoptose schützt. Zudem ist IL-21 über die Induktion des Chemokins MIP-3 α an der Ausbildung des immunsuppressiven zellulären Begleitinfiltrates durch Rekrutierung regulatorischer T-Zellen beteiligt.

Lamprecht, B., Kreher, S., Anagnostopoulos, I., Jöhrens, K., Monteleone, G., Jundt, F., Stein, H., Janz, M., Dörken, B., Mathas, S. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood*, 2008; 112(8): p. 3339-47.

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

2.2 Signalwegsaktivierung und genetische Aberrationen in T-Zell-Lymphomen

2.2.1 Zusammenfassende Darstellung eigener Arbeiten

Köck, J., **Kreher, S.**, Lehmann, K., Riedel, R., Bardua, M., Lischke, T., Jargosch, M., Haftmann, C., Bendfeldt, H., Hatam, F., Mashreghi, MF., Baumgrass, R., Radbruch, A., Chang, HD. Nuclear factor of activated T cells regulates the expression of interleukin-4 in Th2 cells in an all-or-none fashion. *Journal of Biological Chemistry*, **2014**; Sep 26;289(39):26752-61.

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. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **2009**; Apr 7;106(14):5831-6.

Steininger, A., Möbs, M., Ullmann, R., Köchert, K., **Kreher, S.**, Lamprecht, B., Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Richter, J., Beyer, M., Janz, M., Klemke, CD., Stein, H., Dörken, B., Sterry, W., Schrock, E., Mathas, S., Assaf, C. Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, **2011**; Aug 1;208(8):1585-93.

Lamprecht, B., **Kreher, S.**, Möbs, M., Sterry, W., Dörken, B., Janz, M., Assaf, C., Mathas, S. The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sézary syndrome. *British Journal of Dermatology*, **2012**; Aug; 167(2):240-6.

T-Zell-Lymphome sind seltene und zumeist sehr aggressive Lymphome, die ihren Ausgangspunkt von verschiedenen Reifungs- und Differenzierungsstadien physiologischer T-Zellen nehmen. Der molekularen Pathogenese liegt ähnlich den B-Zell-Lymphomen häufig eine aberrante Aktivierung intrazellulärer Signalwege und Transkriptionsfaktoren zugrunde, die wichtige zellbiologische Vorgänge wie Proliferation, Zellaktivierung, Expression von pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokinen sowie Apoptose regulieren. In physiologischen T-Zellen unterliegen diese einer strengen molekularen Regulation, um eine lokale Kontrolle und zeitliche Begrenzung adaptierter Immunreaktionen zu gewährleisten. Ein klassisches Beispiel dafür ist die linienspezifische Zytokinexpression in differenzierten T-Helfer-Zellen und insbesondere die Regulation des Zytokins IL-4 in differenzierten TH2-Zellen. Epigenetische Veränderungen am *IL-4*-Genlocus bilden die molekulare Grundlage für die spezifische Expression von IL-4 in differenzierten TH2-Zellen [161]. Nach Antigen-spezifischer Restimulation exprimiert jedoch immer nur ein Teil der aktivierten TH2-Zellen IL-4. Bezogen

auf die zelluläre Immunantwort wird dadurch die Gesamtmenge an exprimiertem IL-4 reguliert und eine überschießende Zytokinantwort über eine Begrenzung IL-4-exprimierender Zellen verhindert. Der zugrundeliegende molekulare Regulationsmechanismus blieb lange unverstanden. In der im *Journal of Biological Chemistry* publizierten Arbeit konnten wir zeigen, dass nach Antigen-spezifischer Restimulation des TCR eine konzertierte Assemblierung eines Multi-Proteinkomplexes bestehend u.a. aus den TF NFATc2, NF- κ B, p65, c-Maf, p300, Brg1, STAT6 und GATA-3 stattfindet, allerdings nur in IL-4-exprimierenden TH2-Zellen [162]. Die Ausbildung dieses Transkriptionsfaktorkomplexes am *IL-4*-Promoter wird durch den TF NFATc2 reguliert, der nach TCR-Stimulation nur in IL-4-exprimierenden TH2-Zellen aktiviert wird und in den Zellkern transloziert. Voraussetzung dafür ist die vollständige, Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung von NFATc2, die von der Stärke der TCR-Aktivierung abhängt. Im Rahmen von adaptierten TH2-Immunreaktionen wird damit eine graduierte TCR-Stimulation in eine digitale NFATc2-Aktivierung im Sinne einer alles-oder-nichts-Entscheidung übersetzt und die Stärke der IL4-Zytokinantwort reguliert.

In aggressiven Lymphomen lassen sich deregulierte Signalwege häufig auf spezifische chromosomale Translokationen zurückführen, die entweder zur konstitutiven Aktivierung eines an der Translokation beteiligten Onkogens oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führt [163]. Ein klassisches Beispiel ist die Translokation t(2;5)(p23;q35) in einem Teil der anaplastisch großzelligen T-Zell-Lymphome (ALCL), einer Subgruppe reifzelliger T-Zell-Lymphome [164]. Diese Translokation führt über die Fusion der Oligomerisationsdomäne des *Nucleophosmin*-Gens (*NPM1*) mit der Tyrosinkinasedomäne der *Anaplastic Lymphoma Kinase* (*ALK*) zur konstitutiven ALK-Aktivierung [165]. Obwohl der NPM-ALK-Translokation eine kausal-pathogenetische Bedeutung bei der Lymphomentstehung eines Teils der ALCL beigemessen wird, zeigen zurückliegende Arbeiten, dass das Fusionsprotein NPM-ALK allein nicht zur malignen Transformation und Entstehung charakteristischer T-Zell-Lymphome im Mausmodell ausreicht [165]. Nicht zuletzt lässt sich die t(2;5)-Translokation nur in ca. 40% der ALCL nachweisen, wobei sich NPM-ALK-positive (ALK+) und -negative (ALK-) ALCL in den morphologischen und molekularen Charakteristika nicht wesentlich unterscheiden [164, 166]. Durch Genexpressionsanalysen in ALK+ und ALK- ALCL-Zelllinien konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass verschiedene pathogenitätsrelevante Gene wie der Helix-Loop-Helix-Faktor *ID2*, der zur AP1-Familie zugehörige Transkriptionsfaktor *FRA2* und der *CSF1R* um die NPM-ALK-Translokationsstelle lokalisiert und spezifisch in ALCL-Zellen überexprimiert sind; und zwar unabhängig vom Nachweis einer t(2;5) [167]. In einer Reihe nachfolgender Experimente konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *FRA2* zu einer konstitutiven AP1-Aktivierung mit Nachweis charakteristischer *FRA2*-JunB-Komplexen führt. *ID2* vermittelt über die funktionelle Inhibition der E-Box-Proteine HEB und E2A den charakteristischen Verlust des T-Zell-Phänotyps im ALCL.

Die von der t(2;5) unabhängige Deregulation der Gene *FRA2*, *ID2* und *CSF1R* ließ die Hypothese generieren, dass die transkriptionelle Gen-Aktivierung um die NPM-ALK-Bruchstelle der eigentlichen NPM-ALK-Translokation vorausgeht. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ließ sich zeigen, dass sich die an der Translokation beteiligten DNA-Regionen NPM und ALK in ALK- ALCL-Zellen im Zellkern bereits in enger räumlicher Nähe befinden. Die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Bestrahlung führte in ALK- ALCL-Zelllinien zur Entstehung der charakteristischen NPM-ALK-Translokation.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die Deregulation Bruchpunkt-assoziiierter Gene wie *FRA2*, *ID2* und *CSFR1* wesentlich zur Pathogenese sowohl im ALK+ und ALK- ALCL beiträgt und der charakteristischen NPM-ALK-Translokation vorauszu gehen scheint.

Die Expression von *ID2* in ALCL-Zellen stellt die Bedeutung einer Inaktivierung des TF E2A bei der Pathogenese reifzelliger T-Zell-Lymphome heraus. E2A gehört zur Gruppe der E-Proteine, welche fundamentale Bedeutung bei der zellulären Differenzierung verschiedener Zelltypen und insbesondere bei der T- und B-Zell-Differenzierung haben [168]. Verschiedene Arbeiten konnten einen Zusammenhang mit einem Verlust der E2A-Expression oder –Aktivität und der Entwicklung aggressiver T-Zell-Lymphome herstellen [169, 170]. In der in der Fachzeitschrift *Journal of Experimental Medicine* publizierten Arbeit hat unsere eigene Arbeitsgruppe zeigen können, dass der *E2A*-Genlocus bei einem Großteil von Patienten mit Sezary-Syndrom (SeSy), einer aggressiven Variante primär kutaner T-Zell-Lymphome mit ausgeprägtem lymphonodalem Befall und leukämischer Ausschwemmung [171, 172], deletiert ist. Durch verschiedene E2A-Rekonstitutionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der E2A-Expression zur gesteigerten Proliferation der Sezary-Zellen führt, vermittelt durch die Induktion des Zellzyklusregulators CDK6 und des Onkogens MYC.

Die Aktivierung des MYC-Onkogens führt in physiologischen Zellen i.d.R. zur Induktion des zellulären Apoptoseprogrammes, u.a. vermittelt über den Tumorsuppressor p53. Die MYC-induzierte maligne Transformation erfordert daher eine gleichzeitige Apoptoseblockade [173]. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen konnten wir in diesem Zusammenhang eine heterozygote Deletion des *p53*-Genlocus in der überwiegenden Zahl der untersuchten Sezary-Fälle nachweisen [174, 175]. Im Rahmen einer nachfolgenden Mutationsanalyse hat unsere Arbeitsgruppe die Funktionalität und den Mutationsstatus des alternativen *p53*-Allels untersucht [176]. Hierbei wurden verschiedenen Sezary-Zelllinien mit dem MDM2-Antagonisten Nutlin-3 behandelt. Nutlin-3 verhindert die Bindung von MDM2 an p53 und induziert über die Blockade der p53-Degradation dessen Aktivierung. Die p53-Aktivierung führt bei intakter p53-Funktion zur Einleitung des p53-induzierten Apoptoseprogrammes. Wir konnten dabei beobachten, dass Sezary-Zellen resistent gegenüber der Nutlin-3-Behandlung waren und häufig durch einen nichtfunktionellen p53-Signalweg charakterisiert sind. In diesem

Zusammenhang konnten verschiedene alterierende p53-Mutationen nachgewiesen werden. Die Arbeit bestätigt, dass der p53-Signalweg in Sezary-Zellen häufig nichtfunktional ist und zur Blockade der MYC-induzierten Apoptose beiträgt.

Zusammenfassend konnten in den aufgeführten Arbeiten verschiedene Mechanismen herausgearbeitet werden, die über die aberrante Aktivierung zellulärer Signalwege zur malignen Transformation und Entstehung von T-Zell-Lymphomen beitragen.

