Universitätsklinikum Ulm

Institut für Pathologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Charakterisierung von potenziell onkogenen SOCS1-Varianten des klassischen Hodgkin-Lymphoms

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Anika Köder

geboren in Ellwangen (Jagst)

2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Brunner

Tag der Promotion: 26.05.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis
1. Einleitung 1
1.1 Das Hodgkin-Lymphom 1
1.1.1 Hodgkin-/ Reed-Sternberg-Zellen und das Tumor-Mikromilieu 2
1.1.2 Therapie und Prognose 4
1.1 Der JAK-STAT-Signalweg 5
1.2.1 Signalkaskade und negative Regulation 5
1.2.2 Konstitutive Aktivierung im Hodgkin-Lymphom 7
1.3 Der NF-κB-Signalweg 8
1.3.1 Kanonischer und alternativer Signalweg 8
1.3.2 NF-κB-Aktivierung im cHL 10
1.4 SOCS1 11
1.4.1 SOCS1 als negativer Regulator des JAK-STAT-Signalwegs 13
1.4.2 Veränderung der STAT6-Aktivität durch SOCS1-Mutanten 14
1.4.3 SOCS1 und der NF-κB-Signalweg 16
1.4.4 SOCS1-Mutationen in B-Zell-Lymphomen 17
1.5 Fragestellung und Zielsetzung 18
2. Material und Methoden 20
2.1 Material 20
2.2 Methoden 31
2.2.1 Zellkultur und Transfektion 31
2.2.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten 34
2.2.3 Mutagenese und Klonierung 34
2.2.4 Dualer Luciferase-Reporter-Assay 43
2.2.5 Western Blot 45
2.2.6 RNA-Sequenzierung mit dem QIAseq UPX 3‘ Transcriptome Kit 47
3. Ergebnisse 49
3.1 Mutagenese und Klonierung der SOCS1-Varianten 49
3.1.1 Übersicht über die SOCS1-Varianten 49
3.1.2 Mutagenese 51
3.1.3 Herstellung weiterer Expressionsvektoren der SOCS1-Varianten durch Umklonierung 55
3.1.4 Überprüfung der Funktionalität des SOCS1-Tet-On-Vektorsystems pCW57 58

3.1.5 Übersicht über die generierten SOCS1-Varianten 59
3.2 Einfluss der SOCS1-Varianten auf die STAT6-Aktivität 61
3.2.1 Die Minor-Mutationen haben keinen signifikanten Einfluss auf die hemmende Wirkung von SOCS1 auf die IL4-induzierte STAT6-Aktivierung.. 61
3.2.2 Änderung der STAT6-Aktivität durch SOCS1-Major-Mutanten 64
3.2.3 Bestätigung des Effekts der $SOCS1_{DEL}$ mithilfe des pCW57-Vektorsystems 65
3.2.4 Möglicher Einfluss des N-terminalen FLAG-/HA-Tags auf die SOCS1-Funktion 67
3.2.5 Die erhöhte STAT6-Aktivität lässt sich nicht durch eine vermehrte Phosphorylierung erklären 69
3.2.6 Einfluss der SOCS1-Varianten auf die STAT6-abhängige Genexpression 73
3.3 Beeinflussung der STAT1-Aktivität durch die SOCS1-Varianten 84
3.3.1 Erhöhung der STAT1-Aktivität durch die SOCS1-Mutanten 84
3.3.2 Die Major-Mutante $SOCS1_{MUT7}$ zeigt einen starken Effekt auf die STAT1-Aktivität 86
3.3.3 Die erhöhte STAT1-Aktivität korreliert nicht mit einer stark veränderten Phosphorylierung 88
3.4 Einfluss der SOCS1-Varianten auf den NF-κB-Signalweg 90
3.4.1 Gesteigerte Aktivität des TNF-α-induzierten NF-κB-Signalwegs..... 90
3.4.2 Der FLAG-Tag beeinflusst die Wirkung der SOCS1-Varianten auf die NF-κB-Aktivität. 93
4. Diskussion 95
4.1 Veränderung des JAK-STAT-Signalwegs durch die SOCS1-Varianten 95
4.1.1 Mögliche Ursachen für die Erhöhung der STAT6-Aktivität durch die SOCS1-Major-Mutanten 96
4.1.2 Beeinflussung des Transkriptoms in HEK-293-Zellen durch SOCS1.... 99
4.1.3 Konzentrations- und zelltypabhängige Effekte von SOCS1 auf STAT1 103
4.2 Deregulation des NF-κB-Signalwegs 105
4.3 Transfektionsmethodik 108
4.4 Einfluss von Tag-Markierungen auf die Proteinfunktion 109
5. Zusammenfassung 112
6. Literaturverzeichnis 114
Anhang 129
Danksagung 137
Lebenslauf 138

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung:	Erläuterung:
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AKT	Gen für die Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B-Zell-aktivierenden Faktor
BCR	B-Zell-Rezeptor
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	Cluster of Differentation
cDNA	complementary DNA
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
CIS	Cytokine-Induced STAT-Inhibitor
CMV	Cytomegalievirus
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COMMD1	Copper Metabolism Domain Containing 1
CT	Computertomographie
CYLD	CYLD lysine 63 deubiquitinase
DEL	Deletion
DHGO	Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases

EV	Empty Vektor (Kontrolle=Leer-Vektor)
FCS	Fetales Kälberserum
FL	Follikuläres Lymphom
FLAG	spezifische Sequenz zur Protein-Markierung (Tag), Aminosäurensequenz DYKDDDDK
FOXO	Forkhead transcription factors group O
FS	Frameshift
fw	forward (vorwärts)
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GH1	Growth Hormon 1
GQM-Motif	Glycin-Glutamin-Methionin-Motif
H_20	Wasser
HA	Human influenza hemagglutinin, genutzt zur Protein-Markierung (Tag)
HCL	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HL	Hodgkin Lymphom
HRP	horseradish peroxidase
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
IAP	Inhibitors of Apoptosis Protein
IFN-γ	Interferon gamma
IF-RT	Involved-field radiation therapy
Ig	Immunglobulin
IKK	IκB Kinase
IL-4	Interleukin 4
IMDM	Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium
JAB	JAK Binding Protein
JAK	Januskinase
JUN, JUNB, JUND	Transkriptionsfaktoren
kB	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LARII	Luciferase Assay Buffer II
LB	Lysogeny Both
LMP	Latent Membran Protein 1
mA	Milliampere
MCL	Mantle Cell Lymphoma
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Mut.	Mutation
N_2	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	NF-κB essenzieller Modulator

NF-κB	Nuklear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NF-κB1	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit, entspricht p50
NF-κB2	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit, entspricht p52
NGS	Next Generation Sequencing
NIK	NF-κB-induzierenden Kinase
NLPHL	Hodgkin-Lymphom mit nodulär-lymphozytärer Dominanz
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
NP40	Nonylphenolethoxylat 40
O_2	Sauerstoff
p	p-Wert (Signifikanzwert)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD1	Programmed cell death protein 1
PDL-1	Programmed cell death protein 1 ligand 1
PET	Positronenemissionstomographie
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PIM	Proviral Insertion by Murine
pJAK	phosphorylierte JAK
pM	pikomolar
PMBCL	Primär mediastinales B-Zell-Lymphom
PP_i	Pyrophosphat
pSTAT	phosphorylierter STAT
PTP1B	Protein-Tyrosinphosphatase 1B
RANK	Rezeptor-Aktivator von NF-κB
RelA	Transkriptionsfaktor RelA, auch bezeichnet als p65
RelB	Transkriptionsfaktor RelB
rev	revers (rüchwärts)
RHR	Rel Homology Region
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, USA
rtTA	reverse tetracycline transactivator
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelekeltrophorese
SH2	Src-Homology2
SHP	Src-Homology domain-containing Phosphotyrosin Phosphatase
SIFT	Sorting Intolerant from Tolerant
SOCS1	Suppressor Of Cytokine Signaling 1
SP1	Specifity Protein 1

SSI-1	STAT-inducible STAT Inhibitor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transkription
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TC-PTP	T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIP	Tec-interacting protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TNT	Tris-NaCl-Triton
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren
TRE	Tetracyclin Response Element
TYK	Tyrosinkinase 2
UMI	Unique Molekular Identifier
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Bezeichnung der SOCS1-Varianten:

$SOCS1_{WT}$	SOCS1-Wildtyp
$SOCS1_{DEL}$	SOCS1-Deletion (Major-Mutante)
$SOCS1_{FS}$	SOCS1-Frameshift (Major-Mutante)
$SOCS1_{MUT7}$	SOCS1-Mutation 7 (Major-Mutante)
$SOCS1_{MUT1}$	SOCS1-Mutation 1 (exemplarisch für alle Minor-Mutanten)
FLAG-$SOCS1_{X*}$	SOCS1-Variante X* mit N-terminalem FLAG-Tag
HA-$SOCS1_{X*}$	SOCS1-Variante X* mit N-terminalem HA-Tag

*X steht hierbei für jede beliebige SOCS1-Variante

1. Einleitung

1.1 Das Hodgkin-Lymphom

Lymphome werden durch die WHO nach ihrem Ursprung in T- und B-Zell-Neoplasien eingeteilt, wobei mehr als 90% von B-Lymphozyten abstammen. Zu dieser Gruppe gehören zum einen die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), zu denen beispielsweise das DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma), das MCL (Mantle Cell Lymphoma), das FL (Follicular Lymphoma) und die chronische lymphatische Leukämie gezählt werden [143]. Das schnell wachsende und aggressive DLBCL ist dabei mit 30-40% der Lymphome beim Erwachsenen die häufigste Form der B-Zell-Lymphome und betrifft vor allem Personen über dem 65. Lebensjahr [144].
Neben den NHL gibt es das Hodgkin-Lymphom (HL), welches in der Literatur erstmals 1832 von dem britischen Pathologen Thomas Hodgkin als eine Erkrankung der Lymphknoten und der Milz beschrieben wurde [56]. Klinisch manifestiert sich das HL typischerweise durch eine schmerzlose Lymphknotenschwellung und eine B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß oder ungewolltem Gewichtsverlust. Die Inzidenz des klassischen Hodgkin-Lymphoms liegt bei 2-3/100.000 Personen im Jahr, dabei sind vor allem jüngere Personen im Alter von 20 bis 35 Jahren betroffen. Es ist das häufigste Lymphom bei Kindern und Jugendlichen in der westlichen Welt. Ein zweiter Häufigkeitsgipfel zeichnet sich um das 55. Lebensjahr ab. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben aller Altersklassen und aller Stadien nach Therapie ist mit 85-90% sehr gut [129]. Bei Jugendlichen im Alter von 15 bis 19 Jahren gehört das HL zu den häufigsten Krebserkrankungen, wobei das 5 Jahres-Gesamtüberleben bei 96,1% liegt [131].

Für das Staging spielt, neben typischer B-Symptomatik, körperlicher Untersuchung und Laborwerten, die Bildgebung mittels CT oder PET-CT eine wichtige Rolle. Die Stadieneinteilung erfolgt modifiziert nach Ann-Arbor, dargestellt in Tab.1.

Tab.1: Modifizierte Ann-Arbor-Klassifikation nach der S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin-Lymphoms bei erwachsenen Patienten, DGHO, 2022 [34]. DGHO: Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie.

Stadium I	Befall einer Lymphknotenregion **oder** ein einziger lokalisierter Befall außerhalb des lymphatischen Systems
Stadium II	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells **oder** lokalisierter Befall außerhalb des lymphatischen Systems und von Lymphknotenregionen auf der gleichen Seite des Zwerchfells
Stadium III	Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen bzw. von Organen außerhalb des lymphatischen Systems auf beiden Seiten des Zwerchfells
Stadium IV	Nicht lokalisierter, diffuser oder disseminierter Befall einer oder mehrerer extra-lymphatischer Organe mit oder ohne Befall von lymphatischem Gewebe
Zusatz A	Kein Vorliegen einer B-Symptomatik
Zusatz B	Vorliegen einer B-Symptomatik (Fieber >38°C u./o. Nachtschweiß u./o. Gewichtsverlust)

Morphologisch wird das HL in zwei Typen unterteilt, dem seltenen (<5%) Hodgkin-Lymphom mit nodulär-lymphozytärer Dominanz (NLPHL) und dem klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL), welches in vier weitere Subtypen differenziert werden kann. Das nodulär-sklerosierende cHL ist dabei mit circa 70% der häufigste Subtyp, gefolgt vom gemischtzelligen Typ. Die lymphomzytenarmen und -reichen Subtypen kommen deutlich seltener vor [129, 143].

1.1.1 Hodgkin-/ Reed-Sternberg-Zellen und das Tumor-Mikromilieu

Pathologisch kann die Diagnose mit dem Nachweis maligner Tumorzellen des cHL, den Hodgkin- bzw. Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen), gesichert werden. Einkernige Zellen werden dabei als Hodgkin-Zellen, mehrkernige als Reed-Sternberg-Zellen bezeichnet. Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Reed-Sternberg-Zellen aus der Fusion zweier Hodgkin-Zellen entstehen, welche eine inkomplette Zytokinese durchgeführt haben, und mittels eines Netzwerks aus Mikrotubuli weiter verbunden bleiben [115]. Die Hodgkin-Zellen haben dabei die

größere proliferative Komponente, die Reed-Sternberg-Zellen tragen nur wenig zur Tumorproliferation bei [61]. Obwohl die Tumorzellen die meisten typischen B-Zell-Merkmale, wie beispielsweise den B-Zell-Rezeptor, verloren haben [127], lässt sich ihr Ursprung durch den Nachweis von IgG-Rearrangements auf B-Zellen des Keimzentrums zurückführen [69, 75]. Es scheint jedoch wenige Ausnahmen zu geben, bei denen die HRS-Zellen von T-Lymphozyten abstammen [100].

Mit einem Zellanteil von ungefähr 1-20% stellen die HRS-Zellen jedoch eine Minderheit im Tumorinfiltrat dar. Der Großteil wird durch ein sehr komplexes Mikromilieu des Lymphoms (Abb. 1) gebildet, welches die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen sichert [32, 47, 98, 108]. Es besteht vor allem aus CD4+-T-Zellen, daneben kommen noch weitere Zellen des Immunsystems, wie Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen, Natürliche Killerzellen, B-Zellen und Plasmazellen, aber auch Fibroblasten und Stromazellen vor [21, 143].

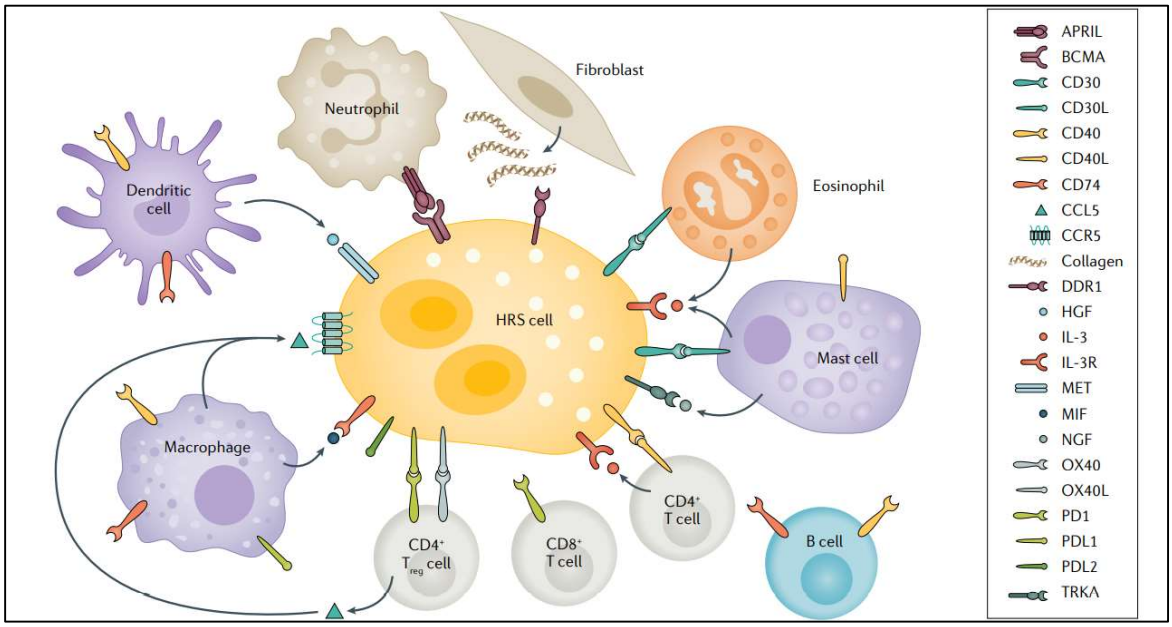


Abb. 1: Interaktion der HRS-Zellen mit dem Mikromilieu (Quelle: Connors JM, 2020 [32]. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature).
Durch Zytokine und Chemokine können HRS-Zellen verschiedenste Immunzellen rekrutieren, welche als umgebendes Mikromilieu ihr Wachstum und Überleben fördern. Einerseits ist über Oberflächenproteine wie CD30, CD40 oder PDL-1 ist eine direkte Interaktion der Tumorzellen mit den Immunzellen möglich, andererseits produziert auch das umliegende Infiltrat Zytokine wie IL-3, welche die HRS-Zellen stimulieren. HRS-Zellen: Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen.

Durch Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine können die HRS-Zellen die unterschiedlichsten Immunzellen rekrutieren und aktivieren, und somit die Zusammensetzung des Mikromilieus aktiv verändern. Zum Beispiel zieht die Produktion und Freisetzung der Chemokine CCL5 und CCL17 die CD4+-T-Zellen

an, zu denen T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen gehören [3, 150]. Lange wurde davon ausgegangen, dass es sich vor allem um T-Helferzellen der Gruppe 2 (TH2-Zellen) handelt. Neuere Untersuchungen mittels Massenspektroskopie haben nun gezeigt, dass vor allem die, an der zellulären Immunantwort beteiligten, T-Helferzellen der Gruppe 1 (TH1-Zellen) dominant sind [21, 98]. Durch Expression von PDL-1 und -2 haben die HRS-Zellen einen Mechanismus der Immunevasion entwickelt, indem sie an PD-1 auf CD4+-T-Zellen binden und deren Aktivierung hemmen können. Außerdem gibt es spezielle PDL-1 positive Makrophagen im Mikromilieu, die diesen Prozess unterstützen [23]. Die regulatorischen T-Zellen schützen das Überleben der HRS-Zellen zusätzlich, indem sie zytotoxische T-Zellen supprimieren [87]. Insgesamt führen viele Interaktionen zwischen den Zellen des Mikromilieus einerseits zur Aktivierung wachstums- und überlebensfördernder Mechanismen, wie beispielsweise dem NF-κB-Signalweg, und andererseits zur Protektion der Tumorzellen gegenüber dem Immunsystem.

1.1.2 Therapie und Prognose

Die Therapie des HL verläuft häufig im Rahmen klinischer Studien, das Prinzip besteht dabei meist aus einer Anthracyclin-basierten Chemotherapie mit Bestrahlung und ist stark abhängig vom Stadium der Erkrankung. In einem frühen Stadium wird die Behandlung mit einer Kombination aus ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin und Dacarbazin)-Chemotherapie und nachfolgender Bestrahlung mittels IF-RT (Involved-field radiation therapy) empfohlen, dabei werden vor allem bei Patienten mit geringem Risiko Heilungsraten von über 90% erreicht [39]. Bei Patienten in einem intermediären oder fortgeschrittenen Stadium entscheidet das Alter über die Art der Chemotherapie, je nach Ansprechen folgt anschließend eine Bestrahlung. Bei Therapieversagen oder refraktärem cHL kommt eine Hochdosis-Chemotherapie in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation zum Einsatz, hierbei liegen die Erfolgschancen bei ungefähr 50% [147]. Auch wenn die Prognose des cHL mit adäquater Therapie sehr gut ist, können durch die aggressiven Behandlungsstrategien vor allem bei jüngeren Patienten Langzeitschäden, wie beispielsweise eine Infertilität, entstehen. Nach kombinierter Radio-Chemotherapie besteht außerdem ein erhöhtes Risiko für Zweit-Neoplasien, dieses ist sogar 40 Jahre nach Therapie mit einer kumulativen Inzidenz von 48,5% noch deutlich erhöht [122].

Neuere Therapieansätze versuchen diese Risiken zu minimieren und fokussieren unter anderem das Mikromilieu des Tumors, bekannt sind hier vor allem Antikörper gegen PD-1 bzw- PDL-1 [7, 8]. Die Pathogenese des cHLs ist jedoch sehr komplex und es wird weiterhin nach neuen Therapieoptionen gesucht. Vor allem zwei anti-apoptotische, proinflammatorische und proliferationsfördernde Signalwege sind in den Tumorzellen des Hodgkin-Lymphoms konstitutiv aktiv und bieten damit sehr vielversprechende Ansatzmöglichkeiten: Der NF-κB-Signalweg und der JAK-STAT-Signalweg.

1.1 Der JAK-STAT-Signalweg

Zellwachstum, -überleben und -proliferation werden stark durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert, hierbei spielt der JAK-STAT-Signalweg (Abb.2) eine wichtige Schlüsselrolle. Mit genetischen Veränderungen in 87% der Fälle [146] hat dieser Signalweg eine große Bedeutung in der Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms und bietet Ansatzpunkte für mögliche therapeutische Interventionen.

1.2.1 Signalkaskade und negative Regulation

Januskinasen (JAKs) sind transmembranäre Proteine, die mit ihrem zugehörigen Zytokinrezeptor auf der Zelloberfläche konstitutiv verbunden sind [33] und ohne die keine Signalweiterleitung stattfinden kann, da Zytokinrezeptoren keine intrinsische Kinaseaktivität besitzen [10]. Insgesamt sind vier unterschiedliche Januskinasen bekannt: JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2 [10, 96, 162].

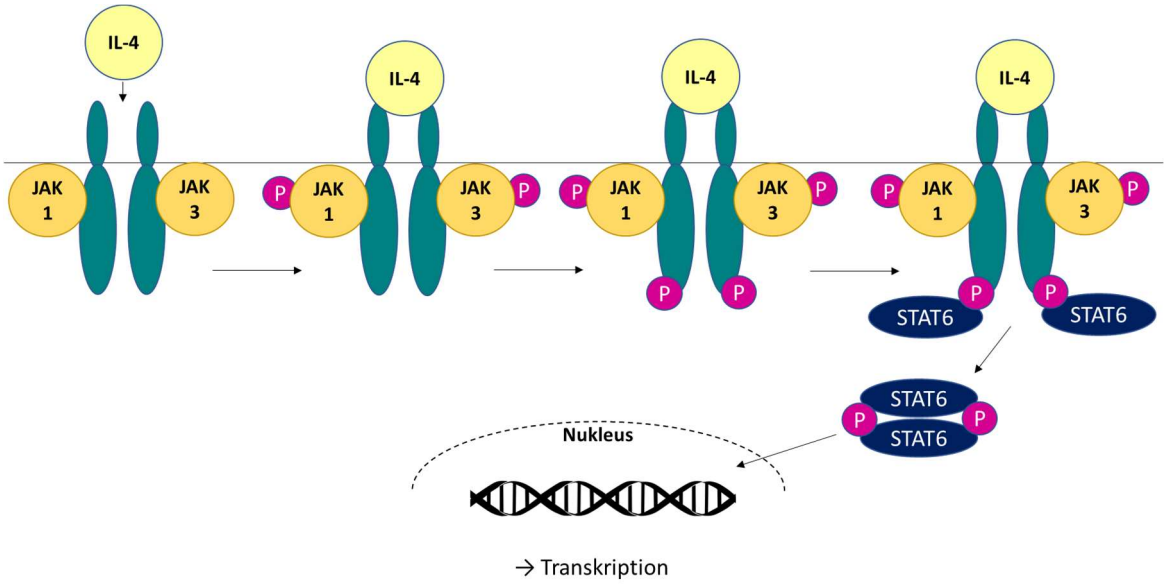


Abb. 2: Schematische Darstellung des JAK-STAT-Signalweges am Beispiel der IL-4-induzierten STAT6-Aktivierung. (Abbildung selbst erstellt, nach [10, 96, 162]).
Nach Bindung des Liganden kommt es via Transphosphorylierung zur Aktivierung der Januskinasen, welche den Rezeptor phosphorylieren und damit eine Bindungsstelle für STAT6 generieren. STAT6 wird dann ebenfalls phosphoryliert, dadurch dimerisiert STAT6 und translociert in den Nukleus, um dort als Transkriptionsfaktor an der DNA die Genexpression zu induzieren. IL-4: Interleukin 4, JAK: Januskinase, P: Phosphat, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

Nach Bindung eines Zytokins oder Wachstumsfaktors kommt es zur Dimerisierung der zugehörigen Rezeptoren [152] und die Transphosphorylierung der Januskinasen an Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife der Januskinasen wird eingeleitet [40, 45]. Die nun aktivierten JAKs phosphorylieren wiederrum den zytosolständigen Teil des Rezeptors und es entstehen Bindungsstellen für die SH2 (Src Homologie Regionen 2) -Domänen der STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) -Gruppe, welche aus sieben Mitgliedern (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) besteht. Durch Phosphorylierung via JAK kommt es zur Dimerisierung und Translokation der STATs in den Nukleus, in welchem die STATs als Transkriptionsfaktoren wirken [10, 96, 162]. Abhängig vom Zytokin werden spezifische Rezeptoren und die dazugehörige JAK-STAT-Kombination genutzt, um die Expression bestimmter Zielgene zu induzieren. Für die vorliegende Arbeit sind vor allem Interferon-γ mit seiner Assoziation zu JAK1/JAK2-STAT1, sowie Interleukin-4 und JAK1/JAK3-STAT6 [96, 162], von Bedeutung.

Zur negativen Regulation des JAK-STAT-Signalweges sind drei verschiedene Proteingruppen bekannt, die in unterschiedliche Schritte der Signalkaskade

eingreifen. Zur Familie der Phosphotyrosin-Phosphatasen gehören SHPs, CD45, PTP1B und TC-PTP. Durch Dephosphorylierung können diese Enzyme Zytokinrezeptoren, JAKs und STATs deaktivieren [58, 101, 133]. Die PIAS (Protein Inhibitor Of Activated STAT) wirken ausschließlich am aktivierten STAT und hemmen dessen Bindung an die DNA [30, 80]. Die dritte große Gruppe ist die der SOCS-Proteine, auf die in dieser Arbeit genauer eingegangen wird.

1.2.2 Konstitutive Aktivierung im Hodgkin-Lymphom

Für die konstitutive Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges im cHL gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Neben der dauerhaften Aktivierung von Zytokin-Rezeptoren durch verstärkte auto- und parakrine Interleukin-Sekretion [70, 123], ist auch die Überexpression von *JAK2* ein wichtiger Mechanismus [63, 64].
Außerdem sind Mutationen im JAK-STAT-Signalweg im cHL sehr häufig: In einer Analyse von Patienten mit cHL wiesen 87% der auswertbaren Fälle eine genetische Veränderung in einem Teil des JAK-STAT-Signalwegs auf [146]. Dabei wurden bereits bekannte Veränderungen in Genen wie *SOCS1* [77, 157], *JAK2* [64, 139] und *PTPN1* [48, 166] bestätigt. *PTPN1* kodiert für das Protein PTP1B und stellt dabei eine Besonderheit dar, weil eine Spleiß-Variante des eigentlich negativen Regulators entdeckt wurde, durch die es nicht nur zu einem Funktionsverlust, sondern zu einer Funktionsumkehr des Proteins kommt und damit zu einer aktiven Verstärkung des JAK-STAT-Weges [165, 166]. Zusätzlich zu den bereits bekannten Genveränderungen zeigten sich in 32% Mutationen in einem weiteren Gen des Signalweges, welche zuvor nicht im cHL gefunden wurden: *STAT6*. Möglicherweise besteht hier eine genetische Interaktion zwischen einer *STAT6*-Mutation und der *SOCS1*-Inaktivierung, da in den *STAT6*-mutierten cHL-Fällen signifikant mehr *SOCS1*-Mutationen nachzuweisen waren [146]. Rekurrente Mutationen in der *STAT6*-DNA-Bindungsdomäne wurden davor schon in einer anderen Gruppe von B-Zell-Lymphomen gefunden, die viele Gemeinsamkeiten mit dem cHL aufweist [121]: dem PMBCL. In Tumorproben (36%) und einer Zelllinie wurden *STAT6*-Mutationen festgestellt, welche mit einer schlechteren DNA-Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors assoziiert waren. Zusätzlich zu *STAT6* wiesen einige der PMBCL-Tumorproben außerdem Mutationen in *SOCS1* (65%) und *JAK2* (47%) auf [116].

In klinischen Studien werden bereits unterschiedliche Therapieansätze, die den konstitutiv aktiven Signalweg adressieren, untersucht. Der JAK1/JAK2-Inhibitor Ruxolitinib zeigt beispielsweise Potential in der Therapie von Hodgkin-Lymphomen und führt je nach Krankheitsstadium in ungefähr 9-54% der Fälle zu einer zumindest partiellen Remission [71, 151].

1.3 Der NF-κB-Signalweg

HRS-Zellen beim klassischen Hodgkin-Lymphom weisen eine konstitutive NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)-Aktivität auf [14, 16, 74], einem Signalweg der neben pro-inflammatorischen und anti-apoptotischen Reaktionen auch eine Zellproliferation bewirkt. Die konstitutive Aktivierung lässt sich auf den heterodimeren p50-RelA-Transkriptionsfaktor zurückführen, dieser verstärkt das Wachstum der cHL-Tumorzellen und verbessert ihr Überleben, während die Inhibition von NF-κB zum Proliferationsarrest und einem erhöhten Ansprechen auf Apoptose-Signale führt [14, 15, 74].

1.3.1 Kanonischer und alternativer Signalweg

Es gibt fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren des NF-κB-Signalweges: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF-κB1 (p50) und NF-κB2 (p52) [149, 156, 164]. Gemeinsam haben sie alle die sogenannte Rel Homology Region (RHR), die ihnen das Zusammenlagern zu Homo- oder Heterodimeren, die Kopplung an das inaktivierende IκB, und die Bindung an die DNA im Zellkern, ermöglicht [53, 57, 103]. Im Ablauf der Signalkaskade werden zwei Wege unterschieden: Der klassische Signalweg wird auch als kanonisch bezeichnet und beinhaltet c-Rel, RelA und p50, während die Transkriptionsfaktoren p52 und RelB dem alternativen, nicht-kanonischen, Signalweg angehören.

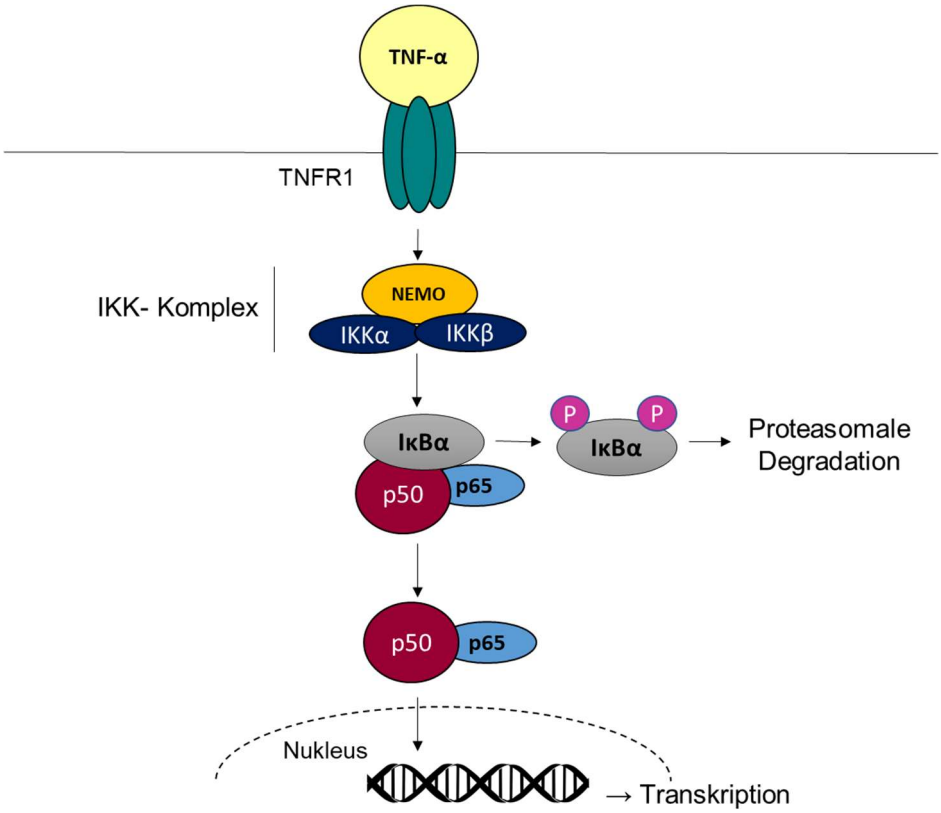


Abb. 3: Schematische Darstellung des kanonischen NF-κB-Signalweges, beispielhaft induziert durch TNF-α. (Abbildung selbst erstellt, nach [53, 94, 149, 156]). Nach Ligandenbindung an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes, welcher den Inhibitor IκB durch Phosphorylierung zur proteasomalen Degradation markiert. Das freigegebene NF-κB-Dimer aus p65 und p50 transloziert in den Nukleus und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. IKK: IκB-Kinase, NEMO: NF-κB essenzieller Modulator, P: Phosphat, TNF-α: Tumornekrosefaktor α, TNFR: Tumornekrosefaktor-Rezeptor.

Der kanonische Signalweg in B-Zellen wird durch Oberflächenrezeptoren aus der Gruppe der TNF-Rezeptoren, wie TNFR1/2, CD30, CD40 und RANK, sowie über TLRs und den BCR ausgelöst [156, 164]. Die Rezeptoren der TNF-Gruppe aktivieren über TNFR-assoziierte Faktoren (TRAFs) die IκB-Kinase (IKK), welche als Komplex aus IKKα, IKKβ und NEMO (NF-κB essenzieller Modulator, entspricht IKKγ) besteht und für die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF-κB zuständig ist. NF-κB kann im klassischen Signalweg als Homodimer oder als Heterodimer aus c-Rel oder p65 und p50 vorliegen und ist im inaktiven Zustand an den inhibitorischen Regulator IκB im Zytoplasma gebunden. Durch Phosphorylierung der IκB-Einheit durch die aktivierte IKK wird diese via Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet und das freigegebene NF-κB kann mit Hilfe seiner nukleären Lokalisationssequenz (NLS) in den Zellkern translozieren, um dort an den Promoter seiner Zielgene zu binden [53, 94, 149, 156]. Je nach Aufbau des NF-κB-Dimers

werden dabei verschiedene DNA-Sequenzen adressiert und es kommt zur Transkription selektierter Gene [59, 120]. Eine negative Regulation des kanonischen NF-κB-Signalweges kann durch das Protein A20 (kodiert durch das Gen *TNFAIP3*) und CYLD erfolgen. CYLD ist ein Tumorsuppressor, welcher mit NEMO und anderen Adaptermolekülen wie TRAF2 interagiert und damit die Aktivierung des IKK-Komplexes verhindert [73]. Die Expression von A20 wird durch NF-κB im Sinne einer negativen Rückkopplung induziert und führt über Ubiquitinierung zur Hemmung verschiedener Faktoren der NF-κB-Signalkaskade [85].

Der alternative NF-κB-Signalweg in B-Zellen wird über den CD40-Rezeptor, den Lymphotoxin-Rezeptor, TNRF2, den B-Zell-aktivierenden Faktor (BAFF) oder TLRs induziert [141, 156, 164] und führt zur Akkumulierung und Stabilisierung der NF-κB-induzierenden Kinase (NIK), welche sonst durch TRAF3 abgebaut wird. Durch Phosphorylierung kann NIK die Kinase-Untereinheit IKKα aktivieren, welche wiederrum p100 innerhalb des p100-RelB-Dimers phosphoryliert. Das Protein p100 wird dabei durch das Proteasom proteolytisch in die p52-Untereinheit prozessiert, das entstandene RelB-p52-Heterodimer kann in den Nukleus transportiert werden und dort an die zugehörige Promotorregion der Gensequenz binden [94, 141, 164].

1.3.2 NF-κB-Aktivierung im cHL

Es gibt verschiedene Ansätze, welche die konstitutive NF-κB-Aktivierung in HRS-Zellen erklären können. Ungefähr ein Drittel aller Hodgkin-Lymphome in der westlichen Welt sind mit dem Epstein Barr Virus (EBV) assoziiert. Dieses Virus kodiert LMP1 (Latent Membran Protein 1), welches neben dem JAK-STAT- auch den NF-κB-Signalweg ohne externen Stimulus induziert, indem es CD40 imitiert und wie der Tumornekrosefaktor mit TRAF interagiert [37, 97, 99]. Aber auch EBV-negative cHL-Tumorzellen können einen konstitutiv aktivierten NF-κB-Signalweg aufweisen. Ursächlich hierfür ist unter anderem eine aberrante Aktivierung von IKK`s oder geschädigte IκBs, wie beispielsweise bei der in cHL-Zelllinie L-428 [74].

Auch genetische Veränderungen der cHL-Tumorzellen im Bezug auf den NF-κB-Signalweg sind beschrieben und betreffen vor allem den klassischen/kanonischen Pfad. Aberrationen im Proto-Onkogen *REL* führen zu einer Überexpression und

Akkumulation des c-Rel-Proteins im Nukleus von HRS-Zellen und aktivieren daher den NF-κB-Signalweg [16, 139]. Die negative Regulation der Signalweiterleitung kann ebenfalls durch Mutationen beeinflusst werden. Circa 10-20% der cHL-Fälle weisen Mutationen im *IκBα*-Gen auf, welche dieses inaktivieren und damit den NF-κB-Signalweg enthemmen [20, 65, 66, 90]. Weitere inaktivierende Mutationen, vor allem bei EBV-positiven cHL-Tumorzellen, wurden auch bei dem für den Signalweg-Inhibitor A20 codierenden Gen *TNFAIP3* gezeigt [125].

Als weitere Veränderungen in Komponenten des Signalweges sind Mutationen in den Genen *TRAF3, MAP3K14 (NIK), IκB, BMP4* und *CD40* bekannt [109, 125, 139].

1.4 SOCS1

SOCS1 steht für Suppressor Of Cytokine Signaling 1 und ist ein Protein mit einer Länge von 211 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 24kDa. Das dazugehörige Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p13) [160] und besteht aus zwei Exons, welche durch ein Intron voneinander getrennt werden [102]. Kodierend ist allerdings nur das erste Exon. SOCS1 lässt sich der SOCS-Familie zuordnen, welche aus acht Mitgliedern besteht: SOCS1-7 und CIS. Erstmals beschrieben wurde SOCS1 im Jahr 1997 von verschiedenen Arbeitsgruppen [38, 102, 107, 138], weshalb noch weitere Bezeichnungen für das neu entdeckte Protein bestehen: JAK Binding Protein (JAB), STAT-inducible STAT Inhibitor (SSI-1) und Tec-interacting protein (TIP-3). Hier wurde SOCS1 außerdem als potentestes Mitglied der SOCS-Familie hervorgehoben.

In Abbildung 4 ist der Aufbau von SOCS1 dargestellt. Alle Mitglieder der SOCS-Familie enthalten eine zentrale SH2-Domäne (Src Homologie Domäne 2) sowie die am C-terminalen Ende lokalisierte SOCS-Box, welche über eine Polyubiquitinierung die proteasomale Degradation von Proteinen initiieren kann [55, 138, 161]. Die SH2-Domäne ist in der Lage, gemeinsam mit der Extended SH2-Domäne (ESS), phosphoryliertes Tyrosin zu binden [105, 161, 163]. Am N-terminalen Ende von SOCS1 befindet sich die SH3-Domäne. Sie besitzt eine Poly-Serin(PS)-Region, die sieben aufeinanderfolgende Serinreste beinhaltet [128]. SOCS1 und SOCS3 besitzen eine zusätzliche, kurze, N-terminale Region mit einer Länge von 12

Aminosäuren. Diese Sequenz trägt den Namen Kinase-Inhibitory-Region (KIR) und kann die Januskinasen 1 und 2 hemmen [79, 161].

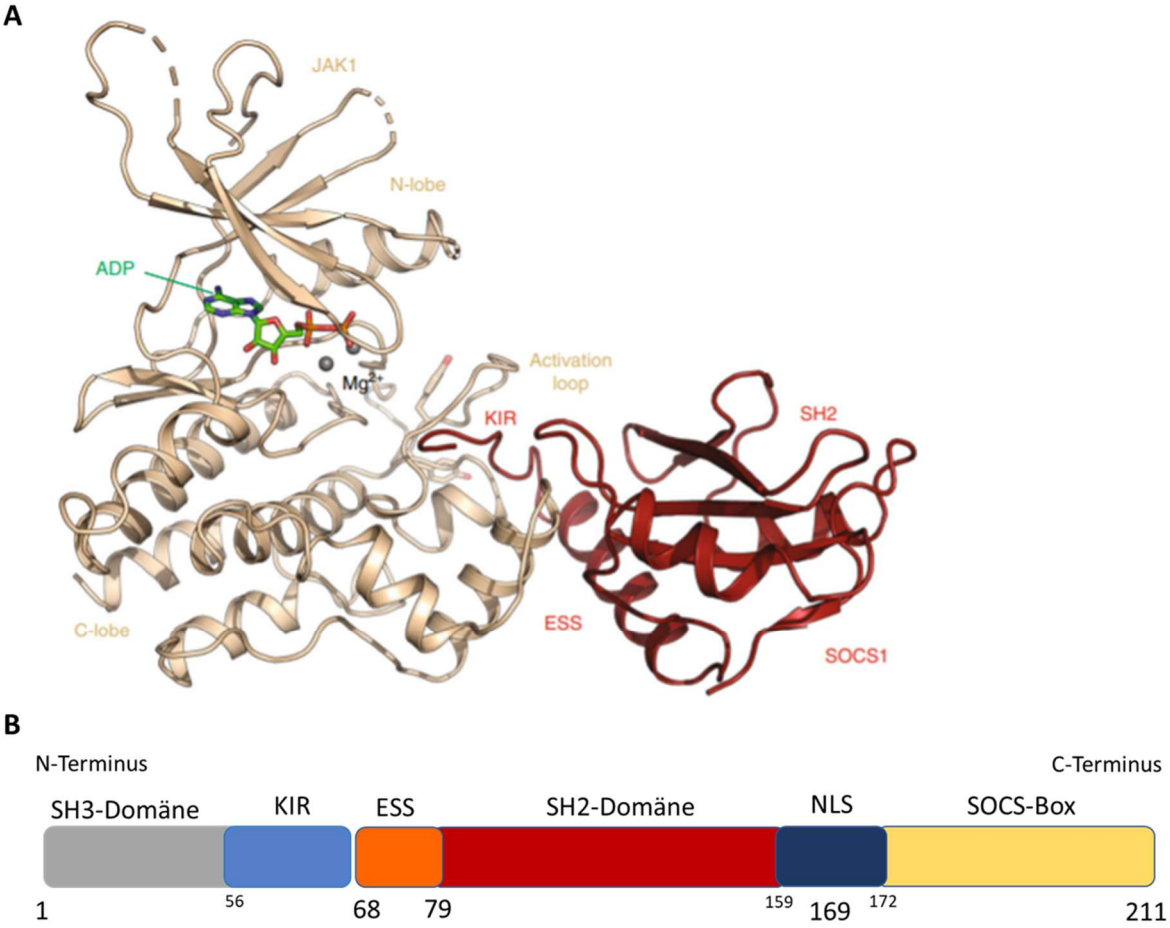


Abb. 4: Aufbau von SOCS1. Modifiziert nach Liau et al. [9]. (Lizenz: Creative Commons Attribution 4.0 International License, http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) **A:** Tertiärstruktur von SOCS1 (rot) in Interaktion mit der Januskinase JAK1 (beige). Die SOCS-Box ist dabei nicht dargestellt. **B**: Schematische Darstellung der SOCS1-Domänen. Die Zahlen geben dabei die Aminosäuren-Länge an. SOCS1 besitzt eine N-terminalen SH3-Domäne, welche außerdem die Kinase Inhibitory Region (KIR) enthält. Zur SH2-Domäne kann ergänzend die Extended SH2 Subdomain (ESS) gezählt werden. Die Nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) verbindet die SH2-Domäne mit der C-terminalen SOCS-Box. ADP: Adenosindiphosphat. Mg^{2+}: Magnesium. SH2-Domäne: Src Homologie Domäne 2, SH3-Domäne: Src Homologie Domäne 3, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Eine weitere Besonderheit von SOCS1 stellt die Nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) dar. SOCS1 besitzt als einziges Mitglied der SOCS-Familie eine NLS, welche den Transport des Proteins in den Nukleus induziert. Die NLS befindet sich zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box, Mutationen in der NLS führen zum Verlust der nukleären Lokalisation von SOCS1 [12].

Durch seinen spezifischen Aufbau besteht die Aufgabe von SOCS1 zum einen in der Inhibition der Signalweiterleitung, und zum anderen in der Steuerung des

proteasomalen Abbaus bestimmter Zielproteine. SOCS1 ist damit ein wichtiger Regulator von Zellwachstum und -proliferation, sowie Apoptose.

1.4.1 SOCS1 als negativer Regulator des JAK-STAT-Signalwegs

Als bekannter Tumorsuppressor im JAK-STAT-Signalweg ist SOCS1 in der Lage, diesen über drei verschiedene Mechanismen zu hemmen (Abb.5).

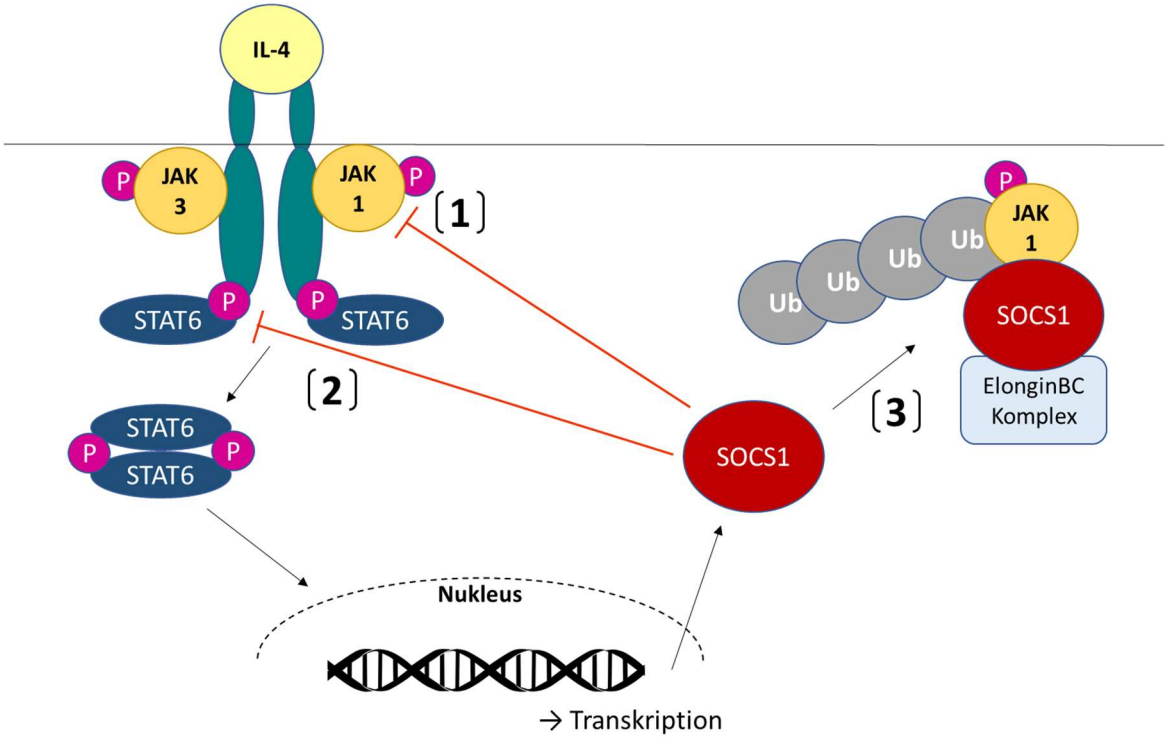


Abb. 5: Mechanismen der negativen JAK-STAT-Regulation durch SOCS1. (Abbildung selbst erstellt, nach [79, 161, 163, 167].)
(1) Die KIR dient als Pseudosubstrat für JAK und bewirkt damit eine direkte Inhibition von JAK1 und JAK2. **(2)** Mit seiner SH2-Domäne kann SOCS1 an Phosphotyrosinreste von Zytokinrezeptoren binden und damit die STAT-Bindungsstelle blockieren. **(3)** Über die SOCS-Box wird der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex rekrutiert, welcher Zielproteine ubiquitiniert und damit zum Abbau im Proteasom freigibt. IL-4: Interleukin 4, JAK: Januskinase, P: Phosphat, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, Ub: Ubiquitin.

Als erste Möglichkeit kann SOCS1 mit seiner SH2-Domäne direkt an die Aktivierungsschleife von JAK binden, wobei der Komplex zusätzlich durch die ESS stabilisiert wird [79, 161, 163]. Das GQM-Motif in der JAK-Aktivierungsschleife ist dabei ein Interaktionspartner mit SOCS1 und hat neben der SH2-Domäne und der ESS auch Kontakt zur KIR, welche eine inhibitorische Wirkung auf die katalytische Aktivität der Januskinasen besitzt. Da nur JAK1, JAK2 und TYK2 das GQM-Motif

besitzen, erfolgt die direkte Inhibition durch SOCS1 nur bei diesen drei Kinasen, nicht aber bei JAK3 [9, 79, 161]. Die KIR dient als Pseudosubstrat für JAK und interagiert über sechs Aminosäuren (His54 bis Arg59) mit der Aktivierungsschleife, dem GQM-Motif und der Glycin-reichen Schleife von JAK1. Hierbei wird durch die erste der sechs Aminosäuren (His54) die Bindungsstelle von JAK besetzt und das Substrat Tyrosin imitiert [79]. Die Relevanz dieser sechs Aminosäuren von KIR für die Interaktion mit JAK wird bei der von Liau et. al. durchgeführten Mutagenese sehr deutlich. Mutationen in dieser Region resultierten in einer signifikanten Abnahme, die Deletion von KIR oder eine Mutation von Phe58 sogar in einem kompletten Verlust der inhibitorischen Funktion von KIR. Zusätzlich unterstreicht die, in einer Sequenzanalyse bei verschiedenen Wirbeltieren nachgewiesene, deutliche Konservierung die Bedeutung der Aminosäuren für den Aufbau von KIR [79].

Zweitens sind alle SOCS-Proteine mit ihrer SH2-Domäne in der Lage, an die Phosphotyrosinreste verschiedener Zytokinrezeptoren zu binden [79, 163]. Über die Blockierung der STAT-Bindungsstelle kommt es somit zur Unterbrechung der Signalweiterleitung im JAK-STAT-Weg.

Der dritte Mechanismus der negativen Regulation besteht in der Rekrutierung des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex durch die C-terminale SOCS-Box. Hierbei binden alle SOCS-Proteine nach Rekrutierung des Elongin-BC-Komplexes an Cullin5, das Gerüstprotein der E3-Ubiquitin-Ligase [11, 167]. Allerdings ist die Affinität von SOCS1 zu Cullin5, im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der SOCS1-Familie, 100-fach geringer [11]. Durch die E3-Ubiquitin-Ligase wird die Ubiquitinierung jener Proteine induziert, welche an der SH2-Domäne gebunden sind [148, 167]. Da die SH2-Domäne phosphoryliertes Tyrosin bindet, werden damit beispielsweise p-JAK und p-STAT ubiquitiniert und anschließend im Proteasom abgebaut. Außerdem scheint die Bindung von Elongin-BC die Degradation von SOCS1 zu hemmen und erreicht damit erhöhte Level des SOCS1-Proteins [68].

1.4.2 Veränderung der STAT6-Aktivität durch SOCS1-Mutanten

Im Hinblick auf den Einfluss verschiedener SOCS1-Varianten auf den JAK-STAT-Signalweg wurde bereits eine erste Versuchsreihe (Abb. 6) durch die Arbeitsgruppe

Marienfeld durchgeführt. Neben dem SOCS1-Wildtyp ($SOCS1_{WT}$) wurden die zwei Major-Mutanten aus der cHL-Zelllinie L-428 – $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{FS}$ – im pFLAG-CMV2-Plasmid verwendet. Untersucht wurde der Einfluss der verschiedenen SOCS1-Varianten auf die relative STAT6-Aktivität mittels eines Luciferase-Reporter-Assays in HEK-293-STAT6-Zellen. Die pFLAG-CMV2-Plasmide mit den SOCS1-Varianten (WT=Wildtyp, DEL=Deletion, FS= Frameshift) wurden jeweils in verschiedenen Konzentrationen in die HEK-293-STAT6-Zellen transfiziert und entweder mit 5ng/ml IL-4 stimuliert oder unstimuliert belassen. Als Transfektions-Kontrolle wurde der Leervektor pFLAG-CMV2 (Empty Vector (EV)) verwendet.

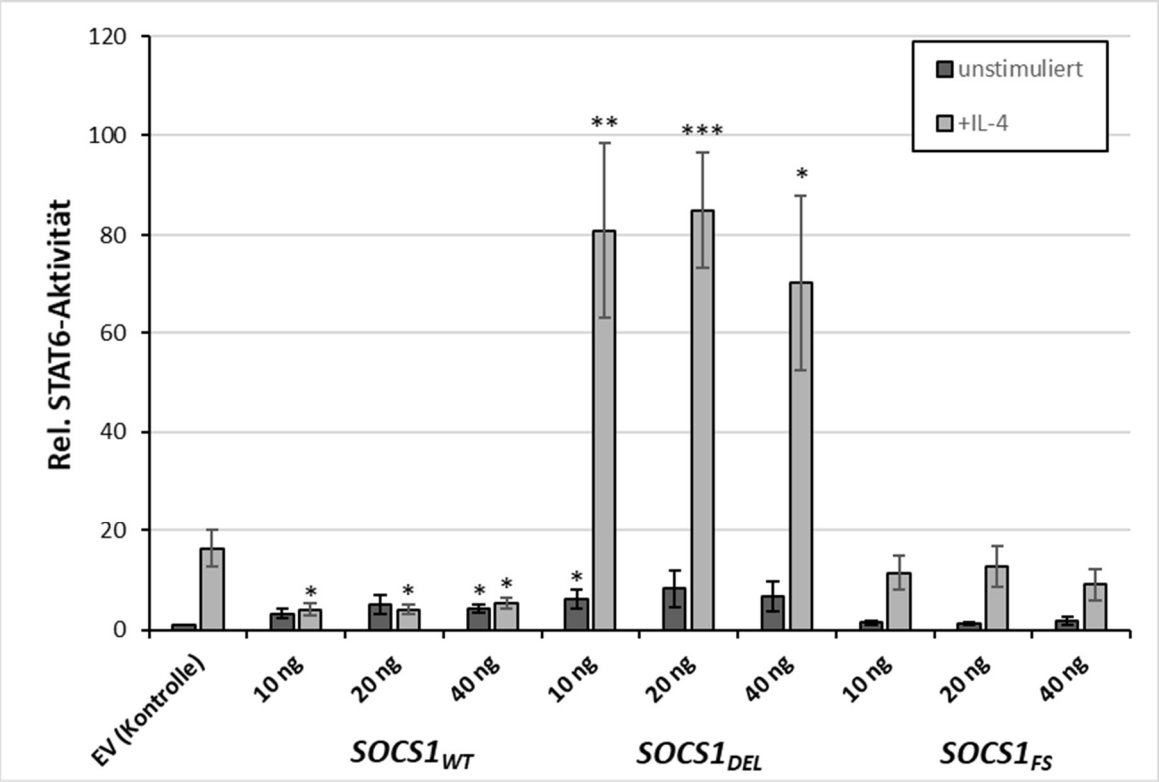


Abb. 6: STAT6-Luciferase-Reporter-Assay (durchgeführt von der AG Marienfeld, Institut für Pathologie der Universitätsklinik Ulm). Es wurden ansteigende Mengen der angegeben pFLAG-SOCS1-Plasmide verwendet. Die Zellen wurden jeweils unstimuliert belassen oder für 18h mit IL-4 (5ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle dienten 40ng des Empty-Vektors (EV, pFLAG-CMV2-Plasmid). Die relative STAT6-Aktivität (Rel. STAT6-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von fünf Versuchen ermittelt (n=5), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). IL-4: Interleukin 4, $SOCS1_{WT}$: FLAG-SOCS1-Wildtyp, $SOCS1_{DEL}$: FLAG-SOCS1-Deletion, $SOCS1_{FS}$: FLAG-SOCS1-Frameshift, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription.

Wie erwartet konnte beim EV im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe ein Anstieg der relativen STAT6-Aktivität nach Stimulation mit IL-4 gezeigt werden. Nach der IL-4-Stimulation kommt es beim FLAG-SOCS1$_{WT}$ bereits in der kleinsten Konzentration von 10ng/ml zu einer signifikanten Abnahme der STAT6-Aktivität im Vergleich zur EV-Kontrolle. Die FLAG-SOCS1$_{DEL}$ wirkt sich hingegen komplett gegenteilig auf die relative STAT6-Aktivität aus, hier kommt es nach der Zytokin-Stimulation zu einem deutlichen und signifikanten Aktivitätsanstieg des Transkriptionsfaktors. Der FLAG-SOCS1$_{FS}$ führt nicht zu einer signifikanten Änderung der STAT6-Aktivität.

Die Signifikanzen wurden jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet. Zudem konnte schon bei den unstimulierten Zellen allein durch die Expression der SOCS1-Varianten eine basale Veränderung der STAT6-Aktivität beobachtet werden. So kommt es beim FLAG-SOCS1$_{WT}$ und auch bei der FLAG-SOCS1$_{DEL}$ zu einem geringen, aber teilweise signifikanten Anstieg der relativen STAT6-Aktivität.

1.4.3 SOCS1 und der NF-κB-Signalweg

Auch wenn SOCS1 erstmals als wichtiger Inhibitor des JAK-STAT-Signalweges bekannt wurde und hier zunächst der Schwerpunkt der Forschung lag, betrifft seine regulatorische Funktion noch weitere Signalwege wie den kanonischen NF-κB-Signalweg. Dort agiert das SOCS1-Protein ebenfalls als negativer Regulator, indem es in den Zellkern transloziert und mit seiner SH2-Domäne an ausschließlich DNA-gebundenes p65 bindet [118, 140]. Stabilisiert wird diese Interaktion durch das COMMD1-Protein [86], während freies p65 nicht durch SOCS1 gebunden werden kann. Andere Mitglieder der SOCS-Familie, wie SOCS3 oder CIS weisen gar keine Interaktion mit p65 auf [140]. Durch Polyubiquitinierung mittels der SOCS-Box markiert SOCS1 die p65-Untereinheit für die proteasomale Degradation und führt damit zur Suppression der NF-κB-induzierten Genexpression [82, 118, 140]. Verschiedene Publikationen geben jedoch Hinweise dafür, dass die regulatorische Funktion von SOCS1 im NF-κB-Signalweg abhängig von diversen Faktoren, wie beispielsweise dem induzierenden Zytokin oder der untersuchten Zelllinie ist [72, 110].

1.4.4 *SOCS1*-Mutationen in B-Zell-Lymphomen

Veränderte Sequenzen des *SOCS1*-Gens lassen sich in Minor- und Major-Mutationen unterteilen [77, 91, 124]. Minor-Mutationen sind Veränderungen einzelner Basen-Paare (Einzelnukleotid-Polymorphismus oder Punktmutationen), welche nicht zu einer Längenänderung des *SOCS1*-Gens führen. Unter den Major-Mutationen sind größere Veränderungen der Gen-Sequenz zu verstehen, wie eine Deletion mehrerer Basenpaare, oder auch die Deletion und gleichzeitige Insertion mehrerer Basenpaare, was entweder zu einer *in-frame*-Deletion (del) oder zu einer *frameshift*-Deletion (fs) führt. Beide verändern die ursprüngliche Aminosäure-Sequenz, wobei es zu einer Sequenzverlängerung aber auch zu einer -verkürzung kommen kann.

Bereits 2005 wurde SOCS1 als wichtiger Tumorsuppressor im PMBCL beschrieben, welcher in der Hälfte der getesteten PMBCL-Fälle mutiert war [92]. Neben einer konstitutiven STAT6-Aktivierung durch eine Loss-of-function-Mutation von *SOCS1* [117] konnte auch eine anhaltenden JAK2-Phosphorylierung nachgewiesen werden [92, 93]. Die daraus resultierende konstitutive STAT5-Phosphorylierung hat die Induktion von Cyclin D1 zur Folge, welches die Progression des Zellzyklus fördert und dessen Überexpression bereits als wichtiger Faktor für die Tumorgenese gilt [92]. Der Funktionsverlust von SOCS1 spielt daher eine wichtige Rolle in der fehlerhaften Regulation des JAK-STAT-Signalweg im PMBCL. Mutationen im *SOCS1*-Gen wurden auch im häufigsten Non-Hodgkin-Lymphom, dem DLBCL, regelhaft detektiert [91, 124]. Besonders häufig sind diese allerdings im klassischen Hodgkin-Lymphom, hier konnten *SOCS1*-Mutationen in bis zu 59% der Fälle nachgewiesen werden [146, 157]. Sie scheinen spezifisch für die HRS-Zellen zu sein und kommen nicht in umliegenden Zellen vor [77, 157]. Der Nachweis einer Phospho-STAT5-Akkumulation im Zellkern unterstreicht die Bedeutung des SOCS1-Funktionsverlustes für die konstitutive Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges auch im cHL [157].

Hinsichtlich der Beeinflussung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens durch *SOCS1*-Mutationen gibt es verschiedene Studien, die eine Abhängigkeit der Prognose von Mutationsart und B-Zell-Lymphom-Typ verdeutlichen [67, 76, 91, 124]. Im klassischen Hodgkin-Lymphom scheinen

SOCS1-Major-Mutationen das Gesamtüberleben der Patienten signifikant zu verkürzen [77].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

SOCS1 ist eines der am häufigsten mutierten Gene im klassischen Hodgkin-Lymphom. Über die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen auf die Tumorgenese ist jedoch kaum etwas bekannt. *SOCS1*-Major-Mutationen reduzieren das Gesamtüberleben der Patienten mit cHL, demnach scheint der Tumorsuppressor eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieses Lymphoms zu spielen. Als negativer Regulator des JAK-STAT-Signalweges, welcher im cHL konstitutiv aktiv ist, hat SOCS1 großen Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung. Es ist bereits eine Spleiß-Variante in *PTPN1*, einem Gen für einen weiteren Inhibitor des JAK-STAT-Signalweges, bekannt, welche eine Funktionsänderung des zugehörigen Proteins und damit eine Hochregulierung der Signalkaskade bewirkt [166]. Erste Hinweise, dass es auch bei *SOCS1* zu einer solchen Veränderung kommen kann, lieferte ein Vorversuch meiner Arbeitsgruppe, welcher jedoch weiter validiert werden sollte.

In dieser Arbeit soll der zentralen Frage nachgegangen werden, welche Funktion *SOCS1*-Mutationen in der Dysregulation des JAK-STAT-Signalweges haben und ob es möglicherweise ebenfalls zu einer Funktionsumkehr des negativen Regulators kommt. Dafür sollen verschiedene SOCS1-Varianten aus Zelllinien und aus Patientenfällen mit cHL generiert, und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT6 untersucht werden. Mit unterschiedlichen Methoden sollen dabei mehrere Interaktionsebenen auf DNA- und Proteinebene betrachtet werden.

Auch der NF-κB-Signalweg ist in HRS-Zellen konstitutiv aktiviert, was sich zum Teil durch Mutationen in verschiedenen beteiligten Proteinen erklären lässt. Da SOCS1 hier in der Regulation der Signalweiterleitung involviert ist, stellt sich die Frage, ob *SOCS1*-Mutationen den NF-κB-Signalweg ebenfalls beeinflussen oder sogar hochregulieren. Eine erste Charakterisierung der Mutanten im Bezug auf den kanonischen NF-κB-Signalweg soll daher in dieser Arbeit erfolgen.

Für die Zukunft kann ein besseres Verständnis der Interaktion von SOCS1 in den pathogen aktiven Signalwegen des Hodgkin-Lymphoms neue Therapieansätze liefern, um so auch die Toxizität der aktuellen Standardtherapie sowie deren Langzeitfolgen zu minimieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zelllinie:	Beschreibung:	Herkunft:
-HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
-HEK-293T-STAT6	HEK-293T mit stabiler STAT6 Expression (CMV-Promoter)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland, STAT6-Expression nachträglich eingebracht
-JM109 Competent cells	*E.coli*	Promega, Madison, USA

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien:	Hersteller:	Firmensitz:
-1 kb Leiter	New England Biolabs	Ipswich, USA
-100 bp Leiter	New England Biolabs	Ipswich, USA
-10x Buffer for T4 DNA Ligase	New England Biolabs	Ipswich, USA
-10X Reaction Buffer with $MgSO_4$	Promega	Madison, USA
-10× Cloned Pfu DNA polymerase reaction buffer	Agilent	Santa Clara, USA
-Agar-Agar	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-Agarose High Resolution	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-Ampicillin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
-Bromphenolblau	Fisher Scientific	Waltham, USA
-BSA	New England Biolabs	Ipswich, USA
-NEBuffer 2.1	New England Biolabs	Ipswich, USA
-CaCl 2M	Fisher Scientific	Waltham, USA
-CutSmart Buffer	New England Biolabs	Ipswich, USA
-DMSO	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

-Doxycycline hydrochloride	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-DTT	Merck	Darmstadt, Deutschland
-EDTA	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
-EGTA	Serva	Heidelberg, Deutschland
-Ethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-Ethidiumbromid	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-FCS	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-Gel Loading Dye Purple 6x	New England Biolabs	Ipswich, USA
-Glycerol	Serva	Heidelberg, Deutschland
-Glycin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-HCL	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
-HEPES	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-HEPES buffered saline (2xHBS)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-IMDM	Lonza	Basel, Schweiz
-IMDM/RPMI 1640 (4:1)	Lonza	Basel, Schweiz
-Isopropanol	VWR Chemicals	Radnor, USA
-KCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
-L-Glutamin	Lonza	Basel, Schweiz
-Magermilchpulver	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-Methanol	VWR Chemicals	Radnor, USA
-NaCl	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-NP40	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-PBS	Lonza	Basel, Schweiz
-PCR grade water	Jena Bioscience	Jena, Deutschland
-PEN-STREP (Penicillin/Streptomycin)	Lonza	Basel, Schweiz
-Phosphatase Inhibitor (PhosSTOP EASYpack)	Roche	Penzberg, Deutschland
-Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford)	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
-Proteinase Inhibitor (complete Mini, EDTA free)	Roche	Penzberg, Deutschland
-Puromycin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-RPMI-1640	Lonza	Basel, Schweiz
-SDS	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-TEMED	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland

-Tris	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-Triton X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-Trypsin EDTA	Lonza	Basel, Schweiz
-Tryptone	Becton Dickinson and Company	Heidelberg, Deutschland
-Tween 20	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
-WesternSure Premium Chemiluminescent Substrate	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
-WesternSure Pre-Stained Chemiluminescent Protein Ladder	LI-COR Biosciences	Lincoln, USA
-Yeast extract	Becton Dickinson and Company	Heidelberg, Deutschland
-β-Mercaptoethanol	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Puffer:	**Zusammensetzung:**	
-Bradford-Lösung	Protein Assay Dye Reagent Concentrate	10ml
	Ampuwa Spüllösung	40ml
-Einfriermedium	Nährmedium	2 Teile
	FCS	2 Teile
	DMSO	1 Teil
-LB Agar (1000ml)	Tryptone (1%)	10g
	Yeast extract (0,5%)	5g
	NaCl (1%)	10g
	Aqua dest.	Ad 1L
	Agar-Agar	15g
-LB Medium (1000ml)	Tryptone (1%)	10g
	Yeast extract (0,5%)	5g
	NaCl (1%)	10g
	Aqua dest.	Ad 1L
-Magermilch 5%	Magermilchpulver	2,5g
	TBS-T	50ml
-Nährmedium Zellkultur	RPMI	100ml
	IMDM	400ml
	Pen/Strep (1%)	6ml
	Glutamine (1%)	6ml
	FCS (10%)	50ml

-Proteinladepuffer (4x)	200mM Tris-HCL pH 6,8	20ml
	8% SDS	8ml
	0,4% Bromphenolblau	0,4g
	40% Glycerol	40ml
	Aqua dest.	Ad 100ml
-Proteinladepuffer-	Proteinladepuffer (4x)	1ml
Gebrauchslösung	1M DTT	50µl
-SDS 10%	SDS	10g
	Aqua dest.	100ml
-SDS-Laufpuffer 10x	Tris	60g
pH 6,8	Glycin	300g
	SDS	20g
	Aqua dest.	Ad 2000ml
-SDS-Laufpuffer 1x	SDS-Laufpuffer 10x	100ml
	Aqua dest.	900ml
-TBS-Puffer 1x	TBS-Puffer 20x	25ml
	Aqua dest.	475ml
-TBS-Puffer 20x	Tris	48,46g
pH 7,6	NaCl	105,2g
	Aqua dest.	Ad 1L
-TBS-T-Puffer 1x	TBS-Puffer 20x	50ml
	Tween 20	500µl
	Aqua dest.	Ad 1L
-TNT $^{++}$	TNT-Puffer Stock	20ml
	DTT 1M	20µl
	Phosphatase Inhibitor	1 Tablette
	Protease Inhibitor	1 Tablette
-TNT-Puffer Stock	Tris HCL pH 7,5 1M	2,5ml
	NaCl 3M	2,5ml
	1% Triton x100	0,5ml
	EDTA (0,5M)	0,5ml
	Aqua dest.	44ml
-Transferpuffer 10x	Tris	58g
	Glycin	29g
	SDS 20%	18,5ml
	Aqua dest.	Ad 1L
-Transferpuffer 1x	Transferpuffer 10x	100ml
	Methanol	100ml
	Aqua dest.	800ml

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material:	Hersteller:	Firmensitz:
-12, 24 ,96 Wells Platten	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-CryoPure Gefäß 1,8ml	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-Einmalskalpell	Braun Biontech	Melsungen, Deutschland
-Einmalspritze Luer-Lok Tip	Beckton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
-Filterpapier Whatman	GE Healthcare	Buckinghamshire, Großbritannien
-Glaspasteurpipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
-Glaswaren	Schott	Mainz, Deutschland
-Handschuhe	Sempermed	Wien, Österreich
-Handschuhe Peha-soft nitril	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
-Labortücher	Kimberly-Clark Professional	Koblenz, Deutschland
-Nitrozellulose Membran	GE Healthcare	Buckinghamshire, Großbritannien
-Nuclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Petrischalen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Pipettenspitzen	Nerbe plus	Winsen/ Luhe, Deutschland
-Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional	Koblenz, Deutschland
-Reagiergefäß SafeSeal	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-Rundfilter	Schleicher & Schuell	Dassel, Deutschland
-Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-Sterile Röhren 13ml	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-Steriler Filter (Syringe Filter)	Corning Incorporated	New York, USA
-Trichter 65mm	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Zellkulturflaschen (TC-Flaschen)	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-Zentrifugenröhrchen 15ml	Sarstedt	Nürnbrecht, Deutschland
-Zentrifugenröhrchen 50ml	Nerbe plus	Winsen/ Luhe, Deutschland

2.1.5 Enzyme

Enzym:	Hersteller:	Firmensitz:
-AgeI-HF	New England Biolabs	Ipswich, USA
-BamHI	New England Biolabs	Ipswich, USA
-DpnI	New England Biolabs	Ipswich, USA
-EcoRI-HF	New England Biolabs	Ipswich, USA
-HindIII	New England Biolabs	Ipswich, USA
-Pfu DNA-Polymerase	Promega	Madison, USA
-Pfu Turbo Polymerase	Agilent	Santa Clara, USA
-SAP	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-T4 DNA-Ligase	New England Biolabs	Ipswich, USA

2.1.6 Antikörper

Alle Antikörper für den Western Blot wurden, entsprechend der Angabe in der unten aufgeführten Tabelle, in TBS-T verdünnt.

Antikörper:	Nummer:	Spezies:	Verdünnung:	Hersteller, Firmensitz:
-alpha/beta-Tubulin	2148S	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
-anti-FLAG	F7425	rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
-anti-HA High Affinity	3F10	rat	1:1000	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
-anti-mouse igG	31430	goat	1:10000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
-anti-rabbit IgG	A0545	goat	1:10000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
-anti-rat IgG (HRP)	7077S	goat	1:2500	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
-anti-SOCS1	424C	mouse	1:1000	Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Ulm (beschrieben in [155])
-anti-β-Aktin	A2228	mouse	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
-GAPDH (14C10)	2118S	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA

-pSTAT1 (Tyr701)	9167S	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
-p-Stat6 (Y641)	9361L	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
-Stat1	9172S	rabbit	1:1000	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
-Stat6 (S-20)	sc-621	rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

2.1.7 Zytokine

Zytokin:	**Nummer:**	**Konzentration:**	**Hersteller, Firmensitz:**
-IL-4	11340043	5ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
-IFN-γ	11343536	40ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
-TNF-α	11343013	10ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland

2.1.8 Primer

Alle Primer wurden selbst designend und über die Biomers.net GmbH (https://www.biomers.net/) generiert. Die veränderte Base der jeweiligen SOCS1-Minor-Mutation ist rot markiert.

Primer	**Sequenz 5´- 3´ Richtung**
-SOCS1_Mut1_fw	CCG TGC CCC GCG GTC CCG ACC CCG GCC CCC GGC GAC ACG
-SOCS1_Mut1_rev	CGT GTC GCC GGG GGC CGG GGT CGG GAC CGC GGG GCA CGG
-SOCS1_Mut2_fw	TAC TGG GGG CCC CTG AGC TTG CAC GGG GCG CAC GAG CGG
-SOCS1_Mut2_rev	CCG CTC GTG CGC CCC GTG CAA GCT CAG GGG CCC CCA GTA
-SOCS1_Mut3_fw	AAC TGC TTT TTC GCC CTT AAC GTG AAG ATG GCC TCG GGA

-SOCS1_Mut3_rev	TCC CGA GGC CAT CTT CAC GTT AAG GGC GAA AAA GCA GTT
-SOCS1_Mut4_fw	TGC TTT TTC GCC CTT AGC GCG AAG ATG GCC TCG GGA CCC
-SOCS1_Mut4_rev	GGG TCC CGA GGC CAT CTT CGC GCT AAG GGC GAA AAA GCA
-SOCS1_Mut5_fw	AGC TTC GAC TGC CTC TTC AAG CTG CTG GAG CAC TAC GTG
-SOCS1_Mut5_rev	CAC GTA GTG CTC CAG CAG CTT GAA GAG GCA GTC GAA GCT
-SOCS1_Mut6_fw	CTG TGC CGC CAG CGC ATC ATG GCC ACC GTG GGC CGC GAG
-SOCS1_Mut6_rev	CTC GCG GCC CAC GGT GGC CAT GAT GCG CTG GCG GCA CAG
-SOCS1_Mut7_fw	GAG AGC TTC GAC TGC TTC GAG CTG CTG GAG
-SOCS1_Mut7_rev	CTC CAG CAG CTC GAA GCA GTC GAA GCT CTC
-pCW57_SOCS1_HA_fw (EcoRI)	GATC GAA TTC A GCC ACC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GGA TCA ATG GTA GCA CAC AAC
-pCW57_SOCS1_rev (AgeI)	GATC ACCGGT TCA AAT CTG GAA GGG GAA GGA
-pFLAG_SOCS1_fw (EcoRI)	GAT CGA ATT CAA TGG TAG CAC ACA ACC AGG T
-pFLAG_SOCS1_rev (BamHI)	GAT CGG ATC CTC AAA TCT GGA AGG GGA AGG
-Seq_CMV_fw (für pcDNA3.1 und pFLAG)	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
-Seq_pCW57_fw	CGT ATG TCG AGG TAG GCG TG

2.1.9 Plasmide

Plasmid:	**Beschreibung:**
-pFLAG-CMV	Expressionsvektor, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-Mut.1	Expressionsvektor, SOCS1$_{Mut.1}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-Mut.2	Expressionsvektor, SOCS1$_{Mut.2}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-Mut.3	Expressionsvektor, SOCS1$_{Mut.3}$, N-terminaler FLAG-Tag

-pFLAG-Mut.4	Expressionsvektor, $SOCS1_{Mut.4}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-Mut.5	Expressionsvektor, $SOCS1_{Mut.5}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-Mut.6	Expressionsvektor, $SOCS1_{Mut.6}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-Mut.7	Expressionsvektor, $SOCS1_{Mut.7}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-SOCS1-WT	Expressionsvektor, $SOCS1_{WT}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-SOCS1-DEL	Expressionsvektor, $SOCS1_{DEL}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pFLAG-SOCS1-FS	Expressionsvektor, $SOCS1_{FS}$, N-terminaler FLAG-Tag
-pCW57-GFP-2A-MCS	Doxycyclin-induzierbar, Turbo-GFP, Puromycin-resistent
-pCW57-HA-SOCS1-WT	Doxycyclin-induzierbar, $SOCS1_{WT}$, Puromycin-resistent
-pCW57-HA-SOCS1-DEL	Doxycyclin-induzierbar, $SOCS1_{DEL}$, Puromycin-resistent
-pcDNA3.1	Expressionsvektor
-pcDNA3.1-SOCS1-WT	Expressionsvektor, $SOCS1_{WT}$
-pcDNA3.1-SOCS1-DEL	Expressionsvektor, $SOCS1_{DEL}$
-pcDNA3.1-SOCS1-FS	Expressionsvektor, $SOCS1_{FS}$
-pcDNA3-GFP	Expressionsvektor, C-terminaler GFP-Tag
-pcDNA3-GFP-SOCS1-WT	Expressionsvektor, $SOCS1_{WT}$, C-terminaler GFP-Tag
-pcDNA3-GFP-SOCS1-DEL	Expressionsvektor, $SOCS1_{DEL}$, C-terminaler GFP-Tag
-pcDNA3-GFP-SOCS1-FS	Expressionsvektor, $SOCS1_{FS}$, C-terminaler GFP-Tag
-pGL3.20-3xκB	*Firefly*-Luciferase-Reporter-Plasmid, 3x κB Promoter
-pGL3.20-STAT1	*Firefly*-Luciferase-Reporter-Plasmid, STAT1 Promoter
-pGL3.20-STAT6	*Firefly*-Luciferase-Reporter-Plasmid, STAT6 Promoter
-pRL-Actin	*Renilla*-Luciferase-Reporter-Plasmid, Aktin Promoter

2.1.10 Kits und Systeme

Kit/System:	Hersteller:	Firmensitz:
-Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega	Madison, USA
-High Sensitivity DNA Reagents (Bioanalyzer 2100 System)	Agilent	Santa Clara, USA
-QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen	Venlo, Niederlande
-QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen	Venlo, Niederlande
-QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen	Venlo, Niederlande
-QIAseq UPX 3` Transcriptome (96)	Qiagen	Venlo, Niederlande
-Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-RNAse-Free DNase Set	Qiagen	Venlo, Niederlande
-RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen	Venlo, Niederlande

2.1.11 Geräte

Geräte:	Hersteller:	Firmensitz:
-Alpha Imager EP	Alpha Innotech	San Leandro, USA
-Bioanalyzer 2100	Agilent	Santa Clara, USA
-Bunsenbrenner	Campingaz	Hattersheim, Deutschland
-C-DiGit Blot Scanner	LI-COR	Lincoln, USA
-CO2 Brutschrank	Revco Technologies	Asheville, USA
-Eismaschine	Scotsman	Vernon Hills, USA
-Elektrische Pipettierhilfe	Brand	Wertheim, Deutschland
-Elektrophoresis Power Supply	Consort	Turnhout, Belgien
-Epoch Mikroplatten Spektralphotometer	BioTek	Winooski, USA
-FB 12 Luminometer	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
-Gefrierschrank -80°C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
-Gefrierschrank-20°C	Liebherr	Bulle, Schweiz
-Gelelektrophoresekamm	VWR	Darmstadt, Deutschland
-Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Gelelektrophoreseschlitten	VWR	Darmstadt, Deutschland
-Kryo-Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Kühlschrank +4°C	Liebherr	Biberach an der Riß, Deutschland

-Laminar-Flow Werkbank Sterilgard	The Baker Company	Sanford, USA
-Magnetrührer	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
-Micro-Zentrifuge	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
-Mikroskop	Leica	Wetzlar, Deutschland
-Mikrowelle	Samsung	Seoul, Südkorea
-Mini Spin Zentrifuge	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
-MiSeq	Illumina	San Diego, USA
-Orbitalinkubator	Stuart, Cole-Parmer	Wertheim, Deutschland
-PCR-Labcycler	Sensoquest	Göttingen, Deutschland
-Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
-Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Semidry Blotter	H. Hölzel	Wörth / Hörlkofen, Deutschland
-Stickstofftank	Consarctic/Cryoson	Schöllkrippen/Westerngrund, Deutschland
-Thermomixer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
-UV-Lampe	Bios Corporation	Sapulpa, USA
-Vortex-Schüttler	VWR	Radnor, USA
-Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
-Wärmeschrank	Memmert	Schwabach, Deutschland
-Western Blot Gel Kammer	C.B.S. Scientific Co.	San Diego, USA
Wippschüttler (Mini-Rocker)	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
-Zentrifuge 5417C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
-Zentrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
-Zentrifuge Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
-Zentrifuge Rotofix 32A	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
-Zentrifuge Sigma 1-14K	Sigma	Osterode am Harz, Deutschland

2.1.12 Software

Software:	**Hersteller:**	**Firmensitz:**
-Alpha Imager EP Version 6.0	Alpha Innotech	San Leandro, USA
-Bioanalyzer 2100 Expert Software	Agilent	Santa Clara, USA
-Gen5 Microplate Reader and Imager Software	BioTek	Winooski, USA
-Image Studio Digits Version 5.2	LI-COR	Lincoln, USA

-Office 365	Microsoft	Redmond, USA
-SnapGene Software	GSL Biotech	San Diego, USA
-Qlucore Omics Explorer	Qlucore	Lund, Schweden

2.1.13 Online-Software und -Anbieter

Online-Software:	**URL Adresse (überprüft am 24.02.2022):**
-Biomers.net	https://www.biomers.net/
-Enrichr	https://maayanlab.cloud/Enrichr/
-Expasy Translate Tool	https://web.expasy.org/translate/
-GraphPad QuickCalcs	https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SEM
-LGC Genomics	https://shop.lgcgenomics.com/
-NCBI Nukleotide Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
-PolypPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
-QIAGEN GeneGlobe	https://geneglobe.qiagen.com/us/
-SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
-String Database	https://string-db.org/

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Transfektion

Die Arbeit in der Zellkultur wurde stets unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt. Die Zusammensetzungen des Nährmediums sowie des Einfriermediums sind im Materialteil zu finden (Kapitel 2.1.3). Alle Zelllinien wurden bei 37°C unter feuchter Umgebung und einem CO_2-Gehalt von 5% kultiviert.

2.2.1.2 Zellen auftauen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und kurz in der Hand aufgetaut. Anschließend wurde ein Tropfen Nährmedium zugegeben, der Inhalt des Kryogefäßes in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und schrittweise auf 6-8ml mit Medium aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 1000rpm über 5min wurde der Überstand abgenommen, das Sediment in 5ml Nährmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C kultiviert. Generell wurden aufgetaute Zellen nach vier Wochen in Kultur verworfen.

2.2.1.3 Zellen abtrypsinieren und splitten

Die verwendeten HEK-293-Zellen sind adhärente Nieren-Zellen und wurden, je nach Zelldichte, alle zwei bis drei Tage gesplittet. Hierbei wurde das Medium entfernt und nach einem Waschschritt mit PBS wurde 0,5-1ml Trypsin zugegeben und 2min bei 37°C inkubiert. Durch Klopfen auf den Flaschenboden werden die adhärenten Zellen abgelöst. Es wurden 2ml Nährmedium zugegeben, um die Trypsin-Reaktion abzustoppen. Davon wurde wiederrum etwas mehr als die Hälfte abgesaugt und im Anschluss 5ml frisches Medium zugegeben.

2.2.1.4 Zellen einfrieren

Von jeder Zelllinie wurden in der ersten Woche nach dem Auftauen wieder zwei Kryogefäße eingefroren. Die adhärenten Zellen wurden durch Trypsinierung abgelöst und anschließend mit Nährmedium in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000rpm über 5min wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment in 1ml Medium resuspendiert.

Zur Herstellung von 2 ml Einfriermedium wurden 800µl Medium (vier Teile), 800µl FCS (vier Teile) und 400µl DMSO (zwei Teile) verwendet. Nach Zugabe des DMSO wurde das Medium mithilfe eines 2µm Filters steril filtriert und anschließend auf Eis gestellt. Zu 1ml Zellsuspension wurde je 1ml Einfriermedium gegeben und durch Pipettieren gemischt. Davon wurde je 1ml in ein Kryogefäß überführt. Die Gefäße wurden in einen Einfrierblock mit Isopropanol gestellt, über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.5 Transfektion mit der Calcium-Phosphat-Methode

Die HEK-293-STAT6-Zellen bzw. die HEK-293T-Zellen wurden an Tag 1 auf 12-Well-Platten für den Western Blot und die RNA-Sequenzierung mit 30% Konfluenz ausgesät. Für das Luciferase-Reporter-Assay wurden 24-Well-Platten verwendet. Nach der Abtrypsinierung wurden die Zellen mit 7ml frischem Medium versetzt und 5ml der Zellsuspension anschließend mit 20ml Medium gemischt. Bei der 12-Well-Platte wurde nun 1ml der Suspension in ein Well pipettiert, bei der 24-Well-Platte 0,5ml pro Well.

An Tag 2 erfolgte die Transfektion. Für 1ml zu transfizierenden Zellen wurde 100 µl Transfektionsansatz hergestellt. Zur gewünschten Menge an Plasmid (diese war

unterschiedlich und wird daher stets im Ergebnisteil angegeben) wurde 45µl reines Wasser und 5µl 2M $CaCl_2$ zugegeben und durch Pipettieren sowie Schnippen gegen das verschlossene Reagenzgefäß gut vermischt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurden der Reaktionsansatz mit 50µl 2x HBS gut vermischt. Weitere 10min später wurde der Transfektionsansatzes tröpfchenweise in ein Well pipettiert und die Zellkulturplatte im Anschluss vorsichtig geschwenkt. Um später eine Zytokin-stimulierte Probe und eine unstimulierte Vergleichsprobe zu erhalten, wurden jeweils zwei Wells mit dem gleichen Transfektionsansatz transfiziert. Für das Luciferase-Reporter-Assay wurde pro Well (0,5ml) jeweils 50µl Transfektionsansatz verwendet und zusätzlich zum Expressionsplasmid wurden 25ng Aktin-*Renilla*-Luciferase-Reporter und 100ng *Firefly*-Luciferase-Reporter (STAT1, STAT6 oder 3xκB) beigefügt. Es wurden immer sechs Wells mit dem gleichen Transfektionsansatz transfiziert.
An Tag 3 wurde das Medium, circa 18-22h nach Transfektion, gewechselt.

Die Transfektion des pCW57-Vektors stellt eine Ausnahme im Ablauf dar. Hier wurde bereits an Tag 2, nach 6-8h Inkubation, das Medium abgesaugt. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde anschließend 0,5ml Medium mit 0,5µg/ml Puromycin verwendet. Das Puromycin dient der Selektion der Zellen, welche den transfizierten Vektor und damit auch sein Puromycin-Resistenzgen enthalten. Alle Zellen ohne den pCW57-Vektor sterben ab. An Tag 3 erfolgte hier die Stimulation mit 100ng/ml Doxycyclin über 24h. Da pCW57 ein Doxycyclin-induzierbarer Vektor ist, wird nun die Expression des Turbo-GFP (Leer-Vektor) bzw. der dort eingebauten SOCS1-Variante aktiviert. Das Turbo-GFP im Leer-Vektor kann im Verlauf unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

2.2.1.6 Zytokinstimulation

Zur Vorbereitung der Proteinanalytik mittels Western Blot erfolgte die Stimulation mit dem jeweiligen Zytokin zu unterschiedlichen Zeiten, wie im Ergebnisteil dargestellt. Als Kontrolle wurde auch immer ein Ansatz ohne Stimulation verwendet. Bei den Luciferase-Reporter-Assays wurden drei der sechs Wells stimuliert, die anderen dienten als Kontrolle. Bei IL-4 und IFN-γ wurde jeweils 18h stimuliert, bei NF-κB 4h.
Die Zytokin-Konzentrationen sind dem Materialteil zu entnehmen (Kapitel 2.1.7).

2.2.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Nach Ablauf der gewünschten Zytokin-Stimulationszeit wurde das Medium der Well-Platten entfernt, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, pro Well wurden 100µl TNT^{++} zugegeben und über mindestens 30min auf Eis inkubiert. Die führte zur Zelllyse und somit zur Freisetzung fast aller zellulären Proteine (TNT^{++} Suspension). Die TNT^{++} Suspension wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 15min bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben werden und bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Mutagenese und Klonierung

2.2.3.1 Herkunft der SOCS1-Mutationen

Die in dieser Arbeit untersuchten *SOCS1*-Mutationen stammen zum einen aus HRS-Zellen von cHL-Patienten und zum anderen aus der cHL-Zelllinie L-428 und wurden bereits von einer Arbeitsgruppe des Instituts für Pathologie Ulm publiziert [157].

2.2.3.2 Prediciton-Scores

Für die Einschätzung möglicher Auswirkungen der Mutationen auf das SOCS1-Protein wurden der SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)- und der Polyphen-Prediction-Score verwendet. Der Polyphen-Prediction-Score vergleicht den Einfluss einer Aminosäuren-Substitution hinsichtlich einer Struktur- oder Funktionsänderung und nutzt dafür verschiedene prädiktive sequenz- und strukturbasierte Methoden [2]. Der SIFT-Score überprüft ebenfalls den Einfluss von kodierenden Aminosäuren-Veränderungen auf die Proteinfunktion. Er basiert auf der Annahme, dass Mutationen in evolutionär konservierten Genregionen die Proteinfunktion mehr beeinflussen, als Mutationen in nicht-konservierten Regionen [132].

2.2.3.3 Mutagenese-PCR

Die gezielte Mutagenese ist eine Methode, mit der eine bestimmte, erwünschte Veränderung der DNA mittels PCR erzeugt und in ein Plasmid eingebaut werden kann.

SOCS1-Minor-Mutanten

Da sich die Minor-Mutanten genetisch nur durch eine Punktmutation vom SOCS1-Wildtyp unterscheiden, können diese durch eine einzige PCR generiert werden (Abb.7). Die Primer enthalten hierbei die gewünschte Punktmutation (siehe Material, Kapitel 2.1.8). Durch die PCR wird das komplette Konstrukt, inklusive dem pFLAG-Template-Vektor, abgelesen und vervielfältigt.

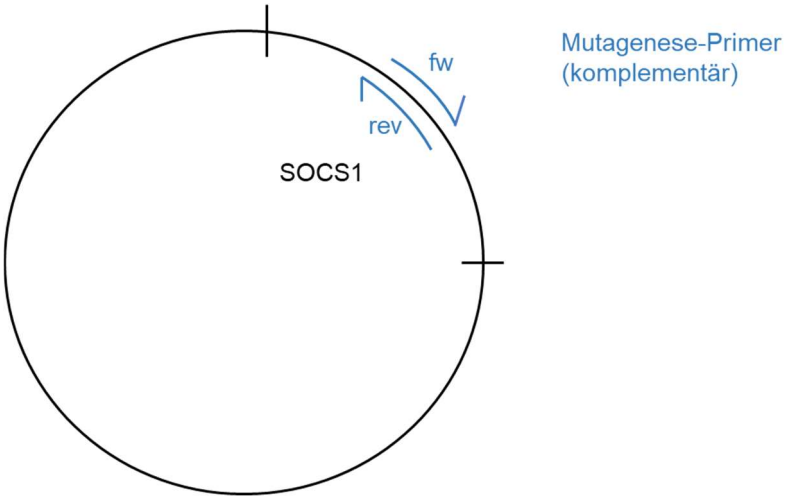


Abb. 7: Prinzip Mutagenese Minor-Mutanten. Die Mutagenese-Primer (fw: forward, rev: revers) enthalten die Punktmutation und sind komplementär zueinander. SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

PCR:

Der PCR-Ansatz sowie das -Protokoll der Mutagenese der SOCS1-Minor-Mutanten sind Tabelle 2 und 3 zu entnehmen. Als DNA-Template wurde das pFLAG-SOCS1-WT-Plasmid verwendet.

Tab. 2: PCR-Ansatz Minor-Mutanten.
PCR: Polymerase-Kettenreaktion, fw: forward, rev: revers, dNTP´s: Desoxynukleosidtriphosphat, DMSO: Dimethylsulfoxid.

PCR	Volumen
10× Cloned Pfu DNA Polymerase reaction buffer	5µl
10mM dNTP´s	1µl
DMSO	2,5µl
PCR grade water	36,5µl
Primermix fw/rev	2µl
Pfu Turbo Polymerase	1µl
DNA-Template (50ng/µl)	2µl
	50µl

Tab. 3: PCR-Protokoll Minor-Mutanten.

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	1min	
95°C	50s	25x
60°C	50s	
72°C	5:30min	
72°C	10min	
8°C	∞	

Im Anschluss an die PCR erfolgte ein Verdau durch Zugabe von 1µl des Enzyms Dpn1 bei 37°C für 1h, um das methylierte DNA-Template zu spalten. Durch 15min bei 65°C konnte das Enzym danach deaktiviert werden.

SOCS1-Major-Mutanten

Die Konstruktion der SOCS1-Major-Mutanten erfolgte nach dem Prinzip der Overlap-Extension-PCR, welche aus zwei verschiedenen PCR besteht (Abb. 8).

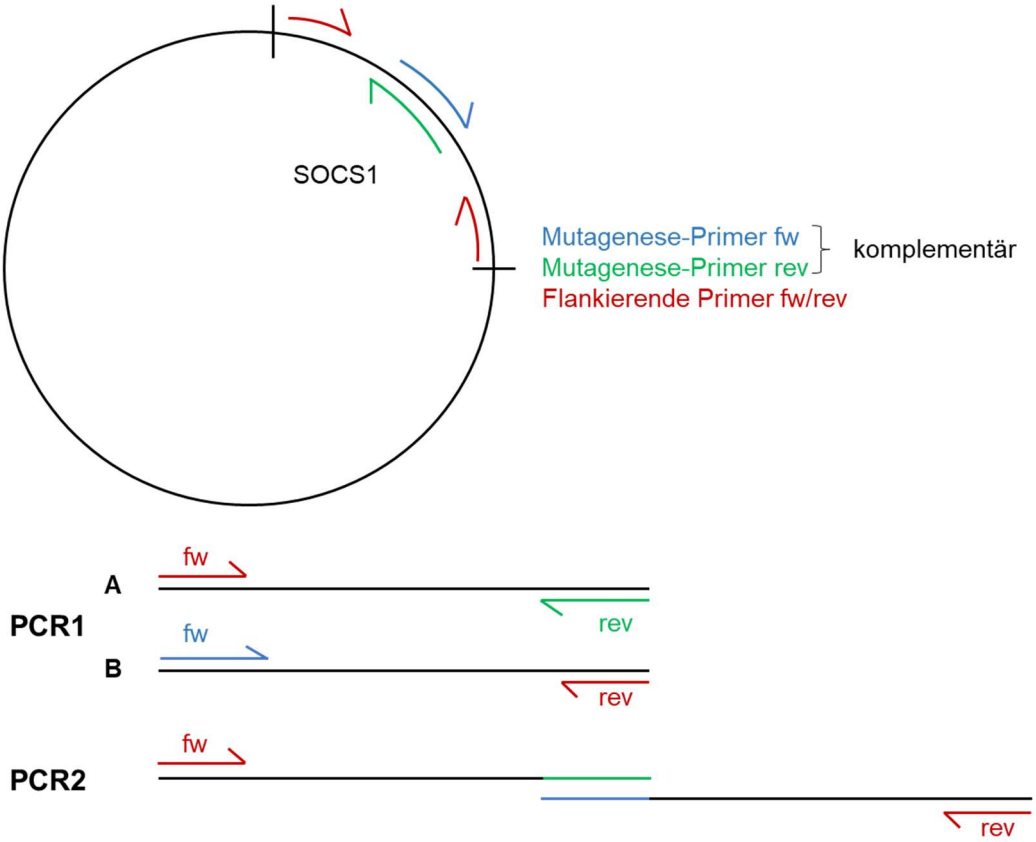


Abb. 8: Prinzip Mutagenese Major-Mutanten. In PCR1 wird in Teil A und B jeweils ein flankierender (fw oder rev) und ein Mutagenese-Primer (fw oder rev) verwendet. Die Mutagenese-Primer sind komplementär zueinander und enthalten die Deletion. in PCR2 lagern sich die DNA-Stränge zusammen und werden mit Hilfe der flankierenden Primer durch die DNA-Polymerase abgelesen. fw: forward, rev: revers, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

PCR1

In der PCR1 wurden für jede Mutation zwei Reaktionsansätze (A und B) hergestellt. Diese enthielten einmal die Primerkombination A und einmal B (Tab. 4), die übrige Zusammensetzung war gleich (Tab. 5). Nach Abschluss der PCR (Protokoll siehe Tab. 6) erfolgte eine Elektrophorese auf Agarosegel sowie eine Gelextraktion.

Tab. 4: Primerkombination PCR1 Major-Mutanten, am Beispiel Mutation 7.
fw: forward, rev: revers

Primerkombination für PCR1, Mutation 7	Primer	Volumen
7A	SOCS1_Mut7_rev pFLAG_SOCS1_fw	1µl 1µl
7B	SOCS1_Mut7_fw pFLAG_SOCS1_rev	1µl 1µl

Tab. 5: PCR1-Ansatz Major-Mutanten.
PCR: Polymerase-Kettenreaktion, fw: forward, rev: revers, dNTP´s: Desoxynukleosidtriphosphat, DMSO: Dimethylsulfoxid.

PCR1	Volumen
DNA-Template (pFLAG_SOCS1_WT) 50ng/µl	0,5µl
Primerkombination A oder B	2µl
10x Pfu DNA-Polymerase Buffer	5µl
10mM dNTP´s	1µl
DMSO	2,5µl
PCR grade water	38µl
Pfu DNA-Polymerase	1µl
	50µl

Tab. 6: PCR1-Protokoll Major-Mutanten.