2.3 Aktivierte Signalwege und Zytokine als diagnostische und prognostische Biomarker bei ZNS-Lymphomen

2.3.1 Der prognostische Einfluss von BCL-6 bei primären ZNS-Lymphomen

Kreher, S., Jöhrens, K., Strehlow, F., Martus, P., Borowiec, K., Radke, J., Heppner, F., Roth, P., Eckhard, T., Pietsch, T., Weller, M., Korfel, A. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. *Neuro-Oncology*, 2015; Jul;17(7):1016-21

PZNSL lassen sich histologisch überwiegend den DLBCL zuordnen. Immunhistologische Analysen konnten dabei einen aktivierten B-Zell-Phänotyp sowie einen Post-Keimzentrums-Ursprung der PZNSL mit häufiger Expression der TF MUM1/IRF4 und BCL-6 nachweisen [95, 177-179]. Die prognostische Bedeutung der verschiedenen Biomarker bei PZNSL war bisher jedoch nur unzureichend untersucht. Kleinere, zumeist retrospektive Fallserien konnten für die B-Zell-Marker BCL-2, MUM1/IRF4 oder BCL-6 keinen prognostischen Einfluss nachweisen bzw. ergaben widersprüchliche Ergebnisse [108, 180-182]. Ebenso zeigte sich die immunphänotypische Subdifferenzierung in DLBCL vom Keimzentrumstyp (GCB) sowie vom aktivierten B-Zell-Typ (non-GCB) entsprechend der Hans-Klassifizierung ohne prognostische Bedeutung [182, 183]. In der im Journal *Neuro-Oncology* publizierten Arbeit haben wir anhand eines Patientenkollektives aus der prospektiven Phase-III-Studie G-PCNSL-SG1 [111] die prognostische Bedeutung der Faktoren BCL-2, BCL-6, CD10 und MUM1/IRF4 sowie des B-Zell-Differenzierungsstatus (GCB vs. non-GCB nach Hans-Klassifizierung) untersucht [184]. Hierfür wurde verfügbares Lymphommaterial von insgesamt 119 Patienten im Rahmen einer *Post-hoc*-Analyse histologisch analysiert und mit den klinischen Charakteristika sowie dem Überleben der eingeschlossenen Patienten statistisch korreliert. In 92,7% der untersuchten Fälle zeigte sich eine Expression von BCL-2; lediglich 24 von 117 (21%) PZNSL exprimierten den Keimzentrumsmarker CD10. BCL-6 und

MUM1/IRF4 wurden in 60 von 111 (54,1%) bzw. 87 von 110 (79%) Fällen exprimiert. Die Klassifizierung nach Hans ergab einen GCB-Phänotyp in 26,6% und ein non-GCB-Typ in 73,4% der analysierten PZNSL. Die deutliche Mehrzahl (88,3%) war dabei durch eine Koexpression von BCL-6 und MUM1/IRF4 charakterisiert. Das mediane Follow-up aller Patienten betrug insgesamt 67,5 Monate. Das mediane Progressions-freie Überleben (PFS) lag bei 10,6 (95% Konfidenz-Intervall [KI] 4,2 – 17,0) Monaten, das mediane Gesamtüberleben (OS) bei 28,9 (95% KI 18 – 39,7) Monaten. Als klinische Charakteristika standen ein fortgeschrittenes Lebensalter (Hazard-Ratio [HR] 1,027; $P=0,026$; 95% KI 1,003 - 1,05) und ein reduzierter Allgemeinzustand (niedriger Karnofsky-Performance-Score) (HR 0,99; $P=0,044$; 95% KI 0,97 – 1,00) in signifikantem Zusammenhang mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten. Ebenso ging das Vorliegen eines multifokalen Lymphombefalles im Vgl. zum unifokalen mit einer signifikant schlechteren Prognose einher (PFS: HR 1,79; $P=0,011$; 95% KI 1,14 – 2,80; OS: HR 2,72; $P=0,019$; 95% KI 1,18 – 6,28). Von den untersuchten histologischen Markern zeigte nur der Expressionsstatus von BCL-6 eine signifikante Korrelation mit der Prognose der Patienten. In der univariaten Analyse ging die Expression von BCL-6 mit einem signifikant schlechteren PFS (HR 1,53; $P=0,047$; 95% KI 1,01 – 2,34) und OS (HR 1,66; $P=0,035$; 95% KI 1,04 – 2,65) einher. Die multivariate Analyse zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit einem schlechteren PFS (HR 1,95; $P=0,005$; 95% KI 1,22 – 3,12). Für alle anderen histologischen Marker inklusive der Klassifikation nach Hans ergab sich kein signifikanter Einfluss auf das Überleben der Patienten. Die klinischen Patientencharakteristika unterschieden sich zwischen den BCL-6-positiven und –negativen PZNSL nur in der Zahl vorhandener Lymphommanifestationen. Ein positiver BCL-6-Expressionsstatus zeigte eine signifikante Korrelation mit einem (prognostisch ungünstigen) multifokalen Lymphombefall (BCL-6-positiv: 33,3% vs. BCL-6-negativ 15,7%).

Zusammenfassend konnte unsere Arbeitsgruppe durch die vorliegende immunhistologische Analyse den aktivierten B-Zell-Phänotyp und den Post-Keimzentrums-Ursprung der PZNSL bestätigen und eine signifikante prognostische Bedeutung des BCL-6-Expressionsstatus bei Patienten mit PZNSL nachweisen.

Kreher, S., Jöhrens, K., Strehlow, F., Martus, P., Borowiec, K., Radke, J., Heppner, F., Roth, P., Eckhard, T., Pietsch, T., Weller, M., Korfel, A. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. *Neuro-Oncology*, 2015; Jul;17(7):1016-21

<https://doi.org/10.1093/neuonc/nov046>

2.3.2 Die diagnostische und prognostische Bedeutung von Osteopontin im Liquor von Patienten mit ZNS-Lymphomen

Strehlow, F., Bauer, S., Martus, P., Weller, M., Roth, P., Schlegel, U., Seidel, S., Scheibenbogen, C., Korfel, A., **S. Kreher**. Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 2016; Aug.; 129 (1):165-71

Die Diagnosestellung von ZNSL ist häufig schwierig. Zum einen kann eine biopsische Erreichbarkeit durch eine Lokalisation innerhalb tiefer Hirnregionen problematisch sein. Andererseits wird die histopathologische Beurteilung durch eine häufig vorausgehende Steroidtherapie erschwert. In der im *Journal of Neuro-Oncology* publizierten Arbeit haben wir die diagnostische und prognostische Bedeutung des Zytokins Osteopontin (OPN) im Liquor von Patienten mit ZNSL untersucht [185]. OPN ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches innerhalb verschiedener immunregulatorischer Prozesse vielfältige Funktionen ausübt. So ist es bei der Immunzellaktivierung, B-Zell-Migration und -Proliferation, Chemotaxis sowie durch seine gleichzeitig immunsuppressive Wirkung an der Suppression der Antitumoraktivität beteiligt [186-188]. Verschiedene Vorarbeiten konnten zeigen, dass das Gen *Osteopontin* (*SPP1*) in PZNSL hoch exprimiert wird und im Vgl. zu systemischen DLBCL zu den am stärksten differentiell exprimierten Genen gehört [189-192]. Unsere Arbeitsgruppe konnte nun erstmals zeigen, dass sich OPN im Liquor von Patienten mit PZNSL und SZNSL in signifikant höherer Konzentration nachweisen lässt als bei Patienten mit Glioblastoma (GBM), multipler Sklerose (MS), verschiedenen anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen oder gesunden Personen. In vergleichenden *receiver operating characteristic* Kurven (ROC) ergaben sich in der Unterscheidung zwischen PZNSL, SZNSL und allen Vergleichsgruppen eine hohe Sensitivität und Spezifität. Somit konnten wir für die OPN-Liquorkonzentration eine hohe diagnostische Aussagekraft für ZNSL im Vgl. zu den häufigen, klinischen und bildmorphologischen Differentialdiagnosen wie GBM, MS und entzündliche ZNS-Erkrankungen herausarbeiten. Nachfolgende Analysen ergaben, dass die Liquorkonzentration von OPN bei Patienten mit PZNSL ebenfalls eine prognostische Aussagekraft besitzt. Patienten mit hohen OPN-Konzentrationen im Liquor zeigten in der multivariaten Analyse mit den klinischen Charakteristika Alter und Geschlecht sowohl ein schlechteres PFS (HR 1,61; 95% KI 1,13-2,31; $P = 0,009$) als auch OS (HR 1,52; 95% CI 1,04-2,21; $P = 0,029$). Zusammenfassend konnten wir damit zeigen, dass die Liquorkonzentration des Zytokins OPN bei Patienten mit ZNSL eine diagnostische und prognostische Aussagekraft besitzt.

Strehlow, F., Bauer, S., Martus, P., Weller, M., Roth, P., Schlegel, U., Seidel, S., Scheibenbogen, C., Korfel, A., S. Kreher. Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 2016; Aug.; 129 (1):165-71

<https://doi.org/10.1007/s11060-016-2162-5>

3. DISKUSSION

3.1 Die hierarchische Ordnung aktivierter Signalwege und Ausbildung des inflammatorischen Phänotyps im cHL

HRS-Zellen zeichnen sich durch die fehlende oder verminderte Expression B-Zell-spezifischer Gene, die Expression B-Linien-fremder Marker und insbesondere durch die Ausbildung eines aktivierten, inflammatorischen Phänotyps mit Expression einer Vielzahl unterschiedlichster Zytokine und Chemokine aus [193]. Diese aktivieren über auto- und parakrine Aktivierung wichtige zelluläre Signalwege innerhalb der Lymphomzellen und induzieren über Chemoattraktion das charakteristische zelluläre Mikroenvironment des cHL. Die Bedeutung der aktivierten Signalwege NF- κ B, JAK/STAT- sowie AP-1/CREB für die Pathogenese des cHL ist klar belegt [193], deren hierarchische Ordnung und funktionelle Bedeutung für die Ausbildung des Hodgkin-spezifischen Phänotyps ist jedoch weit weniger verstanden.

Die genomweite Analyse von DHSs mit nachfolgender Identifizierung zelltyp-spezifischer regulatorischer DNA-Elemente und konservierter TF-Bindungsstellen wurde bereits in verschiedenen zellulären Modellen eingesetzt [194, 195]. In der in der Zeitschrift *Proceedings of the National Academy of Science* erschienen Arbeit haben wir erstmals Hodgkin-spezifische, aktivierte Chromatinbereiche genomweit kartiert und TF mit angereicherten Bindungsmotiven innerhalb der aktivierten Chromatinbereiche funktionell charakterisiert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Anreicherung von Bindungsstellen für die TF NF- κ B, STAT und AP-1 [145]. Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Faktoren für die Ausbildung des aktiven Chromatinmusters im cHL. Ebenso zeigte sich im Vergleich zu Non-Hodgkin-Zellen eine signifikante Unterrepräsentation von aktivierten Chromatinbereichen mit konservierten Bindungsstellen für B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktoren wie E-BOX, OCT und PU.1. Dies belegt eine Vielzahl zurückliegender Arbeiten und unterstreicht auf Chromatinebene die funktionelle Inaktivierung wichtiger B-Zell-spezifischer TF im cHL [11-13]. Die Identifizierung konservierter IRF-Bindungsstellen innerhalb der Hodgkin-spezifisch aktivierten Chromatinbereiche und die nachfolgende Charakterisierung von IRF5 als zentralen Regulator des Hodgkin-spezifischen Phänotyps lässt nun eine beginnende hierarchische Einordnung der einzelnen deregulierten Signalwege im cHL zu. IRF5 übernimmt physiologisch im Rahmen angeborener, antiviraler und antibakterieller Immunabwehrmechanismen eine zentrale Funktion und stimuliert nach Aktivierung von TLR die Expression einer Vielzahl verschiedener inflammatorischer Zyto- und Chemokine [196, 197]. Verschiedene Allelvarianten von IRF5 wurden mit autoimmunologischen Erkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematoses oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert [197-199].