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	2min	
95°C	1min	35x
50°C	30s	
74°C	2min	
74°C	5min	
8°C	∞	

PCR2

Für die PCR2 wurde jeweils 1µl DNA aus der PCR1 A und B mit den flankierenden Primern verwendet. Der weitere Ansatz ist Tabelle 7 zu entnehmen. Nach Ablauf der PCR erfolgte wiederrum eine Agarose-Elektrophorese und eine Gelextraktion.

Tab. 7: PCR2-Ansatz Major-Mutanten. PCR: Polymerase-Kettenreaktion, fw: forward, rev: revers, dNTP´s: Desoxynukleosidtriphosphat, DMSO: Dimethylsulfoxid.

PCR2	Volumen
10x Pfu DNA-Polymerase Buffer	5µl
10mM dNTP´s	1µl
DMSO	2,5µl
PCR grade water	36,5µl
pFLAG-SOCS1_fw	1µl
pFLAG-SOCS1_rev	1µl
DNA aus PCR1 A	1µl
DNA aus PCR1 B	1µl
Pfu DNA-Polymerase	1µl
	50µl

Das Protokoll der PCR2 entsprach dem der PCR1 (siehe Tabelle 6).

2.2.3.4 Umklonierung in pCW57-Vektor

Um den SOCS1-Wildtyp (WT) und die SOCS1-Deletion (DEL) in den pCW57-Vektor zu klonieren, wurden entsprechende Restriktionsstellen durch eine PCR generiert. Als DNA-Template wurde pFLAG-SOCS1-WT bzw. pFLAG-SOCS1-DEL verwendet.

Tab. 8: PCR-Ansatz Umklonierung in pCW57.
PCR: Polymerase-Kettenreaktion, fw: forward, rev: revers, dNTP´s: Desoxynukleosidtriphosphat, DMSO: Dimethylsulfoxid.

pCW57-PCR	Volumen
DNA-Template	1µl
pCW57_SOCS1_HA_fw (EcoRI)	1µl
pCW57_SOCS1_rev (AgeI)	1µl
10mM dNTP´s	1µl
10x Pfu DNA-Polymerase Buffer	5µl
DMSO	2,5µl
PCR grade water	38µl
Pfu DNA-Polymerase	0,5µl
	50µl

Tab. 9: PCR-Protokoll Umklonierung in pCW57.

Temperatur	Zeit	Zyklen
98°C	2min	
95°C	1min	35x
50°C	30s	
74°C	2min	
74°C	5min	
8°C	∞	

Es folgte der präparative Verdau, die Ligation und die Heat-Shock-Transformation.

2.2.3.5 Umklonierung in pcDNA3.1-Vektor und pcDNA3-GFP-Vektor

Für die Umklonierung des SOCS1-Wildtyps (WT) und einiger SOCS1-Mutanten wurden diese zunächst mittels Restriktionsenzymen aus dem pFLAG-Plasmid ausgeschnitten. Dies erfolgte über 2h bei 37°C, danach für 15min bei 65°C.

Tab. 10: Restriktionsverdau der Umklonierung in pcDNA3.1 oder pcDNA3-GFP.

Restriktionsverdau Insert	Volumen
DNA z.B. pFLAG-SOCS1-WT	5 µl
EcoRI	2 µl
BamHI	2 µl
Puffer CutSmart	2 µl
H_20	9 µl
	20 µl

Anschließend erfolgte der präparative Verdau, die Ligation in den neuen Vektor und die Transformation kompetenter Bakterien mittels Heat-Shock wie in den weiteren Methoden beschrieben.

2.2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese können die PCR-Produkte der Länge nach aufgetrennt werden. Es wurde ein 1% Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid verwendet, um die Proben aufzutrennen und zu visualisieren. Bei einer Spannung von 140V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA, welche im Anschluss mit dem UV-Licht des Alpha Imagers visualisiert werden konnte. Das

gewünschte PCR-Produkt wurde dann über einer UV-Lampe ausgeschnitten und konnte weiterverarbeitet werden.

2.2.3.7 Gelextraktion

Um das PCR-Produkt wieder aus dem Agarosegel zu lösen, wurde das Gelextraktion-Kit von Qiagen verwendet. Das Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll.

2.2.3.8 Präparativer Verdau

Um das Insert oder auch den Vektor für die Ligation vorzubereiten, erfolgte ein Restriktionsverdau mit den zum Plasmid passenden Restriktionsenzymen (Tab. 11). Da die SOCS1-Minor-Mutanten bereits über die PCR in den pFLAG-Vektor eingebaut wurden, wurden hier der präparative Verdau und die Ligation nicht benötigt.

Tab. 11: Vektorsysteme und dazu verwendete Restriktionsenzyme.

Vektor	zugehörige Restriktionsenzyme
pFLAG-CMV	EcoRI, BamHI
pCW57-GFP-2A-MCS	AgeI, EcoRI
pcDNA3.1	EcoRI, HindIII
pcDNA3-GFP	EcoRI, HindIII

Tab. 12: Präparativer Verdau.

Präparativer Verdau	Volumen
DNA aus Gelextraktion	20µl
Puffer Cut Smart	4µl
Restriktionsenzym 1	2µl
Restriktionsenzym 2	2µl
H_20	12µl
	40µl

Die Proben wurden 2h bei 37°C und 15min bei 70°C inkubiert. Beim präparativen Verdau des Vektors erfolgte zusätzlich eine weitere Inkubation mit 1,5µl SAP über 1h bei 37°C. Anschließend wurde die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese mittels Gelextraktion wieder aufgereinigt.

2.2.3.9 Ligation

Für den Einbau des Inserts in den Vektor wurde folgender Ligationsansatz (Tab. 13) verwendet. Der Ansatz wurde entweder 3h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tab. 13: Ligationsansatz.

Ligationsansatz	Volumen
Vektor	1µl
Insert	5µl
T4 DNA-Ligase Puffer	2µl
ddH_20	11µl
T4 DNA-Ligase	1µl
	20µl

2.2.3.10 Heat-Shock-Transformation

Die bei -80°C gelagerten kompetenten *E.coli* wurden zunächst für 10min auf Eis aufgetaut. Danach wurde der Ligationsansatz zu 50µl der *E.coli*-Suspension hinzugegeben und weitere 15min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte der Heat-Shock gemäß der folgenden Tabelle.

Tab. 14: Heat-Shock-Protokoll.

Zeit	Temperatur
30s	37°C
10min	auf Eis / 4°C
1min	37°C
15min	auf Eis / 4°C

Nach dem Heat-Shock wurden 500µl LB-Medium dazugegeben und eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 3000rpm über 2min wurden 400µl des Überstands abgenommen und das Bakteriensediment im restlichen Medium resuspendiert. Im Anschluss wurde das Gemisch mittig auf eine Ampicillin-haltige Agarplatte aufgetragen, kreisförmig ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3.11 Kolonien picken und Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Bakterienkolonien wurden von der Ampicillin-haltigen Agarplatte mit einer Pipettenspitze gepickt und je in ein steriles Röhrchen mit jeweils 2ml Ampicillin-haltigem LB-Medium gegeben. Nach einer Nacht bei 37°C im Orbitalinkubator erfolgte die Mini-Präparation zur Isolation des Plasmids gemäß dem Herstellerprotokoll von Qiagen.

2.2.3.12 Analytischer Verdau und Sequenzierung

Um den Einbau des Inserts in das Plasmid zu überprüfen, wurde ein kleiner Teil der Mini-Präparation für einen analytischen Verdau verwendet.

Tab. 15: Analytischer Verdau.

Doppelter Verdau	Volumen	**Einfacher Verdau**	Volumen
Plasmid/ DNA	2µl	Plasmid/ DNA	2µl
Restriktionsenzym 1	0,5µl	Restriktionsenzym 1	0,5µl
Restriktionsenzym 2	0,5µl		-
Puffer Cut Smart	2µl	Puffer Cut Smart	2µl
H_20	15µl	H_20	15,5µl
	20µl		20µl

Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37°C, anschließend für 15min bei 70°C. Als Restriktionsenzyme wurden jeweils die gleichen Enzyme wie beim präparativen Verdau verwendet. Nach der Gelelektrophorese konnte mit dem Alpha Imager das Ergebnis unter UV-Licht visualisiert werden. Der einfache Verdau des Zielplasmids mit nur einem Restriktionsenzym diente als Kontrolle. Für die Sequenzierung wurden 100ng/µl des Plasmids aus der Mini-Präparation sowie der passende Sequenzier-Primer (5pmol/µl, siehe Kapitel 2.1.8) zu LGC Genomics gesendet.

2.2.3.13 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die positiven Plasmid-Klone wurden in 100ml LB_{AMP}-Medium über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Maxi-Präparation erfolgte dann nach Angaben des Herstellerprotokolls. Am Ende erfolgte die Isopropanol-/Ethanol-Präzipitation der Plasmid-DNA. Dabei wurde das DNA-Sediment in 500µl TE-Puffer resuspendiert und der Plasmid-Gehalt mit dem Epoch Spektralphotometer gemessen. Die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

2.2.4 Dualer Luciferase-Reporter-Assay

Das *Firefly*-Luciferase-Gen kodiert für eine Oxyxgenase, die, mithilfe von Sauerstoff, Magnesium und ATP, die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert. Als Nebenprodukt entsteht hierbei Licht. Zusätzlich wird die *Renilla*-Luciferase der *Renilla reniformis* (Seefeder) verwendet, die Coelenterazin mit Sauerstoff zu Coelenteramid, CO_2 und Licht verstoffwechselt (Abb.9) [113].

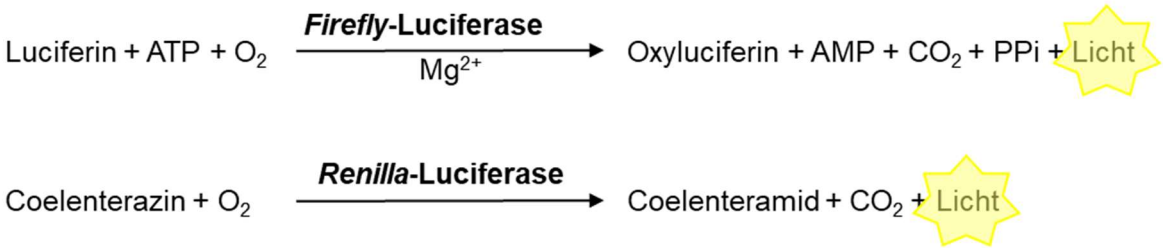


Abb. 9: Chemische Reaktion im Luciferase-Reporter-Assay.
AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, PPi: Pyrophosphat.

Der Promoter des Gens, welches untersucht werden soll, wird in einem Plasmid mit dem *Firefly*-Luciferase-Gen gekoppelt. Zusätzlich wurde das *Renilla*-Luciferase-Gen an den Promoter des Haushaltsgens Aktin gekoppelt und dient damit als interne Kontrolle. Nach der Aktivierung des Promoters wird die jeweilige Luciferase produziert (Abb. 10). Durch Substrat-Zugabe kann das entstehende Licht gemessen werden, wobei die Stärke des Lichtsignals mit der Stärke der Luciferase-Expression korreliert- und damit mit der Aktivität des gekoppelten Promoters und dem zugehörigen Transkriptionsfaktor. Die *Firefly*-Luciferase-Reaktion wird dabei durch Zugabe des Stop&Glo Puffers abgestoppt, gleichzeitig erfolgt dann die Messung der *Renilla*-Luciferase als Kontrolle.

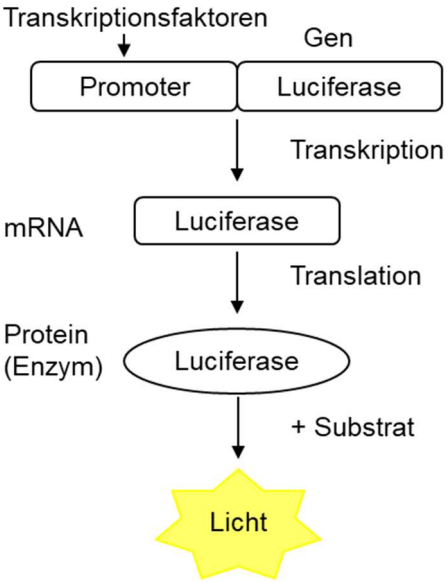


Abb. 10: Prinzip des Luciferase-Reporter-Assays.
mRNA: Messenger-Ribonukleinsäure

Die Transfektion an Tag 2 sowie die Herstellung der Gesamtproteinextrakte an Tag 4 fanden, wie bereits beschrieben (Kapitel 2.2.1.5 und Kapitel 2.2.2), statt. Die Messung erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls von Promega und wurden pro Ansatz und Zytokin-Stimulation im Triplikat durchgeführt. Bei der quantitativen Auswertung wurde ein Normalisierungfaktor aus den Werten der *Renilla*-Luciferase berechnet:

$$\text{Normalisierungsfaktor} = \frac{\text{Niedrigster Wert } \textit{Renilla}\text{-Luciferase-Aktivität}}{\text{Wert } \textit{Renilla}\text{-Luciferase-Aktivität}}$$

Die Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität wurden anschließend durch Multiplikation mit dem jeweiligen Normalisierungsfaktor der Messung normalisiert. Aus den Triplikaten wurde ein Mittelwert und ein mittlerer Standardfehler ermittelt. Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt und die relativen Werte zusammengetragen. Die Signifikanz wurde mittels t-Test der Online-Software Graphpad QuickCalcs berechnet.

2.2.5 Western Blot

2.2.5.1 Polyacrylamid-Gele herstellen

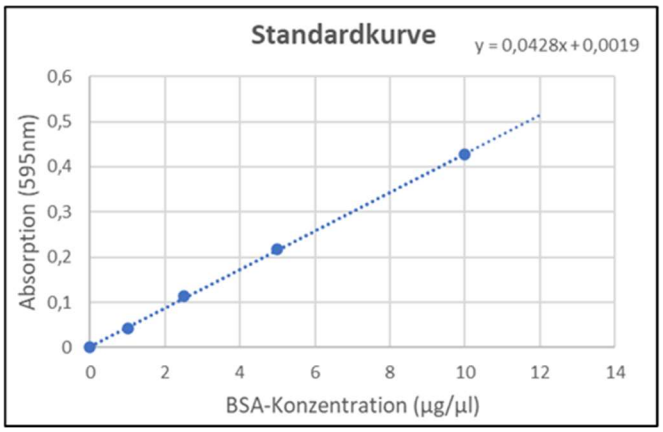
Für die Auftrennung der Proteine wurden 10%ige Trenn-Acrylamidgele verwendet und mit einem 4,5%igem Sammel-Acrylamidgel überschichtet (Tab.16).

Tab. 16: Ansatz für Trenn- und Sammelgel. APS: Ammoniumpersulfat, HCL: Salzsäure, SDS: Sodium-Dodecyl-Sulfat, TEMED: Tetramethylethylendiamin.

Reagenzien	Trenngel 10%	Sammelgel 4,5%
Acrylamid 40%	2824µl	564µl
ddH_20	2306µl	1761µl
Tris-HCL 0,75M pH8,8	5640µl	
Tris-HCL 0,25M pH6,8		2500µl
APS 10mg/ml	280µl	125µl
SDS 10%	224µl	50µl
TEMED	20µl	10µl

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Assay

Zu 0,5ml Bradford-Lösung wurde 1µl Proteinextrakt hinzugegeben, invertiert und über 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte am Epoch-Mikroplatten-Spektralphotometer bei 595nm im Dublett. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Standardreihe (Abb. 11) per Gen5 Software. Die Mittelwerte der Standardreihe, sowie die der Proteinproben, wurden gegen den Mittelwert des Standard 0 (ST0) normalisiert. Anhand der Standardreihe wurde eine lineare Regression erstellt und die Formel nach x aufgelöst (y=Absorption, x=Konzentration), woraus die Konzentrationen der jeweiligen Proteinproben ermittelt werden konnten.



Standardreihe	BSA Konzentration
ST0	0 µg/µl
ST1	1 µg/µl
ST2,5	2,5 µg/µl
ST5	5 µg/µl
ST10	10 µg/µl

Abb. 11: Standardkurve und -reihe zur Ermittlung der Proteinkonzentration. Rechts ist die Standardreihe mit der jeweils verwendeten BSA-Konzentration dargestellt. Links eine beispielhafte Standardkurve, mit der gemessenen Absorption bei 595nm. ST: Standard, BSA: Bovines Serumalbumin.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-Page werden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Hierfür wurden jeweils 5µl des SDS-Proteinladepuffers mit der gewünschten Proteinmenge (10-20µg) gemischt und anschließend bei 95°C denaturiert. Neben den Proben wurde ein Proteinstandard geladen und die Proteine bei 130V für 1:45h aufgetrennt.

2.2.5.4 Semidry-Blot: Proteintransfer auf die Trägermembran

Die Nitrozellulose-Membran wurde für 2min in destilliertem Wasser aktiviert und anschließend mit dem Trenngel zwischen jeweils vier, in Transferpuffer getränkte, Whatman-Filterpapiere gelegt (Blot-Sandwich).

Oben (Kathode):	4 Whatman-Filterpapiere
	Polyacrylamid-Gel
	Nitrozellulose-Membran
Unten (Anode):	4 Whatman Filterpapiere

Die Proteine wurden mittels Semidry-Blotting über einen Zeitraum von 1:45h und einer elektrischen Stromstärke von 70mAmp pro Blot-Sandwich vom Gel auf die Membran übertragen.

2.2.5.5 Blocken der Nitrozellulose-Membran

Um ein unspezifisches Binden der Primär- und Sekundärantikörper an die Nitrozellulose-Membran zu verhindern, wurden freie Bindungsstellen an der Membran durch eine einstündige Inkubation mit 5% Magermilchpulver in TBS-T Puffer bei Raumtemperatur blockiert.

2.2.5.6 Proteinmarkierung: Primär- und Sekundär-Antikörper

Die Primär-Antikörper wurden jeweils im angegebenen Verhältnis (Kapitel 2.1.6) in TBS-T verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5min mit TBS-T gewaschen und in der Sekundär-Antikörperlösung (in TBS-T) eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder dreimal 5min mit TBS-T gewaschen.

2.2.5.7 Proteindetektion

Die Detektion der, durch die Bindung von Primär- und Sekundär-Antikörper markierten, spezifischen Proteine erfolgte mittels Detektierlösung (WesternSure Premium Chemiluminescent Substrate). Dabei erfolgte, durch die an dem Sekundär-Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase, die Umwandlung von Luminol in 3-Aminophthalat unter Emission von Licht der Wellenlänge 425nm. Diese Lichtemission konnte auf dem CDigit Western Blot Scanner sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde die Image Studio Software und der 12-Minuten Scan mit hoher Sensitivität verwendet.
Auch für die Quantifizierung wurde die Image Studio Software verwendet. Die Größe und die Intensität der Proteinbanden wurden gemessen und in Microsoft Office Excel jeweils gegen den kleinsten Wert des Proteins normalisiert. Als Ladekontrolle wurde immer das Signal einer Färbung mit einem Antikörper gegen ein Haushalts-Protein verwendet, welches in den Zellen eine hohe konstitutive Expression aufweist. Beispiele hierfür sind die Proteine Aktin, Tubulin und GAPDH. Die Proteinbande des Haushaltsproteins wurde ebenfalls normalisiert. Nun konnte die Ratio gebildet werden, indem der Wert für das normalisierte Protein x durch den des normalisierten Haushaltsproteins dividiert wurde.

2.2.6 RNA-Sequenzierung mit dem QIAseq UPX 3‘ Transcriptome Kit

Alle Schritte für die RNA-Sequenzierung wurden insgesamt dreimal durchgeführt, somit wurden drei NGS-Librarys pro Datenpunkt erstellt.

2.2.6.1 RNA-Extraktion

Nach dem Aussäen der HEK-293-STAT6 Zellen an Tag 1 erfolgte an Tag 2 die Transfektion. Verwendet wurde hierbei das pFLAG-CMV2-Plasmid als Leer-Vektor, pFLAG-SOCS1-WT, pFLAG-SOCS1-DEL und pFLAG-SOCS1-FS. Es wurden jeweils zwei Wells mit dem gleichen Vektor (500ng/Well) transfiziert, wobei je eines davon an Tag 4 für 30min mit IL-4 stimuliert wurde. Anschließend wurden die Zellen geerntet und pelletiert. Danach erfolgte eine RNA-Extraktion anhand des Protokolls des RNeasy Mini Kits von Qiagen. Der RNA-Gehalt wurde mittels Epoch-Spektralphotometer und der Gen5 Software bestimmt, als Nullwert wurde RNAse freies Wasser verwendet. Die Proben wurden anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.6.2 Erstellung der NGS-Library

Für die RNA-Sequenzierung mittels NGS wurden die Proben auf 1ng/µl verdünnt und die NGS-Library, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, hergestellt. Zwischen jedem Schritt wurden die Proben mit den QIAseq Beads aufgereinigt. Im Anschluss wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem High Sensitivity DNA Reagents Kit nach Herstellerprotokoll die Library QC ermittelt. Diese stellt die Häufigkeit und Länge der Fragmente in bp dar und lässt Rückschlüsse auf die Qualität der Probe zu. Mit dem Qubit Fluorometer wurde erneut die Konzentration der Library in ng/µl gemessen.

2.2.6.3 Sequenzierung und Auswertung

Die Sequenzierung wurde mit dem MiSeq von Illumina durchgeführt, hierfür wurde das MiSeq Sequencing Reagent Kit V3 (600 cycles) gemäß der Herstellerangaben verwendet und eine Library-Konzentration von 3pM genutzt. Die Auswertung der dabei gewonnenen Fastq-Dateinen erfolgte mittels der Gene Globe Software von Qiagen. In der Primary Analysis wurden die vorher zur Sequenzierung zusammengeführten Proben via Demultiplexing über die zuvor zugeordneten Zell-Identitäten wieder in die einzelnen Proben aufgeteilt. Die hierbei gewonnenen Primärdaten wurden für die Erstellung einer Heatmap mittels Qlucore Omics Explorer genutzt.

In der Secondary Analysis erfolgte dann der Vergleich zwischen der Kontrolle (mit dem pFLAG-CMV2-Plasmid) und dem SOCS1-Wildtyp bzw. der jeweiligen SOCS1-Mutante. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse wurden von der Gene Globe Software nach den zwei statistische Auswertungmethoden EdgeR und Limma ausgegeben. Alle ausgegeben Werte erreichten mindestens eine 2fache Steigerung bzw. Herrunterregulierung im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse wurden nach einem p-Wert <0,05 gefiltert, sodass nur signifikante Werte berücksichtigt wurden. Für die Zuordnung der exprimierten Gene zu übergeordneten Signalwegen und zur grafischen Darstellung wurde die Enrichr Datenbank verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Mutagenese und Klonierung der SOCS1-Varianten

3.1.1 Übersicht über die SOCS1-Varianten

Wie in der Einleitung beschrieben, lassen sich *SOCS1*-Mutationen in Minor- und Major-Mutationen unterteilen. In dieser Arbeit wurden sechs Minor- und sechs Major-Mutationen ausgewählt, die aus Patientenfällen mit klassischen Hodgkin-Lymphom stammen. Ergänzt wurden diese um zwei weitere Major-Mutationen aus der cHL-Zelllinie L-428, im weiteren DEL und FS genannt (Tab. 17).

Anhand des SIFT- und des Polyphen-Prediction-Scores wurden die Mutationen bezüglich der möglichen Auswirkungen auf das SOCS1-Protein in verschiedene Klassen eingeteilt – benigne (tolerated/benign), möglicherweise schädigend (probably/possibly damaging) und schädigend (damaging) (Tab. 17). Beide Systeme überprüfen den Einfluss von Substitutionen und sind daher nur für die Minor-Mutationen geeignet. Je höher der Polyphen-Prediction-Score, desto wahrscheinlicher ist eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion. Beim SIFT-Score weist ein möglichst niedriger Wert auf eine veränderte Proteinfunktion hin.

Bei den *SOCS1*-Minor-Mutationen werden Mutation 1 und 5 als sehr wahrscheinlich tolerierte bzw. benigne Mutation beschrieben. Mutation 2, 3 und 4 gelten dagegen als vermutlich schädigend auf die Funktion des SOCS1-Proteins. Mutation 6 wird nur als möglicherweise schädigend oder sogar als toleriert eingestuft.

Da alle *SOCS1*-Major-Mutationen eine Deletion enthalten und damit eine Sequenzlängenänderung bewirken, wird bei allen Varianten ein schädigender Einfluss auf das SOCS1-Protein vorhergesagt.

Tab. 17: Übersicht über die ausgewählten SOCS1-Varianten auf cDNA-Ebene (c.) und auf Proteinebene (p.).

Für die Beschreibung der Varianten wurde die Nomenklatur der HGVS (Human Genom Variation Society) verwendet. > markiert hierbei eine Substitution auf DNA-Ebene, _ markiert eine Reihe betroffener Basen oder Aminosäuren inklusive der vor- und nachgenannten Stelle. Prädiktive Scores: SIFT- und den Polyphen-Prediction-Score. *Abkürzungen*: Auf cDNA-Ebene (c.): A: Adenin, C: Cytosin, c.: Basenposition, G: Guanin, T: Thymin, >: Substitution, _: Deletion. Auf Proteinebene (p.): A: Alanin, F: Phenylalanin, I: Isoleucin, K: Lysin, L: Leucin, M: Methionin, N: Asparagin, p.: Proteinsequenz, R: Arginin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin, Y: Tyrosin, del: Deletion, fs: Frameshift, *: STOP Codon, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Ausgewählte *SOCS1*-Minor-Mutationen							
Nr.	**c.HGVS**	**p.HGVS**	**Mutationstyp**	**SIFT score**	**SIFT Prediction**	**Polyphen score**	**Polyphen Prediction**
1	c.139 G>A	p.A47T	Missense	0,69	Tolerated	0	Benign
2	c.265 G>T	p.A89S	Missense	0,03	Damaging	0,998	Probably damaging
3	c.347 G>A	p.S116N	Missense	0	Damaging	1	Probably damaging
4	c.350 T>C	p.V117A	Missense	0,05	Damaging	0,999	Probably damaging
5	c.445 G>A	p.E149K	Missense	0,8	Tolerated	0,004	Benign
6	c.547 G>A	p.V183M	Missense	0,24	Tolerated	0,836	Possibly damaging
Ausgewählte *SOCS1*-Major-Mutationen							
Nr.	**c.HGVS**	**p.HGVS**	**Mutationstyp**	**SIFT score**	**SIFT Prediction**	**Polyphen score**	**Polyphen Prediction**
7	c.439_441del3	p.L147del	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
8	c.305_325del21	p.A102_R109del	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
9	c.345_350del6	p.S116_V117del	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
10	c.412_429del18	p.L137_S143del	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
11	c.411_429del19	p.L137fs*61	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
12	c.191_218del28	p.Y64fs*11	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
DEL	c.393_407del15	p.Q131_F135del	Deletion	-	Damaging	-	Damaging
FS	c.349_359del11	p.V117fs*132	Deletion	-	Damaging	-	Damaging

3.1.2 Mutagenese

Mutagenese der SOCS1-Minor-Mutanten

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde durch die PCR, mit Hilfe komplementärer Primer, die jeweilige Punktmutation in die wildtypische SOCS1-cDNA eingebracht. Die resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt. Da die SOCS1-Minor-Varianten durch die PCR direkt in den pFLAG-Vektor eingebaut wurden, weist die erzielte DNA-Sequenz eine Länge von 5278bp auf.

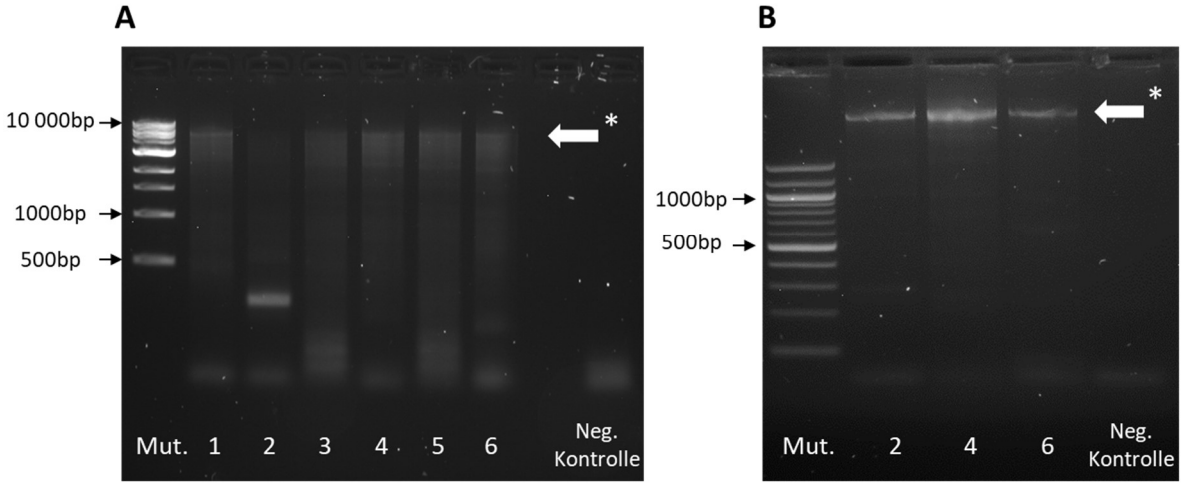


Abb. 12: Gelelektrophorese der SOCS1-Minor-Mutanten im pFLAG-CMV2 Vektor nach der PCR. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle (Neg. Kontrolle) ohne DNA-Template verwendet. **A**: Gelelektrophorese aller SOCS1-Minor-Mutanten (1-6). Es wurde ein 1kb-Marker verwendet. **B**: Gelelektrophorese der SOCS1-Minor-Mutanten 2, 4 und 6 nach erneutem PCR-Versuch. Verwendet wurde ein 100bp-Marker. * Der weiße Pfeil markiert jeweils die positive Bande. Mut.: Mutation, bp: Basenpaare.

Herstellung der SOCS1-Major-Mutanten

Da die SOCS1-Major-Mutanten eine Deletion enthalten, ist die Mutagenese dieser Varianten aufwändiger und die PCR in mehrere Teilschritte untergliedert (vergleiche Kapitel 2.2.3.3). Die generierten *SOCS1*-cDNA Fragmente der PCR-Teilschritte sind, entsprechend der Lokalisation der jeweiligen Deletion, unterschiedlich lang (Abb. 13). Bei Mutation 7 liegt beispielsweise eine Deletion der Basen 439 bis 441 der *SOCS1*-cDNA vor, somit weist Fragment A eine Länge von 438bp und Fragment B eine Länge von 195bp auf.

Nach der PCR2 kann ein zusammenhängender DNA-Strang in der Agarose-Elektrophorese detektiert werden. Die Stranglänge liegt hierbei, je nach Mutation,

bei circa 636bp. Mutation 12 führt durch einen *frameshift* sehr früh zu einem Stoppcodon und ist daher nur 253bp lang, deshalb ist hier die Aufteilung in zwei Fragmente nicht nötig.

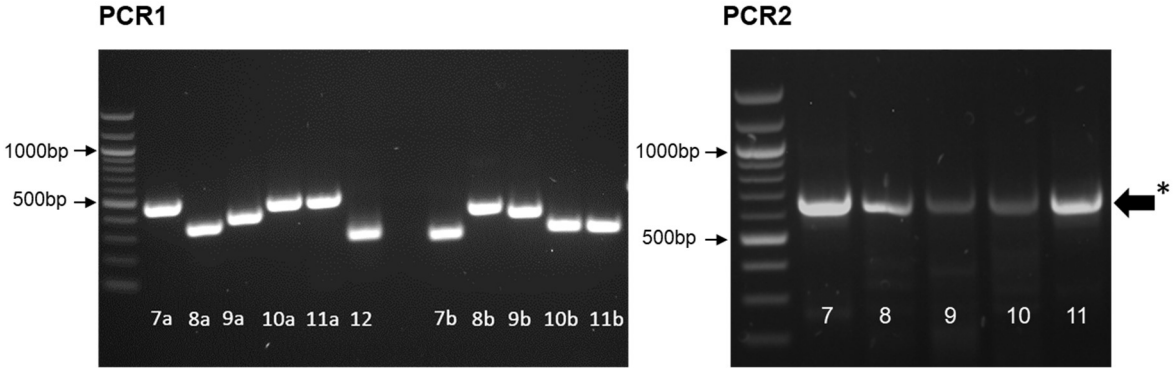


Abb. 13: Agarose-Elektrophorese der SOCS1-Major-Mutanten 7-12, nach PCR1 (links) und nach PCR2 (rechts). Zur Abschätzung der Länge der generierten PCR-Fragmente wurde ein 100bp-Marker verwendet. * Der breite schwarze Pfeil markiert die positive Bande nach PCR2. bp: Basenpaare.

Analytischer Verdau zur Kontrolle der in pFLAG-CMV2 eingebrachten Minor- und Major-Mutanten

Um das gelungene Einbringen der jeweiligen SOCS1-Mutante in den pFLAG-CMV2-Vektor zu kontrollieren, erfolgte nach der Mutagenese und der Klonierung ein analytischer Verdau der hergestellten Plasmide. Mit den passenden Restriktionsenzymen wurde die SOCS1-Variante aus dem jeweiligen Vektor ausgeschnitten. Dabei wurde ein doppelter Verdau (d) und ein einfacher Verdau (e) zur Kontrolle verwendet.

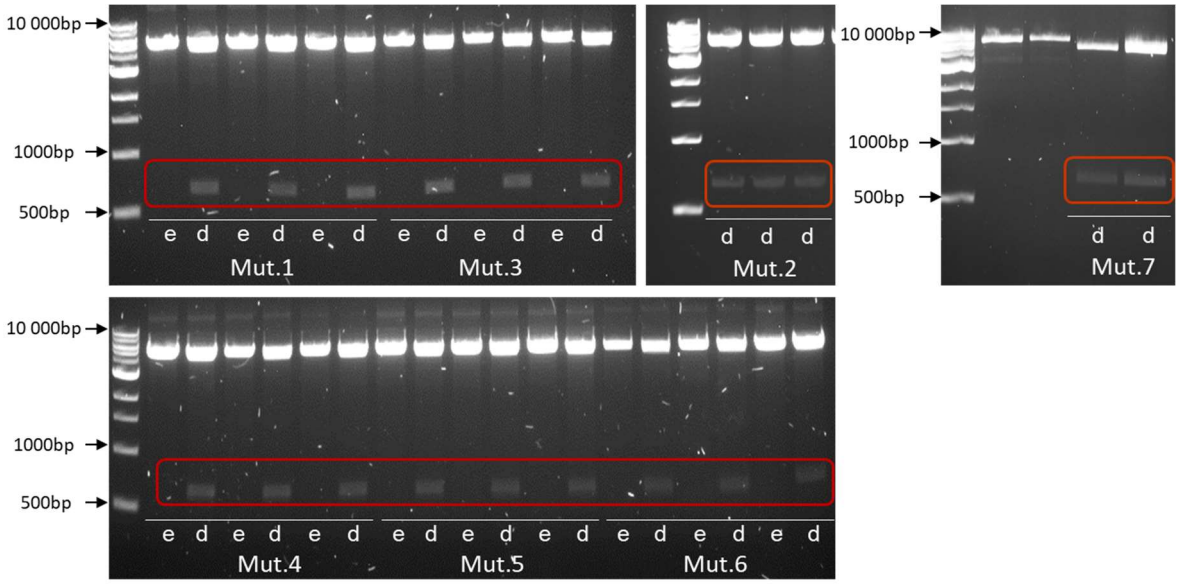


Abb. 14: Analytischer Verdau der erfolgreich klonierten SOCS1-Mutanten 1-7 im pFLAG-CMV2-Vektor. Zum Längenabgleich wurde ein 1kb-Marker verwendet. Die ausgeschnittenen Banden der SOCS1-Varianten sind rot umrandet. e: einfacher Verdau (nur EcoRI), d: doppelter Verdau mit den Restriktionsenzymen AgeI und EcoRI. Mut.: Mutation, bp: Basenpaare, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Im doppelten Verdau wurden beide Restriktionsenzyme verwendet, daher konnte nur hier die SOCS1-Variante vollständig aus dem Vektor ausgeschnitten werden. Auf diesen Bildern der Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 14) ist daher immer eine Bande des pFLAG-Vektors mit einer Länge von circa 4636bp vorhanden und eine weiter Bande bei circa 636bp, welche der *SOCS1*-cDNA entspricht.

Die genaue Basensequenz wurde durch eine Sanger-Sequenzierung überprüft (Abb. 15A). Dargestellt ist hier jeweils der passende DNA-Abschnitt, welcher die Mutation enthält. Die Stelle der Punktmutation ist mit einem Pfeil markiert, die Deletion der Major-Mutation 7 mit einem Keil gekennzeichnet.
Eine erfolgreiche Mutagenese und Klonierung in den pFLAG-Vektor konnte bei allen Minor-Mutationen, sowie bei der Major-Mutation 7 erreicht werden. Der SOCS1-Wildtyp sowie die Major-Mutationen DEL und FS aus der Zelllinie L-428 lagen im Labor bereits im pFLAG-Vektor vor und wurden von mir im Verlauf in weitere Vektorsysteme umkloniert. Abbildung 15B zeigt exemplarisch das pFLAG-Plasmid mit integriertem *SOCS1*-Wildtyp, am N-terminalen Ende von *SOCS1* befindet sich der FLAG-Tag. Markiert sind außerdem die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI.

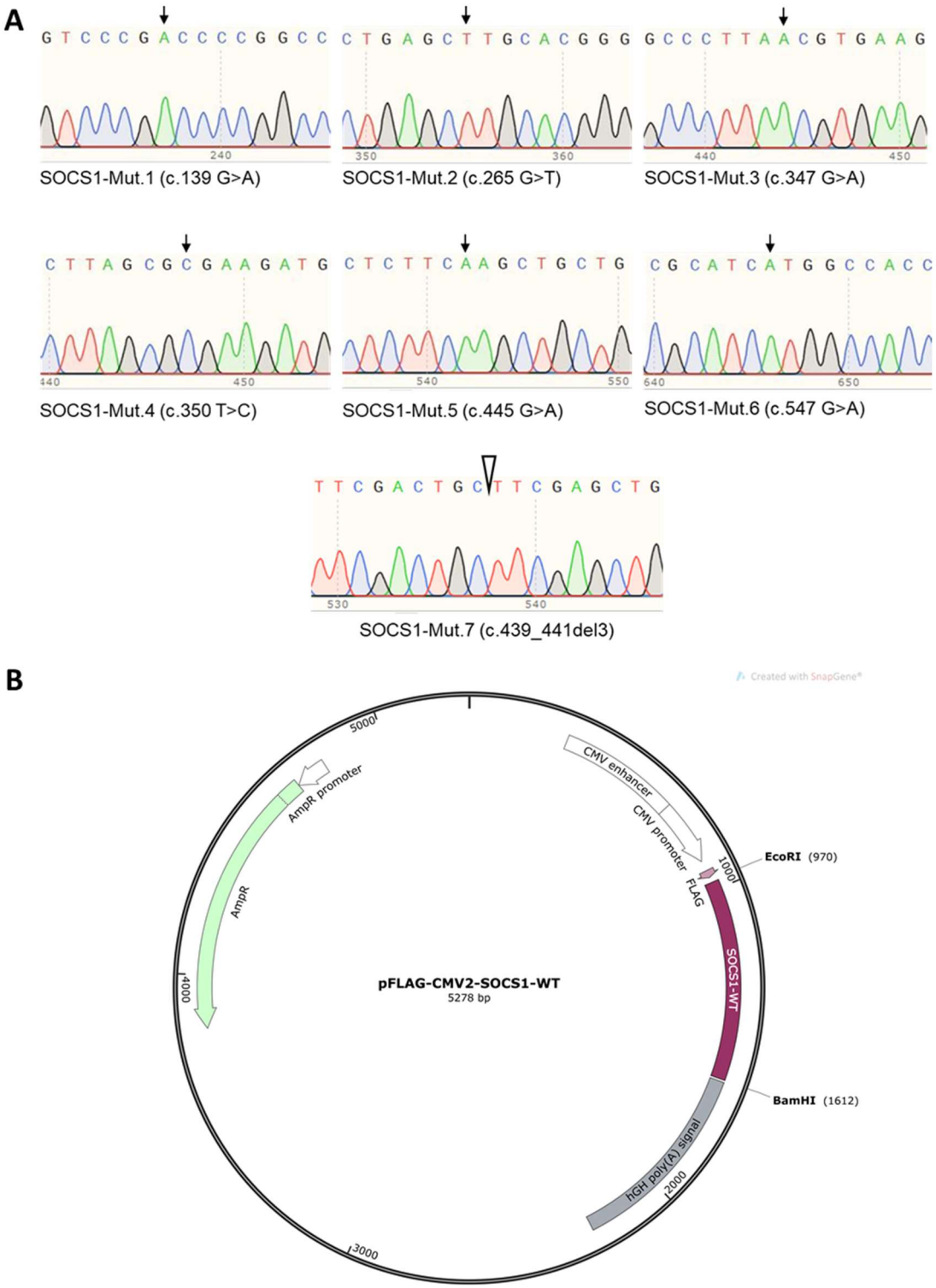


Abb. 15: Minor-Mutanten und die Major-Mutante 7 im pFLAG-CMV2-Plasmid.
A: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung. Dargestellt ist nur ein Ausschnitt der DNA-Sequenzen. Der Pfeil markiert die jeweilige Punktmutation. Die Deletionsstelle der Mutation 7 ist durch einen Keil markiert. A: Adenin (grün), C: Cytosin (blau), G: Guanin (schwarz), T: Thymin (rot). **B**: Exemplarische Darstellung der SOCS1-Varianten am Beispiel des pFLAG-SOCS1-Wildtyps (WT). Erstellt mit SnapGene. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (EcoRI und BamHI) sind gekennzeichnet. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen. CMV: Cytomegalievirus, Mut.: Mutation. SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1. WT: $SOCS1_{WT}$ (Wildtyp).

3.1.3 Herstellung weiterer Expressionsvektoren der SOCS1-Varianten durch Umklonierung

Umklonierung der diversen SOCS1-Varianten in pcDNA3.1 und pcDNA3-GFP

Für die Beurteilung der SOCS1-Varianten in einem Vektorsystem ohne N-terminalen Tag (Markierung) wurden diese via Restriktionsverdau und Ligation in das pcDNA3.1-Plasmid eingebracht, welches keinen Tag enthält. Zusätzlich wurde das pcDNA3-GFP-Plasmid verwendet, welches eine C-terminale GFP-Sequenz aufweist.

Die Überprüfung der erfolgreiche Umklonierung der diversen SOCS1-Varianten fand mit einem analytischen Verdau (Abb. 16) und der anschließenden Sequenzierung nach Sanger statt.

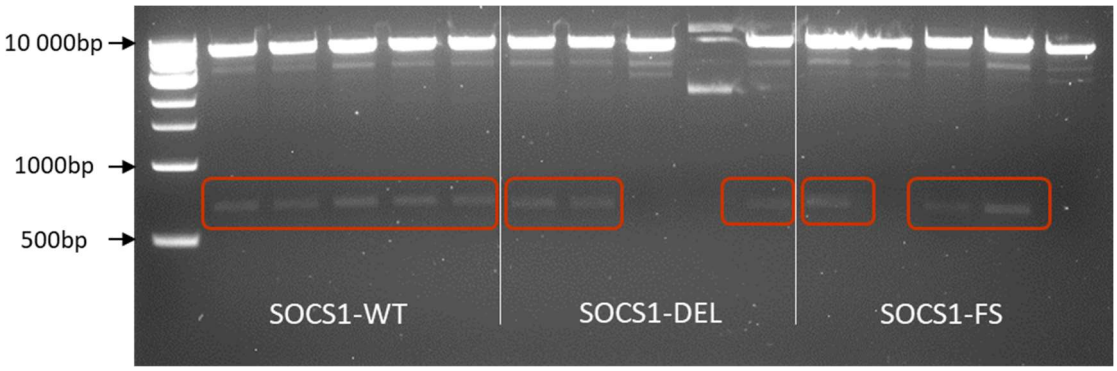


Abb. 16: Analytischer Verdau zur Überprüfung der erfolgreichen Einbringung der SOCS1-Varianten am Beispiel des pcDNA3.1.Vektors. Es wurde ausschließlich ein doppelter Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII durchgeführt. Die ausgeschnittenen Banden der SOCS1-Varianten sind rot umrandet. bp: Basenpaare, WT: SOCS1-Wildtyp, DEL: SOCS1-Deletion, FS: SOCS1-Frameshift. SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Ein Ausschnitt der Sequenzierung ist in Abb. 17 zu sehen. Dargestellt ist im oberen Bereich der pcDNA3-SOCS1-Wildtyp (WT) mit Markierung der Deletionsstelle der SOCS1-Major-Mutanten FS bzw. DEL. Im unteren Bereich ist die Sequenz des FS und der DEL gezeigt.

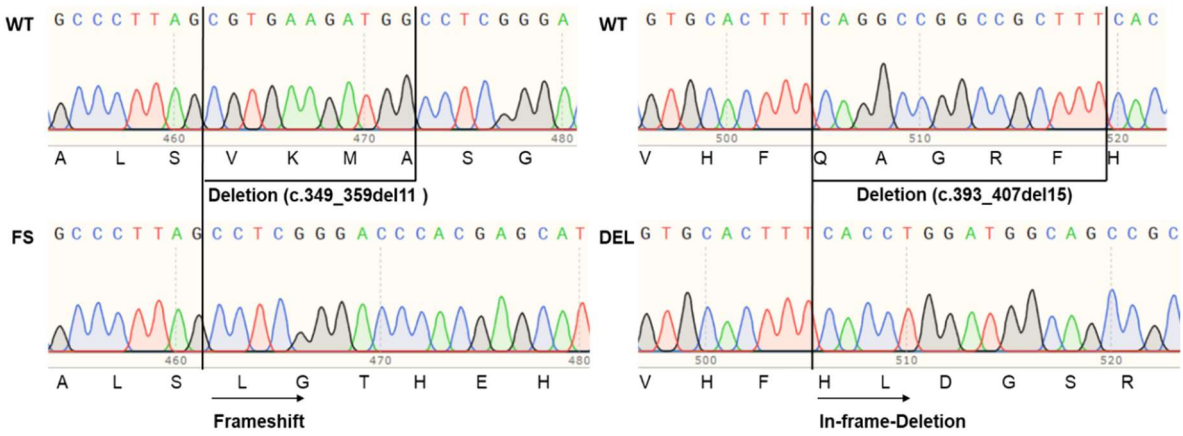


Abb. 17: Sanger-Sequenzierung der SOCS1-Major-Mutanten aus der Zelllinie L-428 im pcDNA3.1-Vektor, verglichen mit der Sequenz des SOCS1-Wildtyps. Der DNA-Sequenzabschnitt des SOCS1-Wildtyps (WT) ist oben dargestellt, markiert ist die Deletionsstelle des SOCS1-*Frameshifts* (FS) bzw. der SOCS1-*Deletion* (DEL). Zusätzlich ist die dazugehörige Aminosäuren-Sequenz angegeben. Erklärung der Farben: A: Adenin (grün), C: Cytosin (blau), G: Guanin (schwarz), T: Thymin (rot). SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Durch die einfache Umklonierung mittels Restriktion wurde das Stopp-Codon der *SOCS1*-Sequenz mit in das pcDNA3-GFP-Plasmid eingebaut, somit wird die GFP-Sequenz nicht mehr abgelesen und die exprimierten SOCS1-Varianten besitzen hier ebenfalls keine GFP-Markierung.

Herstellung eines induzierbaren SOCS1-Expressionssystems unter Verwendung des Vektors pCW57-GFP-2A-MCS

Die SOCS1-Wildtyp-cDNA sowie die cDNA der SOCS1-Major-Mutante SOCS1-Deletion wurden zur genaueren Charakterisierung in weitere Vektorsysteme umkloniert. Der lentivirale pCW57-GFP-2A-MCS-Vektor verfügt über ein Puromycin-Resistenzgen, wodurch eine Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen möglich ist. Zusätzlich enthält er ein sogenanntes Tet(Tetracyclin)-On-System und ist damit ein induzierbarer Vektor. Erst durch die Zugabe von Doxycyclin, welches die Bindung von rtTA (reverse tetracycline transactivator) an den Operator bewirkt, kommt es zur Aktivierung des Promoters und damit zur Expression des Transgens.

Die Umklonierung erfolgte über eine PCR-vermittelte Amplifizierung der SOCS1-Varianten unter Verwendung der pFLAG-SOCS1-Vektoren. Dazu wurde ein spezifischer SOCS1-Primer mit einem N-terminalen HA-Tag markiert (Abb. 18A).

Durch einen präparativen Restriktionsverdau (Abb. 18B) wurde das Turbo-GFP aus dem pCW57-GFP-Vektor entfernt und anschließend durch die SOCS1-Variante ersetzt. Die erfolgreiche Umklonierung wurde mittels eines analytischen Verdaus überprüft, dargestellt in Abb. 18C. Nach dem doppelten Verdau ist dabei eine Bande mit der SOCS1-Varianten-DNA bei circa 636bp zu erkennen, sowie eine weitere Bande mit der deutlich längeren pCW57-Plasmid-DNA.