Die exponierte Rolle von IRF5 für die Regulation der proinflammatorischen Zytokinantwort nach bakterieller Infektion wird durch die Tatsache unterstrichen, dass IRF5^{-/-} Knockout-Mäuse resistent gegenüber letalem Schock nach Exposition verschiedener Stimuli wie LPS ist [196]. Der Nachweis der konstitutiven IRF5-Aktivität und deren fundamentale Bedeutung für die Expression des für das cHL einzigartigen Zytokin- und Chemokinexpressionsmusters charakterisiert den TF IRF5 nun als zentralen Initiator und Regulator des Hodgkin-spezifischen, inflammatorischen Phänotyps. Hierfür wurde zurückliegend vornehmlich die konstitutive Aktivierung von NF- κ B maßgeblich verantwortlich gemacht [22, 45]. Eine konstitutive Aktivierung des NF- κ B-Signalweges lässt sich jedoch auch in verschiedenen anderen Lymphomentitäten konsistent nachweisen, darunter DLBCL vom aktivierten B-Zell-Typ (ABC-DLBCL), dem primär mediastinalen B-Zelllymphom, gastrischen MALT-Lymphomen und dem Multiplen Myelom [20]. Keiner dieser Lymphomentitäten zeichnet sich auch nur vergleichsweise durch eine solch mannigfaltige Zytokinexpression und das ausgeprägte inflammatorische Begleitinfiltrat aus. Eine alleinige NF- κ B-Aktivierung scheint damit nicht ausreichend für die Etablierung des cHL-spezifischen Geno- und Phänotyps zu sein. Vielmehr hat hier die synergistische Kooperation beider Transkriptionsfaktoren, IRF5 und NF- κ B, eine übergeordnete, pathogenetische Bedeutung. Zurückliegende Arbeiten wiesen bereits eine Interaktion der verschiedenen, aktivierten Signalwege im cHL nach. So unterhält die Aktivierung von NF- κ B die verstärkte Expression der TF STAT5, JUNB und GATA-3 [45] bzw. stimuliert über die Expression verschiedener Zytokine (bspw. CCL5, CCL17, CCL22, CCR7 oder IL-13) deren nachgeschaltete Signaltransduktionswege [200]. Hinweise ergeben sich auch für eine Interaktion zwischen dem NOTCH- und NF- κ B-Signalweg [201]. In unserem experimentellen Modell konnte eine synergistische Kooperation von IRF5 und NF- κ B nachgewiesen werden, die essentiell für die Ausbildung des Hodgkin-spezifischen, proinflammatorischen Genexpressionsmusters ist. Dies steht im Einklang mit früheren Arbeiten, die eine synergistische Interaktion beider TF in einem Multiproteinkomplex nachweisen konnten [197, 202]. Neben einer direkten Interaktion beider TF sind indirekte Wechselwirkungen, bspw. eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch verschiedene IRF5-induzierte Zytokine, denkbar. In diesem Zusammenhang wäre auch eine indirekte Stimulation des JAK/STAT-Signalweges durch IRF5 in HRS-Zellen möglich. Die IRF5-vermittelte Expressionsinduktion der AP-1-Faktoren JUN, JUNB und ATF3 und die daraus resultierende Hodgkin-charakteristische AP-1-Aktivität der HRS-Zellen positioniert diese in der Signalkaskade nun unterhalb von IRF5. Damit lässt sich ebenfalls die teilweise MAPK-unabhängige AP-1-Aktivierung in den HRS-Zellen erklären [51, 52, 203].

Unsere Ergebnisse belegen weiterhin, dass IRF5 nicht nur die Ausbildung des cHL-charakteristischen inflammatorischen Phänotyps und das daraus resultierende zelluläre

Begleitinfiltrat induziert, sondern gleichzeitig weitere pathogenetische Aspekte des cHL vermittelt. Die experimentelle Aktivierung von IRF5 durch Einbringen der konstitutiv-aktiven IRF5-Variante IRF5-4D in primäre murine B-Zellen führte zu einer verminderten Expression B-Zell-spezifischer Gene und Transkriptionsfaktoren, die für die Initiation und Aufrechterhaltung des B-Zell-Differenzierungsprozesses inkl. der terminalen Plasmazelldifferenzierung notwendig sind. In gleichem Maße wurde die Expression transkriptioneller Antagonisten wie *ABF-1* und *ID2* induziert sowie die Expression des epigenetischen Regulators *CBFA2T3* reduziert. Somit konnte eine wesentliche Funktion von IRF5 für den charakteristischen Verlust des B-Zell-Phänotyps und die Blockade des lymphatischen Differenzierungsprogrammes in den HRS-Zellen herausgearbeitet werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Aktivität der Transkriptionsfaktoren IRF5 und NF- κ B auszureichen scheint, die komplexen Veränderungen des cHL-charakteristischen Geno- und Phänotyps zu induzieren. Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung beider TF für die Pathogenese des cHL.

Die Frage, auf welchem Wege IRF5 in den HRS-Zellen verstärkt exprimiert und letztendlich aktiviert wird, bleibt derzeit spekulativ. Im Rahmen der antiviralen Immunantwort wird IRF5 nach TLR-Aktivierung u.a. über MyD88-abhängige Signalwege aktiviert. In diesem Zusammenhang wurde die Bedeutung der IKK-verwandten Kinasen TBK1 und IKK ϵ bei der phosphorylierungsabhängigen IRF5-Aktivierung beschrieben [204]. Zudem konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation durch verschiedene externe inflammatorische Mediatoren die NF- κ B-aktivierende Kinase IKK β IRF5 phosphorylieren und aktivieren kann [205]. Von daher wäre eine konstitutive TLR-Aktivierung als übergeordneter IRF5-Aktivierungsmechanismus denkbar. Nachfolgende Untersuchungen konnten nachweisen, dass die IRF5-Expression ebenfalls über einen aktivierten LTR getrieben werden kann [206]. Dies unterstreicht einmal mehr die Bedeutung der funktionellen Interaktion und Vernetzung aktivierter Signalwege im cHL. Im Rahmen der Charakterisierung der LTR-getriebenen CSFR1-Expression konnten wir zeigen, dass die maximale LTR-Promoteraktivität von den TF NF- κ B, AP1, GATA3 und Sp1 abhängt. Die synergistische Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und IRF5 lässt sich damit nicht nur im Rahmen der Induktion entsprechender Zielgene, sondern auch auf der Ebene der direkten gegenseitigen Expressionsregulation zeigen.

3.2 Die Expression B-Linien-fremder Gene und deren funktionelle Bedeutung für die Biologie des cHL

Der charakteristische Verlust des B-Zellphänotyps der HRS-Zellen wird u.a. durch die epigenetische Inaktivierung wichtiger B-Zell-Differenzierungsfaktoren sowie durch die Aktivierung von transkriptionellen Faktoren vermittelt, die die Expression B-Zell-spezifischer Gene inhibiert. So wird beispielsweise der Transkriptionsfaktor TCF3 (E2A) über die Bildung funktionell inaktiver Heterodimere bzw. über eine kompetitive Bindung an E2A-DNA-Bindungsmotiven durch die aberrant exprimierten Proteine ID2 und ABF-1 inhibiert und damit die Expression einer ganzen Reihe B-Zell-spezifischer Gene blockiert [14].

Neben dem Verlust des physiologischen B-Zell-Phänotyps sind HRS-Zellen insbesondere durch die Expression B-linienfremder Gene charakterisiert. So lassen sich in den HRS-Zellen häufig T-Zell-spezifische Marker wie CD3, CD4 oder GATA-3, dendritische Zellmarker (CCL17) oder auch myeloische Marker (CSF1) nachweisen.

Die Identifizierung der LTR-getriebenen CSFR1-Expression in den HRS-Zellen offenbart die funktionelle Bedeutung der genomweiten LTR-Derepression als generellen Mechanismus zur Induktion B-Linien-fremder Gene und onkogener Faktoren. LTRs werden im Rahmen der frühen Entwicklungsphase durch vielfältige Mechanismen epigenetisch inaktiviert [151]. Der Verlust der epigenetischen Kontrolle scheint hier maßgeblich für die LTR-Derepression verantwortlich zu sein. Unsere Arbeiten konnten dabei erstmals den Verlust des epigenetischen Repressors CBFA2T3 in Zusammenhang mit dem epigenetischen Kontrollverlust herstellen. Dieses Konzept wird unterstützt durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die durch Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A und der demethylierenden Substanz 5-Azacytidin in B-Zellen einen Hodgkin-Lymphom-ähnlichen Phänotyp induzieren konnten [207].

Die funktionelle Bedeutung der Expression B-Linienfremder Gene für die Pathogenese des cHL ist größtenteils unverstanden. In den hier vorgestellten Arbeiten konnten wir die pathogenetische Bedeutung von zwei in HRS-Zellen aberrant exprimierten, B-Linien-fremden Genen, *c-fms* und *IL-21*, herausstellen. Die LTR-getriebene Expression von CSFR1 und dessen autokrine Stimulation durch den Liganden CSF1 aktivieren wichtige Überlebenssignalwege in den HRS-Zellen. Eine experimentelle Blockade dieses Signalweges führte zum Wachstumsarrest und Apoptoseinduktion der Hodgkin-Zellen.

Die Expressionsanalyse auf mRNA- und Proteinebene zeigte in Hodgkin-Zelllinien sowie in primärem Lymphomgewebe von Patienten mit cHL eine aberrante Expression des Zytokins IL-21. Die simultane Koexpression des IL-21-Rezeptors weist auch hier auf einen autokrinen Stimulationsmechanismus hin, der sich durch eine experimentelle IL-21-Blockade bestätigen ließ. Weiterhin ließ sich zeigen, dass IL-21 den JAK/STAT-Signalweg induziert und wesentlich

für die konstitutive STAT3-Aktivierung in den HRS-Zellen verantwortlich ist [43]. Durch die IL-21-vermittelte Induktion STAT3-abhängiger Zielgene konnte als funktionelle Konsequenz eine Protektion vor CD95-induzierter Apoptose sowie über die Expression des Chemokins MIP-3 α die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen gezeigt werden. Damit konnten wir am Beispiel des Zytokins IL-21 zeigen, dass die Expression B-Linien-fremder Gene im cHL pathogenetisch wichtige Effektormechanismen wie die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege und die Ausbildung des immunsuppressiven Mikromilieus induzieren kann. Der IL-21-vermittelte Apoptoseschutz könnte dabei vor allem in HRS-Zellen bedeutsam sein, die trotz hochregulierter c-FLIP-Expression sensibel gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose sind [208].