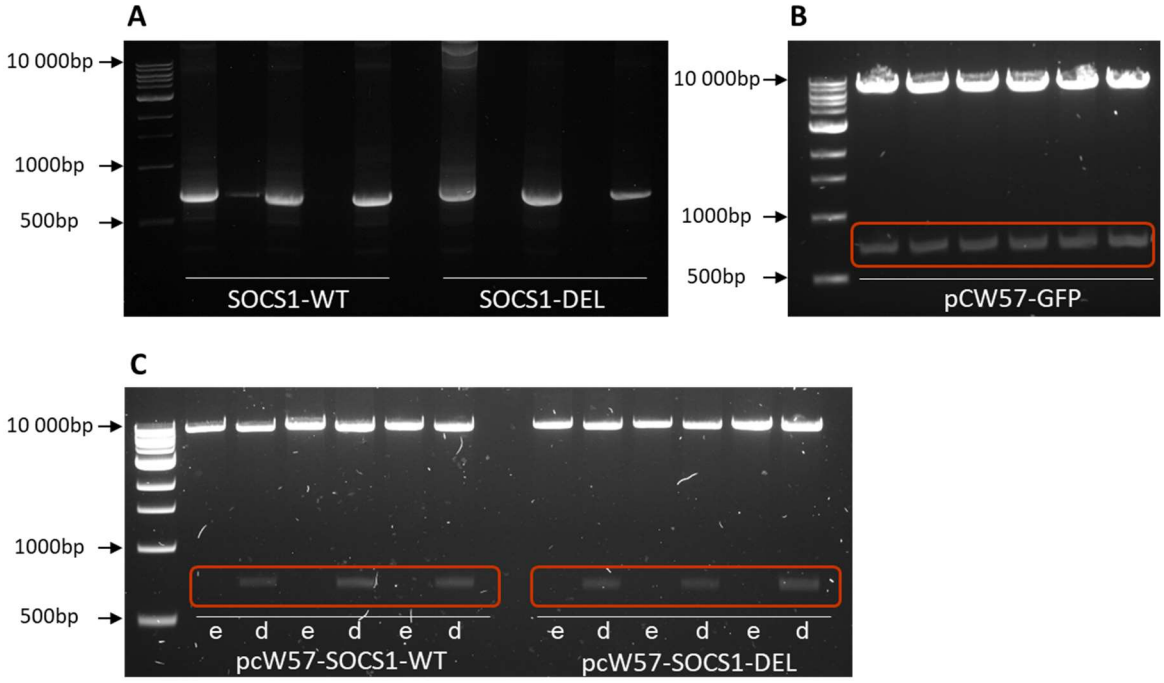


Abb. 18: Umklonierung der SOCS1-WT- und der SOCS1-DEL-cDNA in das pCW57-Vektorsystem. Zum Längenvergleich der DNA-Fragmente wurde ein 1kb-Marker verwendet. **A**: Agarose-Gelelektrophorese nach PCR. **B**: Präparativer Verdau des pCW57-GFP-Vektors. Rot umrandet sind die Banden des ausgeschnittenen Turbo-GFPs. **C**: Analytischer Verdau nach Ligation und Klonierung. Die ausgeschnittenen Banden der SOCS1-Varianten sind rot umrandet. d: doppelter Verdau, e: einfacher Verdau, bp: Basenpaare, GFP: Grün fluoreszierendes Protein. DEL: Deletion, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, WT: Wildtyp.

In Abbildung 19 ist exemplarisch der SOCS1-Wildtyp im pCW57-Vektorsystem dargestellt. Direkt vor der SOCS1-Gensequenz und dem N-terminalen HA-Tag liegt das Tet-On-System mit dem TRE (Tetracycline Response Element)-Promotor und dem Operator, welches nach Zugabe von Doxycyclin die Genexpression von *SOCS1* induziert.

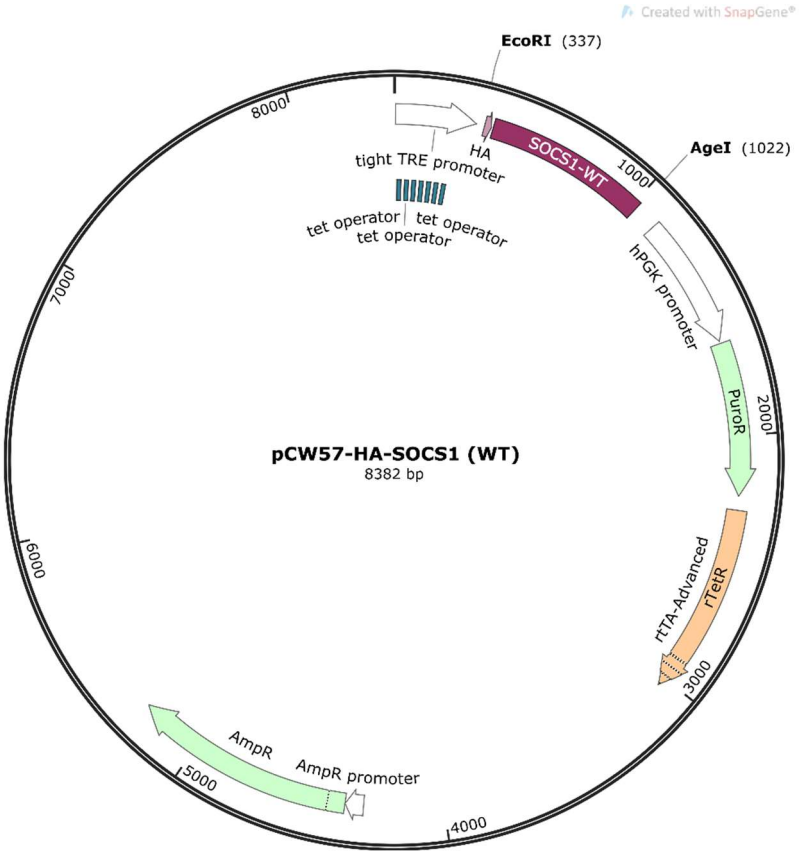


Abb. 19: Exemplarische Darstellung der SOCS1-Varianten im pCW57-Vektor: pCW57-HA-SOCS1-Wildtyp (WT) mit N-terminalem HA-Tag. Erstellt mit SnapGene. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (EcoRI und AgeI) sind gekennzeichnet. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen, HA: Hemagglutinin, hpGK: humane Phosphogylceratkinase, PuroR: Puromycin-Resistenzgen, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, TRE: Tetracycline Response Element, rTetR: reverse Tet-Repressor, rtTA: reverse tetracycline-controlled transactivator.

3.1.4 Überprüfung der Funktionalität des SOCS1-Tet-On-Vektorsystems pCW57

Um die Funktionalität des Vektorsystems bzgl. der induzierbaren Expression der SOCS1-Varianten zu überprüfen und die optimale Konzentration an Puromycin und Doxycyclin zu ermitteln, wurde der pCW57-Empty-Vektor und der pCW57-SOCS1-Wildtyp für eine kombinierte Transfektions-/Expressions-Analyse verwendet (Abb. 20). Der SOCS1-Wildtyp (WT) ist durch die Umklonierung in den pCW57-Vektor mit einem HA-Tag markiert, der Empty-Vektor (EV) trägt keine Markierung. Das Puromycin dient der Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen, das Doxycyclin zur Induktion des Vektorsystems. Zur Kontrolle wurden jeweils Proben ohne Puromycin bzw. ohne Doxycyclin verwendet. Nur in den Ansätzen, in welchen die Expression des Transgens mit Doxycyclin induziert wurde, ist auch das HA-markierte SOCS1-Protein im Western Blot detektierbar. Damit funktioniert das Tet-

On-System des pCW57-Vektors und es kommt erst nach Zugabe von Doxycyclin zur Expression der SOCS1-Variante. Für die weiteren Versuche wurde die Puromycin-Konzentration von 0,5µg/ml für die Selektion sowie die Doxycyclin-Konzentration von 100ng/ml für die Expressions-Induktion übernommen. Der Nachweis von Aktin als Housekeeper-Protein dient als Ladekontrolle in der Western Blot Analyse.

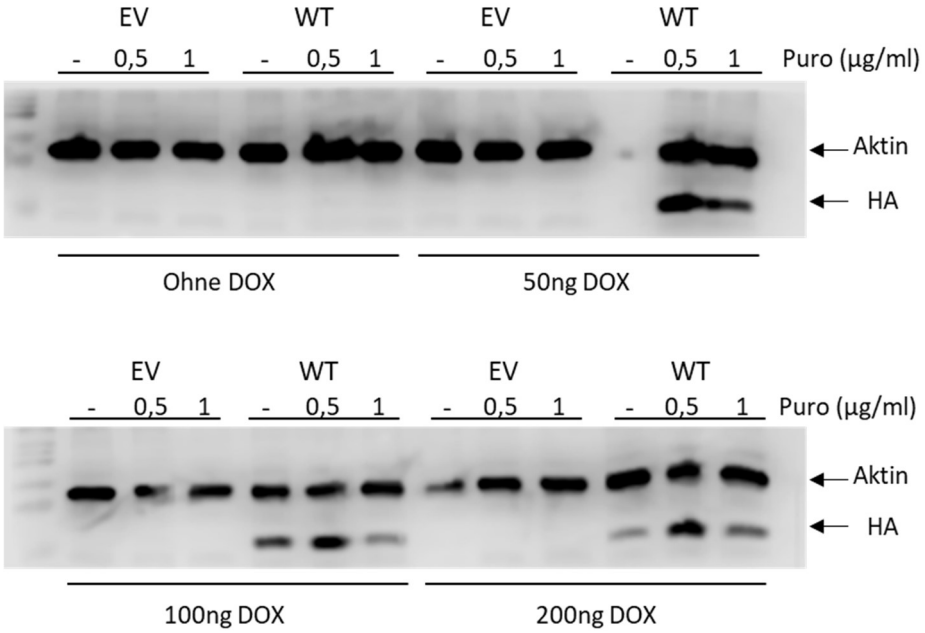


Abb. 20: Western Blot Analyse zur Überprüfung der pCW57-Funktionalität. Untersucht wurde der pCW57-GFP-2A-MCS-Vektor als Leer-Vektor (EV) und der pCW57-SOCS1-Wildtyp (WT). Konzentrationen Puromycin (Puro): kein Puromycin (-), 0,5µg/ml, 1µg/ml. Konzentrationen Doxycyclin (DOX): ohne Doxycyclin, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml. EV: Empty Vektor (Kontrolle), WT: SOCS1-Wildtyp.

3.1.5 Übersicht über die generierten SOCS1-Varianten

Abbildung 21 stellt einen zusammenfassenden Überblick über die die generierten SOCS1-Varianten auf Proteinebene dar. Insgesamt wurden Expressionsvektoren für sechs SOCS1-Minor-Mutanten und drei SOCS1-Major-Mutanten kloniert, die im Verlauf funktionell charakterisiert werden sollen. In Abb. 21A ist der SOCS1-Wildtyp (WT) mit seinen Domänen schematisch dargestellt. Mit Pfeilen sind die Stellen der jeweiligen Mutation gekennzeichnet. Die vollständige Aminosäuren-Sequenz ist in Abb. 21B aufgeführt, grau hinterlegt ist hierbei die Sequenz des SOCS1-Wildtyps (WT). Die Minor-Mutanten sind der Übersicht halber gemeinsam in einer Zeile dargestellt, mit gelb ist jeweils die Punktmutation der in der Klammer genannten Mutation markiert. Die Deletionen der Major-Mutanten sind mit rot markiert. Beim

SOCS1-Frameshift (FS) ist außerdem die, durch die Leseraster-Verschiebung, neu entstandene Aminosäurensequenz rot hervorgehoben.

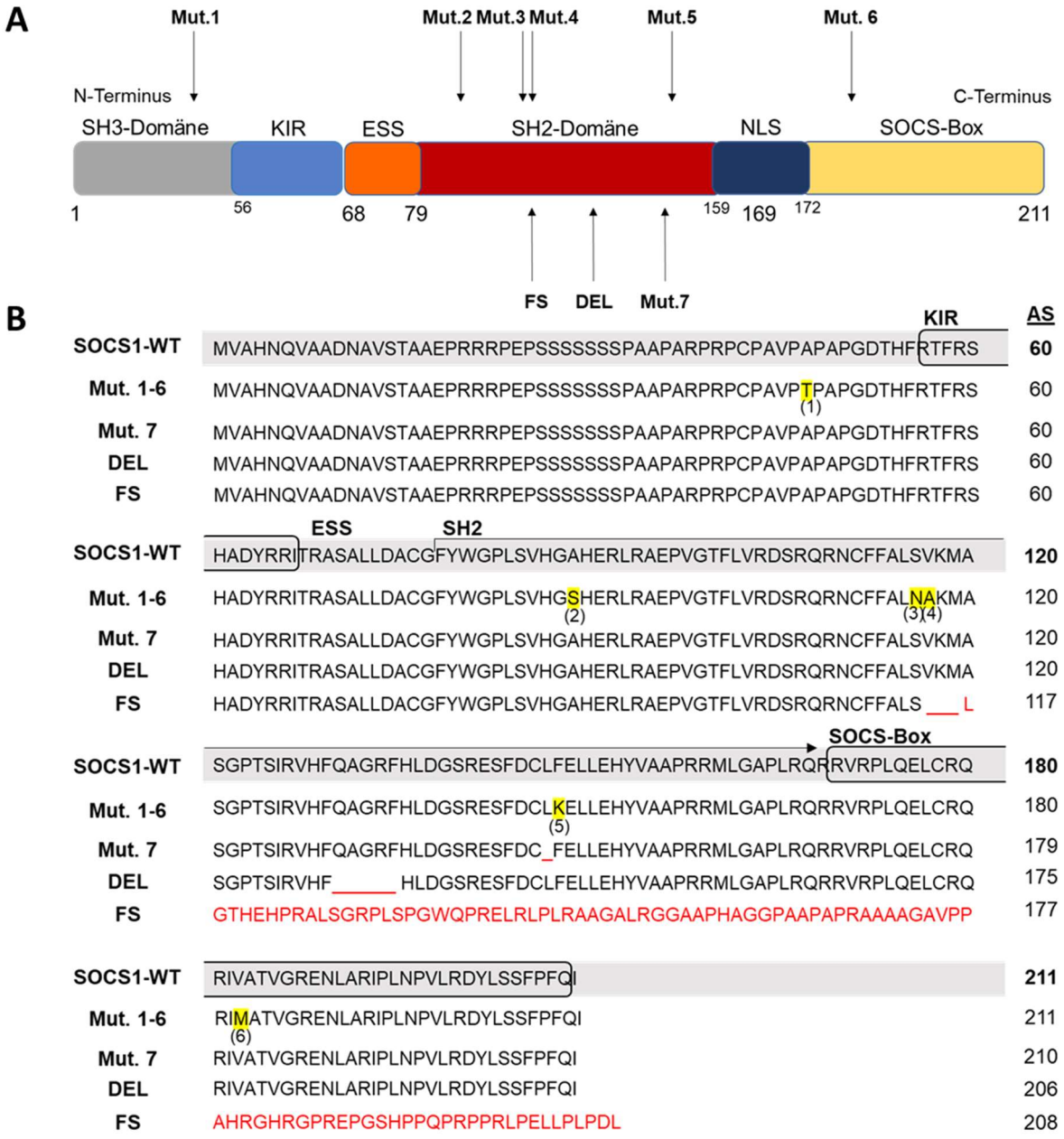


Abb. 21: Darstellung der erfolgreich generierten SOCS1-Varianten auf Proteinebene. **A**: Schematische Abbildung der SOCS1-Domänen und der Lokalisation der Mutationen. KIR: Kinase Inhibitory Region. ESS: Extended SH2 Subdomain NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz. **B**: Aminosäuren-Sequenz des SOCS1-Wildtyps und der Varianten. Dargestellt ist die Sequenz des Wildtyps (WT) mit Kennzeichnung der wichtigsten Proteindomänen. Die Minor-Mutanten (Mut.1-6) sind gemeinsam aufgeführt, die jeweilige Punktmutation ist gelb markiert und in Klammern () der Mutante zugeordnet. Deletionen sind mit einem rotem Unterstrich (_) gekennzeichnet, die Aminosäuren einer Leserasterverschiebung (Frameshift) sind ebenfalls rot geschrieben. AS: Aminosäurensequenz-Länge, WT: SOCS1-Wildtyp, DEL: SOCS1-Deletion, FS: SOCS1-Frameshift, Mut. 1-6: SOCS1-Minor-Mutanten 1-6, Mut.7: SOCS1-Mutation 7, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Im Folgenden werden die generierten SOCS1-Proteinvarianten mit tiefgestellten Kürzeln beschrieben. Der SOCS1-Wildtyp wird damit als $SOCS1_{WT}$, die SOCS1-Deletion als $SOCS1_{DEL}$ und der SOCS1-Frameshift als $SOCS1_{FS}$ bezeichnet. Die SOCS1-Minor-Mutanten werden beispielsweise mit $SOCS1_{MUT1}$ beschrieben, die SOCS1-Major-Mutante 7 wird $SOCS1_{MUT7}$ genannt. Wird durch die Expression des SOCS1-Proteins durch einen Vektor ein Protein-Tag mitexprimiert (z.B: FLAG oder HA), so geht dieser der Bezeichnung der SOCS1-Variante voran.

3.2 Einfluss der SOCS1-Varianten auf die STAT6-Aktivität

3.2.1 Die Minor-Mutationen haben keinen signifikanten Einfluss auf die hemmende Wirkung von SOCS1 auf die IL4-induzierte STAT6-Aktivierung

Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich die SOCS1-Minor-Mutanten genetisch nur durch eine einzelne Punktmutation vom wildtypischen SOCS1. Es wurde ein Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt, um einen möglichen Einfluss dieser Punktmutationen auf die Funktion von SOCS1 in Bezug auf die relative Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT6 festzustellen (Abb. 22A). Dabei wurden drei verschiedene Plasmid-Mengen pro Well (á 500µl) in die HEK-293-STAT6-Zellen transfiziert: 10ng, 50ng und 100ng. Als Kontrolle wurden 100ng des pFLAG-CMV2-Plasmids (Empty Vektor (EV)) verwendet.

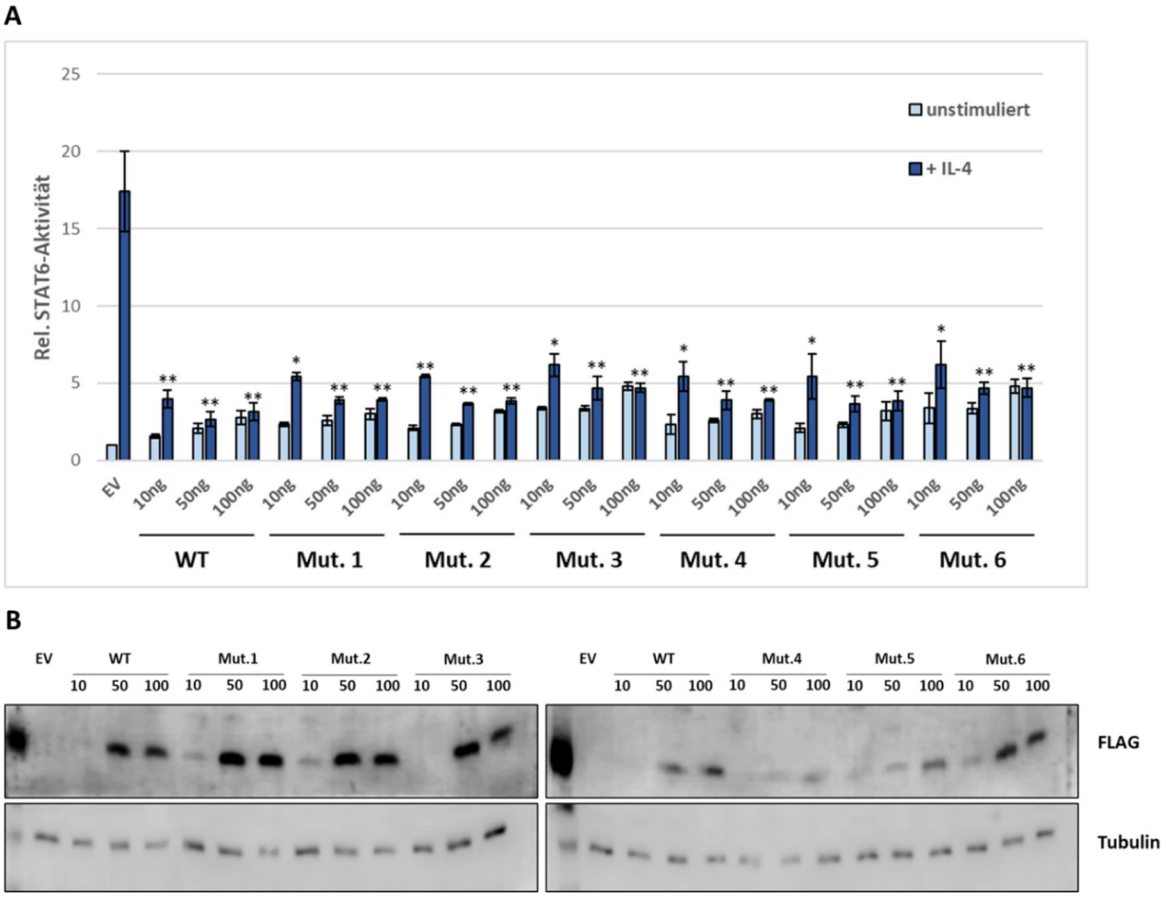


Abb. 22: Einfluss der SOCS1-Minor-Mutanten auf die STAT6-Aktivität. A: STAT6-Luciferase-Reporter-Assay der SOCS1-Minor-Mutanten. Es wurden verschiedene Konzentrationen der Plasmide pro Well (á 500µl) transfiziert: 10ng, 50ng, 100ng. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IL-4 Stimulation (5ng/ml). Die relative STAT6-Aktivität (Rel. STAT6-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). **B**: Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression der FLAG-SOCS1-Proteine. Die Western Blot Analyse von Tubulin dient als Nachweis gleichmäßiger Proteinladung. IL: Interleukin, EV: Empty Vektor (pFLAG-CMV2, Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1-Wildtyp ($SOCS1_{WT}$), Mut.: Mutation, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

Nach 18h Stimulation mit IL-4 kommt es in der Kontrolle zu einem deutlichen Anstieg der relativen STAT6-Aktivität. Im Vergleich dazu zeigt der FLAG-$SOCS1_{WT}$, wie erwartet, in den verschiedenen Konzentrationen eine signifikante Abnahme der relativen IL4-vermittelten STAT6-Aktivität. Die Expression der Minor-Mutanten 1-6 führt ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung der STAT6-Aktivität, ähnlich dem Effekt des wildtypischen Proteins. Auffallend ist, dass die basale STAT6-Aktivität bei allen verwendeten SOCS1-Varianten, auch beim $SOCS1_{WT,}$ mit Zunahme der transfizierten Plasmid-Konzentration ansteigt. Der Unterschied zur Kontrolle ist

dabei, mit Ausnahme der der geringsten Menge der $SOCS1_{MUT4}$ und der $SOCS1_{MUT6}$, signifikant (Signifikanzen siehe Anhang, Tabelle 18). Die gelungene Transfektion der Plasmide in die Zellen wurde mit einem Nachweis des FLAG-Tags im Western Blot belegt (Abb. 22B).

In Abbildung 23 sind die Effekte der Minor-Mutanten auf die relative STAT6-Aktivität nochmals dem wildtypischen SOCS1 gegenübergestellt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der Minor-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Zusammenfassend kann man aus diesen Experimenten schließen, dass die untersuchten Punktmutationen im SOCS1-Gen keinen signifikanten Einfluss auf die hemmende Funktion von SOCS1 im Kontext der IL-4-induzierten STAT6-Aktivität haben.

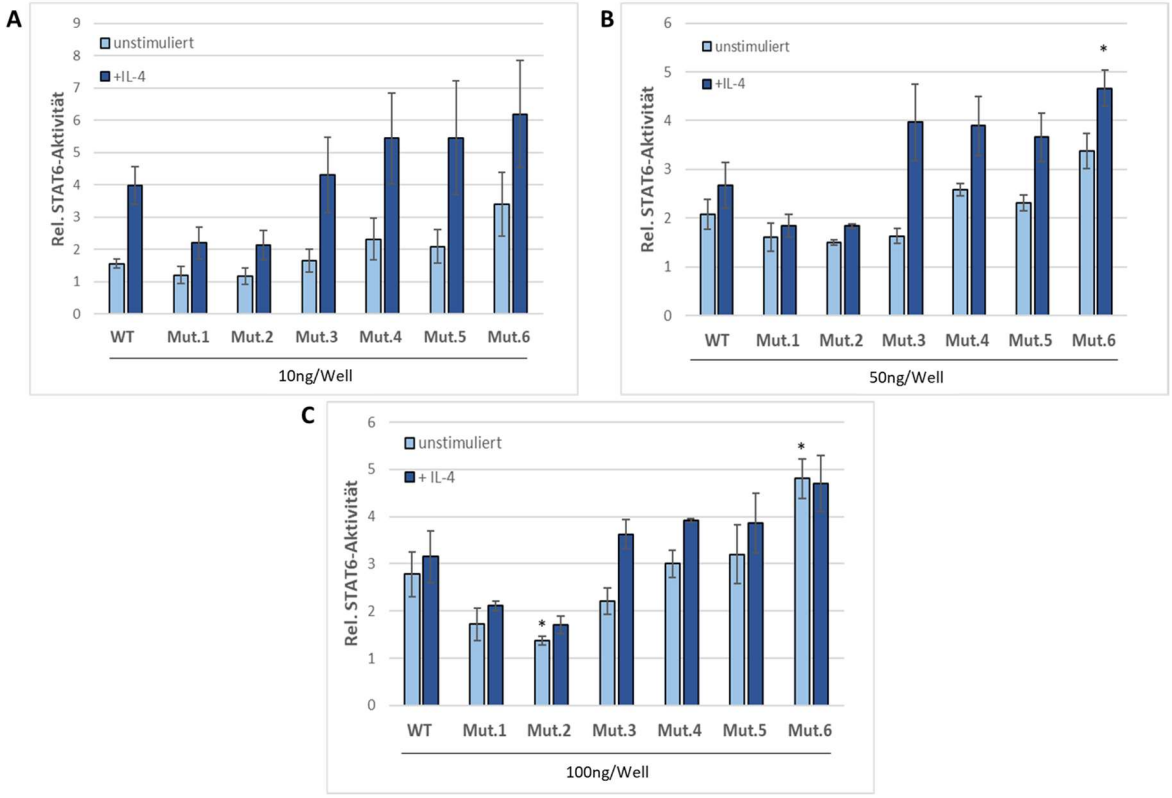


Abb. 23: Vergleich der SOCS1-Minor-Mutanten mit dem SOCS1-Wildtyp hinsichtlich der Beeinflussung der STAT6-Aktivität im STAT6-Luciferase-Reporter-Assay. A: 10ng/Well, **B**: 50ng/Well, **C**:100ng/Well. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IL-4 Stimulation (5ng/ml). Die relative STAT6-Aktivität (Rel. STAT6-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (SOCS1-Wildtyp vs. SOCS1-Minor-Mutante). IL-4: Interleukin 4, WT: FLAG-SOCS1-Wildtyp ($SOCS1_{WT}$), Mut.: FLAG-Mutation (1-6), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

3.2.2 Änderung der STAT6-Aktivität durch SOCS1-Major-Mutanten

Um die Ergebnisse der Vorarbeit weiter zu verfolgen, wurde das STAT6-Luciferase-Reporter-Assay mit dem $SOCS1_{WT}$, der $SOCS1_{DEL}$ und der neu klonierten Major-Mutante 7 ($SOCS1_{MUT7}$) im pFLAG-CMV2-Vektor wiederholt (Abb. 24A). Durch eine Deletion fehlt der $SOCS1_{MUT7}$ im Vergleich zum wildtypischen SOCS1 eine Aminosäure (Isoleucin) in der SH2-Domäne. Verwendet wurde für das Luciferase-Reporter-Assay eine Plasmid-Konzentration von 250ng/0,5ml, die Zellen wurden nach der Transfektion entweder für 18h mit IL-4 (5ng/ml) stimuliert oder unbehandelt belassen.

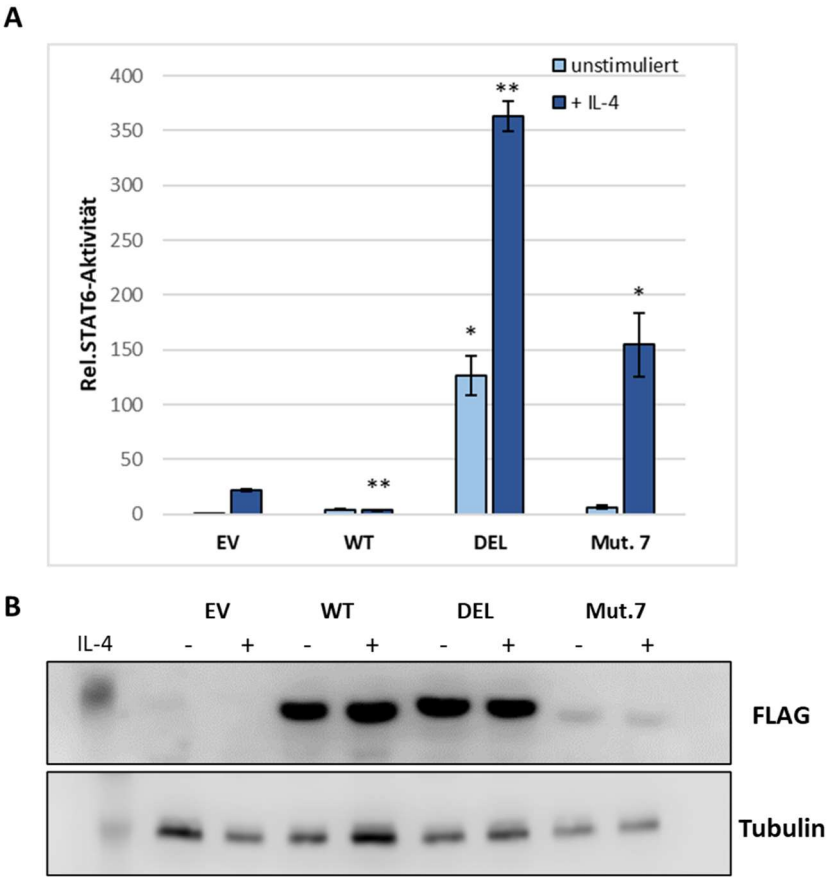


Abb. 24: Einfluss des SOCS1-Wildtyps und der SOCS1-Major-Mutanten auf die STAT6-Aktivität. **A**: STAT6-Luciferase-Reporter-Assay. Vektor-Konzentration: 250ng/0,5ml. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IL-4 Stimulation (5ng/ml). Die relative STAT6-Aktivität (Rel. STAT6-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). **B**: Nachweis der FLAG-SOCS1-Expression in der Western Blot Analyse. -: unstimuliert, +: nach IL-4 Stimulation. IL-4: Interleukin 4, EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-$SOCS1_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-$SOCS1_{DEL}$ (Deletion), Mut.7: FLAG-$SOCS1_{MUT7}$ (Mutante 7), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

Wie erwartet führt die Expression des FLAG-SOCS1$_{WT}$ nach 18h IL-4-Stimulation wieder zu einer signifikanten Abnahme der relativen STAT6-Aktivität. Im Vergleich zum Empty-Vektor (Kontrolle), welcher nach IL-4-Stimulation eine 22-fach höhere STAT6-Aktivität als die unstimulierte Kontrolle zeigt, erhöht der FLAG-SOCS1$_{WT}$ die STAT6-Aktivität nur auf das 4-fache. Die Major-Mutante FLAG-SOCS1$_{DEL}$ dagegen erzielt einen sehr starken Anstieg der relativen STAT6-Aktivität. Dieser ist sowohl nach IL-4-Stimulation (363-fach) als auch in der unstimulierten Gruppe (126-fach) erkennbar, was einen Hinweis auf eine mögliche konstitutive STAT6-Aktivierung gibt. Da in diesem Versuch 250ng Plasmid pro Well verwendet wurden, eine höhere Konzentration als in den anderen Luciferase-Reporter-Assays, scheint diese Aktivierung zudem konzentrationsabhängig zu sein. Auch die FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ erhöht die relative STAT6-Aktivität signifikant auf das 155-fache, allerdings nur in der zytokinstimulierten Gruppe. Zum Nachweis der gelungenen Transfektion der Plasmide in die Zellen wurden die FLAG-SOCS1-Varianten in einer Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 24B).

3.2.3 Bestätigung des Effekts der SOCS1$_{DEL}$ mithilfe des pCW57-Vektorsystems

Um den Effekt der SOCS1-Major-Mutanten, insbesondere der SOCS1$_{DEL}$, auf STAT6 weiter zu validieren, wurde ein Luciferase-Reporter-Assay mit dem SOCS1$_{WT}$ und der SOCS1$_{DEL}$ im pCW57-Vektorsystem durchgeführt (Abb. 25A). Es wurden drei verschiedene Vektormengen pro Well á 0,5ml untersucht: 10ng, 50ng und 100ng. Durch Expression des pCW57-Vektors werden die SOCS1-Varianten mit einem N-terminalen HA-Protein-Tag markiert.

Auch hier führt die ektopische Expression von HA-SOCS1$_{WT}$ wieder zu einer signifikanten Abnahme der relativen, IL4-induzierten STAT6-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (EV). HA-SOCS1$_{DEL}$ dagegen führt, wie bereits mit dem pFLAG-SOCS1$_{DEL}$-Vektor beobachtet, zu einer signifikanten Erhöhung der relativen STAT6-Aktivität. Dabei stellt sich die Aktivitätserhöhung konzentrationsabhängig dar, bei 100ng transfiziertem pCW57- SOCS1$_{DEL}$-Vektor wird der höchste Wert mit 43-fach erhöhter STAT6-Aktivität erreicht.

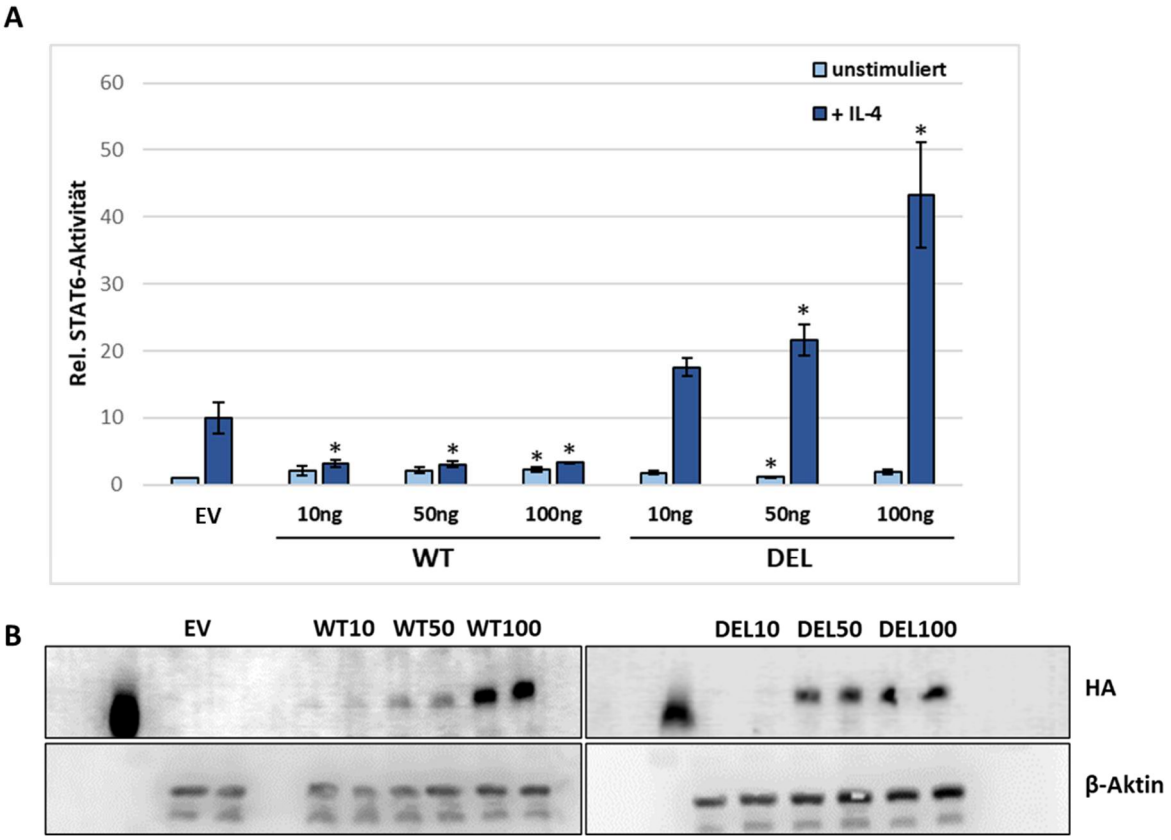


Abb. 25: Effekt der SOCS1-Varianten im pCW57-Vektorsystem auf die STAT6-Aktivität. Nach Selektion mit 0,5µg/ml Puromycin und Induktion mit 100ng/ml Doxycyclin. **A**: STAT6-Luciferase-Reporter-Assay. Es wurden verschiedene Vektor-Konzentrationen pro Well (á 500µl) transfiziert: 10ng, 50ng, 100ng. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IL-4 Stimulation (5ng/ml). Die relative STAT6-Aktivität (Rel. STAT6-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). **B**: HA-Nachweis im Western Blot. IL-4: Interleukin 4, EV: Empty Vektor (Kontrolle), WT: HA-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: HA-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6, HA: Hemagglutinin.

Die erfolgreiche Transfektion des jeweiligen Vektors wurde im Western Blot überprüft (Abb. 25B), hier kann der N-terminale HA-Tag der HA-SOCS1-Varianten detektiert werden. Als Kontrolle wurde der Nachweis des Proteins Aktin verwendet.

Zusammenfassend konnte der stark aktivierende Effekt der SOCS1$_{DEL}$-Variante auf die STAT6-Aktivität unter Nutzung verschiedener Vektorysteme bestätigt werden.

3.2.4 Möglicher Einfluss des N-terminalen FLAG-/HA-Tags auf die SOCS1-Funktion

Im pFLAG- und im pCW57-Vektorsystem sind die SOCS1-Varianten mit einem N-terminalen FLAG- bzw. HA-Tag markiert, um die erfolgreiche Transfektion des Vektors bzw. Expression der SOCS1-Variante kontrollieren zu können. Diese N-terminale Markierung liegt direkt an der KIR (Kinase-Inhibitorische Region) von SOCS1. Da diese Region einen wichtigen Teil der Rolle von SOCS1 als negativer Regulator des JAK-STAT-Signalwegs ausmacht, wurde einer möglichen Beeinflussung der SOCS1-Funktion durch den N-terminalen Tag nachgegangen. Dazu wurde die $SOCS1_{WT}$-cDNA und die cDNAs der beiden Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{FS}$ in ein weiteres Vektorsystem umkloniert. Das pcDNA3.1-Plasmid trägt keinen Tag zur Markierung der SOCS1-Variante, während das pcDNA3-GFP-Plasmid ein zu der „multiple-cloning-site“ C-terminal liegendes GFP-Gen besitzt, das zu einem Größenunterschied von 600 bp führt. Durch den Einbau der SOCS1-Varianten in letzteres Plasmid kam es zu einem Stoppcodon vor dem Gen für das GFP, welches dadurch nur noch im Leervektor exprimiert wurde. Die Vektoren wurden in HEK-293-STAT6-Zellen transfiziert und die STAT6-Aktivität anhand von Luciferase-Reporter-Assays, ohne und mit IL-4-Stimulation für 18h, untersucht (Abb. 26).

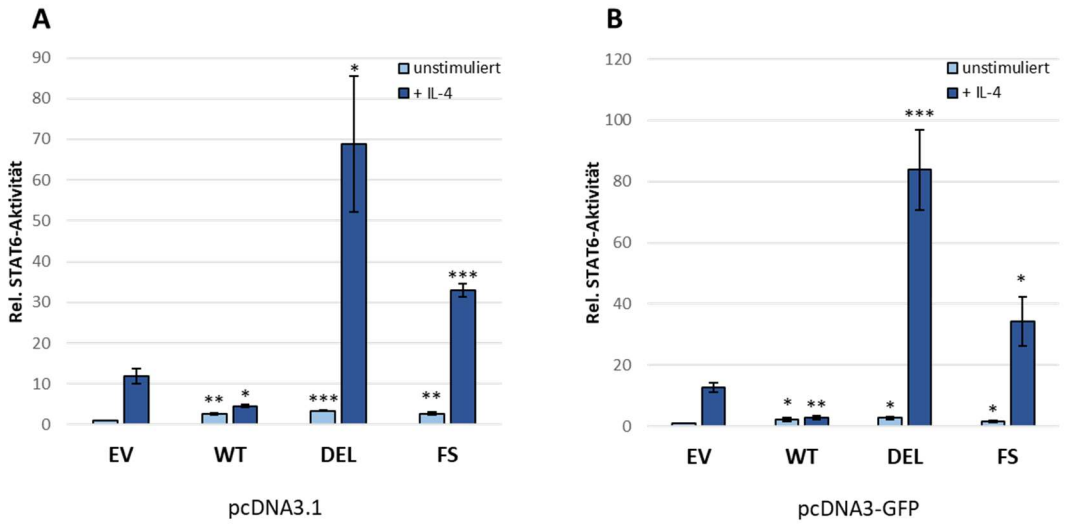


Abb. 26: STAT6-Luciferase-Reporter-Assay unter Verwendung des $SOCS1_{WT}$ (WT) und der Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$ (DEL) und $SOCS1_{FS}$ (FS). Verwendet wurden jeweils 100ng Plasmid pro Well (á 500µl). hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IL-4 Stimulation (5ng/ml). **A**: pcDNA3.1-Vektor. **B**: pcDNA3-GFP-Vektor. Die relative STAT6-Aktivität (Rel. STAT6-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). IL-4: Interleukin 4, EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-$SOCS1_{WT}$ (Wildtyp), DEL: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-$SOCS1_{DEL}$ (Deletion), FS: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-$SOCS1_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.

Bei der Luciferase-Messung zeigen sich hier erwartungsgemäß sehr ähnliche Ergebnisse, da neben den leichten Größenunterschieden der Plasmide nur SOCS1-Varianten ohne Peptid-Tag exprimiert wurden. Die Expression des SOCS1-Wildtyp führt nach IL-4 Stimulation, wie auch in den anderen untersuchten Vektorsystemen, zu einer signifikanten Abnahme der relativen STAT6-Aktivität verglichen mit der Kontrolle. Die $SOCS1_{DEL}$-Variante hat, wie in den vorangegangenen Versuchen, einen starken Anstieg der STAT6-Aktivität zur Folge. Der Effekt der $SOCS1_{FS}$-Variante im pcDNA3-Vektor unterscheidet sich jedoch von den Vorversuchen mit der $SOCS1_{FS}$-Variante im pFLAG-Plasmid. Ohne N-terminales FLAG-Peptid kommt es bei Verwendung dieser $SOCS1_{FS}$-Variante zu einem Anstieg der relativen STAT6-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Im Vorversuch war dies nicht der Fall, hier hat die FLAG-$SOCS1_{FS}$-Variante eher der Kontrollgruppe entsprochen. Der Einfluss der $SOCS1_{FS}$-Variante auf die STAT6-Promoteraktivität scheint also durch einen N-terminalen Protein-Tag beeinflusst zu werden. Beim SOCS1-Wildtyp und der $SOCS1_{DEL}$-Variante ist dies nicht der Fall. Vergleicht man außerdem alle

unstimulierten, unmarkierten SOCS1-Varianten mit der Kontrolle, so findet sich, wie auch teilweise bei den anderen Plasmiden mit Tag, eine geringe, aber signifikante, Erhöhung der relativen basalen STAT6-Aktivität.

3.2.5 Die erhöhte STAT6-Aktivität lässt sich nicht durch eine vermehrte Phosphorylierung erklären

In den durchgeführten Luciferase-Reporter-Assays konnte eine deutliche Beeinflussung der STAT6-Aktivität durch die SOCS1-Major-Mutanten gezeigt werden. Mit dem Assay wurde bisher die Genexpression auf Transkriptionsebene untersucht, die STAT6-Aktivität ist dabei auf eine erhöhte Bindung von STAT6 an die GAS-Elemente in der Kontrollregion des Luciferase-Reporterplasmids zurückzuführen. Da dies durch eine gesteigerte STAT6-Phosphorylierung erklärbar sein könnte, wurde im Folgenden die Menge des phosphorylierten STAT6 (pSTAT6) auf Proteinebene im Western Blot geprüft. Die Phosphorylierung bezieht sich hierbei auf die Phosphorylierung an der Aminosäure Y641 (Tyrosin) von STAT6, an welche der hier verwendete Antikörper bindet. Zur ersten Überprüfung dieser Hypothese wurde exemplarisch eine STAT6/pSTAT6-Western Blot Analyse mit unterschiedlichen Mengen der SOCS1-Varianten durchgeführt (Abb. 27).

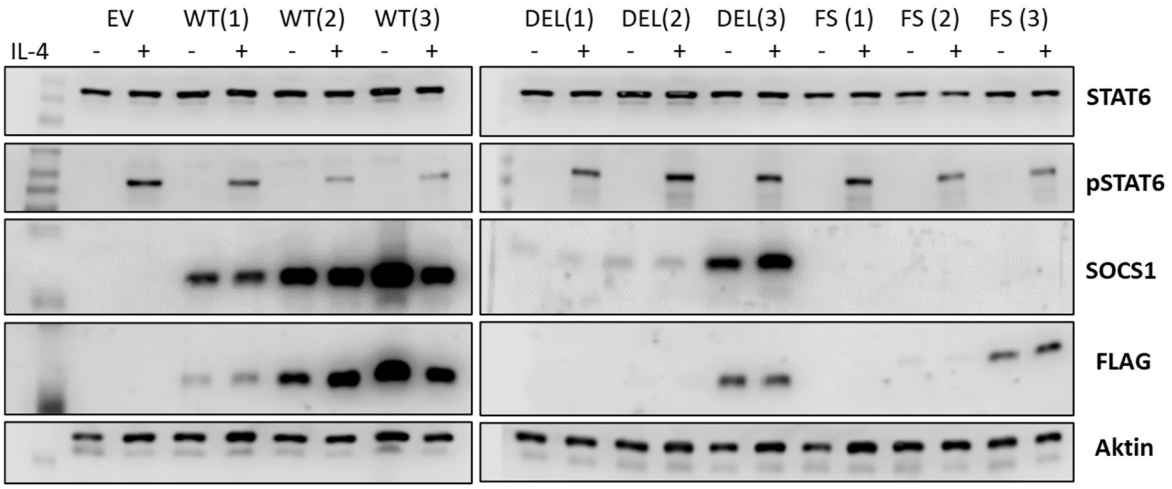


Abb. 27: STAT6/pSTAT6-Western Blot Analyse nach Ko-Expression von FLAG-SOCS1$_{WT}$ und den Major-Mutanten FLAG-SOCS1$_{DEL}$ und FLAG-SOCS1$_{FS}$. Untersucht wurden verschiedene Plasmid-Mengen pro Well (á 500µl): (1): 50ng, (2): 100ng, (3): 250ng, jeweils unstimuliert (IL-4 -) und nach 30min IL-4-Stimulation (IL-4 +, 5ng/ml). Für den EV (Kontrolle) wurden 250ng Plasmid verwendet. IL-4: Interleukin 4, EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6, pSTAT6: an Y641 phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 6.

Das unphosphorylierte STAT6-Protein wird dabei in allen SOCS1-Varianten und auch in der Kontrolle (EV) gleich stark exprimiert. Die Stimulation mit IL-4 induziert die Phosphorylierung von STAT6 und es ist erkennbar, dass der FLAG-SOCS1$_{WT}$ hier wie erwartet zu einer Abnahme von pSTAT6 im Vergleich zur Kontrolle führt. Bei FLAG-SOCS1$_{DEL}$ wäre nach den Ergebnissen der Luciferase-Reporter-Assays ein vermehrter Nachweis der basalen sowie der IL-4-induzierten STAT6-Phosphorylierung zu erwarten gewesen, allerdings zeigt sich in diesen Western Blot Analyse kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Die Detektion von SOCS1 und des FLAG-Epitops weist eine erfolgreiche Transfektion der Plasmide nach, wobei der SOCS1$_{WT}$ am höhsten exprimiert wird, da hier auch bei den geringeren Plasmid-Konzentrationen ein SOCS1- und ein FLAG-Signal zu erkennen ist. Da der SOCS1-Antikörper an das C-terminale Ende von SOCS1 bindet und dieses beim FLAG-SOCS1$_{FS}$ durch die Leserasterverschiebung in seiner Aminosäurensequenz verändert ist, kann bei der SOCS1$_{FS}$-Variante kein SOCS1-Signal beobachtet werden.

Da die Western Blot Analyse unter Verwendung ansteigender Mengen der SOCS1-Varianten nach 30min IL-4-Stimulation keine Erklärung für die Ergebnisse der Luciferase-Reporter-Assays liefert, wurden im Folgenden verschiedene IL-4-Stimulationszeiten beispielhaft untersucht (Abb. 28 und 29).

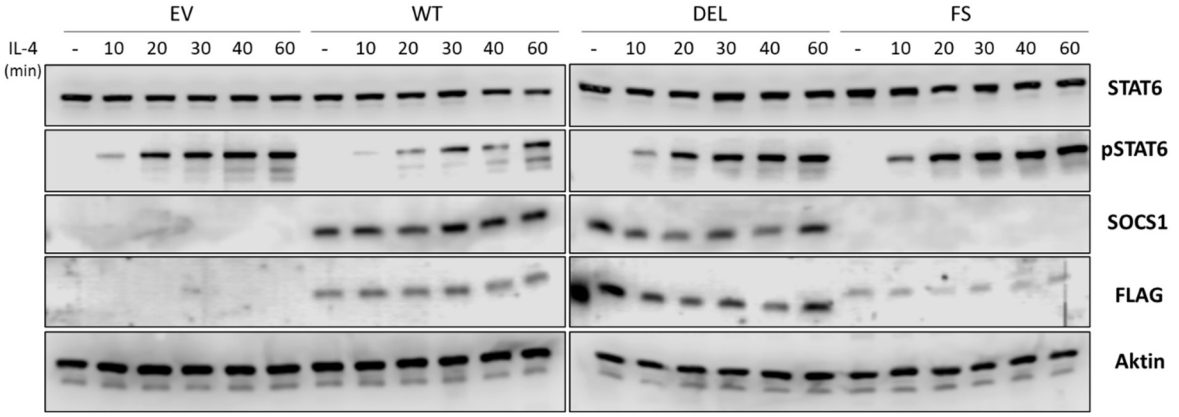


Abb. 28: STAT6/pSTAT6-Western Blot Analysen nach Ko-Expression von FLAG-SOCS1$_{WT}$ und der Major-Mutanten FLAG-SOCS1$_{DEL}$ sowie FLAG-SOCS1$_{FS}$: Kurzzeit-IL4-Kinetik. Plasmid-Konzentration: 100ng/ml. Stimulation mit IL-4 (5ng/ml) zu unterschiedlichen Zeiten: unstimuliert (-), 10min, 20min, 30min, 40min, 60min Stimulation. IL: Interleukin, EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6, pSTAT6: an Y641 phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 6.

Bei den kürzeren Stimulationszeiten (Abb. 28) lässt sich der Anstieg von phosphoryliertem STAT6 bereits 10min nach Zytokinzugabe beobachten. Beim FLAG-SOCS1$_{WT}$ scheint dieser erwartungsgemäß geringer auszufallen, bei FLAG-SOCS1$_{DEL}$ sowie FLAG-SOCS1$_{FS}$ ist kein Unterschied zum Leervektor erkennbar.

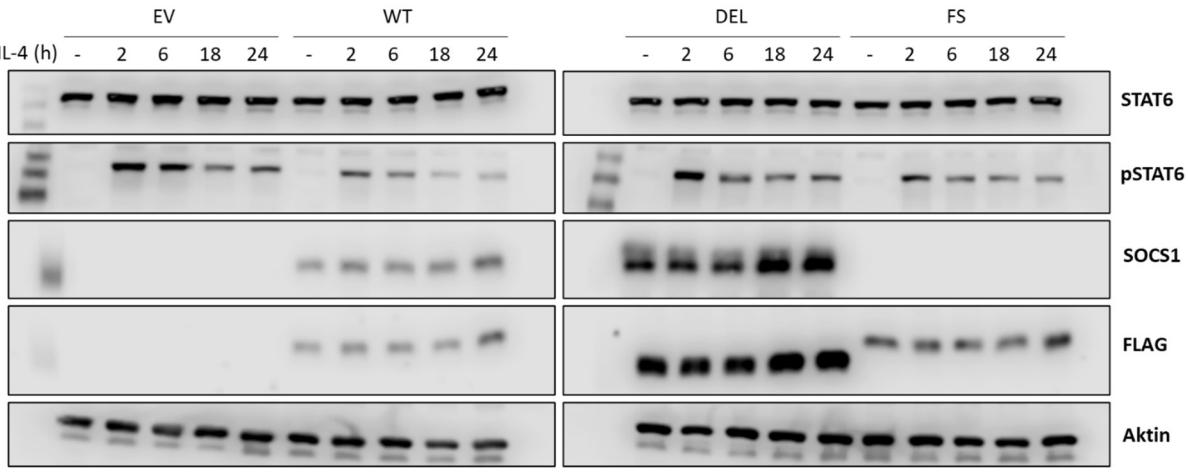


Abb. 29: STAT6/pSTAT6-Western Blot Analysen nach Ko-Expression von FLAG-SOCS1$_{WT}$ und der Major-Mutanten FLAG-SOCS1$_{DEL}$ sowie FLAG-SOCS1$_{FS}$: Langzeit-IL4-Kinetik. Plasmid-Konzentration: 100ng/ml. Stimulation mit IL-4 (5ng/ml) zu unterschiedlichen Zeiten: unstimuliert (-), 2h, 6h, 18h, 24h Stimulation. IL: Interleukin, EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6, pSTAT6: an Y641 phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 6.

Betrachtet man die längeren Stimulationszeiten von bis zu 24h (Abb. 29), so scheint es am ehesten nach 2h IL-4-Stimulation zu einem Unterschied der pSTAT6-Spiegel bei den SOCS1-Varianten zu kommen. Die FLAG-SOCS1$_{FS}$-Variante ähnelt dabei dem FLAG-SOCS1$_{WT}$ mit einem augenscheinlich geringeren pSTAT6-Vorkommen, während der pSTAT6-Spiegel bei der Expression der FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante eher der Bande der Kontrolle entspricht. Generell stellt es sich als schwierig heraus, bei allen SOCS1-Varianten eine ähnliche Expressionshöhe zu erreichen. Oft ist die SOCS1$_{DEL}$-Variante auf Basis der anti-FLAG-Western Blot Analyse am stärksten nachzuweisen.

Da es nach den vorausgegangen Western Blot Analysen am ehesten nach 2h IL-4-Stimulation zu einer Veränderung der STAT6-Phosphorylierung durch die SOCS1-Varianten kommt, wurde dieser Zeitraum im Folgenden nochmals genauer betrachtet (Abb. 30). Es wurden drei biologische Replikate angefertigt, in Western Blot Analysen verwendet und die Resultate wurden anschließend quantifiziert.

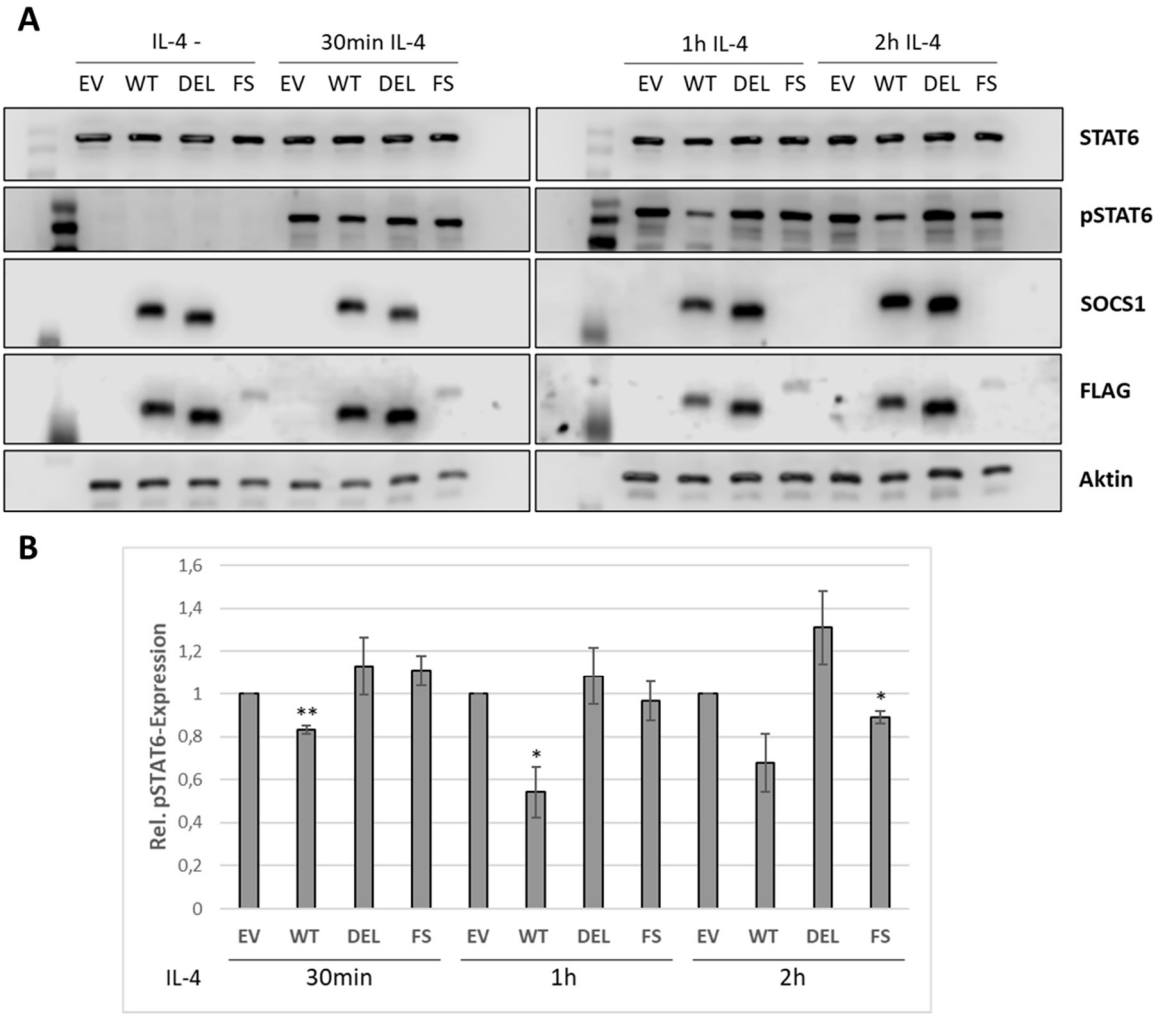


Abb. 30: Einfluss der FLAG-SOCS1-Varianten auf die IL4-induzierte STAT6-Phosphorylierung. Stimulation mit IL-4 (5ng/ml) zu unterschiedlichen Zeiten: unstimuliert (-), 30min, 1h, 2h Stimulation. **A**: Repräsentative Western Blot Analysen. **B**: Quantifizierung der Western Blot Analysen. Die relative pSTAT6-Expression (Rel. pSTAT6-Expression) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3) und gegen die Ladekontrolle (hier Aktin) normalisiert, ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die drei Gruppen der Zytokinstimulations-Dauer (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). IL-4: Interleukin 4, EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6, pSTAT6: an Y641 phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transcription 6.

Wie in den vorausgegangenen Western Blot Analysen bereits erkennbar, bewirkt der FLAG-SOCS1$_{WT}$ eine Verminderung der IL4-induzierten STAT6-Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle, welche bis auf den Wert nach 2h Zytokinstimulation (p=0,0747) signifikant ist. Die SOCS1-Varianten FLAG-SOCS1$_{DEL}$ und FLAG-SOCS1$_{FS}$ führen dagegen zu keiner Abnahme, aber auch zu keiner signifikanten Zunahme der pSTAT6-Expression und unterscheiden sich demnach nicht signifikant von der Situation mit dem Leervektor. Eine Ausnahme

stellt die FLAG-SOCS1$_{FS}$-Mutante nach 2h IL-4-Stimulation dar, hier wird eine signifikante Abnahme von pSTAT6 beobachtet. Zusammenfassend scheint also der negative Effekt des SOCS1$_{WT}$ auf die pSTAT6-Expression durch die Mutanten wegzufallen, die erhöhte Aktivität von STAT6 bei der SOCS1$_{DEL}$ im Luciferase-Reporter-Assay lässt sich allerdings nicht durch eine vermehrte Phosphorylierung erklären.

3.2.6 Einfluss der SOCS1-Varianten auf die STAT6-abhängige Genexpression

In den Luciferase-Reporter-Assays wurde eine, durch die SOCS1-Major-Mutanten bedingte, erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT6 detektiert. Dieser positive Effekt der SOCS1-Major-Mutanten sollte im Weiteren mittels NGS unter Verwendung der RNA von HEK-293-STAT6-Zellen, welche mit den verschiedenen SOCS1-Varianten transfizierten wurden, überprüft werden. Untersucht wurden drei biologische Replikate einer Kontrollgruppe (EV, Leervektor), nach pFLAG-SOCS1$_{WT}$-, nach pFLAG-SOCS1$_{DEL}$- sowie nach pFLAG-SOCS1$_{FS}$-Transfektion, jeweils unstimuliert und nach 30min IL-4-Stimulation.

Abbildung 31 zeigt in einer Heatmap, wie die Genexpression unter basalen Bedingungen (ohne IL-4-Stimulation) durch die SOCS1- Varianten beeinflusst wird. Die drei biologischen Replikate der SOCS1-Varianten bzw. der Kontrolle sind im oberen Teil der Abbildung farblich markiert. Entsprechend der Legende sind hochregulierte, also verstärkt exprimierte, Gene in Rotnuancen gefärbt, vermindert exprimierte Gene sind in Grünnuancen dargestellt. Betrachtet werden dabei jeweils absolute Werte. Gene mit einer Expression von 0 sind schwarz dargestellt. Diese Heatmap soll vor allem als eine erste Übersicht zum Vergleich der SOCS1-Varianten dienen.

Besonders die SOCS1-Major-Mutante SOCS1$_{DEL}$ (orange markiert) ist hier auffällig, da sie einen Kontrast zu den drei anderen Gruppen (Kontrollgruppe, SOCS1$_{WT}$, SOCS1$_{FS)}$ bildet. Viele Gene, welche durch eben diese drei Gruppen vermindert exprimiert werden, liegen bei der SOCS1$_{DEL}$-Variante verstärkt vor und umgekehrt. Am stärksten unterscheidet sich die SOCS1$_{DEL}$-Variante dabei vom wildtypischen SOCS1. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die SOCS1-Major-Mutante SOCS1$_{FS}$ dem Empty Vektor (Kontrolle) ähnelt und damit am ehesten einem Funktionsverlust von SOCS1 entspricht.

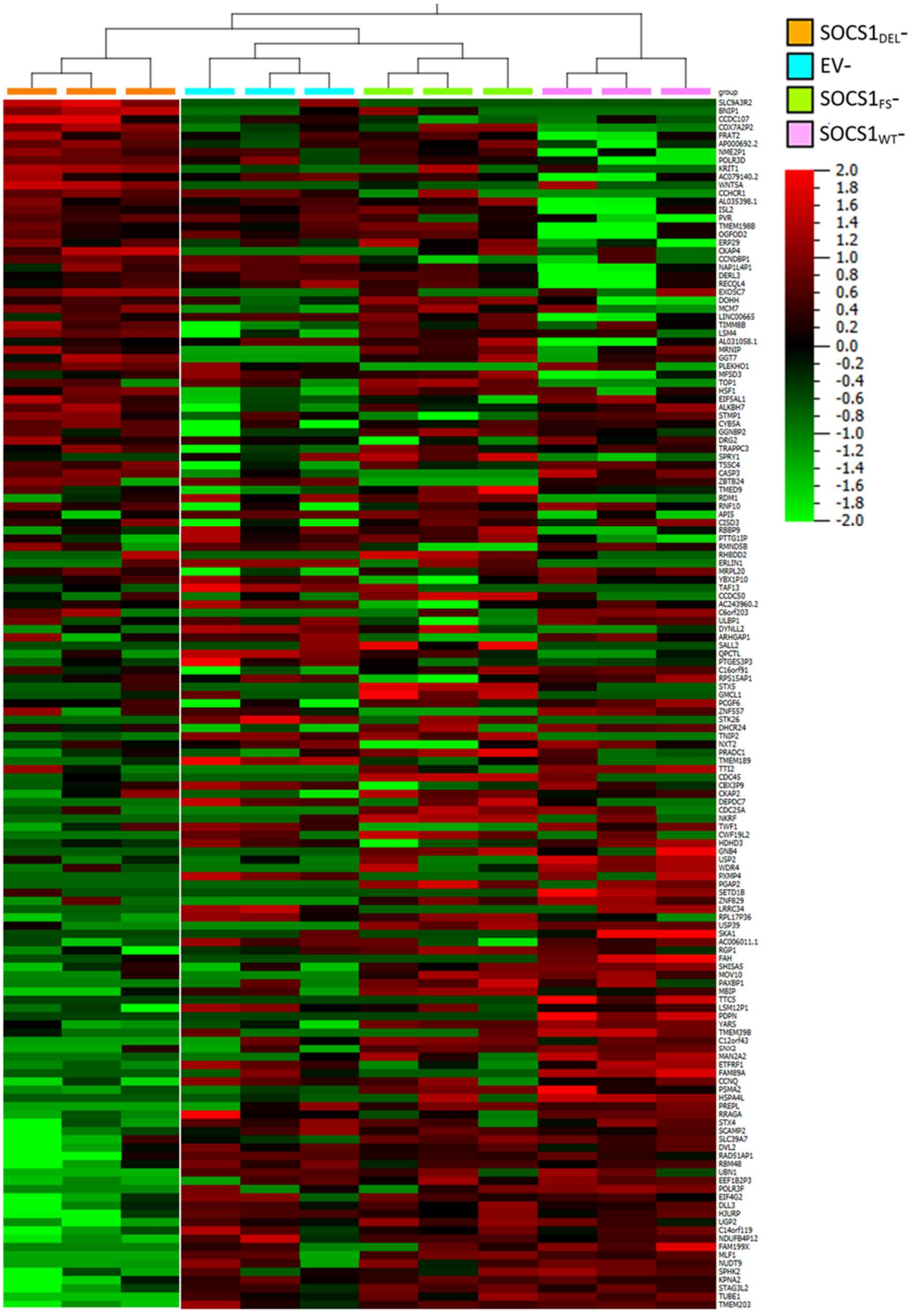


Abb. 31: Heatmap der durch die SOCS1-Varianten beeinflussten Genexpression unter basalen Bedingungen (unstimuliert (-)). Erstellt mit Qlucore Omics Explorer ($p \leq 0{,}05$). Die drei biologischen Replikate der SOCS1-Varianten bzw. der Kontrolle sind farblich markiert: orange=$SOCS1_{DEL}$, hellblau= EV, hellgrün= $SOCS1_{FS}$, rosa=$SOCS1_{WT}$. Die Farbskala reicht von hochregulierten Genen in Rotnuancen bis herunterregulierte Gene in Grünnuancen (siehe Legende). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-$SOCS1_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-$SOCS1_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-$SOCS1_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1.

Im Folgenden werden die Steigerungen sowie die Verminderungen in der Genexpression der Kontrollgruppe und den Gruppen der verschiedenen SOCS1-Varianten ($SOCS1_{WT}$, $SOCS1_{DEL}$, $SOCS1_{FS}$) miteinander verglichen. In der Auswertung wurden nur die Werte einbezogen, die eine signifikante ($p \leq 0,05$) Veränderung zeigen. Via Gene-Set-Anreicherungsanalyse über Enrichr wurden die Gene den übergeordneten Signalwegen zugeordnet. Dabei wurde für die Darstellung der Ergebnisse die Datenbank MSigDB Hallmark 2020 von Enrichr verwendet.

Der $SOCS1_{WT}$ verändert die Expressionsprofile verschiedener Signalwege im Vergleich zur Kontrolle

In Abbildung 32 ist dargestellt, bei welchen Signalwegen die RNA von daran beteiligten Genen beim FLAG-$SOCS1_{WT}$ im Vergleich zum Leervektor entweder vermehrt oder vermindert vorlag.

Generell ist zu erkennen, dass es zwischen der unstimulierten Gruppe (Abb. 32 A und B) und der Gruppe nach IL-4-Stimulation (Abb. 32 C und D) kaum Unterschiede zwischen den hoch- bzw. herunterregulierten Signalwegen gibt, die durchgeführte Zytokinstimulation scheint hierauf also keinen großen Einfluss zu haben.

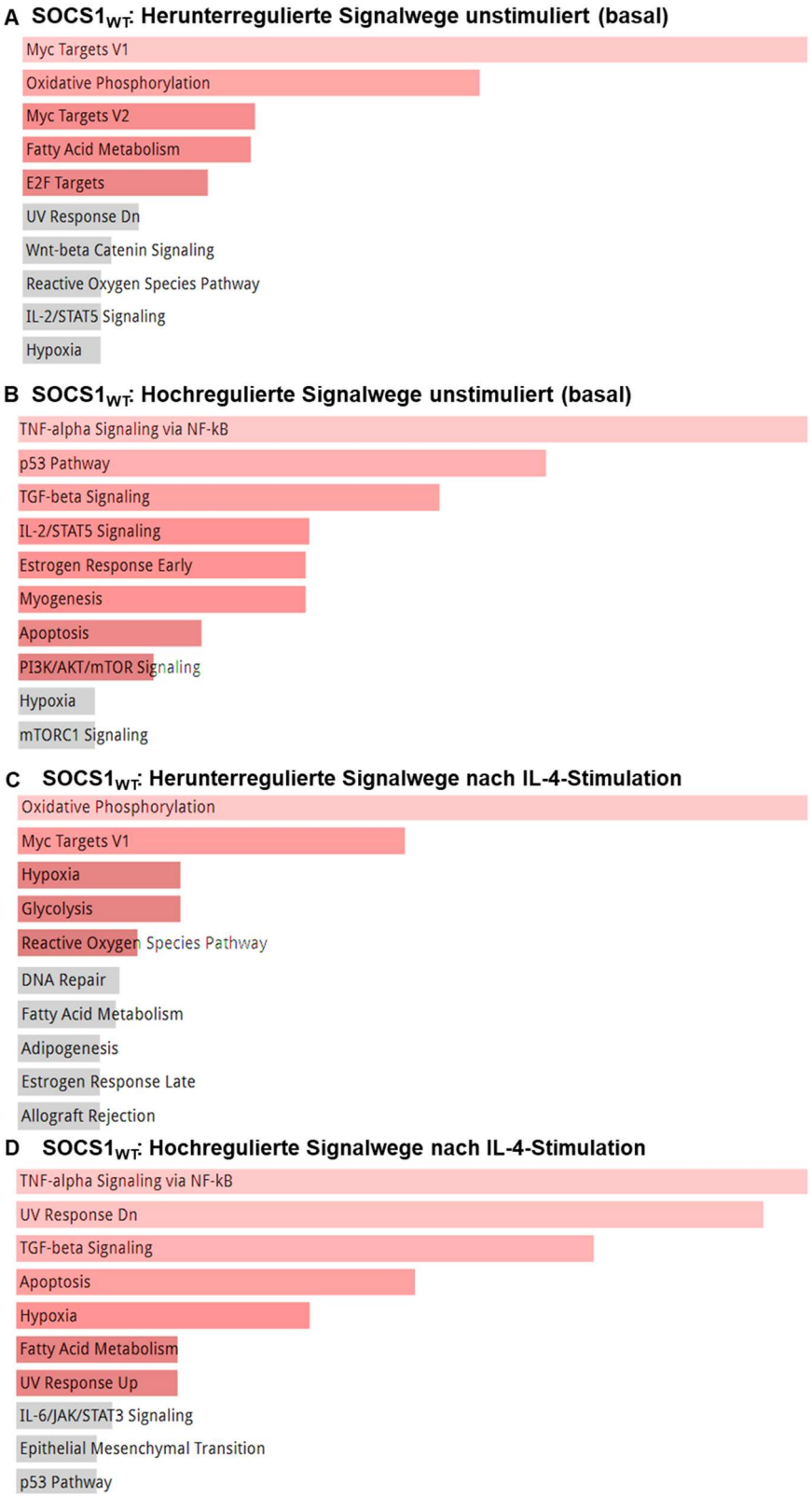


Abb. 32: FLAG-SOCS1$_{WT}$ verändert die Expressionsprofile verschiedener Signalwege unter basalen Bedingungen (unstimuliert) sowie nach IL-4-Stimulation. Herunterregulierte Signalwege unter basalen Bedingungen. **B**: Hochregulierte Signalwege unter basalen Bedingungen. **C**: Herunterregulierte Signalwege nach IL-4-Stimulation. **D**: Hochregulierte Signalwege nach IL-4-Stimulation. Erstellt mit Enrichr. IL-4: Interleukin 4, SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1, SOCS1$_{WT}$: FLAG-SOCS1-Wildtyp.

Durch die Überexpression des FLAG-SOCS1$_{WT}$ werden vor allem Gene für die Oxidative Phosphorylierung und sogenannte *MYC*-Zielgene vermindert exprimiert (Abb. 32 A und C). Auch das *MYC*-Gen, welches für den Transkriptionsfaktor c-MYC codiert, wird vermindert exprimiert. Hochreguliert sind dagegen vor allem Gene für den TNF-α-induzierten NF-κB-Signalweg und für den Apoptose-/p53-Signalweg, sowie das TGF-beta-Signaling (Abb. 32 B und D). Auch die Transkription des *SOCS1*-Gens ist mit und auch ohne IL-4-Stimulation deutlich erhöht (siehe Anhang, Tab. 21).

Betrachtet man die hochregulierten Gene genauer, hier am Beispiel des FLAG-SOCS1$_{WT}$ ohne Zytokinstimulation (Abb. 33), so kann man deren Beteiligung an verschiedenen Signalwegen genauer differenzieren (Abb. 33A). *SOCS1* ist beispielsweise der Datenbank MSigDB Hallmark 2020 zur Folge mit dem p53- und dem IL-2/STAT5-Signalweg assoziiert. Außerdem besteht eine Interaktion mit zwei weiteren durch den SOCS1$_{WT}$ hochregulierten Genen (Abb. 33B): *PIM2*, ein Proto-Onkogen, und *GH1*, welches für Somatotropin kodiert. Beide Genprodukte spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und des Zellwachstums. Weitere hochregulierte Gene, die das Zellwachstum unterstützen, sind beispielsweise die NF-κB-Zielgene *JUNB* oder *EGR1*.

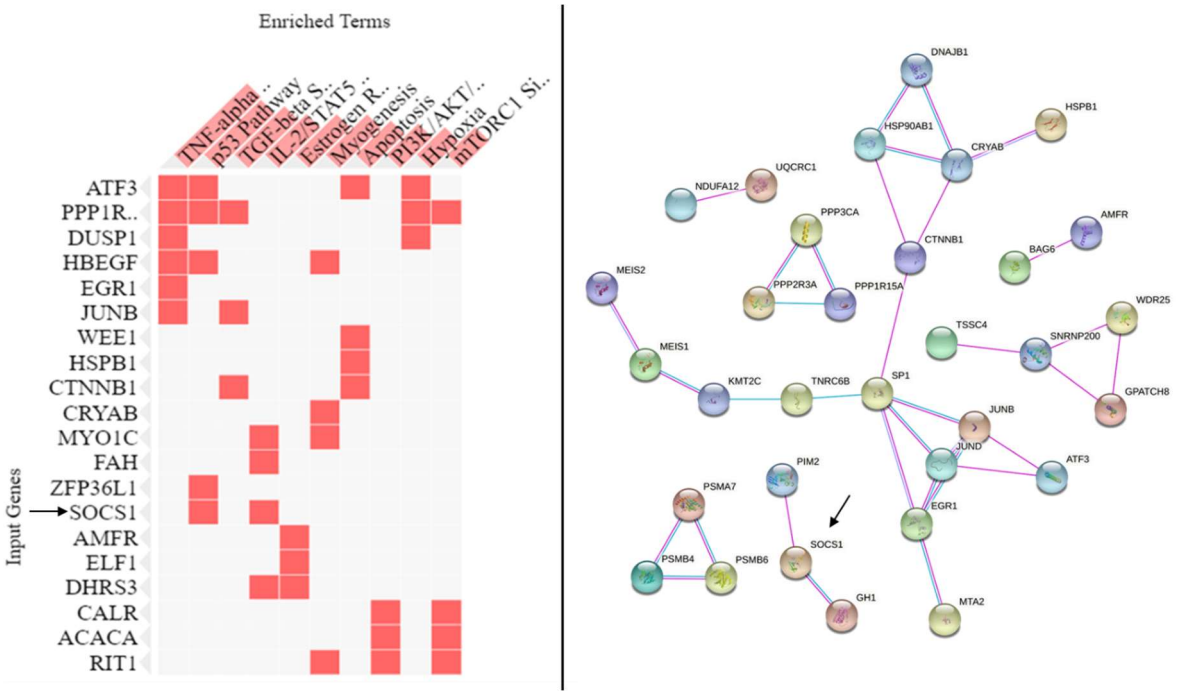


Abb. 33: Durch FLAG-SOCS1$_{WT}$ hochregulierte Gene unter basalen Bedingungen. A: Cluster-Mappe mit den wichtigsten hochregulierten Signalwegen (Enriched Terms) und damit assoziierten hochregulierten Genen (Input Genes). Erstellt mit Enrichr. **B**: STRING-Netzwerk mit aufgezeigten Interaktionen zwischen den hochregulierten Genen. Dabei wurden nur die auf Datensätzen oder Experimenten basierenden Interaktionen verwendet. SOCS1 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Erstellt mit STRING-Database. SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1, SOCS1$_{WT}$: FLAG-SOCS1-Wildtyp.

SOCS1$_{DEL}$ verändert die Expressionsprofile unterschiedlicher Signalwege und unterscheidet sich vom SOCS1$_{WT}$

Die FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante führt unter basalen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle vor allem zu einer starken Abnahme der Expression von Genen der Glykolyse und des ROS (Reactive Oxygen Species) -Signalwegs (Abb. 34A). Hochreguliert sind wiederrum Mitglieder des p53-Signalweges, der Interferon-γ-Antwort, sowie des TNF-α-induzierten NF-κB-Signalweges (Abb. 34B).

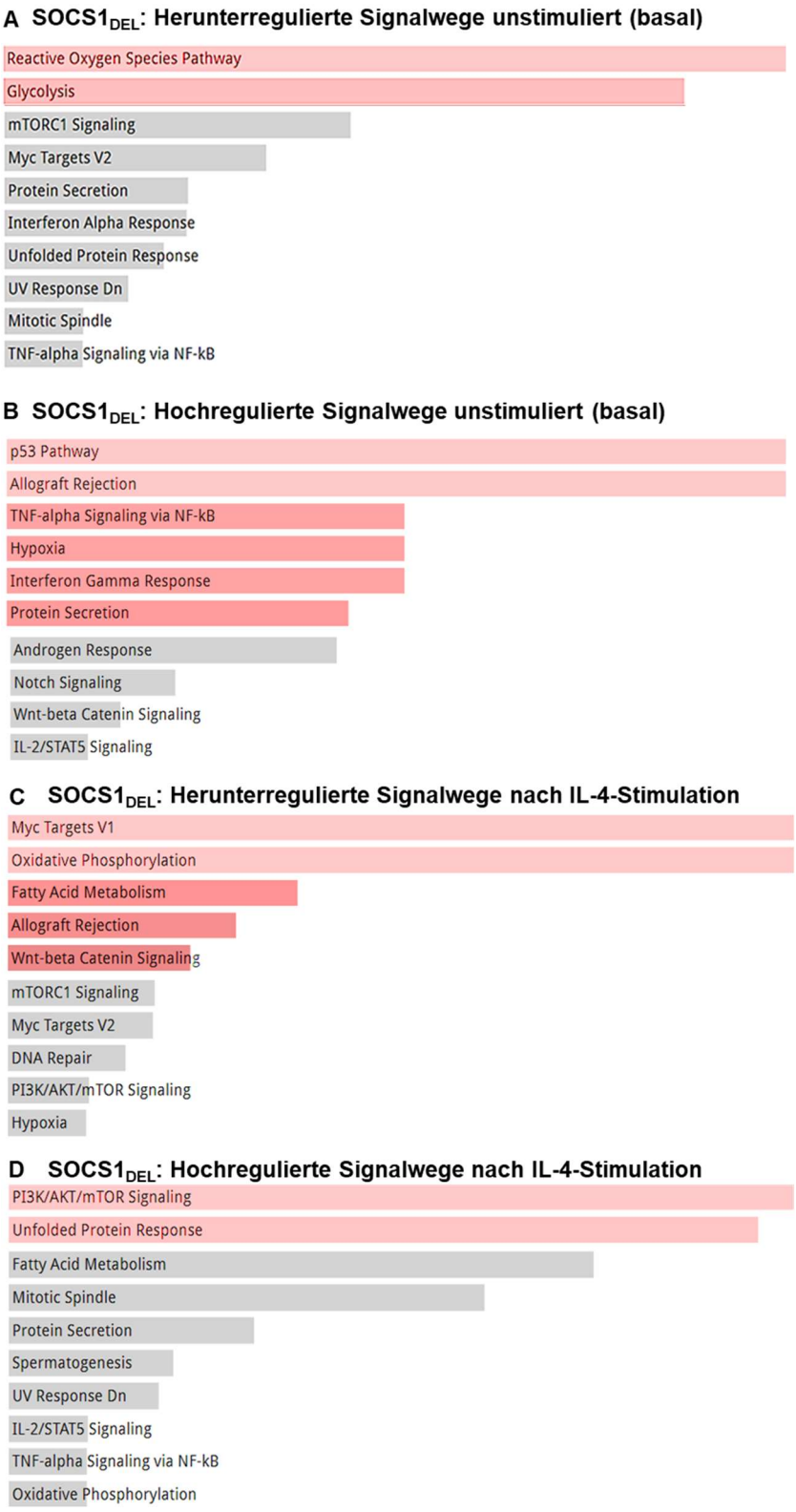


Abb. 34: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ verändert die Expressionsprofile unterschiedlicher Signalwege unter basalen Bedingungen sowie nach IL-4-Stimulation. A: Herunterregulierte Signalwege unter basalen Bedingungen. **B**: Hochregulierte Signalwege unter basalen Bedingungen. **C**: Herunterregulierte Signalwege nach IL-4-Stimulation. **D**: Hochregulierte Signalwege nach IL-4-Stimulation. Erstellt mit Enrichr. IL-4: Interleukin 4, SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1. SOCS1$_{DEL}$: FLAG-SOCS1-Deletion.

Im Gegensatz zum wildtypischen SOCS1 unterscheidet sich bei der FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante die Genexpression nach Zytokinstimulation von derjenigen unter basalen Bedingungen. Nach IL-4-Stimulation werden sehr ähnliche Signalwege wie beim SOCS1$_{WT}$ herunterreguliert: Die oxidative Phosphorylierung und die *MYC*-Zielgen-Gruppe (Abb. 34C). Vermehrt abgelesen werden dagegen Gene, die den anti-apoptotischen, proliferationsfördernden PI3K/AKT/mTor-Signalweg betreffen (Abb. 34D). Die hochregulierten Gene werden im Folgenden nochmals genauer betrachtet (Abb. 35 und 36).

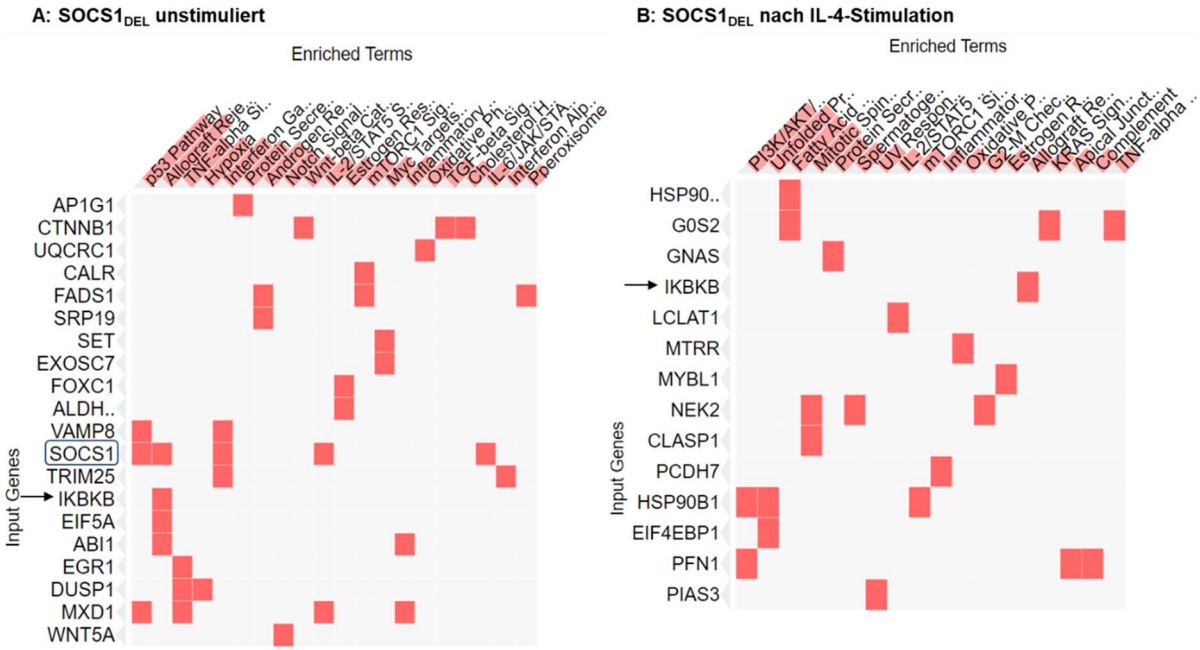


Abb. 35: Durch FLAG-SOCS1$_{DEL}$ hochregulierte Gene. Cluster-Mappen mit den wichtigsten hochregulierten Signalwegen (Enriched Terms) und damit assoziierten hochregulierten Genen (Input Genes). Erstellt mit Enrichr. **A**: Unstimuliert. **B**: Nach IL-4-Stimulation. Hervorgehoben sind SOCS1 (umrahmt) und IκBκB (Pfeil). IL: Interleukin, SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1. SOCS1$_{DEL}$: FLAG-SOCS1-Deletion.

Eine signifikant erhöhte *SOCS1*-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ist nur bei der unstimulierten FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Gruppe zu beobachten (Abb. 35A), gleiches gilt für die Expression des SOCS1-Interaktionspartners *PIM2* (Abb. 36A). Nach IL-4-Stimulation ist die *PIM2*-RNA sogar signifikant weniger vorhanden. Ein Gen, welches in beiden FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Gruppen hochreguliert ist, ist *IκBκB*, ein wichtiger Bestandteil der NF-κB-Kaskade (Abb. 35 A und B, mit einem Pfeil gekennzeichnet). Dabei sind Interaktionen mit weiteren hochregulierten Genen erkennbar, ohne Zytokin-Stimulation (Abb. 36A) unter anderem mit Genen für die

Polyubiquitinierung (*UBB, TRIM25*) und mit IL-4-Stimulation mit *HSP90AA1* (Abb. 36B), welches für ein Hitzeschockprotein kodiert.

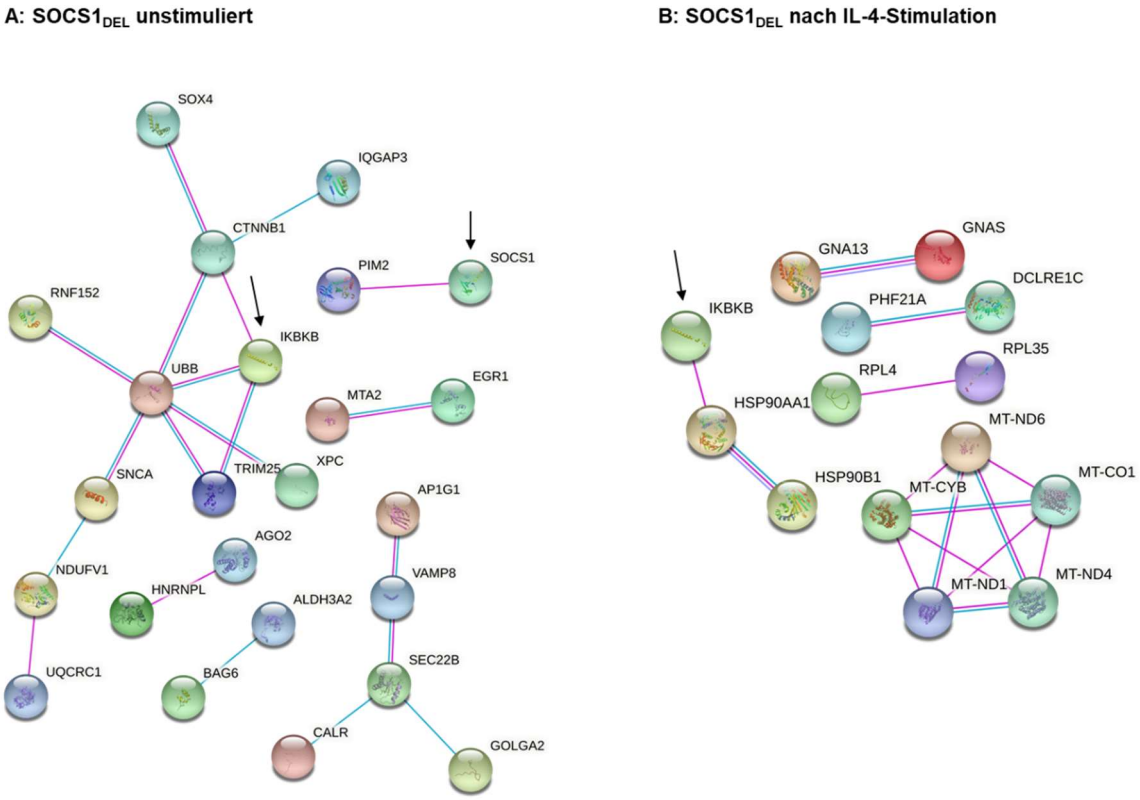


Abb. 36: Hochregulierte Gene bei der SOCS1-Mutante FLAG-SOCS1$_{DEL}$. STRING-Netzwerk mit aufgezeigten Interaktionen zwischen den hochregulierten Genen. Dabei wurden nur Interaktionen, welche auf Datensätzen oder Experimenten basieren, verwendet. Erstellt mit STRING-Database. **A**: Unstimuliert. **B**: Nach IL-4-Stimulation. IL-4: Interleukin 4, SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1. SOCS1$_{DEL}$: FLAG-SOCS1-Deletion.

Der Einfluss der SOCS1$_{FS}$-Variante ähnelt dem des SOCS1$_{WT}$

Bei den Ansätzen mit der ektopischen Expression der FLAG-SOCS1$_{FS}$-Variante werden, sehr ähnlich zur Situation nach FLAG-SOCS1$_{WT}$-Expression, vor allem Gene der oxidativen Phosphorylierung und *MYC*-Zielgene herunterreguliert (Abb. 37 A und C). Auch die RNA von *MYC* selbst ist, ohne und mit Zytokinstimulation, gegenüber der Kontrolle signifikant geringer nachweisbar.

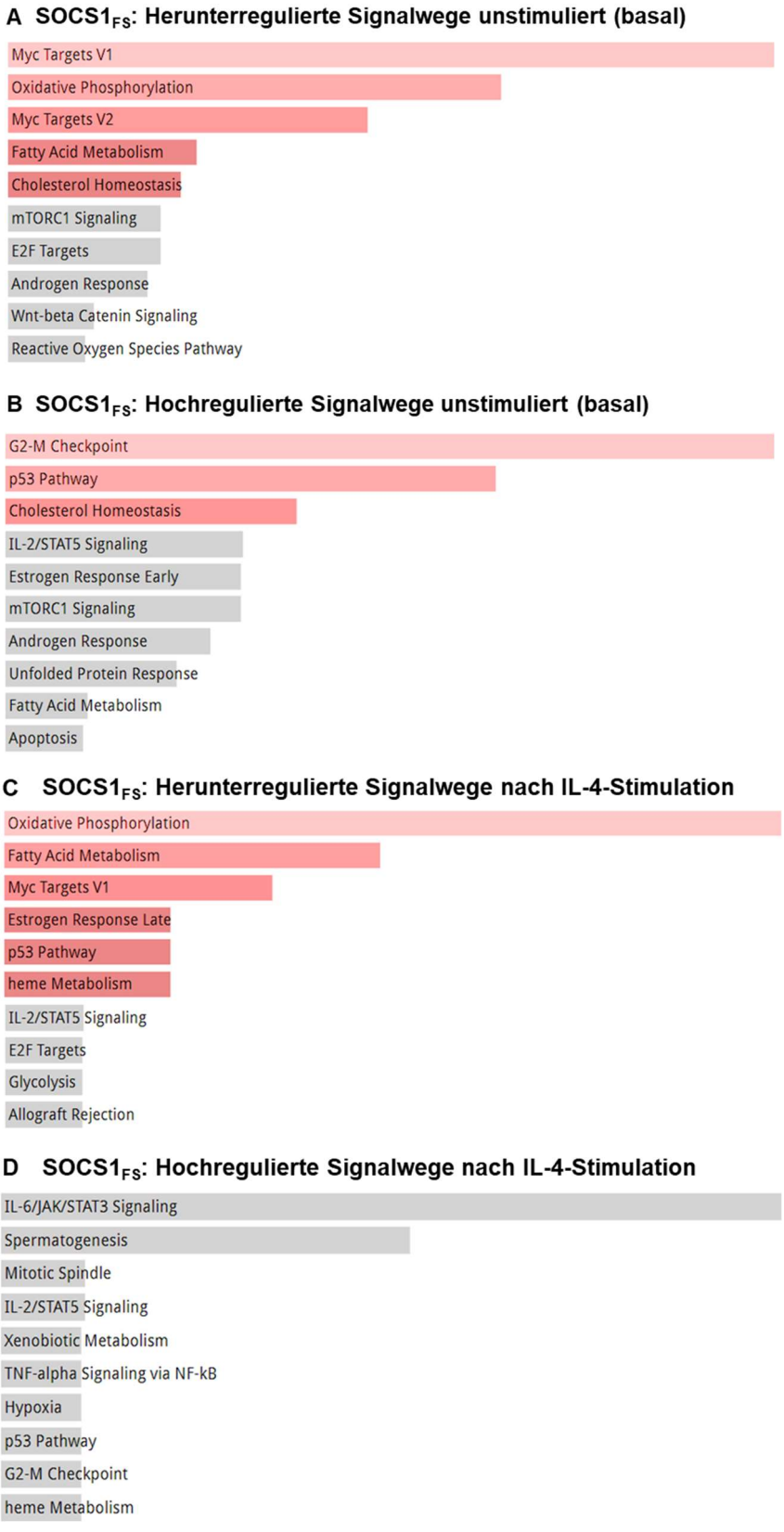


Abb. 37: FLAG-SOCS1$_{FS}$ verändert die Expressionsprofile unterschiedlicher Signalwege unter basalen Bedingungen sowie nach IL-4-Stimulation. A: Herunterregulierte Signalwege unter basalen Bedingungen. **B**: Hochregulierte Signalwege unter basalen Bedingungen. **C**: Herunterregulierte Signalwege nach IL-4-Stimulation. **D**: Hochregulierte Signalwege nach IL-4-Stimulation. Erstellt mit Enrichr. IL-4: Interleukin 4, SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1. SOCS1$_{FS}$: FLAG-SOCS1-Frameshift.

Bei den hochregulierten Genen können nur ohne IL-4-Stimulation Anreicherungen bestimmter Signalwege beobachtet werden (Abb. 37 B). Hochreguliert werden hier Gene, welche am G2-M-Checkpoint beteiligt sind, sowie der p53-Signalweg (Abb. 38). Dabei gibt es, durch die starke Transkription von *SOCS1* und *GH1* (siehe Abb. 38 und im Anhang Tab. 19 und 23), wieder eine Parallele zum wildtypischen *SOCS1*.

Nach IL-4-Stimulation können die hochregulierten Gene eher keinem spezifischen Signalweg zugeordnet werden (Abb. 37 D). Allerdings sind hier auch *SOCS1* und *GH1*, sowie *SOCS6* deutlich stärker transkribiert.

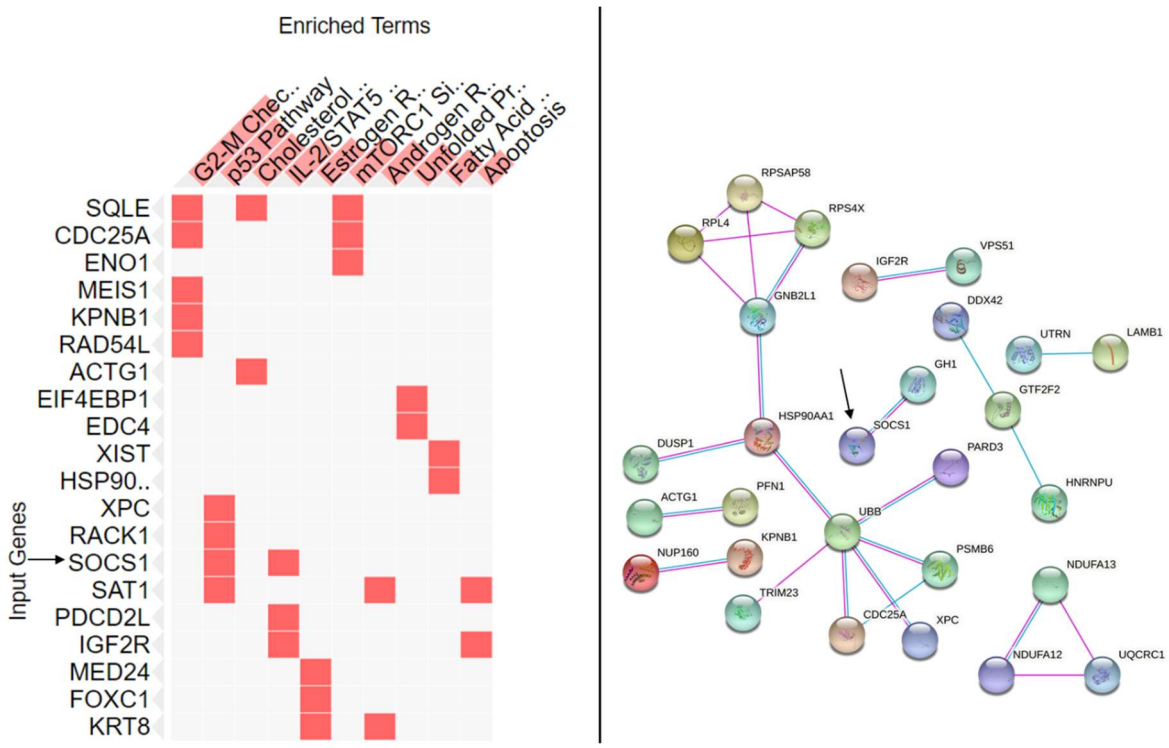


Abb. 38: Durch FLAG-SOCS1$_{FS}$ unter basalen Bedingungen hochregulierte Gene. **A**: Cluster-Mappe mit den wichtigsten hochregulierten Signalwegen (Enriched Terms) und damit assoziierten hochregulierten Genen (Input Genes). Erstellt mit Enrichr. **B**: STRING-Netzwerk mit aufgezeigten Interaktionen zwischen den hochregulierten Genen. Dabei wurden nur die auf Datensätzen oder Experimenten basierenden Interaktionen verwendet. Erstellt mit STRING-Database. SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1. SOCS1$_{FS}$: FLAG-SOCS1-Frameshift.