Die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen durch das IL-21-induzierte Chemokin MIP-3 α erweitert das pathogenetische Verständnis für die Ausbildung und Aufrechterhaltung des zellulären Mikroenvironmentes im cHL. Ein wesentlicher Anteil des reaktiven Begleitinfiltrates stellen CD4-positive TH2-Zellen und insbesondere CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatorische T-Zellen. Diese bilden neben verschiedenen immunregulatorischen Zytokinen ein immunsuppressives Mikromilieu aus, das den HRS-Zellen im Rahmen des Immunescapes einen effektiven Schutz vor zytotoxischen Zellen verschafft [79, 209]. Zurückliegend konnte bereits gezeigt werden, dass das von HRS-Zellen exprimierte AP-1-Zielgen *Galectin-1* zur Vermehrung von T_{reg}-Zellen führt [53]. Unsere Ergebnisse der IL-21-abhängigen Expression von MIP-3 α in HRS-Zellen legt nun nahe, dass die hohe Abundanz von T_{reg}-Zellen innerhalb des cHL-charakteristischen Begleitinfiltrates sowohl durch eine verstärkte Differenzierung von T_{reg}-Zellen aus dem T-Zell-Pool als auch durch eine forcierte Migration bestehender T_{reg}-Zellen aus dem umgebenden Gewebe bzw. peripherem Blut zu erklären ist.

3.3 Therapeutische Implikationen

In den letzten Jahren hat sich die Therapie maligner Lymphome zunehmend weiterentwickelt. Mit der Einführung verschiedener therapeutischer Antikörper und der Möglichkeit einer spezifischen Blockade aberrant aktivierter Signalwege durch spezifische Signalwegsinhibitoren ist bei vielen Lymphomentitäten eine zielgerichtete und zum Teil bereits Chemotherapie-freie Therapie möglich. Das cHL hat im Vergleich zu anderen Lymphomentitäten durch eine kombinierte Chemotherapie mit oder ohne Radiatio der betroffenen Lymphknotenregionen eine sehr gute Langzeitüberlebensrate von stadienabhängig 65% bis >90% [210, 211]. Dennoch ist die Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten insbesondere für Patienten mit refraktärer oder rezidivierter Erkrankung zwingend notwendig. Ebenso sind Langzeittoxizitäten nach intensiver Chemotherapie und Radiatio sowie das Auftreten von sekundären Zweitmalignomen von

erheblicher klinischer Relevanz [212]. In den letzten Jahren konnten verschiedene therapeutische Strategien entwickelt werden, die sich spezifisch gegen das zelluläre Begleitinfiltrat und dessen Interaktion mit den HRS-Zellen bzw. gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren auf den HRS-Zellen richten. So wurde erst kürzlich das Antikörperkonjugat Brentuximab vedotin zur Behandlung des refraktären oder rezidivierten Hodgkin-Lymphoms zugelassen, welches den Oberflächenmarker CD30 auf HRS-Zellen bindet und mit dem Spindelgift Monomethylauristatin E konjugiert ist. Eine Immuncheckpoint-Blockade mit den anti-PD-1-Antikörpern Nivolumab und Pembrolizumab, die die PD-1/PD-L1-vermittelte Suppression reaktiver T-Zellen aufheben, zeigte in verschiedenen Studien eine beeindruckende und z. T. dauerhafte Ansprechraten bei therapierefraktären, multiple vorbehandelten Patienten und unterstreicht die pathogenetische Bedeutung und die therapeutische Relevanz des zellulären Mikromilieus [86]. Trotz der beeindruckenden und erfolgsversprechenden Ansprechraten lässt sich eine komplette Remission durch eine PD-1/PD-L1-Blockade jedoch nur bei ca. 15-20% der behandelten Patienten erreichen [213, 214]. Die zugrundeliegenden Ursachen könnten u.a. in einer reduzierten MHC-vermittelten Antigenexpression der HRS-Zellen bzw. durch die Etablierung eines komplexen immunsuppressiven Mikromilieus liegen. Die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, die sich global gegen das immunsuppressive Mikromilieu bzw. auch direkt gegen proliferationsfördernde und Apoptose-hemmende Signalwege der HRS-Zellen richten, könnten – auch in Kombination mit einer PD1-PD-L1-Blockade – zu einer weiteren Therapieverbesserung des cHL führen. In diesem Zusammenhang haben die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse eine wichtige therapeutische Relevanz. Die Inhibition der IRF5-Aktivität führte bereits im Zelllinienmodell zu einer gesteigerten Apoptoserate in den transfizierten Zellen. Ob dem eine direkte Blockade überlebenswichtiger Signalwege innerhalb der Hodgkin-Zellen bzw. die Inhibition Zytokin-vermittelter auto- und parakriner Signalwege zugrunde liegt, bleibt derzeit noch ungeklärt. Eine Blockade der IRF5-Aktivität bei Patienten mit cHL bietet jedoch die therapeutische Möglichkeit, das regulatorische Zytokin- und Chemokinnetzwerk der HRS-Zellen zu beeinflussen und damit einerseits überlebenswichtige Signalwege zu inhibieren sowie gleichzeitig die Ausbildung und Aufrechterhaltung des immunsuppressiven, zellulären Begleitinfiltrates zu stören. Die damit einhergehende Reduktion der IRF5-nachgeschalteten AP-1-Aktivität mit Expressionsreduktion der AP-1-Zielgene *Galectin-1* und *PD-L1* könnte in diesem Zusammenhang eine weitere Störung des immunsuppressiven Mikromilieus mit potentieller Wirkungsverstärkung einer therapeutischen PD-1/PD-L1-Blockade bedeuten [53, 215]. Die nachgewiesene Kooperation zwischen den TF IRF5 und NF- κ B in den HRS-Zellen birgt zudem die Möglichkeit, durch eine therapeutische Inhibition die funktionelle Interaktion und Aktivität beider Faktoren gleichzeitig zu stören und

damit wichtige, nachgeschaltete Signalwege für Wachstum und Überleben der HRS-Zellen spezifisch zu inhibieren.

Durch die Charakterisierung pathogenetisch wichtiger Effektorfunktionen des aberrant exprimierten Zytokins IL-21 eröffnen sich zudem der IL-21-Signalweg sowie das nachgeschaltete Chemokin MIP-3 α als potentielle therapeutische Zielstrukturen. Eine therapeutische IL-21-Inhibition würde sich in diesem Fall durch die Aufhebung der Apoptoseblockade direkt gegen die HRS-Zellen richten, gleichzeitig aber mit der Ausbildung und Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Mikromilieus interferieren.

Durch die experimentelle Blockade des CSFR1-Rezeptorsignalweges mittels spezifischer CSFR1-Inhibitoren konnten wir im Zelllinienmodell die Bedeutung des CSFR1-Signalweges als potentiell therapeutische Zielstruktur herausarbeiten. Im Rahmen einer nachfolgenden Arbeit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor BAY 43-9006/Sorafenib, der bereits als zugelassenes Medikament zur Behandlung verschiedener Tumorentitäten wie dem Nierenzellkarzinom oder dem hepatozellulären Karzinom klinisch eingesetzt wird, eine Hemmung der CSFR1-Aktivierung in den HRS-Zellen bewirkt [216]. Dies hatte einerseits die Auslösung des Zelltodes zur Folge, andererseits wurden die HRS-Zellen gegenüber einer Behandlung mit konventionellen Zytostatika wie Doxorubicin und Vincristin sensibilisiert. Dies veranschaulicht die synergistische Wirksamkeit einer zielgerichteten CSFR1-Blockade mit klassischen Chemotherapeutika und könnte als Therapiestrategie die bestehenden Behandlungsoptionen erweitern. Zurückliegende Studien mit den CSFR1R-Inhibitoren JNJ-40346527 und PLX3397 bei therapierefraktären bzw. rezidivierten cHL-Patienten konnten bei einigen Patienten eine Krankheitsstabilisierung bzw. auch ein Therapieansprechen erreichen [217].

3.4 Molekulare Biomarker bei PZNSL

Die prognostische Relevanz verschiedener molekularer Marker bei Patienten mit PZNSL war bisher nicht hinreichend untersucht. In einer kleinen Fallserie konnte eine Korrelation zwischen einer starken *MYC*-Expression und einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten nachgewiesen werden [218]. Die bisher publizierten Arbeiten zur prognostischen Bedeutung verschiedener B-Zell-Differenzierungsmarker wie BCL-2, BCL-6, MUM1/IRF4 bzw. des B-Zell-Differenzierungsstatus basieren zumeist auf retrospektiven Studien mit kleinen Patientenzahlen und heterogenen Behandlungsschemata. Diese konnten entweder keinen prognostischen Einfluss der genannten Marker nachweisen bzw. ergaben widersprüchliche Ergebnisse [108, 180, 181]. In der unter Kapitel 2.3.1 vorgestellten Arbeit konnten wir anhand eines größeren und homogen behandelten Patientenkollektives den

prognostischen Einfluss von BCL-6 nachweisen. Ein positiver Expressionsstatus ging mit einem signifikant schlechteren PFS und OS bei Patienten mit PZNSL einher. Dieses Ergebnis bestätigte das der CALGB 50202 Studie, der einzigen prospektiven Studie, die sich mit der prognostischen Rolle von BCL-6 bei ZNSL beschäftigte [108, 180-182].

BCL-6 kommt im Rahmen der physiologischen Keimzentrumsreaktion eine zentrale Funktion zu. Als transkriptioneller Repressor reguliert es eine Vielzahl zellulärer Funktionen einschließlich Aktivierung, Überleben und Differenzierung von Keimzentrums-B-Zellen. Gleichzeitig spielt BCL-6 als aktiviertes Onkogen in der Pathogenese verschiedener B-Zell-Lymphome, insbesondere auch bei PZNSL, eine bedeutende Rolle [219, 220]. So lassen sich in ca. 20-30% der PZNSL Translokationen des *BCL-6*-Genlokus nachweisen [120, 124, 136]. Eine verstärkte BCL-6-Expression scheint vor dem Hintergrund der onkogenen Eigenschaften von BCL-6 mit einer aggressiveren Tumorbilogie der PZNSL in Verbindung zu stehen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die signifikante Assoziation zwischen einem positiven BCL-6-Expressionsstatus und einer multifokalen Lymphommanifestation. In der Gesamtkohorte der G-PCNSL-SG1-Patienten korrelierte die Multifokalität ebenso mit einem schlechteren Überleben der Patienten [221].

Für die B-Zell-Marker BCL-2, CD10 oder MUM1/IRF4 sowie für die immunphänotypische Klassifizierung nach Hans konnte hingegen kein prognostischer Einfluss nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit früheren Arbeiten [95, 178, 182, 222]. Für BCL-2 als antiapoptotisches Protein, welches in Keimzentrums-B-Zellen physiologischerweise nur sehr gering exprimiert wird, zeigte sich in systemischen DLBCL ein Zusammenhang zu einem schlechteren Überleben [223, 224]. Die Tatsache, dass BCL-2 in der überwiegenden Mehrheit der PZNSL stark exprimiert wird, unterstreicht eher dessen pathogenetische als prognostische Bedeutung in PZNSL. Ein Großteil der analysierten Fälle zeigte eine Koexpression von BCL-6 und MUM1/IRF4. Beide Faktoren werden von physiologischen B-Zellen normalerweise exklusiv exprimiert. Die erhobenen Daten stehen damit im Einklang mit früheren Untersuchungen und belegen den aktivierten Immunphänotyp der PZNSL [95].

3.4.1 Zytokine als diagnostische und prognostische Biomarker bei ZNSL

Viele Zytokine lassen sich als lösliche und nicht-membrangebundene Proteine im Serum oder Liquor von Patienten nachweisen. Insbesondere aufgrund der einfachen Zugänglichkeit beider Kompartimente steht die Identifizierung verschiedener Zytokine als diagnostische oder prognostische Biomarker im Fokus klinischer Forschung. Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals zeigen, dass die Liquorkonzentration des Zytokins Osteopontin bei Patienten mit PZNSL und SZNSL diagnostische Aussagekraft besitzt. Frühere Arbeiten u.a. auch von unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten bereits für die Zytokine IL-10, CXCL13

und Neopterin zeigen, dass sich diese im Liquor von Patienten mit PZNSL in höherer Konzentration nachweisen lassen als bei Patienten mit anderen ZNS-Tumoren oder inflammatorischen ZNS-Erkrankungen [140, 144, 225, 226]. Dies unterstreicht die potentielle Bedeutung einer Zytokinanalyse im Liquor zur Diagnosesicherung bei ZNS-Lymphomen. Dies ist insofern von klinischer Bedeutung, da die klassischen Verfahren zur Liquordiagnostik wie die zytomorphologische und immunzytometrische Analyse oder eine Klonalitätsanalyse mittels PCR sich nur auf die Patienten beschränken, die einen leptomeningealen Lymphombefall aufweisen [227-229]. Dies betrifft bei PZNSL lediglich ca. 20% und bei SZNSL ca. 40-50% aller Patienten [229, 230].

Wir konnten in unseren Analysen keinen Einfluss einer möglichen Steroid-Vortherapie auf die Höhe der OPN-Konzentration im Liquor nachweisen. Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung kann eine vorausgehende Steroidtherapie aufgrund des möglichen Zellunterganges die Diagnose erschweren. Die erhöhte OPN-Liquorkonzentration scheint in diesem Zusammenhang ein robust nachzuweisender Biomarker zu sein, der die Diagnosestellung vereinfachen könnte.

Eine Limitation für die klinische Routine ist die derzeit fehlende Definition eines einheitlichen Cut-Off-Wertes für die OPN-Liquorkonzentration. Dies ist insofern relevant, da Osteopontin im Liquor von ZNS-Patienten zwar sehr stark, jedoch im Vgl. zu anderen ZNS-Tumoren wie GBM oder entzündlichen ZNS-Erkrankungen nicht exklusiv bzw. spezifisch exprimiert wird. Zukünftige Arbeiten müssen daher zeigen, ob ein spezifischer Cut-Off-Wert definiert werden kann oder ob vielmehr die Kombination verschiedener Zytokine wie IL-10, CXCL13, Neopterin und OPN die Spezifität der Liquoranalyse weiter verbessern kann. Dieses diagnostische Vorgehen ist zum Beispiel für die Zytokine IL-10, IL-6 und IFN γ zur Diagnose primärer intraokulärer Lymphome gezeigt [231, 232].

Der konsistente Nachweis einer erhöhten OPN-Liquorkonzentration könnte auch bei Patienten mit SZNSL eine erhebliche klinische Bedeutung erlangen. Die derzeitigen Modelle zur Prädiktion einer ZNS-Beteiligung bei Patienten mit systemischen, aggressiven Lymphomen haben nur eine sehr niedrige diagnostische Aussagekraft [233]. Im Rahmen verschiedener retrospektiver Studien konnten verschiedene klinische Parameter wie ein hoher internationaler Prognoseindex (IPI), eine erhöhte Serum-LDH, 2 oder mehr extranodale Manifestationen des DLBCL sowie die extranodalen Manifestationen Testis, Mamma, paranasale bzw. parameningeale Lymphome und Knochenmarksinfiltration als Prädiktoren für ein erhöhtes ZNS-Rezidivrisiko identifiziert werden [234, 235]. Allerdings erlaubt keiner dieser Parameter allein eine valide Risikostratifizierung. Derzeitige Risikomodelle basieren auf der Kombination verschiedener klinischer Parameter, haben aber dennoch nur eine limitierte prädiktive Aussagekraft. Zurückliegende Arbeiten konnten bereits zeigen, dass ein hoher Liquor-OPN-

Spiegel in Zusammenhang mit einer ZNS-Beteiligung bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie steht [236]. Die OPN-Liquorkonzentration könnte einen prädiktiven Marker zur Identifizierung von Patienten mit subklinischem ZNS-Befall darstellen und sollte auch vor dem Hintergrund einer möglichen Therapiestratifizierung (medikamentöse ZNS-Prophylaxe) in zukünftigen Studien näher validiert werden.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass eine hohe OPN-Liquorkonzentration mit einem schlechteren Überleben bei Patienten mit PZNSL assoziiert ist. Dies steht im Einklang mit verschiedenen Arbeiten zur prognostischen Bedeutung einer OPN-Expression in anderen malignen Tumoren außerhalb des ZNS [237-239]. In diesem Zusammenhang konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen dem OPN-Spiegel und einem multifokalem Lymphombefall im ZNS nachweisen. Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Multifokalität mit einem schlechteren Überleben von PZNSL Patienten assoziiert ist [221, 240]. Die Höhe der OPN-Liquorkonzentration könnte damit die vorhandene Tumormasse widerspiegeln. Inwieweit sich auf Basis dieser Annahme der OPN-Liquorspiegel als klinischer Verlaufsparameter unter Therapie bzw. auch als *minimal residual disease* (MRD) Marker verwenden lässt, müssen zukünftige Studien zeigen.

Eine weitere Frage richtet sich nach der pathogenetischen Bedeutung der hohen OPN-Expression bei Lymphomen des ZNS. OPN aktiviert nach Bindung an den membranständigen Rezeptor CD44 oder an verschiedene Integrine nachgeschaltete Signalwege, die Zellwachstum, -Adhäsion und -Migration sowie Schutz vor Apoptose vermitteln [241, 242]. Verschiedene Arbeiten konnten zusätzlich eine immunsuppressive Funktion von OPN im Rahmen der Antitumorimmunität nachweisen [186]. Diese Daten legen nahe, dass die hohe OPN-Expression bei ZNS-Lymphomen wichtige Funktion für das Überleben der Lymphomzellen im ZNS hat. In diesem Zusammenhang könnte der OPN-CD44-Signalweg - wie bereits für andere Tumorentitäten gezeigt - eine neue therapeutische Zielstruktur darstellen [243, 244].

4. ZUSAMMENFASSUNG

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Charakterisierung aktivierter Signalwege sowie die Ursachen und Konsequenzen einer deregulierten Zytokinexpression bei malignen Lymphomen. Dabei wurden vorrangig das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL), periphere T-Zell-Lymphome sowie aggressive Lymphome des ZNS (ZNSL) analysiert.

Im cHL konnte der Transkriptionsfaktor IRF5 als zentraler Regulator des inflammatorischen Phänotyps der Hodgkin-/Reed-Sternberg (HRS)-Zellen sowie als entscheidender Faktor für die deregulierte Zytokinexpression identifiziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des myeloischen Proto-Onkogens CSF1R in HRS-Zellen durch eine epigenetische Derepression eines *long-terminal-repeat*-Elementes induziert wird und wichtige Überlebenssignale in HRS-Zellen vermittelt. Für die aberrante Expression des Zytokins IL-21 konnte herausgearbeitet werden, dass dieses zur Aktivierung von STAT3 und nachgeschalteter STAT3-Zielgene führt und Hodgkin-Zellen vor CD95-induzierter Apoptose schützt. Zudem ist IL-21 über die Induktion des Chemokins MIP-3 α an der Ausbildung des immunsuppressiven zellulären Begleitinfiltrates durch Rekrutierung regulatorischer T-Zellen beteiligt. Im Rahmen weiterer Arbeiten konnten verschiedene Signalwegsalterationen und genetische Aberrationen in zwei unterschiedlichen Entitäten reifzelliger T-Zell-Lymphome, dem anaplastisch großzelligen T-Zell-Lymphom sowie dem Sezary-Syndrom, identifiziert werden, die zur malignen Transformation beitragen.

Die Analyse des immunhistologischen Phänotyps primärer ZNS-Lymphome (PCNSL) bestätigte den aktivierten B-Zell-Phänotyp und den Post-Keimzentrums-Ursprung der PZNSL. Zudem konnte eine signifikante prognostische Bedeutung des BCL-6-Expressionsstatus bei Patienten mit PZNSL nachgewiesen werden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass sich das Zytokin Osteopontin in hoher Konzentration im Liquor von Patienten mit ZNSL nachweisen lässt und eine diagnostische und prognostische Aussagekraft besitzt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse erweitern das molekulare Verständnis der Lymphom-Pathogenese mit Ansatzpunkten für die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Gleichzeitig zeigen sie am Beispiel von ZNS-Lymphomen die Bedeutung molekularer Faktoren und Zytokine als diagnostische und prognostische Biomarker.