3.3 Beeinflussung der STAT1-Aktivität durch die SOCS1-Varianten

3.3.1 Erhöhung der STAT1-Aktivität durch die SOCS1-Mutanten

Um der Frage nachzugehen, ob die SOCS1-Varianten weitere Mitglieder des JAK-STAT-Signalweges beeinflussen, wurde auch die Aktivität des Trankskriptionsfaktors STAT1 im Luciferase-Reporter-Assay untersucht (Abb. 39A). Neben dem FLAG-SOCS1$_{WT}$ wurden zunächst wieder die Major-Mutanten FLAG-SOCS1$_{DEL}$ und FLAG-SOCS1$_{FS}$ in verschiedenen Konzentrationen (10ng, 50ng, 100ng pro Well á 0,5ml) in HEK-293T-Zellen transfiziert. Als Vertreter der SOCS1-Minor-Mutanten wurde die FLAG-SOCS1$_{MUT3}$ ausgewählt. Die Transfektion mit dem Leervektor dient wieder als Kontrolle, hier zeigt sich ein Anstieg der relativen STAT1-Aktivität nach Stimulation mit IFN-γ über 18h. Die Expression des FLAG-SOCS1$_{WT}$ führt zunächst (in den niedrigen Transfektions-Konzentrationen), wie erwartet, zu einem Abfall der STAT1-Aktivität im Vergleich zum Leervektor. In der höchsten verwendeten Konzentration kann allerdings kein signifikanter Unterschied zur IFN-γ-stimulierten Kontrolle mehr gezeigt werden. Zusätzlich nimmt auch die STAT1-Aktivität in den unstimulierten Gruppen mit steigender Plasmid-Konzentration zu und ist signifikant höher als in der Kontrolle. Dieser Effekt ist bei allen weiteren SOCS1-Varianten zu beobachten.

Besonders ausgeprägt ist der Anstieg der relativen STAT1-Aktivität bei den unstimulierten Gruppen der Major-Mutante FLAG-SOCS1$_{DEL}$ zu beobachten. Bei dieser SOCS1-Variante ist auch die Zunahme der relativen STAT1-Aktivität nach IFN-γ-Stimulation am höchsten. Schon bei einer Transfektions-Konzentration von 10ng/Well kommt es, verglichen mit dem Empty-Vektor (2,5-fache Steigerung), zu einer signifikanten Erhöhung der STAT1-Aktivität auf das 5-fache. Mit steigender Plasmid-Konzentration nimmt die relative STAT1-Aktivität weiter zu, bei 100ng pFLAG-SOCS1$_{DEL}$ wird eine Aktivitätserhöhung auf das 18-fache erreicht. Auch die FLAG-SOCS1$_{FS}$-Variante und die Minor-Mutante FLAG-SOCS1$_{MUT3}$ führen in höheren Konzentrationen, wenn auch im geringeren Maße, zu einem signifikanten Anstieg der STAT1-Aktivität. Zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion wurde das FLAG-Epitop in Western Blot Analysen detektiert (Abb. 39B), dabei wurden zur Platzersparnis nur die unstimulierten Proben verwendet. Als Ladekontrolle diente die Western Blot Analyse des Proteins Tubulin.

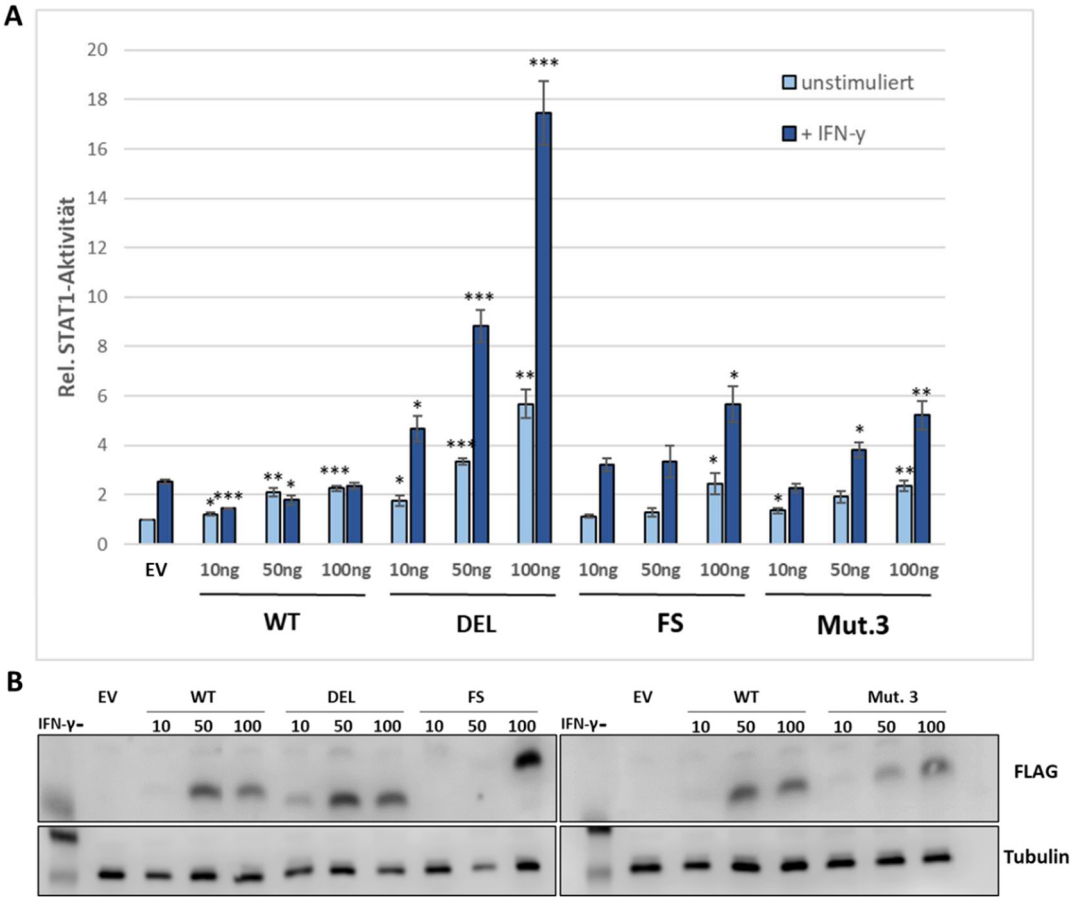


Abb. 39: Einfluss der unterschiedlichen FLAG-SOCS1-Varianten auf die STAT1-Aktivität. A: STAT1-Luciferase-Reporter-Assay nach Transfektion des Leervektors (EV, Kontrolle), des FLAG-SOCS1$_{WT}$-, des FLAG-SOCS1$_{DEL}$-, des FLAG-SOCS1$_{FS}$- sowie des FLAG-SOCS1$_{MUT3}$-kodierenden Plasmids. Es wurden jeweils drei Plasmid-Mengen pro Well (á 500µl) transfiziert: 10ng, 50ng, 100ng. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IFN-γ Stimulation (40ng/ml). Die relative STAT1-Aktivität (Rel. STAT1-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). **B**: Nachweis der Expression der FLAG-SOCS1-Varianten durch eine anti-FLAG Western Blot Analyse (oben). Die gleichmäßige Beladung des Gels erfolgte durch eine Kontroll Western Blot Analyse mit einem anti-Tubulin-Antikörper (unten). Es wurden nur die Proben ohne Stimulation aufgetragen (IFN-γ-). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), Mut.3: FLAG-SOCS1$_{MUT3}$ (Mutante 3). IFN-γ: Interferon γ, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transkription.

Um eine mögliche Beeinflussung der SOCS1-Funktion durch den N-terminalen FLAG-Tag auszuschließen, wurde das STAT1-Luciferase-Reporter-Assay mit den SOCS1-Varianten im pcDNA3.1- bzw. pcDNA3-GFP-Vektor wiederholt (Abb. 40). Dabei wurde eine Plasmid-Menge von 100ng pro Well (á 0,5ml) verwendet. Die Ergebnisse entsprechen weitestgehend denen der Messungen unter Verwendung der pFLAG-SOCS1-Konstrukte.

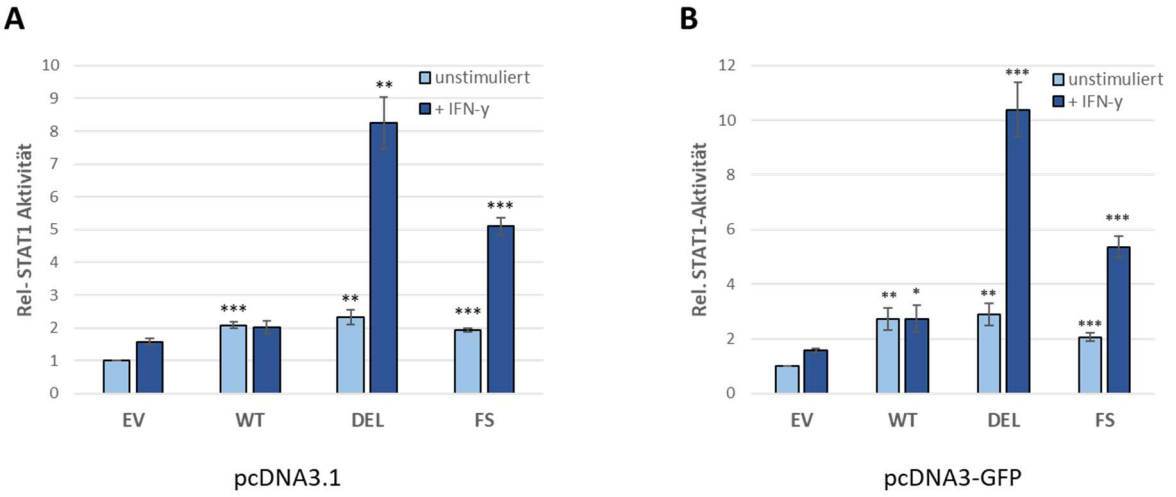


Abb. 40: STAT1-Luciferase-Reporter-Assay nach Koexpression unterschiedlicher SOCS1-Varianten. Verwendet wurden jeweils 100ng Plasmid pro Well (á 500µl). hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IFN-γ Stimulation (40ng/ml). **A**: pcDNA3.1-Vektor. **B**: pcDNA3-GFP-Vektor. Die relative STAT1-Aktivität (Rel. STAT1-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-$SOCS1_{WT}$ (Wildtyp), DEL: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-$SOCS1_{DEL}$ (Deletion), FS: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-$SOCS1_{FS}$ (Frameshift), IFN- γ: Interferon γ, GFP: Grün-fluoreszierendes Protein, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transkription.

Die Expression der SOCS1-Varianten $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{FS}$ führt weiterhin zu einem signifikanten Anstieg der relativen STAT1-Aktivität nach Zytokinstimulation. Beim IFN-γ-stimulierten Ansätzen mit der Expression des SOCS1-Wildtyps kommt es ebenfalls zu einem geringen, teilweise signifikanten, Anstieg der STAT1-Aktivität.

3.3.2 Die Major-Mutante $SOCS1_{MUT7}$ zeigt einen starken Effekt auf die STAT1-Aktivität

Im Folgenden wurde auch die Expression der Major-Mutation FLAG-$SOCS1_{MUT7}$ hinsichtlich eines möglichen Effektes auf die STAT1-Aktivität mittels Luciferase-Reporter-Assay untersucht (Abb. 41A). Dabei wurden pro Well (0,5ml) 250ng der pFLAG-SOCS1-Varianten zur Transfektion verwendet und erneut mit 40ng/µl IFN-γ über 18h stimuliert. Die Expression des FLAG-$SOCS1_{WT}$ führt, im Vergleich zum vorherigen STAT1-Luciferase-Reporter-Assay mit 100ng pro Well verwendetem Plasmid, zu einer weiteren Steigerung der STAT1-Aktivität, sowohl mit als auch ohne IFN-γ-Stimulation. Die FLAG-$SOCS1_{DEL}$-Variante erreicht mit 250ng pro Well

im Vergleich zu 100ng Vektor eine noch höhere relative STAT1-Aktivität (22-fach), besonders nach Interferon-Stimulation. Der positive Effekt scheint daher möglicherweise von der Menge des exprimierten SOCS1-Proteins abhängig zu sein. Der stärkste Effekt ist jedoch bei der Major-Mutante FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ messbar. Hier führt die IFN-γ-Stimulation zu einem Anstieg der relativen STAT1-Aktiviät auf das 36-fache.

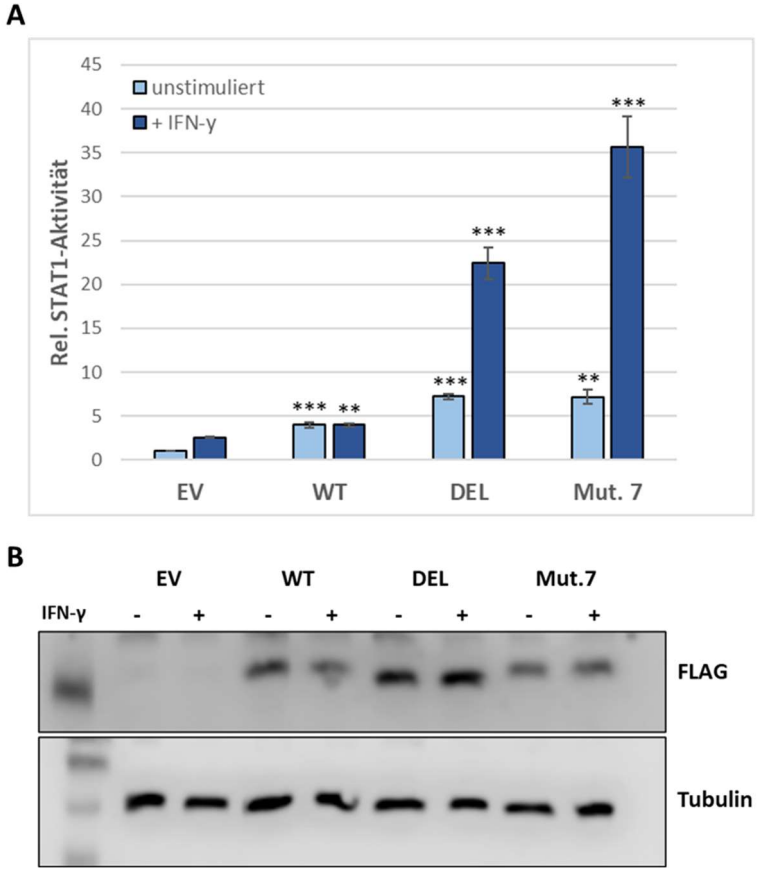


Abb. 41: Einfluss des FLAG-SOCS1-Wildtyps und der FLAG-SOCS1-Major-Mutanten auf die STAT1-Aktivität. A: STAT1-Luciferase-Reporter-Assay unter Verwendung des SOCS1-Wildtyps und der Major-Mutanten SOCS1$_{DEL}$ (DEL) und SOCS1$_{MUT7}$ (Mut.7). Transfiziert wurde eine Plasmid-Menge von 250ng pro Well (á 500µl). Hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 18h IFN-γ Stimulation (40ng/ml). Die relative STAT1-Aktivität (Rel. STAT1-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). **B**: Nachweis der Expression der FLAG-SOCS1-Varianten durch eine anti-FLAG Western Blot Analyse (oben). Die gleichmäßige Beladung des Gels erfolgte durch eine Kontroll Western Blot Analyse mit einem anti-Tubulin Antikörper (unten). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), Mut.7: FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ (Mutante 7), IFN-γ: Interferon γ, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transkription.

Vergleicht man die FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante und die FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ mit dem Ergebnis unter Verwendung des wildtypischen SOCS1, so ist der Unterschied

jeweils in beiden unstimulierten, sowie in den IFN-γ-stimulierten Gruppen signifikant. Die gleichmäßige Transfektion der Plasmide kann mit dem FLAG-Nachweis in der Western Blot Analyse (Abb. 41B) gezeigt werden.

3.3.3 Die erhöhte STAT1-Aktivität korreliert nicht mit einer stark veränderten Phosphorylierung

Um eine Erklärung für die, im Luciferase-Reporter-Assay gemessene, Erhöhung der STAT1-Aktivität nach Koexpression des $SOCS1_{WT}$ sowie allen SOCS1-Varianten zu finden, sollte die Phosphorylierung von STAT1 in Western Blot Analysen überprüft werden. Genutzt wurde hierfür ein Antikörper, welcher an das phosphorylierte Y701 (Tyrosin) von pSTAT1 bindet. Analog zum pSTAT6-Western Blot wurden ebenfalls drei biologische Replikate mit verschiedenen IFN-γ-Stimulationszeiten untersucht und quantifiziert. Betrachtet man die pSTAT1-Bande auf der Membran (Abb. 42A), so scheint es keinen Unterschied bei der Expression von pSTAT1 zwischen der Kontrolle und den FLAG-SOCS1-Varianten zu geben. In der Quantifizierung (Abb. 42B) zeigt sich ein geringer, aber teilweise signifikanter Unterschied, welcher abhängig von der Interferon-γ-Stimulationszeit zu sein scheint: Nach 30min Stimulation zeigt sich kein signifikanter Unterschied zum Leervektor, nach 1h ist eine geringe, aber signifikante Zunahme- und nach 2h eine ebenfalls geringe, aber signifikante Abnahme der STAT1-Phosphorylierung erkennbar. Die Abweichungen sind dabei jedoch so gering, dass die starke Veränderung der STAT1-Aktivität durch die FLAG-SOCS1-Varianten im Luciferase-Reporter-Assay hiermit nicht begründet werden kann. Auch der Einfluss des $SOCS1_{WT}$ auf die STAT1-Aktivität kann nicht durch eine veränderte STAT1-Phosphorylierung erklärt werden.

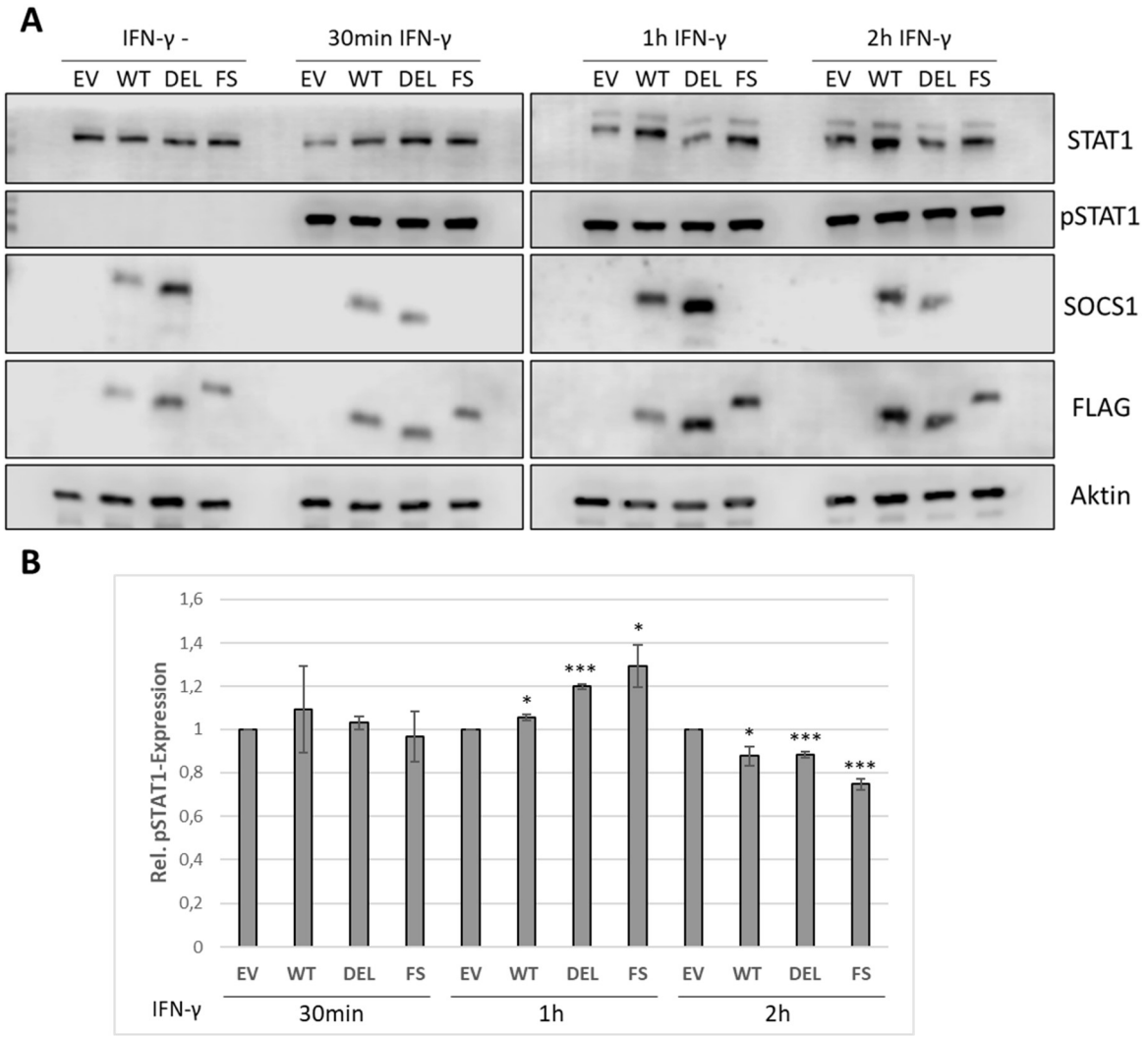


Abb. 42: Analyse der STAT1-Phosphorylierung nach ektopischer Expression von FLAG-SOCS1$_{WT}$ und der Major-Mutanten FLAG-SOCS1$_{DEL}$ und FLAG-SOCS1$_{FS}$. Untersucht wurden verschiedene Stimulationszeiten mit IFN-γ: unstimuliert (-). 30min, 1h, 2h Stimulation. **A**: Repräsentative Western Blot Analyse. **B**: Quantifizierung der Western Blot Analyse. Die relative pSTAT1-Expression (Rel. pSTAT1-Expression) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3) und gegen die Ladekontrolle (hier Aktin) normalisiert, ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die drei Gruppen der Zytokinstimulations-Dauer (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), IFN-γ: Interferon γ, SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, STAT: Signal Transducer and Activator of Transkription. pSTAT: an Y701 phosphorylierter Signal Transducer and Activator of Transkription.

Da die relative pSTAT1-Expression nach 1h Zytokinstimulation auch nur sehr geringfügig erhöht ist, lässt sich die zum Teil stark erhöhte STAT1-Aktivität bei den SOCS1-Varianten im Luciferase-Reporter-Assay nicht durch eine vermehrte STAT1-Phosphorylierung erklären.

3.4 Einfluss der SOCS1-Varianten auf den NF-κB-Signalweg

Ein weiterer wichtiger Signalweg in der Regulation von Zellproliferation ist der kanonische NF-κB-Signalweg. Für die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung dieses Signalweges durch die FLAG-SOCS1-Varianten mittels Luciferase-Reporter-Assay wurde das 3x κB-*Firefly*-Luciferase-Reporter-Plasmid verwendet.

3.4.1 Gesteigerte Aktivität des TNF-α-induzierten NF-κB-Signalwegs

Die Transfektion für das NF-κB-Luciferase-Reporter-Assay in Abb. 43A erfolgte analog der STAT1-Luciferase-Reporter-Assays. Verglichen werden wiederrum die unstimulierten Gruppen und die Gruppen nach 4h TNF-α-Stimulation (20ng/ml).

Entgegen der Erwartung, dass SOCS1 zu einer Abnahme der relativen κB-Aktivität führt, ist beim FLAG-SOCS1$_{WT}$ in höheren Plasmid-Konzentrationen nach TNF-α-Stimulation eine signifikante Zunahme der NF-κB-Aktivität zu erkennen.
Ein noch deutlicherer Anstieg der relativen NF-κB-Aktivität ist bei der FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante messbar. Hier wird bei 100ng/Well Plasmid nach TNF-α-Stimulation eine 78-fache Steigerung erreicht, die Steigerung der NF-κB-Aktivität bei der stimulierten Kontrollgruppe (EV) beträgt das 7-fache gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Außerdem fällt auf, dass auch die unstimulierten Gruppen der FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante zu einem starken signifikanten Anstieg der relativen NF-κB-Aktivität führen. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche konstitutive Aktivierung des NF-κB-Signalwegs durch den Einfluss der FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante sein.

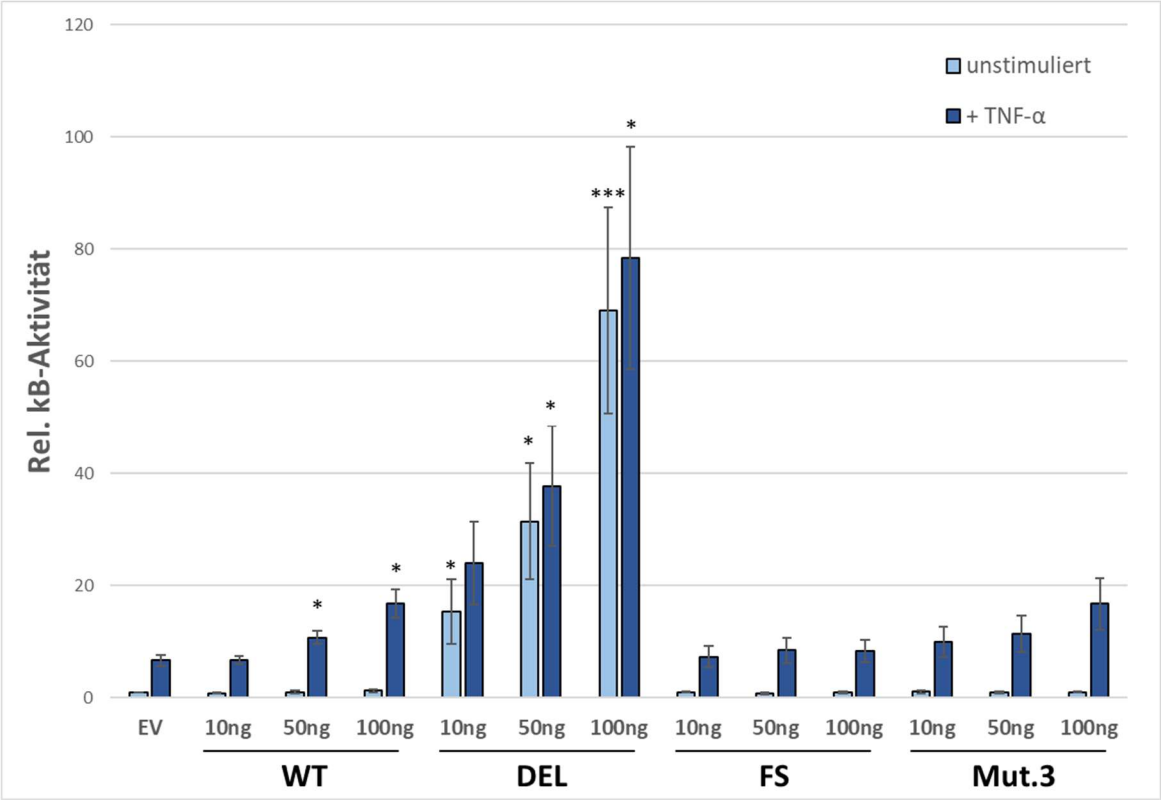


Abb. 43: Einfluss des FLAG-SOCS1$_{WT}$, FLAG-SOCS1$_{DEL}$, FLAG-SOCS1$_{FS}$ und der SOCS1-Minor-Mutante FLAG-SOCS1$_{MUT3}$ auf die kanonische NF-κB-Aktivität. Für den NF-κB-abhängigen Luciferase-Reporter-Assay wurden jeweils drei Plasmid-Mengen (pro Well, á 500µl) transfiziert: 10ng, 50ng, 100ng. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 4h TNF-α-Stimulation (20ng/ml). Die relative κB-Aktivität (Rel. κB-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von vier Versuchen ermittelt (n=4), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: FLAG-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), Mut.3: FLAG-SOCS1$_{MUT3}$ (Mutante 3), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, TNF-α: Tumornekrosefaktor α.

Bei allen anderen SOCS1-Varianten erreichen die unstimulierten Gruppen ähnliche Werte wie die Kontrolle ohne Zytokinstimulation. Die FLAG-SOCS1$_{FS}$-Variante und die Minor-Mutante FLAG-SOCS1$_{MUT3}$ erzielen keine signifikante Änderung der NF-κB-Aktivität und entsprechen daher am ehesten der Kontrollgruppe.

Im Folgenden wird die NF-κB-Aktivität nach Transfektion einer noch höheren Menge (250ng pro Well á 0,5ml) der pFLAG-SOCS1-Expressionsvektoren betrachtet (Abb. 44A).

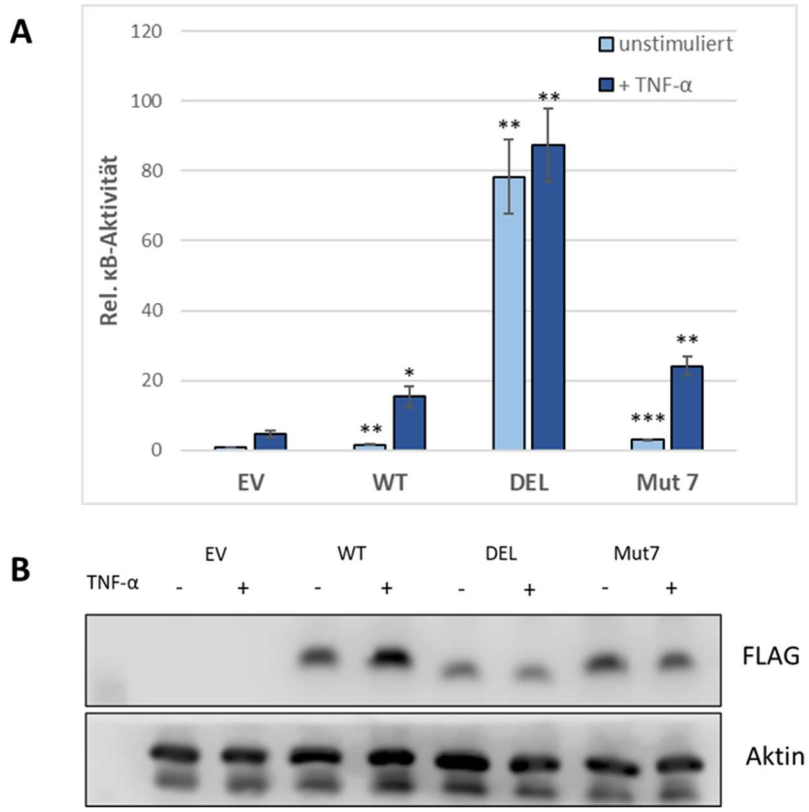


Abb. 44: Einfluss des FLAG-SOCS1$_{WT}$ und der FLAG-SOCS1-Major-Mutanten auf die Aktivität des kanonischen NF-κB Signalweg. A: NF-κB-Luciferase-Reporter-Assay nach Transfektion von FLAG-SOCS1$_{WT}$, FLAG-SOCS1$_{DEL}$ und FLAG-SOCS1$_{MUT7}$. Es wurde eine Plasmid-Konzentration von 250ng pro Well (á 500µl) transfiziert. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 4h TNF-α-Stimulation (20ng/ml). Die relative κB-Aktivität (Rel. κB-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). **B**: Nachweis der Expression der FLAG-SOCS1-Varianten durch eine anti-FLAG Western Blot Analyse (oben). Die gleichmäßige Beladung des Gels erfolgte durch eine Kontroll Western Blot Analyse mit einem anti-β-Aktin Antikörper (unten). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: FLAG-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: FLAG-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), Mut7: FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ (Mutante 7), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, TNF: Tumornekrosefaktor.

Auch hier kommt es nach TNF-α-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der NF-κB-Aktivität beim FLAG-SOCS1$_{WT}$ und der FLAG-SOCS1$_{DEL}$, mit noch etwas höheren Zahlenwerten als bei der zuvor untersuchten Konzentration von 100ng pro Well. Zusätzlich wurde die SOCS1-Major-Mutante FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ untersucht. Auch bei der Transfektion dieser SOCS1-Variante konnte nach Zytokin-Stimulation eine Erhöhung der relativen NF-κB-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Bei der FLAG-SOCS1$_{DEL}$-Variante gibt es dabei einen signifikanten Unterschied zum FLAG-SOCS1$_{WT}$ (p=0,0027), der Unterschied von FLAG-SOCS1$_{MUT7}$ zu FLAG-SOCS1$_{WT}$ ist mit einem p-Wert von 0,0987 nicht statistisch

signifikant. Der $SOCS1_{WT}$ und die Major-Mutante $SOCS1_{MUT7}$ führen damit zu einer ähnlichen Änderung der relativen NF-κB-Aktivität, die $SOCS1_{DEL}$-Variante bewirkt einen deutlich höheren Anstieg. Abb. 44B zeigt die Western Blot Analyse der Expression der unterschiedlichen FLAG-SOCS1-Varianten.

3.4.2 Der FLAG-Tag beeinflusst die Wirkung der SOCS1-Varianten auf die NF-κB-Aktivität

Zum Ausschluss einer Beeinflussung der SOCS1-Varianten durch den N-terminalen FLAG-Tag wurde das NF-κB-Luciferase-Reporter-Assay mit den SOCS1-pcDNA3.1-Vektoren und den SOCS1-pcDNA3-GFP-Vektoren (jeweils 100ng pro Well á 0,5ml) wiederholt (Abb. 45).

Wie auch im Versuch mit den pFLAG-SOCS1-Varianten führt der $SOCS1_{WT}$ nach 4h TNF-α-Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der relativen NF-κB-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 100ng pro Well wird mit dem $SOCS1_{WT}$-pcDNA3.1-Vektor eine 14-fache, mit dem pcDNA3-GFP-Vektor eine 17-fache Aktivität erreicht. Damit ähneln die Werte dem Mittelwert aus dem Assay mit 100ng/Well pFLAG-$SOCS1_{WT}$, hier beträgt die relative κB-Aktivität das 16-fache. Auch die $SOCS1_{DEL}$-Variante bewirkt einen Anstieg der NF-κB-Aktivität im Vergleich zum Kontrollansatz (Empty-Vektor), der Anstieg ist allerdings deutlich geringer als im Luciferase-Reporter-Assay mit dem N-terminal getaggten Konstrukt. Vergleicht man die $SOCS1_{DEL}$-Variante mit dem Wildtyp, gibt es in beiden Vektorsystemen keinen signifikanten Unterschied der relativen κB-Aktivität. Im Gegensatz zum pFLAG-$SOCS1_{FS}$ führt der $SOCS1_{FS}$ im pcDNA3.1-Vektor bzw. pcDNA3-GFP-Vektor ebenfalls zu einer Zunahme der relative κB-Aktivität nach TNF-α-Stimulation. Diese entspricht ungefähr den Werten des wildtypischen SOCS1.

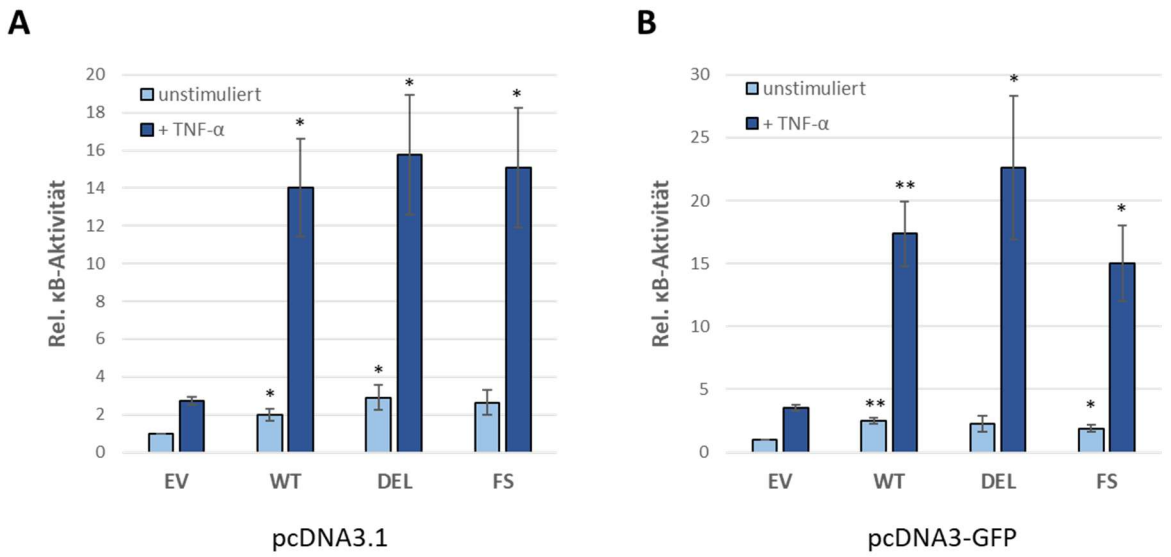


Abb. 45: NF-κB-Luciferase-Reporter-Assays unter Verwendung der SOCS1-Varianten im pcDNA3.1-Vektor oder im pcDNA3-GFP-Vektor. Verwendet wurden pro Well (á 500µl) jeweils 100ng Plasmid. hellblau: unstimuliert, dunkelblau: nach 4h TNF-α-Stimulation (20ng/ml). **A**: Verwendet wurden die SOCS1-Varianten im pcDNA3.1-Vektor. **B**: Verwendet wurden die SOCS1-Varianten im pcDNA3-GFP-Vektor. Die relative κB-Aktivität (Rel. κB-Aktivität) wurde aus dem Mittelwert von drei Versuchen ermittelt (n=3), wobei die unstimulierte Kontrolle (EV) gleich 1 gesetzt wurde. ± Standardfehler. *=p≤0.05, **=p≤0.01, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und die stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). EV: Empty-Vektor (Kontrolle), WT: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-SOCS1$_{WT}$ (Wildtyp), DEL: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-SOCS1$_{DEL}$ (Deletion), FS: pcDNA3.1 (**A**)- / pcDNA3-GFP (**B**)-SOCS1$_{FS}$ (Frameshift), SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling 1, GFP: Grün fluoreszierendes Protein, TNF-α: Tumornekrosefaktor α.

Nach dem Ergebnis dieses Versuchs scheint der N-terminale FLAG-Tag einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion der SOCS1-Varianten im NF-κB-Signalweg zu haben. Ohne N-terminalen Tag gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem SOCS1$_{WT}$ und den Major-Mutanten SOCS1$_{DEL}$ und SOCS1$_{FS}$. Verglichen mit den Ergebnissen ohne Tag-Markierung hat der FLAG-Tag bei der SOCS1$_{DEL}$ eine Erhöhung, beim SOCS1$_{FS}$ eine Abnahme der relativen κB-Aktivität bewirkt. Nichtsdestotrotz führt der SOCS1-Wildtyp, und auch die beiden -Varianten, zu einer signifikanten Zunahme der κB-Promoter-Aktivität gegenüber der Kontrolle.

4. Diskussion

Im klassischen Hodgkin-Lymphom (cHL) sind typischerweise der JAK-STAT- und der NF-κB-Signalweg konstitutiv aktiv und unterstützen damit die Tumorprogression. SOCS1 ist ein wichtiger Regulator beider Signalwege und außerdem eines der am häufigsten mutierten Gene im cHL [146, 157]. Auch wenn die Therapie des cHL sehr erfolgreich ist, werden besonders für therapierefraktäre Fälle und Rezidive immer wieder neue Behandlungsansätze gesucht, die unter anderem in den JAK-STAT-Signalweg eingreifen. Neben Januskinase-Inhibitoren gibt es bereits SOCS1-Mimetika, welche beispielsweise die KIR von SOCS1 imitieren und dadurch die JAK2-Aktivität blockieren [42, 153], die in der Forschung bereits eine hemmende Wirkung auf Tumorzellen gezeigt haben [43]. Im Hinblick darauf soll die vorliegende Arbeit helfen, den SOCS1-Wildtyp sowie die SOCS1-Mutanten und ihre Auswirkungen auf die Signalwege besser zu verstehen, um so neue Hinweise für Therapiemöglichkeiten finden zu können.

Neben Mutationen aus der bekannten cHL Zelllinie L-428 wurden 12 Mutationen aus cHL-Fällen ausgewählt, die durch zwei Vorhersage-Algorithmen als benigne, möglicherweise schädigend oder schädigend eingeteilt wurden und verschiedene Abschnitte des SOCS1-Proteins betreffen, wie die SH2-Domäne, die KIR-Domäne oder die SOCS-Box. Alle *SOCS1*-Mutationen wurden dabei je nach Art und Ausmaß der Veränderung in Minor- und Major-Mutationen unterteilt. Die SOCS1-Varianten wurden in unterschiedliche Expressionsvektoren eingebracht und diese wurden nachfolgend für die transiente Transfektion von HEK-293-Zellen verwendet, um den möglichen Einfluss auf den JAK-STAT- und NF-κB-Signalweg zu analysieren.

4.1 Veränderung des JAK-STAT-Signalwegs durch die SOCS1-Varianten

Für die Charakterisierung der SOCS1-Mutanten, insbesondere zur Bestimmung ihrer Wirkung auf den JAK-STAT-Signalweg wurde sich in dieser Arbeit auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT6 und STAT1 konzentriert, da die Wirkung des wildtypischen SOCS1 auf diese beiden Transkriptionsfaktoren schon genauer untersucht wurde und diese besonders relevant in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms sind. Mit Hilfe der Luciferase-Reporter-Assays sollte der Einfluss des SOCS1-Wildtyps und der untersuchten -Mutanten auf die Aktivität von STAT6 und

STAT1 auf Transkriptions-Ebene dargestellt, und die Phosphorylierung der STAT-Proteine in Western Blot Analysen untersucht werden. Zudem wurden die Auswirkungen der verschiedenen SOCS1-Varianten auf die RNA-Expressionsprofile mit der UPX-RNA-Sequenzierung analysiert.

4.1.1 Mögliche Ursachen für die Erhöhung der STAT6-Aktivität durch die SOCS1-Major-Mutanten

Im klassischen Hodgkin-Lymphom ist der Trankskriptionsfaktor STAT6 konstitutiv aktiviert [31, 134] und in vielen Fällen auf Genebene auch mutiert [146]. STAT6 fördert das Tumorwachstum und hemmt die Apoptose in cHL-Zelllinien [17, 31] und stellt damit ein onkogenes Protein dar, während SOCS1 als negativer Regulator des JAK-STAT-Signalwegs eine tumorsuppressive Wirkung hat. Im Falle von STAT6 bestätigten die Ergebnisse der hier durchgeführten Luciferase-Reporter-Assays und Western Blot Analysen, dass die Expression des wildtypischen SOCS1 in einer Abnahme von phosphoryliertem und damit aktivierten STAT6 resultiert, wie bereits in der Literatur beschrieben [84, 117, 146]. Neben der inhibitorischen Funktion des wildtypischen SOCS1 auf die STAT6-Aktivität konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch die Expression der SOCS1-Mutanten dieser Effekt auf STAT6 jedoch teilweise verloren zu gehen, bzw. sogar ein gegenteiliger Effekt zu entstehen, scheint.

Die SOCS1-Minor-Mutanten aus den cHL-Fällen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Einflusses auf die STAT6-Aktivität nicht vom Wildtyp und scheinen daher nicht zu einer Funktionsbeeinträchtigung von SOCS1 zu führen. Da es bei den Minor-Mutanten durch eine Punktmutation nur zum Austausch einer einzelnen Aminosäure kommt, war dieses Ergebnis jedoch zu erwarten. Die Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$, $SOCS1_{FS}$ und $SOCS1_{MUT7}$ dagegen führen alle zu einer signifikant erhöhten STAT6-Aktivität im Vergleich zum $SOCS1_{WT}$. Die Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{FS}$ wurden in der cHL-Zelllinie L-428 identifiziert [157], in welcher eine konstitutive STAT6-Aktivierung nachgewiesen wurde [134], während die verwendete $SOCS1_{MUT7}$ in einem Hodgkin-Fall identifiziert wurde. Die Varianten $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{MUT7}$ führen nach IL-4-Stimulation beide zu einer signifikant erhöhten STAT6-Aktivität im Vergleich zum Kontrollvektor, dieser Effekt wurde für die $SOCS1_{DEL}$-Variante in mehreren Vektorsystemen bestätigt (Kapitel 3.2.2 bis 3.2.4). Die $SOCS1_{FS}$-Variante im pFLAG-Plasmid scheint dagegen am ehesten der

Kontrollgruppe zu ähneln, während sie in einem Plasmid ohne zusätzlichem Epitop ebenfalls eine signifikante Erhöhung der STAT6-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle induziert (Kapitel 3.2.4). Die Beeinflussung der Wirkungsweise der SOCS1-Varianten durch den N-terminalen FLAG-Tag wird in einem gesonderten Punkt genauer diskutiert (Kapitel 4.3).

Obwohl die Abnahme der STAT6-Aktivität durch Koexpression des wildtypischen SOCS1 mit einer Abnahme von phosphoryliertem STAT6 in einer Western Blot Analyse korreliert, konnte keine signifikante Zunahme der STAT6-Phosphorylierung nach Koexpression der Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$ oder $SOCS1_{MUT7}$ detektiert werden (Kapitel 3.2.6, Abb. 27-30). Es könnte sein, dass die Gesamtproteinextrakte, die in den Western Blot Analysen verwendet wurden, zur exakten Darstellung der pSTAT6-Spiegel nicht hinreichend geeignet waren und eine Veränderung des phosphorylierten STAT6 nur im Zellkern nachweisbar ist. Eine detaillierte Untersuchung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinextrakten könnte hier also sinnvoll sein. Nach den Ergebnissen der Luciferase-Reporter-Assays dieser Arbeit ist allerdings ein Zusammenhang der konstitutiven STAT6-Aktivität mit den untersuchten SOCS1-Major-Mutanten möglich. Jedoch gibt es noch einige Unklarheiten, denen in Zukunft weiter nachgegangen werden sollte.

Die starke Erhöhung der STAT6-Aktivität durch die SOCS1-Varianten im Luciferase-Reporter-Assay wurde nach Stimulation mit Interleukin-4 beobachtet (Kapitel 3.2.3 Abb. 24 und Kapitel 3.2.4 Abb. 25). Daneben wäre auch eine Untersuchung des Einflusses der SOCS1-Major-Mutanten auf die STAT6-Aktivität im Luciferase-Reporter-Assay und die pSTAT6-Expression im Western Blot nach IL-13-Stimulation interessant. Interleukin 13 (IL-13) ähnelt in seinen biologischen Aktivitäten dem IL-4 und induziert so unter anderem ebenfalls über den JAK-STAT-Signalweg STAT6. Es ist bekannt, dass die HRS-Zellen des Hodgkin-Lymphoms IL-13 sezernieren und damit ihr Wachstum stimulieren [70, 134]. Bei der Untersuchung verschiedener cHL-Zelllinien gibt es außerdem Hinweise darauf, dass die Aktivierung von STAT6 weniger durch IL-4, sondern eher durch IL-13 ausgelöst wird, so führt auch die Blockierung von IL-13 mittels eines Antikörpers zu einer Abnahme der STAT6-Phosphorylierung [134]. Trotzdem sollte dem Grund der starken STAT6-Aktivität durch die Major-Mutanten nach IL-4-Stimulation weiter nachgegangen werden. Selbst durch IL-13 lässt sich die konstitutive STAT6-Aktivität in cHL-Zelllinien nicht vollständig erklären. In der Zelllinie L-540 war auch

ohne messbare IL-4- und IL-13-Spiegel phosphoryliertes STAT6 detektierbar, wenn auch in geringem Maße, und durch die Ausschaltung von IL-13 wurde die STAT6-Aktivität nicht vollständig gestoppt [134].