5. LITERATURANGABEN

1. Shaffer, A.L., 3rd, R.M. Young, and L.M. Staudt, *Pathogenesis of human B cell lymphomas*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 565-610.
2. Basso, K. and R. Dalla-Favera, *Germinal centres and B cell lymphomagenesis*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 172-84.
3. Lenz, G. and L.M. Staudt, *Aggressive lymphomas*. N Engl J Med, 2010. **362**(15): p. 1417-29.
4. Shain, K.H., W.S. Dalton, and J. Tao, *The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B-cell malignancies*. Oncogene, 2015. **34**(36): p. 4673-82.
5. Scott, D.W. and R.D. Gascoyne, *The tumour microenvironment in B cell lymphomas*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 517-34.
6. Kanzler, H., et al., *Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells*. J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1495-505.
7. Marafioti, T., et al., *Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1443-50.
8. Swerdlow SH, C.E., Harris NL, et al. , *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press;; 2008.
9. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2375-90.
10. Kuppers, R., A. Engert, and M.L. Hansmann, *Hodgkin lymphoma*. J Clin Invest, 2012. **122**(10): p. 3439-47.
11. Re, D., et al., *Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2080-4.
12. Aldinucci, D., et al., *IRF4 silencing inhibits Hodgkin lymphoma cell proliferation, survival and CCL5 secretion*. Br J Haematol, 2011. **152**(2): p. 182-90.
13. Schwering, I., et al., *Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1505-12.
14. Mathas, S., et al., *Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 207-15.
15. Janz, M., B. Dorken, and S. Mathas, *Reprogramming of B lymphoid cells in human lymphoma pathogenesis*. Cell Cycle, 2006. **5**(10): p. 1057-61.
16. Kuppers, R., et al., *Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10962-6.
17. Savage, K.J., A. Mottok, and M. Fanale, *Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma*. Semin Hematol, 2016. **53**(3): p. 190-202.
18. Vockerodt, M., et al., *The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma*. J Pathol, 2015. **235**(2): p. 312-22.
19. Bargou, R.C., et al., *Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2961-9.
20. Nagel, D., et al., *Mechanisms and consequences of constitutive NF-kappaB activation in B-cell lymphoid malignancies*. Oncogene, 2014. **33**(50): p. 5655-65.
21. Vallabhapurapu, S. and M. Karin, *Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 693-733.
22. Hinz, M., et al., *Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2798-807.
23. Guo, F., et al., *TRAF1 is involved in the classical NF-kappaB activation and CD30-induced alternative activity in Hodgkin's lymphoma cells*. Mol Immunol, 2009. **46**(13): p. 2441-8.
24. Nonaka, M., et al., *Aberrant NF-kappaB2/p52 expression in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and CD30-transformed rat fibroblasts*. Oncogene, 2005. **24**(24): p. 3976-86.
25. de Oliveira, K.A., et al., *A roadmap of constitutive NF-kappaB activity in Hodgkin lymphoma: Dominant roles of p50 and p52 revealed by genome-wide analyses*. Genome Med, 2016. **8**(1): p. 28.
26. Izban, K.F., et al., *Characterization of NF-kappaB expression in Hodgkin's disease: inhibition of constitutively expressed NF-kappaB results in spontaneous caspase-independent apoptosis in Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Mod Pathol, 2001. **14**(4): p. 297-310.
27. Ranuncolo, S.M., et al., *Hodgkin lymphoma requires stabilized NIK and constitutive RelB expression for survival*. Blood, 2012. **120**(18): p. 3756-63.
28. Liu, Y., et al., *The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: an actively shaped and essential tumor component*. Semin Cancer Biol, 2014. **24**: p. 15-22.
29. Skinnider, B.F. and T.W. Mak, *The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4283-97.

30. Lake, A., et al., *Mutations of NFKBIA, encoding I kappa B alpha, are a recurrent finding in classical Hodgkin lymphoma but are not a unifying feature of non-EBV-associated cases.* Int J Cancer, 2009. **125**(6): p. 1334-42.
31. Liu, X., et al., *Mutations of NFKBIA in biopsy specimens from Hodgkin lymphoma.* Cancer Genet Cytogenet, 2010. **197**(2): p. 152-7.
32. Emmerich, F., et al., *Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells.* J Pathol, 2003. **201**(3): p. 413-20.
33. Jungnickel, B., et al., *Clonal deleterious mutations in the I kappa B alpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma.* J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 395-402.
34. Schmitz, R., et al., *TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma.* J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 981-9.
35. Kato, M., et al., *Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas.* Nature, 2009. **459**(7247): p. 712-6.
36. Joos, S., et al., *Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2.* Blood, 2002. **99**(4): p. 1381-7.
37. Martin-Subero, J.I., et al., *Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma.* Blood, 2002. **99**(4): p. 1474-7.
38. Otto, C., et al., *Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma.* Br J Haematol, 2012. **157**(6): p. 702-8.
39. Steidl, C., et al., *Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome.* Blood, 2010. **116**(3): p. 418-27.
40. Horie, R., et al., *Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells.* Oncogene, 2002. **21**(16): p. 2493-503.
41. Yurchenko, M. and S.P. Sidorenko, *Hodgkin's lymphoma: the role of cell surface receptors in regulation of tumor cell fate.* Exp Oncol, 2010. **32**(4): p. 214-23.
42. Gruss, H.J., J. Duyster, and F. Herrmann, *Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease.* Ann Oncol, 1996. **7 Suppl 4**: p. 19-26.
43. Kube, D., et al., *STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines.* Blood, 2001. **98**(3): p. 762-70.
44. Skinnider, B.F., et al., *Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma.* Blood, 2002. **99**(2): p. 618-26.
45. Hinz, M., et al., *Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity.* J Exp Med, 2002. **196**(5): p. 605-17.
46. Scheeren, F.A., et al., *IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis.* Blood, 2008. **111**(9): p. 4706-15.
47. Joos, S., et al., *Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells.* Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 549-52.
48. Van Roosbroeck, K., et al., *JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma.* Blood, 2011. **117**(15): p. 4056-64.
49. Weniger, M.A., et al., *Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation.* Oncogene, 2006. **25**(18): p. 2679-84.
50. Gunawardana, J., et al., *Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma.* Nat Genet, 2014. **46**(4): p. 329-35.
51. Mathas, S., et al., *Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B.* EMBO J, 2002. **21**(15): p. 4104-13.
52. Janz, M., et al., *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. **107**(6): p. 2536-9.
53. Juszczynski, P., et al., *The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13134-9.
54. Watanabe, M., et al., *AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin and Reed-Sternberg cells.* Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 633-41.
55. Jundt, F., et al., *Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma.* Blood, 2002. **99**(9): p. 3398-403.
56. Jundt, F., et al., *Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma.* Leukemia, 2008. **22**(8): p. 1587-94.
57. Kochert, K., et al., *High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas.* Oncogene, 2011. **30**(15): p. 1831-40.
58. Schwarzer, R. and F. Jundt, *Notch and NF-kappaB signaling pathways in the biology of classical Hodgkin lymphoma.* Curr Mol Med, 2011. **11**(3): p. 236-45.
59. Dutton, A., et al., *Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR.* J Pathol, 2005. **205**(4): p. 498-506.
60. Georgakis, G.V., et al., *Inhibition of the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma.* Br J Haematol, 2006. **132**(4): p. 503-11.
61. Zheng, B., et al., *MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival.* Blood, 2003. **102**(3): p. 1019-27.

62. Saitoh, Y., et al., *Overexpressed NF-kappaB-inducing kinase contributes to the tumorigenesis of adult T-cell leukemia and Hodgkin Reed-Sternberg cells*. *Blood*, 2008. **111**(10): p. 5118-29.
63. Gruss, H.J., et al., *Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. *Cancer Res*, 1992. **52**(12): p. 3353-60.
64. Jundt, F., et al., *Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 2065-71.
65. Aldinucci, D., et al., *Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(4): p. 769-76.
66. Skinnider, B.F., U. Kapp, and T.W. Mak, *The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma*. *Leuk Lymphoma*, 2002. **43**(6): p. 1203-10.
67. van den Berg, A., L. Visser, and S. Poppema, *High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma*. *Am J Pathol*, 1999. **154**(6): p. 1685-91.
68. Kapp, U., et al., *Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. *J Exp Med*, 1999. **189**(12): p. 1939-46.
69. Jucker, M., et al., *Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease*. *Blood*, 1991. **77**(11): p. 2413-8.
70. Fischer, M., et al., *Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue*. *Int J Cancer*, 2003. **107**(2): p. 197-201.
71. Teruya-Feldstein, J., G. Tosato, and E.S. Jaffe, *The role of chemokines in Hodgkin's disease*. *Leuk Lymphoma*, 2000. **38**(3-4): p. 363-71.
72. Ullrich, K., et al., *The IL-15 cytokine system provides growth and survival signals in Hodgkin lymphoma and enhances the inflammatory phenotype of HRS cells*. *Leukemia*, 2015. **29**(5): p. 1213-8.
73. Klein, S., et al., *Production of multiple cytokines by Hodgkin's disease derived cell lines*. *Hematol Oncol*, 1992. **10**(6): p. 319-29.
74. Aldinucci, D., et al., *The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape*. *J Pathol*, 2010. **221**(3): p. 248-63.
75. Tesch, H., et al., *Expression of interleukin-2R alpha and interleukin-2R beta in Hodgkin's disease*. *Am J Pathol*, 1993. **142**(6): p. 1714-20.
76. Cattaruzza, L., et al., *Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: Involvement of IL-7 in tumor cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(5): p. 1092-101.
77. Steidl, C., J.M. Connors, and R.D. Gascoyne, *Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(14): p. 1812-26.
78. Baumforth, K.R., et al., *Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(1): p. 195-204.
79. Marshall, N.A., et al., *Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1755-62.
80. Hanamoto, H., et al., *Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(3): p. 997-1006.
81. Hedvat, C.V., et al., *Macrophage-derived chemokine expression in classical Hodgkin's lymphoma: application of tissue microarrays*. *Mod Pathol*, 2001. **14**(12): p. 1270-6.
82. Tanijiri, T., et al., *Hodgkin's reed-sternberg cell line (KM-H2) promotes a bidirectional differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+ cytotoxic T lymphocytes from CD4+ naive T cells*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(3): p. 576-84.
83. Herbst, H., et al., *Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease*. *Blood*, 1996. **87**(7): p. 2918-29.
84. Kadin, M., et al., *Eosinophils are the major source of transforming growth factor-beta 1 in nodular sclerosing Hodgkin's disease*. *Am J Pathol*, 1993. **142**(1): p. 11-6.
85. Green, M.R., et al., *Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma*. *Blood*, 2010. **116**(17): p. 3268-77.
86. Ansell, S.M., et al., *PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 311-9.
87. Verbeke, C.S., et al., *Fas ligand expression in Hodgkin lymphoma*. *Am J Surg Pathol*, 2001. **25**(3): p. 388-94.
88. Yamamoto, R., et al., *PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2008. **111**(6): p. 3220-4.
89. Reichel, J., et al., *Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. *Blood*, 2015. **125**(7): p. 1061-72.
90. Steidl, C., et al., *MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers*. *Nature*, 2011. **471**(7338): p. 377-81.
91. Roth, P., et al., *Pathogenesis and management of primary CNS lymphoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012. **12**(5): p. 623-33.