Weitere mögliche Erklärungen für die starke Erhöhung der STAT6-Aktivität durch die SOCS1-Major-Mutanten im Luciferase-Reporter-Assay wären zum Beispiel ein verzögerter Abbau von pSTAT6 oder eine verstärkte Phosphorylierung der vorgeschalteten Januskinasen. Auch wenn die IL-4-induzierten Signalwege vorwiegend über JAK1 und JAK3 verlaufen, konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition von JAK2 zu einer verminderten Phosphorylierung von STAT6 in der Zelllinie L-428 führt [146]. Da diese Zelllinie die SOCS1-Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{FS}$ besitzt, wäre eine Untersuchung des Phosphorylierung-Status der Januskinasen 1, 2, und 3 interessant. Auffällig war bei der beschriebenen Publikation außerdem, dass die JAK2-Inhibition in der L-428-Zelllinie nicht zur Apoptose führt, sondern nur bei Zelllinien, die auch eine *STAT*-Mutation besitzen [146]. SOCS1 kann jedoch nicht nur an phosphorylierte JAKs, sondern auch an die unphosporylierte JAK1 binden und die Aktivierung des Signalwegs verhindern [79]. Möglich wäre es daher auch, dass die SOCS1-Mutanten diese Bindung nicht mehr eingehen können und die Januskinase durch Zytokinstimulation ungehindert aktiviert werden kann.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass sich die SOCS1-Mutanten gar nicht auf die SOCS1-Funktionen in den JAK-STAT-Signalkaskaden im Zytoplasma auswirken, sondern womöglich erst später die nukleären SOCS1-Funktionen beeinflussen, beispielsweise durch eine Interaktion mit dem DNA-gebundenen STAT6. Im NF-κB-Signalweg ist bekannt, dass SOCS1 via seiner NLS in den Zellkern wandern, und dort direkt mit der NF-κB-Untereinheit p65 an der DNA agieren kann [118, 140]. Da die $SOCS1_{DEL}$-Variante (wie der $SOCS1_{WT}$) noch immer über eine unveränderte NLS verfügt, ist eine Translokation dieser Mutante in den Zellkern möglich. Die $SOCS1_{FS}$-Variante besitzt durch die Leserasterverschiebung keine NLS mehr und kann diese nukleären Funktionen daher nicht mehr aufweisen. Durch die Deletion, und die damit einhergehende Veränderung der Tertiärstruktur des SOCS1-Proteins bei der $SOCS1_{DEL}$-Variante, könnte möglicherweise eine neue oder verbesserte Bindungsstelle für STAT6 entstehen, mit welcher die $SOCS1_{DEL}$-Variante im Zellkern an das DNA-gebundene STAT6 binden, und dieses damit in seiner Funktion beeinflussen könnte. Möglich wäre beispielsweise eine

Stabilisierung der STAT6-DNA-Interaktion durch SOCS1, die in einer erhöhten bzw. verlängerten STAT6-Aktivität, wie im Luciferase-Reporter-Assay detektiert, resultieren würde. Um dieser Hypothese nachzugehen, wäre neben einer genauen Analyse der Tertiärstruktur der $SOCS1_{DEL}$ auch ein EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) hilfreich, mit welchem die Affinität von STAT6 zur DNA untersucht werden kann.

4.1.2 Beeinflussung des Transkriptoms in HEK-293-Zellen durch SOCS1

Durch seine regulatorische Funktion auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflusst SOCS1 die Genexpression der Zelle. In der UPX-Sequenzierung konnte, im Vergleich zur Kontrolle, ein signifikant höheres Vorliegen von *SOCS1*-RNA durch alle SOCS1-Varianten in der unstimulierten Gruppe gezeigt werden. Dies deutet auf die erfolgreiche Transkription der eingebrachten SOCS1-Plasmide hin.

In der generierten Heatmap der SOCS1-Varianten unter basalen Bedingungen (Kapitel 3.2.6, Abb. 31) bildet die $SOCS1_{DEL}$ im Bezug auf die Genexpression einen starken Kontrast zum wildtypischen SOCS1. Gene, welche durch den $SOCS1_{WT}$ vermindert exprimiert werden, werden durch die $SOCS1_{DEL}$ erhöht exprimiert und umgekehrt. Prinzipiell korreliert dieses Ergebnis mit den Ergebnissen der STAT1- und STAT6-Luciferase-Reporter-Assays (Kapitel 3.2.2, 3.2.3, 3.3.1), in denen durch die $SOCS1_{DEL}$ eine Funktionsumkehr des negativen Regulators hin zu einem Aktivator beobachtet werden konnte. Ob dieser Effekt der $SOCS1_{DEL}$ auf die Genexpression jedoch als dominant negativ oder als intrinsisch positiv gewertet werden kann, ist aus dieser Auswertung nicht klar festzulegen. Generell ist anzumerken, dass die hier dargestellte Auswertung der RNA-Sequenzierung erst den Anfang dieser Datenanalyse darstellt und noch eine detailliertere Gen-Set-Anreicherungsanalyse durchgeführt werden sollte. Wichtig ist außerdem zu bedenken, dass das bisher verwendete Analyse-Werkzeug Enrichr zwar Gene zu bestimmten Signalwegen zuordnet, jedoch nicht weiter differenziert, ob diese den jeweiligen Signalweg aktivieren oder hemmen.

Die stabile Expression von STAT6 in HEK-293T-Zellen führt zur Unterdrückung der IFN-γ-induzierten STAT1- und der TNF-α-induzierten NF-κB-Aktivierung [106]. Im NF-κB-Signalweg geschieht dies über eine Inhibition der p65-Translokation in den Zellkern [104]. Dazu passen auch die Ergebnisse der UPX-RNA-Sequenzierung,

welche eine Hochregulierung des TNF-α-induzierten NF-κB-Signalwegs durch das exogen hinzugegebene SOCS1 belegen. SOCS1 wird normalweise nicht in HEK-293T-Zellen exprimiert und hemmt, falls exogen exprimiert, die STAT6-Aktivität. Durch die Inhibition von STAT6 durch das wildtypische SOCS1 fällt der negative Effekt von STAT6 auf den Signalweg weg, wodurch ein Anstieg der NF-κB-Aktivität entstehen könnte. Da die, im NF-κB-Luciferase-Reporter-Assay verwendeten, HEK-293T-Zellen allerdings eigenständig auch kein STAT6-Protein herstellen können, müssen hierbei noch andere Mechanismen eine Rolle spielen.

In der UPX-Sequenzierung fällt auf, dass sich die hoch- und herunterregulierten Signalwege beim wildtypischen SOCS1 zwischen der unstimulierten und IL-4-stimulierten Gruppe nicht wesentlich unterscheiden. Möglicherweise war jedoch auch die Zytokinstimulation über einen Zeitraum von 30min zu kurz, sodass eine erneute Untersuchung der Genexpression nach längerer Stimulationszeit sinnvoll wäre.

Drei der durch den $SOCS1_{WT}$ hochregulierten Gene, welche am TNF-α-induzierten NF-κB-Signalweg beteiligt sind, sind *JUN*, *JUNB* und *JUND*. Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren ist, mit anderen Subgruppen wie *FOS*, *MAH* und *ATF,* Bestandteil des AP-1 (Activator protein 1) -Komplexes. Auch *ATF3* ist durch den $SOCS1_{WT}$ hochreguliert. In HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist die Aktivität des AP-1-Komplexes durch die Überexpression von *JUN* und *JUNB* erhöht und unterstützt die Tumorprogression [78, 88]. *JUNB* ist dabei ein Zielgen des konstitutiv aktiven NF-κB-Signalweges, während das c-Jun-Protein unabhängig davon exprimiert wird [88]. c-Jun ist der potenteste Transkriptionsfaktor und ein Aktivator von AP-1, es hemmt den Tumorsuppressor p53 und fördert damit die Zellproliferation [126]. JunB war als Inhibitor von c-Jun lange als wachstumshemmendes Protein bekannt [27]. Mittlerweile besteht jedoch die Annahme, dass JunB abhängig von Kontext auch die Tumorprogression unterstützen und damit als Onkogen wirken kann [6, 130], was auch die Überexpression im cHL erklären könnte. Über die Interaktion von SOCS1 mit AP-1 ist bisher nichts bekannt.

MYC ist ein Zielgen von c-Jun und in einem Großteil der klassischen Hodgkin-Lymphome exprimiert [62, 83, 145]. Es ist eines der bekanntesten Gene für den Zellzyklusprogress und hat damit eine onkogene Funktion [18]. Die RNA-

Sequenzierung zeigt eine starke Repression von *MYC* und von *MYC*-Zielgenen durch das wildtypische SOCS1. Auch wenn bisher keine Daten über eine Interaktion von SOCS1 und MYC bekannt sind, würde dies die Funktion von SOCS1 als Tumorsuppressor unterstützen. Kritisch ist dabei allerdings zu beachten, dass das wildtypische SOCS1 in meiner Analyse auch die Expression von *JUN* erhöht, welches wiederrum die *MYC*-Expression induziert.

Interessant ist auch, dass die *GH1*-Genexpression durch die zusätzliche Expression des $SOCS1_{WT}$ ohne Zytokinstimulation hochreguliert wird, es nach IL-4-Stimulation aber nicht mehr zu einer erhöhten Expression dieses Gens kommt. *GH1* kodiert für das Wachstumshormon (GH1), welches seine Wirkung über den JAK2-STAT5b-Signalweg entfaltet und damit unter anderem SOCS3, aber auch SOCS1 induziert [1]. SOCS1 als negativer Regulator führt im Feedback-Mechanismus wiederrum durch die Inhibition von JAK2 und durch die Bindung an den phosphorylierten Wachstumshormon-Rezeptor zur Hemmung der GH1-induzierten Transkriptionsaktivität [51, 114]. Das Wachstumshormon wird normalerweise in der Hypophyse produziert, seine Expression konnte jedoch auch in vielen anderen Geweben und Organen gezeigt werden. Auch viele Bestandteile des Immunsystems, wie Thymus, Milz, Lymphknoten und T- und B-Lymphozyten, aber auch Lymphome exprimieren GH1 und den zugehörigen Rezeptor, welche eine Rolle in der auto- und parakrinen Immunmodulation spielen [52, 154, 158]. Für die Lymphozyten konnte außerdem mittels RT-PCR und DNA-Sequenzierung gezeigt werden, dass das von ihnen produzierte GH1 und das GH1 aus der Hypophyse identisch sind [81]. Dass das wildtypische SOCS1-Protein zu einer erhöhten *GH1*-Expression führt, ist bisher nicht beschrieben worden und sollte weiter überprüft werden.

PIM-2 codiert für das Pim-2-Protein, welches zur Familie der Pim (Proviral insertion by murine) -Kinasen gehört. Pim-2 wird durch SOCS1 hochreguliert, was auch in der hier durchgeführten Expressionsanalyse gezeigt werden konnte, und kann in Kooperation mit diesem die IL-4-induzierte STAT6-Aktivierung im Sinne eines negativen Feedbacks hemmen. Dabei führt Pim-2 zur Phosphorylierung von SOCS1 und verlängert dessen Halbwertszeit, und somit die inhibitorische Wirkung auf seine Zielproteine deutlich [24]. *PIM-2* ist allerdings auch als potenzielles Onkogen beschrieben, welches vor allem anti-apoptotisch wirkt und das Überleben der einzelnen Zellen fördert [44]. Neben SOCS1 hemmt es durch Stabilisierung

auch die Degradation des Onkogens c-Myc [168]. Im Tierversuch kann die Überexpression von Pim-2 in Kombination mit c-Myc die Entstehung von Lymphomen begünstigen [5], was unter anderem durch eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs erklärt wird [50]. Auch wenn die Wirkung von Pim-2 durch die Stabilisierung von SOCS1 und c-Myc gegensätzlich zu sein scheint, besteht die Annahme, dass Pim-2 alleine nur zur Feinabstimmung der Regulation des JAK-STAT-Signalweges für eine normale Zellproliferation beiträgt und erst in Kombination mit einem überexprimierten Onkogen, wie zum Beispiel c-Myc, zur Tumorentstehung führt [111].

Cochet et. al. zeigten bereits, dass die Blockade der konstitutiven STAT-Aktivierung in cHL-Zelllinien zur Aktivierung von Caspasen und letztendlich zum Zelltod führt. Vor allem die Hemmung der Genexpression von *IAP* und *TRAF* wurde hier als möglicher Stimulus für die, an der Apoptose beteiligten, Caspasen 3 und 8 erwähnt [31]. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Ergebnisse dahingehend, dass es auch hier durch das wildtypische SOCS1-Protein, welches die STAT-Aktivität blockiert, zu einer signifikanten Hochregulierung der am p53- bzw. Apoptose-Signalweg beteiligten Gene in der RNA-Sequenzierung kommt. Hochreguliert sind dabei aber nicht nur pro-apoptotische Gene wie *SP1* und *CTNNB1* [29, 36], sondern auch anti-apoptotische Gene wie *JUN* oder *HBEGF*, welches für ein Apoptose-inhibierendes Protein kodiert [28]. SOCS1 spielt im p53-Signalweg ebenfalls eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor, indem es als Adapter für die ATM-abhängige Phosphorylierung von p53 dient, welche die Apoptose induziert [22]. Wenn SOCS1 phosphoryliert wird, geht jedoch die Bindungsstelle für ATM und somit die tumorsuppressive Wirkung von SOCS1 verloren [119].

Ein weiteres interessantes Gen, dessen Expression durch den $SOCS1_{WT}$ nach IL-4-Stimulation hochreguliert wurde, ist *FOXO1*. Es gehört zur FOXO (forkhead transcription factors group O) -Gruppe, welche aus vier Transkriptionsfaktoren besteht und unter anderem via Apoptose-Induktion und Zellzyklus-Arrest tumorsuppressive Eigenschaften aufweist. Das FOXO1-Protein ist zudem ein wichtiger Regulator der B-Zell-Differenzierung und seine Inaktivierung über den BCR sichert deren Überleben [136]. In Zelllinien des klassischen Hodgkin-Lymphoms ist *FOXO1* typischerweise herunterreguliert und die Re-Aktivierung des Tumorsuppressors führt zum Wachstumsarrest und zur Apoptose der Zellen [159]. Erklärt wurde diese *FOXO1*-Repression im cHL zumindest teilweise durch eine

Aktivierung der Proteinkinasen ERK und AKT. Mit der Erkenntnis, dass der $SOCS1_{WT}$ die *FOXO1*-Expression erhöht, stellt sich nun die Frage, ob auch die im cHL sehr häufigen *SOCS1*-Mutationen an der herunterregulierten *FOXO1*-Expression beteiligt sind. In den untersuchten SOCS1-Major-Mutationen dieser Arbeit konnte jedoch keine verminderte *FOXO1*-mRNA-Expression im Vergleich mit der Kontrolle festgestellt werden.

4.1.3 Konzentrations- und zelltypabhängige Effekte von SOCS1 auf STAT1

SOCS1 ist es ein bekannter Inhibitor des IFN-γ-induzierten JAK-STAT-Signalwegs [4, 41, 112], welcher im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus durch STAT1 induziert wird [41]. Er spielt eine wichtige Rolle in der Balance zwischen der positiven und der schädigenden Wirkung von IFN-γ auf den Organismus. Der komplette Verlust von SOCS1 bei Mäusen führt zu einer Hyperreagibilität auf Interferon-γ [4] und endet innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt letal [137]. SOCS1 bindet allerdings nicht an den IFN-γ Rezeptor [79], die Inhibition des Signalweges erfolgt durch die Interaktion mit der SOCS1-Box und der daraus resultierenden Ubiquitinierung, sowie durch eine Hemmung von JAK1, JAK2 und TYK2 [79, 112].

Der beschriebenen Literatur zufolge wurde erwartet, dass die STAT1-Aktivität im Luciferase-Reporter-Assay durch den $SOCS1_{WT}$ stark abnehmen wird und dass SOCS1-Mutanten mit Veränderungen der SH2-Domäne oder der SOCS-Box diese Wirkung gar nicht oder in geringerem Maße aufweisen. Hadjadj et. al. publizierte 2020 bereits eine Untersuchung des wildtypischen SOCS1 und verschiedener SOCS1-Mutanten in Autoimmun-Krankheiten, in denen dieser negative Effekt auch gezeigt werden konnte. Im Luciferase-Reporter-Assay zeigt der, in HEK-293T-Zellen transfizierte, SOCS1-Wildtyp eine deutliche Inhibition der IFN-γ-induzierten STAT1-Luciferase-Expression. Bei den SOCS1-Mutanten ist dieser inhibitorische Effekt nicht mehr zu sehen [49]. Nach der jeweiligen Zytokinstimulation wurde bei EBV-B-Zellen der Patienten mit *SOCS1*-Mutation eine erhöhte Expression von pSTAT1, sowie eine verstärkte Translokation von pSTAT1 in den Nukleus gezeigt [49]. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nur teilweise reproduziert werden, da der $SOCS1_{WT}$ in den Luciferase-Reporter-Assays in höheren Konzentrationen nicht mehr zu einer signifikanten Abnahme der STAT1-Aktivität geführt hat. Es wurde aber bereits beschrieben, dass die maximale inhibitorische

Wirkung von SOCS1 auf STAT1 bei einer sehr geringen SOCS1-Expression erreicht wird [135]. Daher besteht die Möglichkeit, dass die transfizierten SOCS1-Plasmid-Mengen in meiner Arbeit zu groß waren und für einen besseren Effekt von SOCS1 geringere Plasmid-Konzentrationen verwendet werden sollten. Der zugrundeliegende Mechanismus für den Verlust der SOCS1-Wirkung auf STAT1 in höheren Konzentrationen ist jedoch bisher noch unklar.

In dieser Arbeit konnte auch die, durch das wildtypische SOCS1 erwartete, verminderte STAT1-Phosphorylierung in den Western Blot Analysen nicht gezeigt werden. Eine Erklärung hierfür wäre, wie bereits beschrieben, dass die verwendete Plasmid-Konzentration und somit die SOCS1-Expression zu hoch war. Für die Proteindetektion in Western Blot Analysen wurden jeweils 100ng/ml oder sogar 250ng/ml SOCS1-Plasmid verwendet, was genau den Konzentrationen entspricht, bei welchen auch im Luciferase-Reporter-Assay kein negativer Effekt des wildtypischen SOCS1 auf die STAT1-Aktivität mehr gesehen werden konnte. Neben einer IFN-γ-Stimulation über 24h haben Hadjadj et. al. nicht explizit angegeben, welche Plasmid-Konzentration verwendet wurde, während in der hier vorliegenden Arbeit über 18h stimuliert und verschiedene Plasmid-Konzentrationen untersucht wurden. Es ist also möglich, dass die Ergebnisse durchaus übereinstimmen, wenn man nur eine niedrige transfizierte Plasmid-Menge betrachtet. Die erhöhte Expression von pSTAT1 durch die SOCS1-Mutanten im Western Blot wurde außerdem nicht in HEK-293T-Zellen, sondern in B-Zellen von Patienten mit nachgewiesener *SOCS1*-Mutation detektiert [49]. Deshalb ist auch eine zelltyp-abhängiger Effekt der SOCS1-Varianten nicht ausgeschlossen. Nicht beantwortet bleibt außerdem die Frage, wieso das wildtypische SOCS1 in höheren Konzentrationen im Luciferase-Reporter-Assay nicht mehr nur neutral, sondern sogar aktivierend auf die STAT1-Aktivität wirkt.

Die untersuchten SOCS1-Mutanten bewirken ebenfalls eine erhöhte STAT1-Aktivität im Luciferase-Reporter-Assay. Besonders die Major-Mutante $SOCS1_{DEL}$ und die Major-Mutante $SOCS1_{MUT7}$ führen konzentrationsabhängig zu einer ansteigenden STAT1-Aktivität. Die $SOCS1_{FS}$-Variante und die Minor-Mutante $SOCS1_{MUT3}$ wirken in geringerem Ausmaß aktivierend auf STAT1, jedoch erst in höheren Konzentrationen. Da die Minor-Mutation vermutlich die Funktion des SOCS1-Proteins nicht beeinflusst, passen die Ergebnisse mit der aktivierenden Wirkung des wildtypischen SOCS1 in höheren Konzentrationen zusammen.

Die Rolle von STAT1 in der Tumorgenese ist nicht eindeutig geklärt. STAT1 gilt in den meisten Fällen als Tumorsuppressor und bewirkt unter anderem einen Wachstumsarrest, einen Stopp der Angiogenese, sowie Apoptose [26, 60]. Generell ist STAT1 zum Beispiel in Zelllinien des cHL konstitutiv aktiviert [31]. Die Überexpression von STAT1 in der cHL-Zelllinie L-1236 bewirkt eine verstärkte Apoptose, während STAT6 das Tumorüberleben unterstützt [17]. Allerdings gibt es auch cHL-Zelllinien, in denen die gegenteilige Wirkung von STAT1 beobachtet wurde und somit die mögliche Rolle von STAT1 als Tumorpromoter bekräftigt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass durch den Transkriptionsfaktor viele anti-apoptotische Gene wie *TRAF1*, welches die Tumorzellen im cHL vor der Apoptose bewahrt, induziert werden [31]. Insgesamt wäre STAT1 ein interessantes Ziel für neue Tumortherapien, jedoch muss dafür die genaue Rolle des Proteins in der Tumorgenese noch besser verstanden werden.

Auch wenn die veränderte STAT1-abhängige Reportergen-Aktivität, genauso wie bei STAT6, nicht abschließend durch eine vermehrte Phosphorylierung von STAT1 erklärt werden kann, gibt es hier ebenfalls weitere Erklärungsansätze, welche in Zukunft untersucht werden sollten. Durch einen Wegfall der inhibitorischen SOCS1-Funktion durch die Major-Mutanten wäre eine vermehrte Phosphorylierung von JAK, die dann zu einer kontinuierlich stärkeren STAT-Phosphorylierung führt, möglich. Dass eine konstitutive STAT-Aktivierung in Zusammenhang mit einer JAK-Phosphorylierung steht, wurde bereits gezeigt [31]. Eine weitere Hypothese ist, dass die erhöhte Aktivität des STAT1-abhängigen Reporters durch die SOCS1-Mutanten gar nicht durch pSTAT1, sondern durch unphosphoryliertes STAT1 entsteht. Dieses agiert ebenfalls als Transkriptionsfaktor und verlängert zum Beispiel die Expressionsdauer IFN-γ-induzierter Zielgene [25].

4.2 Deregulation des NF-κB-Signalwegs

Der NF-κB-Signalweg ist der zweite regelhaft konstitutiv aktive Signalweg im Hodgkin-Lymphom und fördert das Überleben der Tumorzellen. Die Inhibition des kanonischen NF-κB-Signalweges induziert die Apoptose in HRS-Zellen [89]. In diesem Signalweg ist die Funktion von SOCS1 im Vergleich zum JAK-STAT-Signalweg weniger ausführlich erforscht. Allgemein wird jedoch angenommen, dass SOCS1 als negativer Regulator wirkt, indem es DNA-gebundenes p65 im Zellkern bindet und dieses mittels Polyubiquitinierung für den proteasomalen Abbau

kennzeichnet [118, 140]. Die Erwartung war daher, dass das wildtypische SOCS1 zu einer signifikanten Abnahme der NF-kB-abhängigen Reportergen-Aktivität führt, was auch schon in murinen embryonalen Fibroblasten nach IL-1β-induzierter p65-Aktivierung gezeigt wurde [118]. Die generierten SOCS1-Mutanten sollten mit der Frage, ob sie zu einer geringeren oder sogar zum Wegfall dieser inhibitorischen SOCS1-Funktion führen, untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde überraschenderweise sogar ein positiver Effekt des $SOCS1_{WT}$ auf die TNF-α-induzierte NF-κB-Aktivität gezeigt, welcher auch durch die SOCS1-Mutanten erreicht wurde. Damit ist das Ergebnis das absolute Gegenteil der beschriebenen Erwartung. Verschiedene andere Publikationen geben jedoch Hinweise darauf, dass die regulatorische Funktion von SOCS1 im NF-κB-Signalweg abhängig von diversen Faktoren, wie beispielsweise dem induzierenden Zytokin oder der untersuchten Zelllinie ist.

In Raw-Zellen hat SOCS1 nur auf den LPS-induzierten NF-κB-Signalweg einen negativen Einfluss im Luciferase-Reporter-Assay, nicht aber auf den TNF-α-induzierten Signalweg [72]. Es gibt eine weitere Untersuchung, in denen SOCS1 im Luciferase-Reporter-Assay die RelA-induzierte NF-κB-Aktivität nach TNF-α-Stimulation signifikant erhöht [110] und somit eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufweist. In diesem Fall wurden jedoch Raw264.7-Zellen verwendet, während in meiner Arbeit HEK-293T-Zellen transfiziert wurden. Der positive Effekt von SOCS1 auf NF-κB konnte allerdings nur in den Raw264.7-Zellen und nicht in NIH-3T3- und HeLa-Zellen gezeigt werden [110], was die Hypothese des zelltypabhängigen Effekts von SOCS1 untermauert.

Die Publikation, welche die Degradation von p65 durch SOCS1 zeigte, wurde zwar mit HEK-293T-Zellen durchgeführt, allerdings wurden diese mit IL-1β stimuliert und nicht mit TNF-α [118, 140]. Daher ist die Hypothese naheliegend, dass der Einfluss von SOCS1 auf den NF-κB-Signalweg zusätzlich abhängig vom stimulierenden Zytokin ist. Um dieser Überlegung nachzugehen, könnte man die mit IL-1β durchgeführten Versuche, wie eine Immunopräzipitation mit p65, wiederholen und stattdessen mit TNF-α stimulieren. Umgekehrt wäre auch eine Untersuchung der Wirkung des wildtypischen SOCS1 und der, in dieser Arbeit generierten, SOCS1-Mutanten im Bezug auf den IL-1β-induzierten NF-κB-Signalweg möglich.

Passend zur erhöhten NF-κB-Aktivität im Luciferase-Reporter-Assay wurden in der vorliegenden Arbeit auch in der RNA-Sequenzierung Gene des TNF-α-induzierten NF-κB-Signalweges durch den SOCS1-Wildtyp, ohne und mit Interleukin-4-Stimulation, hochreguliert. SOCS1 scheint daher nicht nur einen positiven Effekt auf die Signalweg-spezifische Aktivierung von NF-κB zu haben, sondern scheint diesen auch über andere Mechanismen, wie möglicherweise den IL-4-induzierten JAK-STAT6-Signalweg zu fördern. Alle diese Ergebnisse in den HEK-293T-Zellen gilt es natürlich zu validieren, zum Beispiel über die Untersuchung der p65-Phosphorylierung in einer Western Blot Analyse. Falls die positive Wirkung von SOCS1 auf NF-κB sich bestätigt, wäre SOCS1 damit im Bezug auf diesen Signalweg kein Tumorsuppressor, sondern ein onkogenes Protein.

Die SOCS1-Varianten haben ebenfalls einen verstärkenden Effekt auf die NF-κB-Aktivität im Luciferase-Reporter-Assay. Die, für die Minor-Mutanten exemplarisch untersuchte, Mutante 3 führt zwar nicht zu einer signifikant erhöhten NF-κB-Reporteraktivität, ähnelt aber am ehesten dem Wildtyp. Die Minor-Mutanten scheinen die Funktion von SOCS1 im Bezug auf den TNF-α-induzierten NF-κB-Signalweg also nicht signifikant zu beeinflussen. Die SOCS1-Major-Mutanten dagegen scheinen im pFLAG-Plasmid zu einer Veränderung der SOCS1-Wirkung auf NF-κB führen, welche sich aber durch die Überprüfung mittels anderer Vektorsysteme nicht bestätigen lässt. Mit dem N-terminalen FLAG-Epitop gleicht die $SOCS1_{FS}$-Variante der Kontrollgruppe (Kapitel 3.4.1), was einem Funktionsverlust von SOCS1 entspricht. Einen besonders starken Effekt zeigt die FLAG-$SOCS1_{DEL}$-Variante, bei der es auch ohne TNF-α-Stimulation zu einer stark erhöhten NF-κB-Aktivität kommt, was an eine konstitutive Aktivierung denken lässt. Ohne N-terminalen FLAG-Tag fällt dieser Effekt jedoch vollständig weg und die $SOCS1_{DEL}$-Variante zeigt die gleiche Wirkung auf die NF-kB-Aktivität wie der $SOCS1_{WT}$. Die $SOCS1_{FS}$-Variante entspricht ohne FLAG-Markierung nicht mehr der Kontrolle, sondern ebenfalls dem wildtypischen SOCS1 (Kapitel 3.4.2). Auf die Beeinflussung der Varianten durch den FLAG-Tag wird nochmals gesondert eingegangen.

Beide untersuchten Major-Mutanten führen zusammenfassend eher nicht zu einer Funktionsänderung von SOCS1 in Bezug auf den kanonischen NF-kB-Signalweg. Die Interaktion des wildtypischen SOCS1 mit NF-κB muss also auf einem Mechanismus beruhen, welcher durch die Mutationen nicht beeinträchtigt wird. Strebovsky et. al. haben beschrieben, dass die Interaktion von SOCS1 mit p65 über

den N-terminalen Teil der SH2-Domäne besteht [140]. Da Mutationen und auch die vollständige Deletion dieser Domäne jedoch nicht zum kompletten Verlust der Bindung führen, müssen noch weitere Regionen an der Interaktion beteiligt sein [140]. Dazu passt auch die Beobachtung, dass die Major-Mutanten $SOCS1_{DEL}$ und $SOCS1_{FS}$, welche beide die SH2-Domäne von SOCS1 betreffen, die Funktion des Proteins nicht beeinflussen. Von besonderem Interesse ist die $SOCS1_{FS}$-Variante, da diese durch die Leserasterverschiebung auch die nachfolgende NLS und die SOCS-Box verloren hat. Beide sind normalerweise als wichtige Domänen für die Hemmung des NF-κB-Signalwegs durch SOCS1 bekannt [118, 140]. Trotzdem zeigt die $SOCS1_{FS}$-Variante im Luciferase-Reporter-Assay den gleichen Effekt wie der SOCS1-Wildtyp. Wie bereits erwähnt, wurden die in der Literatur beschriebenen Interaktionen jedoch nicht spezifisch für den TNF-α-induzierten NF-κB-Signalweg untersucht, sodass es auch hier unentdeckte, zytokin- und zelltypabhängige Interaktionsmechanismen geben könnte. Erste Hinweise auf die Interaktion des wildtypischen SOCS1 und der SOCS1-Varianten könnte zum Beispiel ein EMSA geben, mit welchem eine veränderte p65-DNA-Bindung untersucht werden kann.

Zusammenfassend muss vor allem zuerst die Rolle des wildtypischen SOCS1 in der Regulation des TNF-α-induzierten NF-κB-Signalwegs geklärt und verstanden werden, bevor dann einzelne SOCS1-Mutanten näher charakterisiert werden können.

4.3 Transfektionsmethodik

Eine Schwachstelle in der Methodik dieser Arbeit ist die transiente Transfektion der SOCS1-Varianten in die HEK-293-Zellen, mit welcher eine gleichmäßige Transfektion der Varianten nur schwierig zu erreichen war. Im Luciferase-Reporter-Assay ist dies durch die Normalisierung gegen die, durch den Aktin-Promotor-kontrollierte, Expression der Renilla-Luciferase zu vernachlässigen, da auch der Renilla-Wert abhängig von der Transfektionsrate ist. In den Western Blot Analysen wird dagegen nur gegen ein ubiquitär in den Zellen vorhandenes Protein, zum Beispiel β-Aktin, normalisiert, um damit eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels zu gewährleisten. Wie auf den Abbildungen der pSTAT6/STAT6-Western Blots (Kapitel 3.2.6, Abb. 27-30) an der Proteindetektion von SOCS1 und FLAG zu erkennen ist, fällt vor allem die Detektionsbande des wildtypischen SOCS1 und auch des $SOCS1_{FS}$ häufig geringer aus als die der $SOCS1_{DEL}$. Da der SOCS1-

Antikörper an das C-terminale Ende und somit an die SOCS-Box bindet, ist für den $SOCS1_{FS}$, welcher diese Domäne nicht mehr besitzt, die Detektion des N-terminalen FLAG-Epitops nötig [155]. Ursächlich für diese verminderte Detektion des $SOCS1_{WT}$- bzw. $SOCS1_{FS}$-Proteins könnte eine verminderte Expression des Proteins, oder auch eine geringere Transfektionsrate des Plasmids sein. Warum die transiente Transfektion dieser beiden SOCS1-Varianten weniger effizient gewesen sein könnte, gilt es noch zu bestimmen. Möglich wäre zum Beispiel eine erhöhte Toxizität dieser Varianten, welche zu einem rascheren Zelltod der transfizierten Zellen führt. Diese würde dann die ohnehin schon strapazierende Wirkung der Transfektions-Methode auf die Zellen noch weiter verstärken. Gemessen werden könnte dieser Effekt beispielsweise in einem Proliferations- oder Apoptoseassay.

Auch wenn die transiente Transfektion für die erste Charakterisierung der SOCS1-Varianten ausreicht, sollte in der Fortführung dieses Projekts eine stabile Transduktion in die HEK-293-Zellen erfolgen, um eine effizientere und vor allem gleichmäßigere Expression der unterschiedlichen SOCS1-Varianten zu erreichen. Die Grundlagen hierfür wurden in dieser Arbeit mit der Umklonierung einiger Varianten in das lentivirale pCW57-Vektorsystem bereits gelegt, da dieses für eine stabile Transduktion geeignet ist. Durch die Selektion mit Puromycin werden außerdem alle nicht erfolgreich transduzierten Zellen aussortiert und die Genexpression des Vektors kann gezielt mit Tetracyclin induziert werden [13, 46]. Gelingt die stabile Transduktion der HEK-293-Zellen, besteht der nächste Schritt in der Transduktion von B-Zellen, um die Effekte der SOCS1-Varianten auf die Ursprungszellen des Hodgkin-Lymphoms zu untersuchen. Da sich B-Zellen sehr schnell teilen, ist die lentivirale Transduktion das Mittel der Wahl, da die DNA hiermit in den Zellkern integriert wird. B-Zellen sind bekannterweise schwieriger zu transfizieren bzw. zu transduzieren, sodass verschiedene Protokoll für eine maximale Effizienz getestet werden sollten [19, 95, 142].

4.4 Einfluss von Tag-Markierungen auf die Proteinfunktion

Eine weit verbreitete Methode zur molekularen Markierung ist die kovalente Bindung eines zusätzlichen Peptidepitops, eines sogenannten Tags, an das gewünschte Zielprotein, um beispielsweise dessen Expression in der Zelle nachweisen zu können. Durch die Verifizierung der Luciferase-Reporter-Assays mittels verschiedener Vektorsysteme hat sich herausgestellt, dass die molekularen

Markierungen einen wesentlichen Einfluss auf die Funktion des markierten Proteins haben können. Die Veränderung von Proteinstrukturen und -funktion wurde zuvor schon für unterschiedliche Proteinmarkierungen beschrieben [35, 169].

Aufgefallen ist diese Beeinflussung der Proteinfunktion in der vorliegenden Arbeit zum einen bei der $SOCS1_{FS}$-Mutante im STAT6-Luciferase-Reporter-Assay. Mit FLAG-Tag ähnelt die Funktion der $SOCS1_{FS}$-Mutante der des Leervektors, während die STAT6-Aktivität bei der Untersuchung der $SOCS1_{FS}$-Variante in einem Plasmid ohne Markierung im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ist. Diese Beeinflussung durch den N-terminalen FLAG-Tag könnte durch eine Beeinträchtigung der KIR, welche am N-terminalen Ende von SOCS1 und damit unmittelbar in der Nähe der FLAG-Markierung liegt, erklärbar sein. Im 3D-Modell steht die KIR in direkter Interaktion mit JAK1 und spielt eine essentielle Rolle in der negativen Regulation von SOCS1 [79]. Eigentlich müsste es durch die Beeinträchtigung der KIR durch den FLAG-Tag zu einer Abnahme der SOCS1-Funktion und zu einer Zunahme der STAT6-Aktivität kommen. Warum aber genau das Gegenteil passiert und es durch den Wegfall des FLAG-Tags zu einer erhöhten STAT6-Aktivität kommt, sollte noch weiter untersucht werden. Möglichweise verändert sich auch die Tertiärstruktur des SOCS1-Proteins durch die Leserasterverschiebung der Frameshift-Mutation komplett und es kommt zu einer völlig anderen Interaktion mit den Januskinasen. Zum anderen hat der FLAG-Tag auch die Funktion der SOCS1-Varianten im NF-κB-Luciferase-Reporter-Assay beeinflusst. Mit FLAG-Tag erhöhen nur der $SOCS1_{WT}$ und die $SOCS1_{DEL}$ die NF-κB-Aktivität signifikant, während die $SOCS1_{FS}$-Variante wieder der Kontrollgruppe gleicht und somit einem Funktionsverlust von SOCS1 entspricht. Einen besonders starken Effekt zeigt hier die $SOCS1_{DEL}$-Variante, bei der es auch ohne TNF-α-Stimulation zu einer stark erhöhten NF-κB-Aktivität kommt, was an eine konstitutive Aktivierung denken lässt. Ohne N-terminalen FLAG-Tag fällt dieser Effekt vollständig weg und die $SOCS1_{DEL}$-Variante zeigt die gleiche Wirkung auf die NF-kB-abhängige Reporterexpression wie der $SOCS1_{WT}$. Die $SOCS1_{FS}$-Variante entspricht ohne FLAG-Markierung nicht mehr der Kontrolle, sondern ebenfalls dem wildtypischen SOCS1.

Generell kommt es durch die Major-Mutanten zur Veränderung mehrerer Aminosäuren und zur Längenänderung des SOCS1-Proteins. Die Betrachtung der Tertiärstruktur der einzelnen SOCS1-Mutanten in einer Art 3D-Modell könnte neue

Hinweise auf eine veränderte Interaktion mit JAKs oder STATs im Vergleich zum Wildtyp liefern. Liau et. al. verwendeten für die Darstellung der SOCS1-Interaktionen eine Methode der Röntgen-Kristallographie. Die Herstellung eines kompletten humanen SOCS1-Modells war damit zwar nicht erfolgreich, jedoch konnten mit den sehr ähnlichen SOCS1-Proteinen aus *Gallus gallus* und *Xenopus laevis* die Interaktionen mit JAK1 oder dem Elongin-BC-Komplex molekular sehr detailliert untersucht werden [79]. Eine solche Methode wäre auch für die SOCS1-Major-Mutanten geeignet, um die genaue Interaktion mit den Januskinasen oder auch mit STAT6 zu charakterisieren.

Zusammenfassend ist die Feststellung, dass Markierungs-Tags die Funktion des Zielproteins verändern können, jedoch eine wichtige Erkenntnis für die Interpretation von zukünftigen Versuchen und impliziert die notwendige Durchführung von Kontrollversuchen ohne die jeweilige Markierung.

5. Zusammenfassung

Die Prognose des klassischem Hodgkin-Lymphoms (cHL) ist bei adäquater Therapie sehr gut, jedoch erleiden viele Patienten starke Nebenwirkungen durch die aggressive Behandlung und das Risiko für die Entstehung von Zweitneoplasien ist erhöht. Eine neue Herangehensweise ist daher die Adressierung bestimmter Proteine in hochregulierten Signalwegen durch Antikörper oder andere spezifische Inhibitoren. Ein konstitutiv aktivierter Signalweg im cHL ist der JAK (Januskinase) -STAT (Signal Transducer and Activator of Transkription) -Signalweg, welcher unter anderem durch SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1) negativ reguliert werden kann. Mutationen im *SOCS1*-Gen sind mit ungefähr 50% aller cHL-Fälle sehr häufig, sie geben einen Hinweis auf die Relevanz von SOCS1 in der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms und stellen somit ein potenzielles, vielversprechendes Ziel zukünftiger Therapien dar. Welchen Einfluss die *SOCS1*-Mutationen auf beteiligte Signalwege haben, ist bisher nicht ausreichend bekannt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss potenziell onkogener SOCS1-Varianten aus cHL-Patientenfällen und -Zelllinien auf verschiedene konstitutiv aktive Signalwege im cHL untersucht und mit verschiedenen Plasmiden validiert. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Mutationen im *SOCS1*-Gen nicht zu einer einheitlichen funktionellen Änderung des Proteins führen. Neben keiner Funktionsänderung im JAK-STAT-Signalweg konnte bei einigen Mutationen ein Funktionsverlust oder sogar eine Funktionsumkehr des negativen Regulators hin zu einem Aktivator beobachtet werden. SOCS1-Minor-Mutanten erreichen keine Veränderung der STAT6-Aktivität im Vergleich zum wildtypischen SOCS1, haben aber möglicherweise einen positiven Effekt auf die STAT1-abhängige Genexpression. Der erwartete negative Effekt des SOCS1-Wildtyps konnte im STAT6-Luciferase-Reporter-Assay reproduziert werden, während er bei STAT1 nur in den niedrigen SOCS1-Plasmid-Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. In höheren Konzentrationen kam es überraschenderweise sogar zu einem Anstieg der relativen STAT1-Aktivität durch das wildtypische SOCS1. Die SOCS1-Major-Mutanten führten zu einer erhöhten STAT6- und STAT1-Aktivität im Sinne einer Funktionsumkehr. Die Hypothese war dabei, dass die veränderte STAT-Aktivität durch eine verstärkte Phosphorylierung bedingt ist. In Western Blot Analysen konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden. Der stark aktivierende Effekt der SOCS1-

Mutanten auf STAT6 und STAT1 scheint daher nicht oder nur bedingt durch eine erhöhte Phosphorylierung dieser Transkriptionsfaktoren bedingt zu sein. Außerdem wurde eine Beeinflussung der SOCS1-Funktion durch den N-terminalen FLAG-Tag (Peptidepitop zur molekularen Markierung) entdeckt, was die Verwendung dieses Plasmids für weitere Charakterisierungen der SOCS1-Varianten in Frage stellt.

Entgegen der gängigen Erwartung, dass das wildtypische SOCS1 zu einer Repression des NF-κB (Nuklear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) -Signalwegs führt, konnte im TNF-α (Tumornekrosefaktor alpha) -induzierten NF-κB-Luciferase-Reporter-Assay eine erhöhte Promotoraktivität durch den SOCS1-Wildtyp gezeigt und mittels verschiedener Vektorsysteme überprüft werden. Der Vergleich mit vorbekannten Daten der Literatur lässt die Hypothese entstehen, dass der Einfluss von SOCS1 auf den NF-κB-Signalweg abhängig vom untersuchten Zelltyp und vom stimulierenden Zytokin sein könnte. Die SOCS1-Major-Mutanten erzielten, in einem Plasmid ohne N-terminale Markierung, den gleichen Effekt auf NF-κB wie der SOCS1-Wildtyp und scheinen daher in diesem Signalweg keine Funktionsänderung zu bewirken.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass jede *SOCS1*-Mutation einzeln betrachtet werden muss, es ist keine Generalisierung des *SOCS1*-Mutationsstatus im Hinblick auf die Beeinflussung des JAK-STAT- und des NF-κB-Signalwegs möglich. Im Verlauf der Arbeit sind viele neue Hypothesen und Fragestellungen entstanden. In Zukunft sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich der positive Effekt der SOCS1-Major-Mutanten auf die STAT6- und STAT1-Aktivität erklären lässt und welche Rolle die Phosphorylierung dabei spielt. Für die weitere Untersuchung der Mutationen muss außerdem zunächst der SOCS1-Wildtyp noch besser verstanden werden. Unter der Diskussion der bekannten Literatur sollte vor allem seine Funktion im NF-κB-Signalweg kritisch hinterfragt, und dem hier gezeigten positiven Effekt auf die TNF-α-induzierte NF-κB-Aktivität weiter nachgegangen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams T E, Hansen J A, Starr R, Nicola N A, Hilton D J, Billestrup N: Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. Journal of Biological Chemistry 273: 1285–1287 (1998).
2. Adzhubei I A, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V E, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov A S, Sunyaev S R: A method and server for predicting damaging missense mutations. Nature Methods 7: 248–249 (2010).
3. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, Colombatti A: Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. International journal of cancer 122: 769–776 (2008).
4. Alexander W S, Starr R, Fenner J E, Scott C L, Handman E, Sprigg N S, Corbin J E, Cornish A L, Darwiche R, Owczarek C M, Kay T W, Nicola N A, Hertzog P J, Metcalf D, Hilton D J: SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. Cell 98: 597–608 (1999).
5. Allen J D, Verhoeven E, Domen J, van der Valk M, Berns A: Pim-2 transgene induces lymphoid tumors, exhibiting potent synergy with c-myc. Oncogene 15: 1133–1141 (1997).
6. Andrecht S, Kolbus A, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M: Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. Journal of Biological Chemistry 277: 35961–35968 (2002).
7. Ansell S M, Lesokhin A M, Borrello I, Halwani A, Scott E C, Gutierrez M, Schuster S J, Millenson M M, Cattry D, Freeman G J, Rodig S J, Chapuy B, Ligon A H, Zhu L, Grosso J F, Kim S Y, Timmerman J M, Shipp M A, Armand P: PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. The New England Journal of Medicine 372: 311–319 (2015).
8. Armand P, Shipp M A, Ribrag V, Michot J-M, Zinzani P L, Kuruvilla J, Snyder E S, Ricart A D, Balakumaran A, Rose S, Moskowitz C H: Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology 34: 3733–3739 (2016).
9. Babon J J, Kershaw N J, Murphy J M, Varghese L N, Laktyushin A, Young S N, Lucet I S, Norton R S, Nicola N A: Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. Immunity 36: 239–250 (2012).

10. Babon J J, Lucet I S, Murphy J M, Nicola N A, Varghese L N: The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. Biochemical Journal 462: 1–13 (2014).

11. Babon J J, Sabo J K, Zhang J G, Nicola N A, Norton R S: The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signalling suppression. Journal of Molecular Biology 387: 162–174 (2009).

12. Baetz A, Koelsche C, Strebovsky J, Heeg K, Dalpke A H: Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. FASEB Journal 22: 4296–4305 (2008).

13. Barger C J, Branick C, Chee L, Karpf A R: Pan-Cancer Analyses Reveal Genomic Features of FOXM1 Overexpression in Cancer. Cancers 11 (2019).

14. Bargou R C, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara M Y, Arnold W, Royer H D, Grinstein E, Greiner A, Scheidereit C, Dörken B: Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. Journal of Clinical Investigation 100: 2961–2969 (1997).

15. Bargou R C, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara M Y, Bommert K, Royer H D, Scheidereit C, Dörken B: High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Blood 87: 4340–4347 (1996).

16. Barth T F E, Martin-Subero J I, Joos S, Menz C K, Hasel C, Mechtersheimer G, Parwaresch R M, Lichter P, Siebert R, Möller P: Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. Blood 101: 3681–3686 (2003).

17. Baus D, Nonnenmacher F, Jankowski S, Döring C, Bräutigam C, Frank M, Hansmann M-L, Pfitzner E: STAT6 and STAT1 are essential antagonistic regulators of cell survival in classical Hodgkin lymphoma cell line. Leukemia 23: 1885–1893 (2009).

18. Bretones G, Delgado M D, León J: Myc and cell cycle control. Biochimica et biophysica acta 1849: 506–516 (2015).

19. Buschle M, Brenner M K, Chen I S, Drexler H G, Gignac S M, Rooney C M: Transfection and gene expression in normal and malignant primary B lymphocytes. Journal of Immunological Methods 133: 77–85 (1990).

20. Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett R F, Hay R T: Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. Oncogene 18: 3063–3070 (1999).

21. Cader F Z, Schackmann R C J, Hu X, Wienand K, Redd R, Chapuy B, Ouyang J, Paul N, Gjini E, Lipschitz M, Armand P, Wu D, Fromm J R, Neuberg D, Liu X S, Rodig S J, Shipp M A: Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4+

regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. Blood 132: 825–836 (2018).

22. Calabrese V, Mallette F A, Deschênes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, Ilangumaran S, Ferbeyre G: SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. Molecular cell 36: 754–767 (2009).

23. Carey C D, Gusenleitner D, Lipschitz M, Roemer M G M, Stack E C, Gjini E, Hu X, Redd R, Freeman G J, Neuberg D, Hodi F S, Liu X S, Shipp M A, Rodig S J: Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. Blood 130: 2420–2430 (2017).

24. Chen X P, Losman J A, Cowan S, Donahue E, Fay S, Vuong B Q, Nawijn M C, Capece D, Cohan V L, Rothman P: Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 2175–2180 (2002).

25. Cheon H, Stark G R: Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 9373–9378 (2009).

26. Chin Y E, Kitagawa M, Kuida K, Flavell R A, Fu X Y: Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. Molecular and Cellular Biology 17: 5328–5337 (1997).

27. Chiu R, Angel P, Karin M: Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. Cell 59: 979–986 (1989).

28. Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick W J, Barlow D H, Mardon H J: Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 90: 913–919 (2005).

29. Chuang J-Y, Wu C-H, Lai M-D, Chang W-C, Hung J-J: Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells. International journal of cancer 125: 2066–2076 (2009).

30. Chung C D, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K: Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. Science 278: 1803–1805 (1997).

31. Cochet O, Frelin C, Peyron J-F, Imbert V: Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. Cellular Signalling 18: 449–455 (2006).

32. Connors J M, Cozen W, Steidl C, Carbone A, Hoppe R T, Flechtner H-H, Bartlett N L: Hodgkin lymphoma. Nature Reviews Disease Primers 6: 61 (2020).

33. Demoulin J B, Uyttenhove C, van Roost E, DeLestre B, Donckers D, van Snick J, Renauld J C: A single tyrosine of the interleukin-9 (IL-9) receptor is required for STAT activation, antiapoptotic activity, and growth regulation by IL-9. Molecular and Cellular Biology 16: 4710–4716 (1996).

34. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten. Langversion 3.1 (2022), AWMF Registernummer: 018/029 OL, https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom/ (12.04.2022)

35. Dickson J M J, Lee W-J, Shepherd P R, Buchanan C M: Enzyme activity effects of N-terminal His-tag attached to catalytic sub-unit of phosphoinositide-3-kinase. Bioscience reports 33 (2013).