92. Korfel, A. and U. Schlegel, *Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma*. Nat Rev Neurol, 2013. **9**(6): p. 317-27.
93. Tomita, N., et al., *Secondary central nervous system lymphoma*. Int J Hematol, 2006. **84**(2): p. 128-35.
94. Villano, J.L., et al., *Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma*. Br J Cancer, 2011. **105**(9): p. 1414-8.
95. Camilleri-Broet, S., et al., *A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases*. Blood, 2006. **107**(1): p. 190-6.
96. Braaten, K.M., et al., *BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(3): p. 1063-9.
97. Deckert-Schluter, M., A. Rang, and O.D. Wiestler, *Apoptosis and apoptosis-related gene products in primary non-Hodgkin's lymphoma of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 1998. **96**(2): p. 157-62.
98. Klapper, W. and H.H. Wacker, *[Follicular and mantle cell lymphoma. Extranodal involvement of primarily nodal indolent B-cell lymphomas]*. Pathologe, 2007. **28**(1): p. 21-8.
99. Salzburg, J., et al., *Prevalence, clinical pattern, and outcome of CNS involvement in childhood and adolescent non-Hodgkin's lymphoma differ by non-Hodgkin's lymphoma subtype: a Berlin-Frankfurt-Munster Group Report*. J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3915-22.
100. Batchelor, T. and J.S. Loeffler, *Primary CNS lymphoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(8): p. 1281-8.
101. Josephson, S.A., et al., *The diagnostic utility of brain biopsy procedures in patients with rapidly deteriorating neurological conditions or dementia*. J Neurosurg, 2007. **106**(1): p. 72-5.
102. Kuker, W., et al., *Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients*. J Neurooncol, 2005. **72**(2): p. 169-77.
103. Fischer, L., et al., *Meningeal dissemination in primary CNS lymphoma: prospective evaluation of 282 patients*. Neurology, 2008. **71**(14): p. 1102-8.
104. Kreher, S., et al., *Prognostic impact of intraocular involvement in primary CNS lymphoma: experience from the G-PCNSL-SG1 trial*. Ann Hematol, 2015. **94**(3): p. 409-14.
105. Baraniskin, A., et al., *Current strategies in the diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system*. Br J Haematol, 2012. **156**(4): p. 421-32.
106. Scott, B.J., et al., *A systematic approach to the diagnosis of suspected central nervous system lymphoma*. JAMA Neurol, 2013. **70**(3): p. 311-9.
107. Giannini, C., A. Dogan, and D.R. Salomao, *CNS lymphoma: a practical diagnostic approach*. J Neuropathol Exp Neurol, 2014. **73**(6): p. 478-94.
108. Rubenstein, J.L., et al., *Intensive chemotherapy and immunotherapy in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202)*. J Clin Oncol, 2013. **31**(25): p. 3061-8.
109. Korfel, A., et al., *Phase II study of central nervous system (CNS)-directed chemotherapy including high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for CNS relapse of aggressive lymphomas*. Haematologica, 2013. **98**(3): p. 364-70.
110. Omuro, A., et al., *R-MPV followed by high-dose chemotherapy with TBC and autologous stem-cell transplant for newly diagnosed primary CNS lymphoma*. Blood, 2015. **125**(9): p. 1403-10.
111. Thiel, E., et al., *High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(11): p. 1036-47.
112. Korfel, A., et al., *Randomized phase III study of whole-brain radiotherapy for primary CNS lymphoma*. Neurology, 2015. **84**(12): p. 1242-8.
113. Gerstner, E.R., et al., *Long-term outcome in PCNSL patients treated with high-dose methotrexate and deferred radiation*. Neurology, 2008. **70**(5): p. 401-2.
114. Kasenda, B., et al., *Prognosis after high-dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation as first-line treatment in primary CNS lymphoma--a long-term follow-up study*. Ann Oncol, 2012. **23**(10): p. 2670-5.
115. Abrey, L.E., et al., *Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model*. J Clin Oncol, 2006. **24**(36): p. 5711-5.
116. Ferreri, A.J., et al., *Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience*. J Clin Oncol, 2003. **21**(2): p. 266-72.
117. Courts, C., et al., *Transcriptional profiling of the nuclear factor-kappaB pathway identifies a subgroup of primary lymphoma of the central nervous system with low BCL10 expression*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(3): p. 230-7.
118. Schwindt, H., et al., *Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma*. Leukemia, 2009. **23**(10): p. 1875-84.
119. Montesinos-Rongen, M., et al., *Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(4): p. 529-35.
120. Montesinos-Rongen, M., et al., *Interphase cytogenetic analysis of lymphoma-associated chromosomal breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(10): p. 926-33.
121. Montesinos-Rongen, M., et al., *Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma*. Acta Neuropathol, 2011. **122**(6): p. 791-2.
122. Deckert, M., et al., *Modern concepts in the biology, diagnosis, differential diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma*. Leukemia, 2011. **25**(12): p. 1797-807.

123. Gonzalez-Aguilar, A., et al., *Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(19): p. 5203-11.
124. Chapuy, B., et al., *Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas*. Blood, 2016. **127**(7): p. 869-81.
125. Montesinos-Rongen, M., et al., *Genes regulating the B cell receptor pathway are recurrently mutated in primary central nervous system lymphoma*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(6): p. 905-6.
126. Booman, M., et al., *Genomic alterations and gene expression in primary diffuse large B-cell lymphomas of immune-privileged sites: the importance of apoptosis and immunomodulatory pathways*. J Pathol, 2008. **216**(2): p. 209-17.
127. Jordanova, E.S., et al., *Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **35**(1): p. 38-48.
128. Harada, K., et al., *Distinct primary central nervous system lymphoma defined by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry*. Cancer Genet Cytogenet, 2001. **125**(2): p. 147-50.
129. Boonstra, R., et al., *Analysis of chromosomal copy number changes and oncoprotein expression in primary central nervous system lymphomas: frequent loss of chromosome arm 6q*. Virchows Arch, 2003. **443**(2): p. 164-9.
130. Cady, F.M., et al., *Del(6)(q22) and BCL6 rearrangements in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course*. J Clin Oncol, 2008. **26**(29): p. 4814-9.
131. Courts, C., et al., *Recurrent inactivation of the PRDM1 gene in primary central nervous system lymphoma*. J Neuropathol Exp Neurol, 2008. **67**(7): p. 720-7.
132. Braggio, E., et al., *Primary central nervous system lymphomas: a validation study of array-based comparative genomic hybridization in formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4245-53.
133. Montesinos-Rongen, M., et al., *Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1869-75.
134. Chu, L.C., et al., *Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma*. Int J Cancer, 2006. **119**(10): p. 2487-91.
135. Cobbers, J.M., et al., *Frequent inactivation of CDKN2A and rare mutation of TP53 in PCNSL*. Brain Pathol, 1998. **8**(2): p. 263-76.
136. Braggio, E., et al., *Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(17): p. 3986-94.
137. Rubenstein, J.L., et al., *Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma*. Blood, 2006. **107**(9): p. 3716-23.
138. Sung, C.O., et al., *Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1291-300.
139. Roy, S., et al., *Protein biomarker identification in the CSF of patients with CNS lymphoma*. J Clin Oncol, 2008. **26**(1): p. 96-105.
140. Sasayama, T., et al., *Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL)*. Neuro Oncol, 2012. **14**(3): p. 368-80.
141. Smith, J.R., et al., *Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma*. Blood, 2003. **101**(3): p. 815-21.
142. Smith, J.R., et al., *Malignant B cells from patients with primary central nervous system lymphoma express stromal cell-derived factor-1*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(4): p. 633-41.
143. Brunn, A., et al., *Expression pattern and cellular sources of chemokines in primary central nervous system lymphoma*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(3): p. 271-6.
144. Fischer, L., et al., *CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(19): p. 5968-73.
145. Kreher, S., et al., *Mapping of transcription factor motifs in active chromatin identifies IRF5 as key regulator in classical Hodgkin lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(42): p. E4513-22.
146. Kuppers, R., *The biology of Hodgkin's lymphoma*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 15-27.
147. Re, D., R. Kuppers, and V. Diehl, *Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(26): p. 6379-86.
148. Lamprecht, B., et al., *Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 571-9, 1p following 579.
149. Bonifer, C. and D.A. Hume, *The transcriptional regulation of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (csf1r) gene during hematopoiesis*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 549-60.
150. Jundt, F., et al., *Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease*. Blood, 2002. **99**(8): p. 3060-2.
151. Maksakova, I.A., D.L. Mager, and D. Reiss, *Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(21): p. 3329-47.
152. Hug, B.A. and M.A. Lazar, *ETO interacting proteins*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4270-4.
153. Lamprecht, B., et al., *Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3339-47.
154. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 57-79.

155. di Carlo, E., et al., *Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2007. **56**(9): p. 1323-34.
156. Caruso, R., et al., *A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(1): p. 166-75.
157. Kleiweietfeld, M., et al., *CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset*. *Blood*, 2005. **105**(7): p. 2877-86.
158. Hirahara, K., et al., *The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors*. *J Immunol*, 2006. **177**(7): p. 4488-94.
159. Buettner, R., L.B. Mora, and R. Jove, *Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(4): p. 945-54.
160. Schutyser, E., S. Struyf, and J. Van Damme, *The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(5): p. 409-26.
161. Ansel, K.M., et al., *Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 607-56.
162. Kock, J., et al., *Nuclear factor of activated T cells regulates the expression of interleukin-4 in Th2 cells in an all-or-none fashion*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(39): p. 26752-61.
163. Mitelman, F., B. Johansson, and F. Mertens, *The impact of translocations and gene fusions on cancer causation*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 233-45.
164. Stein, H., et al., *CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features*. *Blood*, 2000. **96**(12): p. 3681-95.
165. Chiarle, R., et al., *The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(1): p. 11-23.
166. Mathas, S., et al., *Elevated NF-kappaBp50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas*. *Blood*, 2005. **106**(13): p. 4287-93.
167. Mathas, S., et al., *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*, 2009. **106**(14): p. 5831-6.
168. Kee, B.L., *E and ID proteins branch out*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 175-84.
169. O'Neil, J., et al., *TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(6): p. 587-96.
170. Aspland, S.E., H.H. Bendall, and C. Murre, *The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis*. *Oncogene*, 2001. **20**(40): p. 5708-17.
171. Hwang, S.T., et al., *Mycosis fungoides and Sezary syndrome*. *Lancet*, 2008. **371**(9616): p. 945-57.
172. Steininger, A., et al., *Genomic loss of the putative tumor suppressor gene E2A in human lymphoma*. *J Exp Med*, 2011. **208**(8): p. 1585-93.
173. Eischen, C.M., et al., *Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis*. *Genes Dev*, 1999. **13**(20): p. 2658-69.
174. Vermeer, M.H., et al., *Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2689-98.
175. Brito-Babapulle, V., et al., *p53 allele deletion and protein accumulation occurs in the absence of p53 gene mutation in T-prolymphocytic leukaemia and Sezary syndrome*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(1): p. 180-7.
176. Lamprecht, B., et al., *The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sezary syndrome*. *Br J Dermatol*, 2012. **167**(2): p. 240-6.
177. Preusser, M., et al., *Primary central nervous system lymphoma: a clinicopathological study of 75 cases*. *Pathology*, 2010. **42**(6): p. 547-52.
178. Lin, C.H., et al., *Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(4): p. 1152-6.
179. Levy, O., et al., *Bcl-6 predicts improved prognosis in primary central nervous system lymphoma*. *Cancer*, 2008. **112**(1): p. 151-6.
180. Song, M.K., et al., *Clinical importance of Bcl-6-positive non-deep-site involvement in non-HIV-related primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma*. *J Neurooncol*, 2011. **104**(3): p. 825-31.
181. Lossos, C., et al., *LMO2 and BCL6 are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma*. *Br J Haematol*, 2014. **165**(5): p. 640-8.
182. Momota, H., et al., *Prognostic value of immunohistochemical profile and response to high-dose methotrexate therapy in primary CNS lymphoma*. *J Neurooncol*, 2010. **98**(3): p. 341-8.
183. Hans, C.P., et al., *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray*. *Blood*, 2004. **103**(1): p. 275-82.
184. Kreher, S., et al., *Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma*. *Neuro Oncol*, 2015. **17**(7): p. 1016-21.
185. Strehlow, F., et al., *Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma*. *J Neurooncol*, 2016. **129**(1): p. 165-71.
186. Sangaletti, S., et al., *Osteopontin shapes immunosuppression in the metastatic niche*. *Cancer Res*, 2014. **74**(17): p. 4706-19.
187. Chiodoni, C., M.P. Colombo, and S. Sangaletti, *Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(2): p. 295-307.
188. Rangaswami, H., A. Bulbule, and G.C. Kundu, *Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression*. *Trends Cell Biol*, 2006. **16**(2): p. 79-87.

189. Yuan, J., et al., *Preferential up-regulation of osteopontin in primary central nervous system lymphoma does not correlate with putative receptor CD44v6 or CD44H expression*. Hum Pathol, 2013. **44**(4): p. 606-11.
190. Tun, H.W., et al., *Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3200-10.
191. Rubenstein, J.L., et al., *Differential gene expression in central nervous system lymphoma*. Blood, 2009. **113**(1): p. 266-7; author reply 267-8.
192. Jiang, L., et al., *Selective central nervous system tropism of primary central nervous system lymphoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2010. **3**(8): p. 763-7.
193. Mathas, S., S. Hartmann, and R. Kupperts, *Hodgkin lymphoma: Pathology and biology*. Semin Hematol, 2016. **53**(3): p. 139-47.
194. Boyle, A.P., et al., *High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome*. Cell, 2008. **132**(2): p. 311-22.
195. Neph, S., et al., *An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 83-90.
196. Takaoka, A., et al., *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 243-9.
197. Tamura, T., et al., *The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 535-84.
198. Graham, R.R., et al., *A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 550-5.
199. Krausgruber, T., et al., *IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 231-8.
200. Hopken, U.E., et al., *Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1109-16.
201. Schwarzer, R., B. Dorken, and F. Jundt, *Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells*. Leukemia, 2012. **26**(4): p. 806-13.
202. Genin, P., et al., *Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF-kappa B and IFN-regulatory factor transcription factors*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5352-61.
203. Habelhah, H., et al., *Ubiquitination and translocation of TRAF2 is required for activation of JNK but not of p38 or NF-kappaB*. EMBO J, 2004. **23**(2): p. 322-32.
204. Paun, A., et al., *Functional characterization of murine interferon regulatory factor 5 (IRF-5) and its role in the innate antiviral response*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14295-308.
205. Ren, J., X. Chen, and Z.J. Chen, *IKKbeta is an IRF5 kinase that instigates inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(49): p. 17438-43.
206. Babaian, A., et al., *Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma*. Oncogene, 2016. **35**(19): p. 2542-6.
207. Ehlers, A., et al., *Histone acetylation and DNA demethylation of B cells result in a Hodgkin-like phenotype*. Leukemia, 2008. **22**(4): p. 835-41.
208. Mathas, S., et al., *c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis*. J Exp Med, 2004. **199**(8): p. 1041-52.
209. Ishida, T., et al., *Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege*. Cancer Res, 2006. **66**(11): p. 5716-22.
210. Skoetz, N., et al., *Effect of initial treatment strategy on survival of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a systematic review and network meta-analysis*. Lancet Oncol, 2013. **14**(10): p. 943-52.
211. Ansell, S.M., *Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment*. Mayo Clin Proc, 2015. **90**(11): p. 1574-83.
212. Franklin, J., et al., *Second malignancy risk associated with treatment of Hodgkin's lymphoma: meta-analysis of the randomised trials*. Ann Oncol, 2006. **17**(12): p. 1749-60.
213. Ansell, S.M., *Targeting immune checkpoints in lymphoma*. Curr Opin Hematol, 2015. **22**(4): p. 337-42.
214. Armand, P., et al., *Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure*. J Clin Oncol, 2016.
215. Green, M.R., et al., *Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1611-8.
216. Ullrich, K., et al., *BAY 43-9006/Sorafenib blocks CSF1R activity and induces apoptosis in various classical Hodgkin lymphoma cell lines*. Br J Haematol, 2011. **155**(3): p. 398-402.
217. von Tresckow, B., et al., *An Open-Label, Multicenter, Phase I/II Study of JNJ-40346527, a CSF-1R Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(8): p. 1843-50.
218. Tapia, G., et al., *MYC protein expression is associated with poor prognosis in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system*. APMIS, 2015. **123**(7): p. 596-603.
219. Basso, K. and R. Dalla-Favera, *Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells*. Immunol Rev, 2012. **247**(1): p. 172-83.
220. Green, M.R., et al., *Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3904.

221. Weller, M., et al., *Surgery for primary CNS lymphoma? Challenging a paradigm*. Neuro Oncol, 2012. **14**(12): p. 1481-4.
222. Raoux, D., et al., *Primary central nervous system lymphoma: immunohistochemical profile and prognostic significance*. Neuropathology, 2010. **30**(3): p. 232-40.
223. Mounier, N., et al., *Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4279-84.
224. Gascoyne, R.D., et al., *Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma*. Blood, 1997. **90**(1): p. 244-51.
225. Rubenstein, J.L., et al., *CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma*. Blood, 2013. **121**(23): p. 4740-8.
226. Viaccoz, A., et al., *CSF neopterin level as a diagnostic marker in primary central nervous system lymphoma*. Neuro Oncol, 2015. **17**(11): p. 1497-503.
227. Schroers, R., et al., *Diagnosis of leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system by flow cytometry and cytopathology*. Eur J Haematol, 2010. **85**(6): p. 520-8.
228. Gleissner, B., et al., *CSF evaluation in primary CNS lymphoma patients by PCR of the CDR III IgH genes*. Neurology, 2002. **58**(3): p. 390-6.
229. Korfel, A., et al., *Prognostic impact of meningeal dissemination in primary CNS lymphoma (PCNSL): experience from the G-PCNSL-SG1 trial*. Ann Oncol, 2012. **23**(9): p. 2374-80.
230. Bromberg, J.E., et al., *Central nervous system recurrence of systemic lymphoma in the era of stem cell transplantation--an International Primary Central Nervous System Lymphoma Study Group project*. Haematologica, 2013. **98**(5): p. 808-13.
231. Fisson, S., et al., *Cytokine profile in human eyes: contribution of a new cytokine combination for differential diagnosis between intraocular lymphoma or uveitis*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e52385.
232. Cassoux, N., et al., *IL-10 measurement in aqueous humor for screening patients with suspicion of primary intraocular lymphoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(7): p. 3253-9.
233. Hollender, A., et al., *Central nervous system involvement following diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma: a risk model*. Ann Oncol, 2002. **13**(7): p. 1099-107.
234. Boehme, V., et al., *Incidence and risk factors of central nervous system recurrence in aggressive lymphoma--a survey of 1693 patients treated in protocols of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL)*. Ann Oncol, 2007. **18**(1): p. 149-57.
235. Lee, K.W., et al., *Risk factors for poor treatment outcome and central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma with bone marrow involvement*. Ann Hematol, 2009. **88**(9): p. 829-38.
236. Incesoy-Ozdemir, S., et al., *The relationship between cerebrospinal fluid osteopontin level and central nervous system involvement in childhood acute leukemia*. Turk J Pediatr, 2013. **55**(1): p. 42-9.
237. Han, S.S., et al., *Plasma osteopontin is a useful diagnostic biomarker for advanced non-small cell lung cancer*. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2013. **75**(3): p. 104-10.
238. Poruk, K.E., et al., *Serum osteopontin and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas, 2013. **42**(2): p. 193-7.
239. Zhou, C., et al., *Postoperative serum osteopontin level is a novel monitor for treatment response and tumor recurrence after resection of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2013. **20**(3): p. 929-37.
240. Bessell, E.M., et al., *Primary non-Hodgkin's lymphoma of the CNS treated with BVAM or CHOD/BVAM chemotherapy before radiotherapy*. J Clin Oncol, 1996. **14**(3): p. 945-54.
241. Fujisaki, T., et al., *CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4427-34.
242. Rodrigues, L.R., et al., *The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(6): p. 1087-97.
243. Dai, J., et al., *A humanized anti-osteopontin antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(3): p. 355-66.
244. Megaptsche, A.P., et al., *CD44v10, osteopontin and lymphoma growth retardation by a CD44v10-specific antibody*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(8): p. 709-20.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Bernd Dörken für die großzügige Unterstützung und die klinischen und wissenschaftlichen Entfaltungsmöglichkeiten, ohne die meine wissenschaftlichen Arbeiten so nicht möglich gewesen wären. Besonders möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Mentor und Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. med. Stephan Mathas bedanken, der mich mit seinem Eifer, wissenschaftlichem Enthusiasmus, Ausdauer und Durchhaltevermögen stets begleitet, inspiriert und angespornt hat. Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. med. Martin Janz für seine freundschaftliche Unterstützung in allen Belangen danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Hanno Riess, der mich mit seiner pragmatischen und freundschaftlichen Art inspiriert und mir seine Begeisterung für die Hämostaseologie übertragen hat.

Insbesondere möchte ich Prof. Dr. med. Antonio Pezzutto danken, der mich in seiner einzigartigen Weise klinisch angeleitet und in allen hämatologischen Fragestellungen ausgebildet hat.

Frau PD Dr. med. Agnieszka Korfel möchte ich für die freundschaftliche und erfolgreiche Zusammenarbeit im Bereich der klinischen Lymphomforschung danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen langjährigen Labormitarbeitern Dr. Björn Lamprecht, Franziska Hummel, Dr. Karl Köchert, Simone Lusatis, Brigitte Wollert-Wulf, Ute Nitschke, Dr. Kathrin D. Wurster, Dr. Katrin Ullrich und Dr. Shuang Li sowie allen, die ich an dieser Stelle vergessen habe, aber nicht hätte vergessen dürfen.

Zudem gilt mein besonderer Dank allen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Campus Virchow-Klinikum sowie am Campus Benjamin-Franklin für die jahrelange freundschaftliche Zusammenarbeit. Besonders möchte ich meiner Doktorandin Frau Felicitas Strehlow danken, die mich bei vielen klinischen Forschungsprojekten durch ihr wissenschaftliches Engagement unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Ehefrau Nicolett, meinen Kindern Hanna und Marlene sowie bei meinen Eltern für die immer währende Unterstützung, Beratung und Geduld in all den Jahren bedanken. Ich widme diese Arbeit meinem verstorbenen Vater, der sehr stolz gewesen wäre.

ERKLÄRUNG

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

Hiermit erkläre ich, Dr. med. S. Kreher, dass

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Dr. med. S. Kreher