36. Donmez H G, Demirezen S, Beksac M S: The relationship between beta-catenin and apoptosis: A cytological and immunocytochemical examination. Tissue & cell 48: 160–167 (2016).

37. Eliopoulos A G, Stack M, Dawson C W, Kaye K M, Hodgkin L, Sihota S, Rowe M, Young L S: Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. Oncogene 14: 2899–2916 (1997).

38. Endo T A, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A: A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature 387: 921–924 (1997).

39. Engert A, Raemaekers J: Treatment of early-stage Hodgkin lymphoma. Seminars in Hematology 53: 165–170 (2016).

40. Feng J, Witthuhn B A, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr I M, Ihle J N: Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. Molecular and Cellular Biology 17: 2497–2501 (1997).

41. Fenner J E, Starr R, Cornish A L, Zhang J-G, Metcalf D, Schreiber R D, Sheehan K, Hilton D J, Alexander W S, Hertzog P J: Suppressor of cytokine signaling 1 regulates the immune response to infection by a unique inhibition of type I interferon activity. Nature immunology 7: 33–39 (2006).

42. Flowers L O, Johnson H M, Mujtaba M G, Ellis M R, Haider S M I, Subramaniam P S: Characterization of a peptide inhibitor of Janus kinase 2 that mimics suppressor of cytokine signaling 1 function. Journal of immunology 172: 7510–7518 (2004).

43. Flowers L O, Subramaniam P S, Johnson H M: A SOCS-1 peptide mimetic inhibits both constitutive and IL-6 induced activation of STAT3 in prostate cancer cells. Oncogene 24: 2114–2120 (2005).

44. Fox C J, Hammerman P S, Cinalli R M, Master S R, Chodosh L A, Thompson C B: The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. Genes & Development 17: 1841–1854 (2003).

45. Gauzzi M C, Velazquez L, McKendry R, Mogensen K E, Fellous M, Pellegrini S: Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. Journal of Biological Chemistry 271: 20494–20500 (1996).

46. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H: Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science 268: 1766–1769 (1995).

47. Greaves P, Clear A, Owen A, Iqbal S, Lee A, Matthews J, Wilson A, Calaminici M, Gribben J G: Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. Blood 122: 2856–2863 (2013).

48. Gunawardana J, Chan F C, Telenius A, Woolcock B, Kridel R, Tan K L, Ben-Neriah S, Mottok A, Lim R S, Boyle M, Rogic S, Rimsza L M, Guiter C, Leroy K, Gaulard P, Haioun C, Marra M A, Savage K J, Connors J M, Shah S P, Gascoyne R D, Steidl C: Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. Nature Genetics 46: 329–335 (2014).

49. Hadjadj J, Castro C N, Tusseau M, Stolzenberg M-C, Mazerolles F, Aladjidi N, Armstrong M, Ashrafian H, Cutcutache I, Ebetsberger-Dachs G, Elliott K S, Durieu I, Fabien N, Fusaro M, Heeg M, Schmitt Y, Bras M, Knight J C, Lega J-C, Lesca G, Mathieu A-L, Moreews M, Moreira B, Nosbaum A, Page M, Picard C, Ronan Leahy T, Rouvet I, Ryan E, Sanlaville D, Schwarz K, Skelton A, Viallard J-F, Viel S, Villard M, Callebaut I, Picard C, Walzer T, Ehl S, Fischer A, Neven B, Belot A, Rieux-Laucat F: Early-onset autoimmunity associated with SOCS1 haploinsufficiency. Nature Communications 11: 5341 (2020).

50. Hammerman P S, Fox C J, Cinalli R M, Xu A, Wagner J D, Lindsten T, Thompson C B: Lymphocyte transformation by Pim-2 is dependent on nuclear factor-kappaB activation. Cancer Research 64: 8341–8348 (2004).

51. Hansen J A, Lindberg K, Hilton D J, Nielsen J H, Billestrup N: Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. Molecular Endocrinology 13: 1832–1843 (1999).

52. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang B H, Kitagawa K, Inagaki C: GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 86: 4284–4291 (2001).

53. Hayden M S, Ghosh S: NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. Genes & Development 26: 203–234 (2012).

54. Hebenstreit D, Luft P, Schmiedlechner A, Regl G, Frischauf A-M, Aberger F, Duschl A, Horejs-Hoeck J: IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site. Journal of immunology 171: 5901–5907 (2003).

55. Hilton D J, Richardson R T, Alexander W S, Viney E M, Willson T A, Sprigg N S, Starr R, Nicholson S E, Metcalf D, Nicola N A: Twenty proteins containing a C-

terminal SOCS box form five structural classes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 114–119 (1998).

56. Hodgkin T: On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. Medico-chirurgical transactions 17: 68–114 (1832).

57. Hoesel B, Schmid J A: The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Molecular Cancer 12: 86 (2013).

58. Hoeve J ten, Jesus Ibarra-Sanchez M de, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K: Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. Molecular and Cellular Biology 22: 5662–5668 (2002).

59. Hoffmann A, Leung T H, Baltimore D: Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. EMBO Journal 22: 5530–5539 (2003).

60. Huang S, Bucana C D, van Arsdall M, Fidler I J: Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. Oncogene 21: 2504–2512 (2002).

61. Ikeda J, Mamat S, Tian T, Wang Y, Rahadiani N, Aozasa K, Morii E: Tumorigenic potential of mononucleated small cells of Hodgkin lymphoma cell lines. The American journal of pathology 177: 3081–3088 (2010).

62. Jiwa N M, Kanavaros P, van der Valk P, Walboomers J M, Horstman A, Vos W, Mullink H, Meijer C J: Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. Journal of clinical pathology 46: 211–217 (1993).

63. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martin-Subero J I, Wolf J, Adamowicz M, Barth T F, Lichter P, Jauch A: Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. International Journal of Cancer 103: 489–495 (2003).

64. Joos S, Küpper M, Ohl S, Bonin F von, Mechtersheimer G, Bentz M, Marynen P, Möller P, Pfreundschuh M, Trümper L, Lichter P: Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. Cancer Research 60: 549–552 (2000).

65. Jost P, Ruland J: Aberrant NF-B signaling in lymphoma : mechanisms, consequences , and therapeutic implications. Blood 109: 2700–2707 (2007).

66. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Bräuninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, Hansmann M L, Rajewsky K, Küppers R: Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. Journal of Experimental Medicine 191: 395–402 (2000).

67. Juskevicius D, Jucker D, Klingbiel D, Mamot C, Dirnhofer S, Tzankov A: Mutations of CREBBP and SOCS1 are independent prognostic factors in diffuse large B cell lymphoma: mutational analysis of the SAKK 38/07 prospective clinical trial cohort. Journal of Hematology & Oncology 10: 70 (2017).

68. Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin W G, Conaway R C, Conaway J W: The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. Genes & Development 12: 3872–3881 (1998).

69. Kanzler H, Küppers R, Hansmann M L, Rajewsky K: Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. Journal of Experimental Medicine 184: 1495–1505 (1996).

70. Kapp U, Yeh W C, Patterson B, Elia A J, Kägi D, Ho A, Hessel A, Tipsword M, Williams A, Mirtsos C, Itie A, Moyle M, Mak T W: Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Journal of Experimental Medicine 189: 1939–1946 (1999).

71. Kim S J, Yoon D H, Kang H J, Hong J Y, Lee H S, Oh S Y, Shin H-J, Kong J H, Yi J H, Sakamoto K, Ko Y H, Huh J, Lee S-S, Takeuchi K, Shin D-Y, Suh C, Kim W S: Ruxolitinib shows activity against Hodgkin lymphoma but not primary mediastinal large B-cell lymphoma. BMC cancer 19: 1080 (2019).

72. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H, Kubo M, Yoshimura A: SOCS1/JAB Is a Negative Regulator of LPS-Induced Macrophage Activation. Immunity 17: 583–591 (2002).

73. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G: The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. Nature 424: 801–805 (2003).

74. Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dörken B, Scheidereit C: Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Oncogene 18: 943–953 (1999).

75. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann M L: 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 10962–10966 (1994).

76. Lacy S E, Barrans S L, Beer P A, Painter D, Smith A G, Roman E, Cooke S L, Ruiz C, Glover P, van Hoppe S J L, Webster N, Campbell P J, Tooze R M, Patmore R, Burton C, Crouch S, Hodson D J: Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. Blood 135: 1759–1771 (2020).

77. Lennerz J K, Hoffmann K, Bubolz A M, Lessel D, Welke C, Ruther N, Viardot A, Möller P: Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. Oncotarget 6: 29097–29110 (2015).

78. Leventaki V, Drakos E, Karanikou M, Psatha K, Lin P, Schlette E, Eliopoulos A, Vassilakopoulos T P, Papadaki H, Patsouris E, Medeiros L J, Rassidakis G Z: c-JUN N-terminal kinase (JNK) is activated and contributes to tumor cell proliferation in classical Hodgkin lymphoma. Human Pathology 45: 565–572 (2014).

79. Liau, N. P. D. Laktyushin A, Lucet I S, Murphy J M, Yao S, Whitlock E, Callaghan K, Nicola N A, Kershaw N J, Babon J J: The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. Nature Communications 9: 1558-1 (2018).

80. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner S A, Chung C D, Chang D D, Shuai K: Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 10626–10631 (1998).

81. Liu J, Zheng D, Deng J, Xiao S, Liu S, Shi Y: Immunoreactive growth hormone in human peripheral T lymphocytes: encoding sequence of cDNA identical to that of the pituitary human growth hormone. Chinese medical journal 110: 362–365 (1997).

82. Liu X, Li J, Peng X, Lv B, Wang P, Zhao X, Yu B: Geraniin Inhibits LPS-Induced THP-1 Macrophages Switching to M1 Phenotype via SOCS1/NF-κB Pathway. Inflammation 39: 1421–1433 (2016).

83. Lollies A, Hartmann S, Schneider M, Bracht T, Weiß A L, Arnolds J, Klein-Hitpass L, Sitek B, Hansmann M-L, Küppers R, Weniger M A: An oncogenic axis of STAT-mediated BATF3 upregulation causing MYC activity in classical Hodgkin lymphoma and anaplastic large cell lymphoma. Leukemia 32: 92–101 (2018).

84. Losman J A, Chen X P, Hilton D, Rothman P: Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction. Journal of immunology 162: 3770–3774 (1999).

85. Ma A, Malynn B A: A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. Nature reviews. Immunology 12: 774–785 (2012).

86. Maine G N, Mao X, Komarck C M, Burstein E: COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. EMBO Journal 26: 436–447 (2007).

87. Marshall N A, Christie L E, Munro L R, Culligan D J, Johnston P W, Barker R N, Vickers M A: Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. Blood 103: 1755–1762 (2004).

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

89. Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheidereit C, Bommert K, Dorken B: Inhibition of NF-kappaB essentially contributes to arsenic-induced apoptosis. Blood 102: 1028–1034 (2003).

90. Matsuki E, Younes A: Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. Seminars in Cancer Biology 34: 14–21 (2015).

91. Mellert K, Martin M, Lennerz J K, Ludeke M, Staiger A M, Kreuz M, Loffler M, Schmitz N, Trumper L, Feller A C, Hartmann S, Hansmann M L, Klapper W, Stein H, Rosenwald A, Ott G, Ziepert M, Moller P: The impact of SOCS1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. British Journal of Haematology 187: 627–637 (2019).

92. Melzner I, Bucur A J, Bruderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth T F, Leithauser F, Moller P: Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. Blood 105: 2535–2542 (2005).

93. Melzner I, Weniger M A, Bucur A J, Bruderlein S, Dorsch K, Hasel C, Leithauser F, Ritz O, Dyer M J, Barth T F, Moller P: Biallelic deletion within 16p13.13 including SOCS-1 in Karpas1106P mediastinal B-cell lymphoma line is associated with delayed degradation of JAK2 protein. International Journal of Cancer 118: 1941–1944 (2006).

94. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A: Signaling via the NFκB system. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine 8: 227–241 (2016).

95. Mock U, Thiele R, Uhde A, Fehse B, Horn S: Efficient lentiviral transduction and transgene expression in primary human B cells. Human gene therapy methods 23: 408–415 (2012).

96. Morris R, Kershaw N J, Babon J J: The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. Protein Science 27: 1984–2009 (2018).

97. Mosialos G, Birkenbacht M, Yalamanchill R, van Arsdale T, Ware C, Kleff E: The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. Cell 80: 389–399 (1995).

98. Mottok A: Microenvironment in classical Hodgkin lymphoma. Der Pathologe 41: 254 (2020).

99. Murray P G, Young L S: An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. Blood 134: 591–596 (2019).

100. Müschen M, Rajewsky K, Bräuninger A, Baur A S, Oudejans J J, Roers A, Hansmann M L, Küppers R: Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. Journal of Experimental Medicine 191: 387–394 (2000).

101. Myers M P, Andersen J N, Cheng A, Tremblay M L, Horvath C M, Parisien J P, Salmeen A, Barford D, Tonks N K: TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. Journal of Biological Chemistry 276: 47771–47774 (2001).

102. Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T: Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. Nature 387: 924–929 (1997).

103. Napetschnig J, Wu H: Molecular basis of NF-κB signaling. Annual review of biophysics 42: 443–468 (2013).

104. Nelson G, Wilde G J C, Spiller D G, Kennedy S M, Ray D W, Sullivan E, Unitt J F, White M R H: NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms. Journal of Cell Science 116: 2495–2503 (2003).

105. Nicholson S E, Willson T A, Farley A, Starr R, Zhang J G, Baca M, Alexander W S, Metcalf D, Hilton D J, Nicola N A: Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. EMBO Journal 18: 375–385 (1999).

106. Ohmori Y, Hamilton T A: Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. Journal of Biological Chemistry 275: 38095–38103 (2000).

107. Ohya K i, Kajigaya S, Yamashita Y, Miyazato A, Hatake K, Miura Y, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K, Mano H: SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. Journal of Biological Chemistry 272: 27178–27182 (1997).

108. Opinto G, Agostinelli C, Ciavarella S, Guarini A, Maiorano E, Ingravallo G: Hodgkin Lymphoma: A Special Microenvironment. Journal of Clinical Medicine 10 (2021).

109. Otto C, Giefing M, Massow A, Vater I, Gesk S, Schlesner M, Richter J, Klapper W, Hansmann M-L, Siebert R, Küppers R: Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. The British Journal of Haematology 157: 702–708 (2012).

110. Park S-H, Kim K-E, Hwang H-Y, Kim T Y: Regulatory effect of SOCS on NF-kappaB activity in murine monocytes/macrophages. DNA and cell biology 22: 131–139 (2003).

111. Peltola K J, Paukku K, Aho T L T, Ruuska M, Silvennoinen O, Koskinen P J: Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. Blood 103: 3744–3750 (2004).

112. Piganis R A R, Weerd N A de, Gould J A, Schindler C W, Mansell A, Nicholson S E, Hertzog P J: Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. Journal of Biological Chemistry 286: 33811–33818 (2011).

113. Promega: Dual-Luciferase® Reporter Assay System. Instructions for use of Products E1910 and E1960. Technical manual: 1-26 (2015), https://www.promega.de/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol/ (10.01.2022)

114. Ram P A, Waxman D J: SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. Journal of Biological Chemistry 274: 35553–35561 (1999).

115. Rengstl B, Newrzela S, Heinrich T, Weiser C, Thalheimer F B, Schmid F, Warner K, Hartmann S, Schroeder T, Küppers R, Rieger M A, Hansmann M-L: Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed-Sternberg cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110: 20729–20734 (2013).

116. Ritz O, Guiter C, Castellano F, Dorsch K, Melzner J, Jais J P, Dubois G, Gaulard P, Moller P, Leroy K: Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. Blood 114: 1236–1242 (2009).

117. Ritz O, Guiter C, Dorsch K, Dusanter-Fourt I, Wegener S, Jouault H, Gaulard P, Castellano F, Moller P, Leroy K: STAT6 activity is regulated by SOCS-1 and modulates BCL-XL expression in primary mediastinal B-cell lymphoma. Leukemia 22: 2106–2110 (2008).

118. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou Y-C, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu K P: Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. Molecular cell 12: 1413–1426 (2003).

119. Saint-Germain E, Mignacca L, Huot G, Acevedo M, Moineau-Vallee K, Calabrese V, Bourdeau V, Rowell M C, Ilangumaran S, Lessard F, Ferbeyre G: Phosphorylation of SOCS1 Inhibits the SOCS1-p53 Tumor Suppressor Axis. Cancer Research 79: 3306–3319 (2019).

120. Sanjabi S, Williams K J, Saccani S, Zhou L, Hoffmann A, Ghosh G, Gerondakis S, Natoli G, Smale S T: A c-Rel subdomain responsible for enhanced DNA-binding affinity and selective gene activation. Genes & Development 19: 2138–2151 (2005).

121. Savage K J, Monti S, Kutok J L, Cattoretti G, Neuberg D, Leval L de, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar R C T, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus G S, Habermann T, Dalla-Favera R, Harris N L, Aster J C, Golub T R, Shipp M A: The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. Blood 102: 3871–3879 (2003).

122. Schaapveld M, Aleman B M P, van Eggermond A M, Janus C P M, Krol A D G, van der Maazen R W M, Roesink J, Raemaekers J M M, Boer J P de, Zijlstra J M, van Imhoff G W, Petersen E J, Poortmans P M P, Beijert M, Lybeert M L, Mulder I, Visser O, Louwman M W J, Krul I M, Lugtenburg P J, van Leeuwen F E: Second Cancer Risk Up to 40 Years after Treatment for Hodgkin's Lymphoma. The New England Journal of Medicine 373: 2499–2511 (2015).

123. Scheeren F A, Diehl S A, Smit L A, Beaumont T, Naspetti M, Bende R J, Blom B, Karube K, Ohshima K, van Noesel C J M, Spits H: IL-21 is expressed in

Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. Blood 111: 4706–4715 (2008).

124. Schif B, Lennerz J K, Kohler C W, Bentink S, Kreuz M, Melzner I, Ritz O, Trumper L, Loeffler M, Spang R, Moller P: SOCS1 mutation subtypes predict divergent outcomes in diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL) patients. Oncotarget 4: 35–47 (2013).

125. Schmitz R, Hansmann M-L, Bohle V, Martin-Subero J I, Hartmann S, Mechtersheimer G, Klapper W, Vater I, Giefing M, Gesk S, Stanelle J, Siebert R, Küppers R: TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. The Journal of experimental medicine 206: 981–989 (2009).

126. Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Möhle-Steinlein U, Tian J, Karin M, Angel P, Wagner E F: Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. Genes & Development 13: 607–619 (1999).

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

128. Sepulveda P de, Okkenhaug K, Rose J L, Hawley R G, Dubreuil P, Rottapel R: Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. EMBO Journal 18: 904–915 (1999).

129. Shanbhag S, Ambinder R F: Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. CA: a Cancer Journal for Clinicians 68: 116–132 (2018).

130. Shaulian E: AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? Cellular Signalling 22: 894–899 (2010).

131. Siegel R L, Miller K D, Jemal A: Cancer statistics, 2019. CA: a Cancer Journal for Clinicians 69: 7–34 (2019).

132. Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng P C: SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic Acids Research 40: 452 (2012).

133. Simoncic P D, Lee-Loy A, Barber D L, Tremblay M L, McGlade C: The T Cell Protein Tyrosine Phosphatase Is a Negative Regulator of Janus Family Kinases 1 and 3. Current biology 12: 446–453 (2002).

134. Skinnider B F, Elia A J, Gascoyne R D, Patterson B, Trumper L, Kapp U, Mak T W: Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood 99: 618–626 (2002).

135. Song M M, Shuai K: The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and

antiproliferative activities. Journal of Biological Chemistry 273: 35056–35062 (1998).

136. Srinivasan L, Sasaki Y, Calado D P, Zhang B, Paik J H, DePinho R A, Kutok J L, Kearney J F, Otipoby K L, Rajewsky K: PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. Cell 139: 573–586 (2009).

137. Starr R, Metcalf D, Elefanty A G, Brysha M, Willson T A, Nicola N A, Hilton D J, Alexander W S: Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 14395–14399 (1998).

138. Starr R, Willson T A, Viney E M, Murray L J, Rayner J R, Jenkins B J, Gonda T J, Alexander W S, Metcalf D, Nicola N A, Hilton D J: A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. Nature 387: 917–921 (1997).

139. Steidl C, Telenius A, Shah S P, Farinha P, Barclay L, Boyle M, Connors J M, Horsman D E, Gascoyne R D: Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. Blood 116: 418–427 (2010).

140. Strebovsky J, Walker P, Lang R, Dalpke A H: Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. FASEB Journal 25: 863–874 (2011).

141. Sun S-C: Non-canonical NF-κB signaling pathway. Cell research 21: 71–85 (2011).

142. Swainson L, Mongellaz C, Adjali O, Vicente R, Taylor N: Lentiviral Transduction of Immune Cells. Methods in Molecular Biology 415: 301–320 (2008).

143. Swerdlow S H, Campo E, Pileri S A, Harris N L, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles G A, Zelenetz A D, Jaffe E S: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 127: 2375–2390 (2016).

144. Thandra K C, Barsouk A, Saginala K, Padala S A, Barsouk A, Rawla P: Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. Medical Sciences 9: 5 (2021).

145. Tiacci E, Döring C, Brune V, van Noesel C J M, Klapper W, Mechtersheimer G, Falini B, Küppers R, Hansmann M-L: Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. Blood 120: 4609–4620 (2012).

146. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, Penson A, Fortini E, Pettirossi V, Wang Y, Rosseto A, Venanzi A, Vlasevska S, Pacini R, Piattoni S, Tabarrini A, Pucciarini A, Bigerna B, Santi A, Gianni A M, Viviani S, Cabras A, Ascani S, Crescenzi B, Mecucci C, Pasqualucci L, Rabadan R, Falini B: Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. Blood 131: 2454–2465 (2018).

147. Tresckow B von, Moskowitz C H: Treatment of relapsed and refractory Hodgkin Lymphoma. Seminars in Hematology 53: 180–185 (2016).

148. Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton D J, Silvennoinen O: Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. Molecular and Cellular Biology 22: 3316–3326 (2002).

149. Vallabhapurapu S, Karin M: Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. Annual review of immunology 27: 693–733 (2009).

150. van den Berg A, Visser L, Poppema S: High Expression of the CC Chemokine TARC in Reed-Sternberg Cells. The American journal of pathology 154: 1685–1691 (1999).

151. van den Neste E, André M, Gastinne T, Stamatoullas A, Haioun C, Belhabri A, Reman O, Casasnovas O, Ghesquieres H, Verhoef G, Claessen M-J, Poirel H A, Copin M-C, Dubois R, Vandenberghe P, Stoian I-A, Cottereau A S, Bailly S, Knoops L, Morschhauser F: A phase II study of the oral JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib in advanced relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. Haematologica 103: 840–848 (2018).

152. Vila-Coro A J, Rodriguez-Frade J M, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz M C, Martinez-A C, Mellado M: The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. FASEB Journal 13: 1699–1710 (1999).

153. Waiboci L W, Ahmed C M, Mujtaba M G, Flowers L O, Martin J P, Haider M I, Johnson H M: Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS-1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist. Journal of immunology 178: 5058–5068 (2007).

154. Weigent D A, Blalock J E: Expression of growth hormone by lymphocytes. International Reviews of Immunology 4: 193–211 (1989).

155. Weissinger S E, Zahn M, Marienfeld R, Tessmer C, Moldenhauer G, Möller P: A new reliable and highly specific monoclonal antibody to detect the C-terminal region of Silencer of Cytokine Signaling 1 (SOCS1). European journal of haematology 107: 74-80 (2021).

156. Weniger M A, Küppers R: NF-κB deregulation in Hodgkin lymphoma. Seminars in Cancer Biology 39: 32–39 (2016).

157. Weniger M A, Melzner I, Menz C K, Wegener S, Bucur A J, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth T F, Moller P: Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 90: 210–215 (2006).

158. Wu H, Devi R, Malarkey W B: Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system--a Clinical Research Center study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 81: 1278–1282 (1996).

159. Xie L, Ushmorov A, Leithäuser F, Guan H, Steidl C, Färbinger J, Pelzer C, Vogel M J, Maier H J, Gascoyne R D, Möller P, Wirth T: FOXO1 is a tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma. Blood 119: 3503–3511 (2012).

160. Yandava C N, Pillari A, Drazen J M: Radiation hybrid and cytogenetic mapping of SOCS1 and SOCS2 to chromosomes 16p13 and 12q, respectively. Genomics 61: 108–111 (1999).

161. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle J N, Yoshimura A: The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. EMBO Journal 18: 1309–1320 (1999).

162. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H: Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. Cold Spring Harbor perspectives in biology 10: a028571 (2018).

163. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins N A, Gilbert D J, Copeland N G, Hara T, Miyajima A: A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. EMBO Journal 14: 2816–2826 (1995).

164. Yu L, Li L, Medeiros L J, Young K H: NF-κB signaling pathway and its potential as a target for therapy in lymphoid neoplasms. Blood reviews 31: 77–92 (2017).

165. Zahn M, Kaluszniak B, Möller P, Marienfeld R: The PTP1B mutant PTP1BΔ2-4 is a positive regulator of the JAK/STAT signalling pathway in Hodgkin lymphoma. Carcinogenesis 42: 517–527 (2021).

166. Zahn M, Marienfeld R, Melzner I, Heinrich J, Renner B, Wegener S, Miessner A, Barth T F, Dorsch K, Bruderlein S, Moller P: A novel PTPN1 splice variant upregulates JAK/STAT activity in classical Hodgkin lymphoma cells. Blood 129: 1480–1490 (2017).

167. Zhang J G, Farley A, Nicholson S E, Willson T A, Zugaro L M, Simpson R J, Moritz R L, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile B T, Kile B J, Kent S B, Alexander W S, Metcalf D, Hilton D J, Nicola N A, Baca M: The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 2071–2076 (1999).

168. Zhang Y, Wang Z, Li X, Magnuson N S: Pim kinase-dependent inhibition of c-Myc degradation. Oncogene 27: 4809–4819 (2008).

169. Zhao D, Huang Z: Effect of His-Tag on Expression, Purification, and Structure of Zinc Finger Protein, ZNF191(243-368). Bioinorganic Chemistry and Applications 2016: 8206854 (2016).

Anhang

Tab. 18: p-Werte des STAT6-Luciferase-Reporter-Assays der SOCS1-Minor-Mutanten (Kapitel 3.3.2)**.** *=p≤0.05, **=p≤0.01, ***=p≤0.001, berechnet mit dem Zweistichproben-t-Test, jeweils für die unstimulierte und stimulierte Gruppe (Kontrolle vs. SOCS1-Variante). EV=Empty-Vektor (Kontrolle), WT=SOCS1-Wildtyp, DEL=SOCS1-Deletion, FS=SOCS1-Frameshift.

SOCS1-Variante	Plasmid-Konzentration (ng/Well)	-/+IL-4-Stimulation	p-Wert	Signifikanz
SOCS1-WT	10ng	-	0.0138	*
		+	0.0072	**
	50ng	-	0.0253	*
		+	0.0050	**
	100ng	-	0.0189	*
		+	0.0058	**
Mut. 1	10ng	-	0.0005	***
		+	0.0101	*
	50ng	-	0.0057	**
		+	0.0065	**
	100ng	-	0.0042	**
		+	0.0065	**
Mut. 2	10ng	-	0.0025	**
		+	0.0099	**
	50ng	-	0.0001	***
		+	0.0061	**
	100ng	-	0.0001	***
		+	0.0065	**
Mut. 3	10ng	-	0.0001	***
		+	0.0140	*
	50ng	-	0.0001	***
		+	0.0092	**
	100ng	-	0.0001	***
		+	0.0082	**
Mut. 4	10ng	-	0.1074	
		+	0.0124	*
	50ng	-	0.0002	***
		+	0.0071	**
	100ng	-	0.0024	**
		+	0.0065	**
Mut. 5	10ng	-	0.0197	*
		+	0.0159	*
	50ng	-	0.0013	**
		+	0.0065	**
	100ng	-	0.0234	*
		+	0.0071	**
Mut. 6	10ng	-	0.0736	
		+	0.0204	*
	50ng	-	0.0029	**
		+	0.0082	**
	100ng	-	0.0008	***
		+	0.0088	**

Im Folgenden sind die wichtigsten Werte der UPX-Transkriptom-Sequenzierung aufgelistet, weitere Informationen hierzu befinden sich im Methodenteil. Der vollständige Datensatz würden den Umfang dieser Arbeit überschreiten, können aber auf Nachfrage gerne von mir angefordert werden. Aufgrund der Verwendung von zwei verschiedenen Analyse-Tools können einige, in beiden Tools als signifikant bewertete, Gene mehrmals aufgeführt sein.

Tab. 19: Vergleich der unstimulierten Gruppen aus der UPX-Transkriptom-Sequenzierung. Es wurde jeweils der SOCS1-WT, die SOCS1-Mutante DEL oder FS mit der Kontrolle (EV) verglichen. Aufgelistet sind alphabetisch geordnet alle Gene, die in mindestens zwei der drei Gruppen signifikant hoch- (positive Zahl) bzw. herunterreguliert (negative Zahl) sind. EV=Empty Vektor (Kontrolle), WT=SOCS1-Wildtyp, DEL=SOCS1-Deletion, FS=SOCS1-Frameshift.

Legende:
(kein Unterschied bedeutet, dass das Gen in den jeweiligen verglichenen Gruppen entweder nur hoch- oder nur herunterreguliert ist)

allen 3 Gruppen (kein Unterschied)
EV-WT und EV-DEL (kein Unterschied)
EV-WT und EV-FS (kein Unterschied)
EV-DEL und EV-FS (kein Unterschied)
EV-WT und EV-FS (Unterschied)
SOCS1

EV-WT		**EV-DEL**		**EV-FS**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
AC011448.1	3.29832	AC011448.1	5.23186	AC011448.1	3.71931
AC016876.2	4.40813	AC117503.1	13.30646	AC016876.2	3.95063
AC117503.1	11.6531	AFMID	6.28099	ANKRD1	16.00403
AFMID	3.7682	AL355816.2	15.7057	AP000275.2	-6.25805
AL355816.2	16.50361	ANKRD1	25.38787	ATP5MF	-1.67179
AP1G1	4.51738	AP000275.2	-11.27896	C16orf91	3.49665
ATP5MF	-1.51431	AP1G1	4.5793	CA2	-5.84295
BAG6	3.28966	BAG6	3.46836	CD55	-6.89266
C16orf91	3.84512	CALR	5.81922	CMTM8	-10.32968
CA2	-3.68691	CTNNB1	3.38184	COX5A	-2.2053
CALR	4.3717	DUSP1	11.07769	COX6C	-2.10318
CD55	-6.53091	EIF5A	6.21636	DDX5	-1.78694
CMTM8	-5.37692	EIF5AL1	7.80523	DNTTIP1	2.97129
COX5A	-1.9635	ERLIN1	-3.45663	DUSP1	9.18198
COX6C	-2.31603	FOXC1	6.72671	FOXC1	9.32452
CTNNB1	3.2273	HNRNPL	3.47453	GH1	80.88747
DDX5	-2.69089	MRNIP	4.79361	GK5	6.29609
DNTTIP1	4.21475	MTA2	7.53845	KRT8	6.75052
DUSP1	23.52	NEFM	-26.39925	MED24	15.15385
EIF5A	4.5721	PIM2	3.745	MEIS1	10.57613
EIF5AL1	6.35566	RF01871	3.27764	MIF	-1.23223
ERLIN1	-6.54298	SDC2	-8.75005	MRNIP	3.93772
GH1	14351.07505	SOCS1	136.83448	MTATP6P1	-1.70193
GK5	4.91774	SYNC	7.67285	MT-ATP8	-2.66467
HNRNPL	2.95769	TOPORS	12.65206	MYC	-3.84506
KRT8	6.23419	TRHDE	-20.34823	NDUFA12	1.74048
MED24	8.2655	TSSC4	3.17621	NEFL	-2.24739
MEIS1	13.2923	UBB	1.97838	NUBP1	9.48281
MIF	-1.19635	UQCRC1	2.88555	PA2G4	-1.95757

MTA2	9.38568	VPS51	10.77949	PDCD2L	15.65828
MTATP6P1	-2.4192	XPC	3.42249	PEG10	-3.44303
MT-ATP8	-3.02104	ZNF234	12.02132	PRDX4	-1.96146
MYC	-4.01416			PSMB6	1.91292
NDUFA12	1.80223			PTPN13	6.0744
NEFL	-2.38303			RF01871	3.14399
NEFM	-15.85721			RGS10	-7.69554
NUBP1	13.00435			RPL19	-1.24206
PA2G4	-1.79428			RPL21	-2.9056
PDCD2L	11.28977			RPL24	-2.41187
PEG10	-3.59068			RPL27A	-2.42234
PIM2	3.93083			RPL29	-1.71031
PRDX4	-1.90821			RPL34	-1.81111
PSMB6	1.95925			RPL36A-HNRNPH2	-2.20046
PTPN13	6.11763			RPL37A	-1.76861
RF01871	3.81668			RPL39	-2.86459
RGS10	-5.64644			RPL5	-1.52345
RPL19	-1.48496			RPS12	-3.07019
RPL21	-2.49526			RPS13	-2.21414
RPL24	-2.01537			RPS15A	-2.99554
RPL27A	-2.17237			RPS23	-1.54849
RPL29	-1.95724			RPS26	-1.88633
RPL34	-1.45851			RPS27	-1.31376
RPL36A-HNRNPH2	-2.44796			RPSAP58	8.27182
RPL37A	-1.81233			SLK	2.98454
RPL39	-2.75223			SOCS1	112.02104
RPL5	-1.52387			SOX11	18.23501
RPS12	-2.70467			TMUB2	8.25008
RPS13	-1.80175			TRAF3IP1	-5.13159
RPS15A	-2.90019			TRHDE	-6.13772
RPS23	-1.98732			UBB	1.4798
RPS26	-2.03211			UQCRC1	3.28445
RPS27	-1.49873			UQCRH	-1.6273
RPSAP58	10.32808			VPS51	11.07647
SDC2	-6.34769			XIST	1.29759
SLK	2.35891			XPC	4.30738
SOCS1	17502.13942			ZFAND2A	9.41894
SOCS1	149.3762			ZNF148	4.09614
SOX11	15.92129				
SYNC	6.55376				
TMUB2	16.52217				
TOPORS	11.31229				
TRAF3IP1	-4.66962				
TSSC4	2.92198				
UQCRC1	3.64671				
UQCRH	-1.94154				
XIST	-1.31994				
ZFAND2A	14.54587				
ZNF148	4.53521				
ZNF234	7.93883				

Tab. 20: Vergleich der IL4-stimulierten Gruppen aus der UPX-Transkriptom-Sequenzierung. Es wurde jeweils der SOCS1-WT, die SOCS1-Mutante DEL oder FS mit der Kontrolle (EV) verglichen. Aufgelistet sind alphabetisch geordnet alle Gene, die in mindestens zwei der drei Gruppen signifikant hoch- (positive Zahl) bzw. herunterreguliert (negative Zahl) sind. EV=Empty Vektor (Kontrolle), WT=SOCS1-Wildtyp, DEL=SOCS1-Deletion, FS=SOCS1-Frameshift.

Legende:
(kein Unterschied bedeutet, dass das Gen in den jeweiligen verglichenen Gruppen entweder nur hoch- oder nur herunterreguliert ist)

allen 3 Gruppen (kein Unterschied)
EV-WT und EV-DEL (kein Unterschied)
EV-WT und EV-FS (kein Unterschied)
EV-DEL und EV-FS (kein Unterschied)
EV-WT und EV-FS (Unterschied)
SOCS1

EV-WT		EV-DEL		EV-FS	
gene.name	fold.regulation	gene.name	fold.regulation	gene.name	fold.regulation
AC005726.5	13.62427	AC069257.3	-5.08942	AC005726.5	10.93593
AC069257.3	-40.52325	AC245033.1	-1.68546	AC092069.1	-2.51646
AC092069.1	-1.36925	AC246787.1	-5.82872	ACO1	-28.10362
AC245033.1	-1.82113	AEBP2	4.33916	AEBP2	5.84494
AC246787.1	-2.58797	AKAP9	4.04574	AKAP9	5.16431
ACO1	-36.12195	AKAP9	3.75341	AKAP9	4.57468
AKAP9	3.07484	AL161787.1	-5.95414	AL161787.1	-5.35455
AKAP9	2.97965	AP001324.1	-5.34003	BLVRB	-55.85597
AP001324.1	-4.97762	ARHGAP8	-14.60493	CCDC58	-3.75913
ARHGAP8	-15.72642	ATP5MF	-1.72887	CKB	-2.74853
ATP5MF	-1.36388	ATP5PO	-1.64135	COX5A	-2.66955
ATP5PO	-1.75936	C8orf59	-2.04156	DCLRE1C	5.59958
BLVRB	-72.16094	CCDC58	-4.8883	ELMOD2	4.77714
C8orf59	-2.00386	CLASP1	10.35358	FAM171B	3.88558
CKB	-2.71569	COX5A	-1.74771	FAUP1	-5.19992
CLASP1	16.36982	COX6C	-1.55793	GH1	67.54525
COX5A	-1.50705	COX7A2	-1.38527	GSTP1	-2.8397
COX6C	-1.77054	DCLRE1C	5.1763	IFI6	-39.90401
COX7A2	-1.30621	EIF1	-1.94129	IGFLR1	-27.47171
EIF1	-1.27301	ELMOD2	5.18008	KIAA2013	5.32398
FAIM	-3.095	FAIM	-3.68634	MRPL23	-41.97073
FAN1	3.68648	FAM171B	3.72272	MRPL52	-3.79342
GABARAPL1	-6.83789	FAN1	3.92359	MT-ND6	6.00881
GH1	19916.46176	FAUP1	-4.9378	NEAT1	3.13913
GLYCTK	-24.29591	GABARAPL1	-24.48133	NUP210	12.75424
GNA13	9.64891	GH1	134.49436	OGFRL1	-30.22351
GSTP1	-1.32941	GLYCTK	-22.50233	PCBD1	-4.239
HOXB-AS3	-55.91149	GNA13	11.19437	PMP22	-6.87582
HSP90AA1	1.43046	HOXB-AS3	-4.98708	RPL11	-2.06551
MAFG	11.7014	HSP90AA1	2.00978	RPL13	-1.91796
MRPL52	-5.22882	IFI6	-11.1075	RPL15	-2.25261
MT-CYB	-1.36851	IGFLR1	-32.68663	RPL21	-3.29956
NEAT1	3.07707	KIAA2013	4.90995	RPL21	-3.40998
OGFRL1	-38.91829	MAFG	13.98568	RPL23	-2.78723
PHF21A	5.62382	MRPL23	-4.62418	RPL23A	-2.06138
PMP22	-13.42696	MT-CYB	1.41096	RPL24P2	-24.32039
RNF122	-3.50511	MT-ND6	4.51874	RPL29	-2.36696

RPL13	-1.50177	NUP210	9.57221	RPL32	-2.49427
RPL14	-2.17736	PCBD1	-3.25329	RPL34	-1.97933
RPL21	-2.22495	PHF21A	5.5963	RPL39	-4.759
RPL24P2	-7.99367	RNF122	-7.56782	RPL39	-3.3361
RPL34	-1.52535	RPL11	-1.74648	RPS12	-4.1809
RPL39	-2.93675	RPL13	-1.5058	RPS19	-2.41075
RPL9	-1.57901	RPL14	-2.00784	RPS19P1	-13.72111
RPS12	-3.44811	RPL15	-1.28506	RPS26	-3.08712
RPS15A	-2.18137	RPL21	-2.85865	RPS29	-2.77907
RPS28	-2.33957	RPL21	-2.866	RPS7	-2.22715
RPS3A	-1.4513	RPL23	-3.07717	RPUSD2	-7.11403
RPS5	-1.47186	RPL23A	-1.46755	SAP30	-24.33799
RPS7	-1.57876	RPL24P2	-28.90172	SNRPA	-7.20159
SNRPA	-3.17226	RPL29	-1.65302	SOCS1	55.21791
SOCS1	25726.88495	RPL32	-1.7983	SON	2.58477
SON	1.6367	RPL39	-2.85253	SPAG16	-5.9593
SUCLG1	-2.69483	RPL9	-1.5842	SUCLG1	-3.61795
TBCA	-1.98602	RPS12	-3.08572	TXN	-2.50713
TOMM22	-2.0634	RPS15A	-1.76715	UPF1	6.97283
TXN	-1.53534	RPS19	-1.28762	ZC3H13	3.03575
UBA52	-2.2831	RPS19P1	-3.83549		
UBR4	3.59052	RPS26	-1.85166		
UPF1	6.1851	RPS28	-2.94357		
UQCRH	-1.48889	RPS29	-2.77715		
USP46	-7.29167	RPS3A	-1.70691		
		RPS5	-1.51931		
		RPS7	-1.64837		
		RPUSD2	-6.38753		
		SAP30	-28.94339		
		SON	1.95754		
		SPAG16	-5.3315		
		TBCA	-2.57582		
		TOMM22	-2.66557		
		UBA52	-2.01743		
		UBR4	4.28672		
		UQCRH	-1.86477		
		USP46	-3.70031		
		ZC3H13	3.10401		

Tab. 21: Vergleich EV-Wildtyp (WT): Die 20 stärksten herunter-/ bzw. hochregulierten Gene in absteigender Reihenfolge. EV: Empty Vektor (Kontrolle), WT: SOCS1-Wildtyp, IL-4: Interleukin 4.

Vergleich EV-WT: Die 20 stärksten herunterregulierten Gene			
unstimuliert		**nach IL-4-Stimulation**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
MFSD3	-45.88602	BLVRB	-72.16094
LPCAT2	-34.03851	HOXB-AS3	-55.91149
IGSF10	-32.98378	RBPMS	-53.63756
NEFM	-15.85721	AC090498.1	-47.35154
ARMCX5	-11.50792	AC069257.3	-40.52325
TUBGCP6	-9.26882	OGFRL1	-38.91829
THAP1	-9.24336	ACO1	-36.12195
RDM1	-8.89084	DUBR	-33.71008
TAF13	-8.61272	OXCT1	-32.51135
RPGR	-8.49355	C19orf47	-30.87962
VDAC1P6	-8.35034	ZNF22	-30.12379
DCAF11	-8.22934	XRCC1	-28.42725
DLG3	-8.06383	PCIF1	-27.10669
DENND1A	-7.87902	PSMA6P2	-25.23278
ERLIN1	-6.54298	GLYCTK	-24.29591
CD55	-6.53091	ALG9	-23.21089
AC025423.2	-6.50417	MT-TS2	-16.88038
SDC2	-6.34769	ARHGAP8	-15.72642
RGS10	-5.64644	GALK1	-15.40373
CMTM8	-5.37692	PMP22	-13.42696
Vergleich EV-WT: Die 20 stärksten hochregulierten Gene			
unstimuliert		**nach IL-4-Stimulation**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
SOCS1	17502.13942	SOCS1	25726.88495
GH1	14351.07505	GH1	19916.46176
GH1	82.91159	AC068025.1	62.28735
AC006486.2	52.41862	TSGA10	47.67537
CRYAB	47.66327	AC010319.3	44.29469
AL662890.1	41.13199	GRB10	37.73852
FILIP1L	38.40485	FOXO1	33.31724
HEATR4	33.45081	STX18-AS1	30.87132
DUSP10	31.65505	AL121936.1	30.33843
PHLDB2	31.45016	AP001033.1	30.10843
CPEB1	29.94082	PRKD1	28.05801
LTBP1	29.85311	RNU6-993P	24.83665
ZNF236	29.71534	SPX	22.48326
AL121936.1	29.43761	CLASP1	16.36982
CD83P1	29.43587	TNFRSF9	14.48313
EGR1	27.15588	RN7SL1	13.76316
MEX3D	26.88685	AC005726.5	13.62427
ARHGEF2	26.11239	MIR99AHG	11.75108
HSPBAP1	22.59878	SLC26A11	11.43259
RN7SL2	19.80105	TTLL7	11.09047

Tab. 22: Vergleich EV-Deletion (DEL): Die 20 stärksten herunter-/ bzw. hochregulierten Gene in absteigender Reihenfolge. EV: Empty Vektor (Kontrolle), DEL: SOCS1-Deletion, IL-4: Interleukin 4.

Vergleich EV-DEL: Die 20 stärksten herunterregulierten Gene			
unstimuliert		**nach IL-4 Stimulation**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
LSM12P1	-45.52408	PLS1	-55.39254
IFI30	-36.07523	HADH	-54.59267
SNORD57	-34.59661	TIMM10B	-45.41573
DNAJC4	-34.49561	BEX2	-41.33648
TMEM131L	-32.86484	AC010761.1	-38.65411
COMTD1	-30.90789	MTMR14	-36.37503
ABCB7	-30.59847	TXNDC12	-35.23786
BTN3A2	-27.03436	ENDOV	-35.16254
NEFM	-26.39925	RWDD4	-34.40841
TRHDE	-20.34823	SP4	-34.37128
HMOX2	-13.38134	AMPD2	-33.94122
TET1	-12.34837	PIGC	-33.69018
B4GALT3	-12.25246	IGFLR1	-32.68663
AP000275.2	-11.27896	AC024940.1	-31.32436
PHLDA2	-9.93913	ARL6	-30.50898
ZNF318	-9.93279	SAP30	-28.94339
PSRC1	-9.80256	RPL24P2	-28.90172
SDC2	-8.75005	PSPH	-28.80927
MFF	-6.28287	HEATR4	-28.03035
SFSWAP	-6.16658	FBXO30	-27.16164
Vergleich EV-DEL: Die 20 stärksten hochregulierten Gene			
unstimuliert		**nach IL-4 Stimulation**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
SOCS1	136.83448	GH1	134.49436
AC103769.1	47.01125	IKBKB	64.99465
SDSL	39.16294	ALKBH8	35.62034
RNF152	37.86851	RWDD2A	33.65509
MFAP2	34.21895	HRASLS	28.72832
TRIM25	31.83233	G0S2	16.99572
ANKRD1	25.38787	MAFG	13.98568
NOCT	19.42424	RPAP1	12.83931
ULK2	13.31207	NEK2	11.99467
AC117503.1	13.30646	KLKP1	11.39187
TOPORS	12.65206	GNA13	11.19437
ZNF234	12.02132	SNORA59B	10.65315
GCHFR	11.67257	CLASP1	10.35358
DUSP1	11.07769	NUP210	9.57221
VPS51	10.77949	CCDC97	9.28511
HOXA-AS2	10.46823	AC090181.3	9.23609
IKBKB	8.55474	PIAS3	8.34967
SNCA	8.28355	IMPACT	8.27432
EGR1	7.81784	EML3	7.49393
EIF5AL1	7.80523	NT5DC3	5.58391

Tab. 23: Vergleich EV-Frameshift (FS): Die 20 stärksten herunter-/ bzw. hochregulierten Gene in absteigender Reihenfolge. EV: Empty Vektor (Kontrolle), FS: SOCS1-Frameshift, IL-4: Interleukin 4.

Vergleich EV-FS: Die 20 stärksten herunterregulierten Gene			
unstimuliert		**nach IL-4 Stimulation**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
PCID2	-55.98073	RPL15P3	-66.42633
SRP54-AS1	-36.62298	KIFAP3	-63.20584
TTC27	-11.51035	BLVRB	-55.85597
CMTM8	-10.32968	TUBB2B	-55.71621
ARHGAP1	-10.29866	ARL1	-52.52366
TWF1	-8.57486	PSMA6P1	-46.37584
TDRD3	-8.51396	UBR7	-45.26907
PAM16	-8.37392	DTL	-44.28463
FASTKD1	-8.36266	NBN	-42.46014
NOV	-8.13229	TBC1D31	-42.22182
RGS10	-7.69554	MRPL23	-41.97073
UGCG	-7.15145	CDKN1A	-40.73236
CD55	-6.89266	IFI6	-39.90401
ZDHHC2	-6.28915	TARBP2	-39.82472
AP000275.2	-6.25805	AC068768.1	-37.42369
AL137782.1	-6.25236	YJU2	-36.90515
TRHDE	-6.13772	DDIT3	-36.89117
MBTD1	-6.09265	ERMARD	-36.88388
CA2	-5.84295	ETFRF1	-36.76667
WTAP	-5.80349	SNX14	-35.53596
Vergleich EV-FS: Die 20 stärksten hochregulierten Gene			
unstimuliert		**nach IL-4 Stimulation**	
gene.name	**fold.regulation**	**gene.name**	**fold.regulation**
SOCS1	112.02104	GH1	67.54525
GH1	80.88747	SOCS1	55.21791
NAPRT	40.66012	AC114760.2	36.28965
FAM111B	35.62594	LYG2	36.26567
AL035425.4	33.75877	APBB3	27.04497
ZCCHC12	33.42623	GAD1	25.57207
KIF1A	31.25126	NUP210	12.75424
AKAP8L	28.59196	AC016831.4	11.35239
SOX11	18.23501	AC020915.3	11.02456
AL035425.3	16.02347	AC005726.5	10.93593
ANKRD1	16.00403	SOCS6	10.53224
PDCD2L	15.65828	PKD2	9.61467
MED24	15.15385	PDE5A	9.37206
VPS51	11.07647	SOX5	9.37188
FAM160B1	10.97689	EFNB2	9.16767
PTPRD	10.90271	ADD2	7.40291
MEIS1	10.57613	UBE2Q2P1	7.13811
TMCC1	9.69107	UPF1	6.97283
TRIM23	9.63287	MT-ND6	6.00881
NUBP1	9.48281	ITPR1	5.86949

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.