Institut für Pathologie

Universität Ulm

Prof. Dr. Peter Möller

Die Bedeutung von *SOCS-1*-Mutationen als prognostischer Marker im Hodgkin-Lymphom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von:

Karl Hoffmann

geb. am 13.01.1985

in Marburg/Lahn

Ulm 2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

2. Berichterstatter: PD. Dr. Andreas Viardot

Tag der Promotion: 20.12.2013

„Arbeit ist des Bürgers Zierde,

Segen ist der Mühe Preis“

Friedrich Schiller, Das Lied von der Glocke

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS i

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS iii

1 EINLEITUNG 1

1.1 Vorwort 1

1.2 Hodgkin-Lymphom 3

1.3 Die Rolle von *SOCS-1* in der Signaltransduktion 13

1.4 Ziele und Fragestellungen der Arbeit 23

2 MATERIAL 24

2.1 Geräte und Software 24

2.2 Verbrauchsmaterial 25

2.3 Reagenzien und Chemikalien 25

2.4 Lösungen und Puffer 26

2.5 Antikörper, Enzyme, Oligonukleotid-Primer 27

2.6 Reagenziensysteme (Kits) 28

2.7 Zellen und Kulturmedien 30

2.8 Patientenkollektiv 30

3 METHODEN 32

3.1 Präparation von PEN-Membranslides 32

3.2 Färbungen von Gefrierschnitten 32

3.3 Lasermikrodissektion 34

3.4 DNA-Extraktion aus Zellkultur 36

3.5 DNA-Extraktion mikrodissektierter Zellen 37

3.6 RNA-Extraktion und RT-PCR 38

3.7 Fotometrische Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA 40

3.8 RNA-Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer 40

3.9 Polymerase-Kettenreaktion 41

3.10 Agarose-Gelelektrophorese 44

3.11 Gelextraktion und Sequenzierung 45

3.12 Statistik 46

4 ERGEBNISSE 47

4.1 Patientenkollektiv 47

4.2 Optimierung der PCR-Reaktion aus mikrodissektierten Zellen 49

4.3 Zelllinien aus cHL und NHL zeigen *SOCS-1*-Mutationen 55

4.4 Mutationsanalysen am Patientenkollektiv 57

4.5 Korrelation von DNA-Mutationen mit denen der mRNA 59

4.6 Mutationsverteilung innerhalb des *SOCS-1*-Gens 61

4.7 Subklassifikation der Punktmutationen 64

4.8 Mögliche Ursachen von Punktmutationen im Hodgkin Lymphom 67

4.9 Phänotyp-Analyse der Mutationsgruppen 74

4.10 Kaplan-Meier-Analysen der Mutationsgruppen 79

5 DISKUSSION 84

6 ZUSAMMENFASSUNG 97

LITERATURVERZEICHNIS 99

ANHANG 118

LEBENSLAUF 125

DANKSAGUNG 126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	amino acid
a. e.	am ehesten
alk.	alkalisch
BCL-2	B-Zell-Lymphom 2
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
cHL	Classical Hodgkin Lymphoma
CIS	Cytokine inducible SH2 containing protein
ddH_2O	doppelt destilliertes H_2O
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ESS	Extended SH2 Subdomain

evtl.	eventuell
FCS	fötales Kälberserum
FU	Fluoreszenz
GAS	Gamma Interferon Activation Site
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-/Monocyte-Colony Stimulating Factor
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	Human Embryonic Kidney
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRS-Zelle	Hodgkin-Reed-Sternberg-Zelle
IFN-γ	Interferon Gamma
IκBα	Inhibitor Nuclear Factor Kappa B alpha
IL	Interleukin
IMDM	Iscove‘s Modified Dulbecco‘s Medium
IPFP	International Prognostic Factors Project
JAK	Januskinase
L&H	Lymphozytär & Histiocytär
LCM	Laser Capture Microdissection
LK	Lymphknoten
LMP	Late Membran Protein
M	Molar

MgCl	Magnesiumchlorid
MM	Mastermix
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEN	Polyethylene Naphthalate
PET	Polyethylene Terephthalate
pJAK2	phosphorylierte Januskinase 2
POL	Polyester
pSTAT	phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription
RIN	RNA-Integritätszahl
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute

RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Reverse Transcription
s. u.	siehe unten
SH2	Sarcoma Homology Domain 2
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
Src	Sarcoma
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAD	Transcriptional Activation Domain
Taq	Thermus aquaticus
TF	Transkriptionsfaktor
TYK	Tyrosinkinase
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt

1 EINLEITUNG

1.1 Vorwort

Im Zuge einer immer älter werdenden Bevölkerung ist die Anzahl der Krebserkrankungen weltweit in den vergangenen Jahren erheblich angestiegen. Trotz modernster Therapieverfahren versterben in Deutschland laut Robert-Koch Institut jährlich 208.824 von 436.500 Neuerkrankten. Krebserkrankungen sind damit hierzulande nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Als Ursache schädliche Umwelteinflüsse für diese Entwicklung verantwortlich zu machen, trifft nur in wenigen Fällen zu. Bösartige Erkrankungen sind meist Erscheinungen des hohen Lebensalters. Mehr als zwei Drittel aller malignen Erkrankungen treten jenseits des 65. Lebensjahres auf.

In den letzten Jahrzehnten wurden in der Krebsforschung erhebliche medizinische und wissenschaftliche Fortschritte erzielt. Der große Durchbruch in der Therapie steht jedoch weiterhin noch aus. Aktuell befinden sich mehrere Millionen Menschen unter Therapie oder sind in Nachbeobachtung. Der Umgang mit dem Erkrankungskomplex „Krebs“ stellt also nicht nur eine medizinisch-wissenschaftliche, sondern auch eine sozialpolitische, menschliche und zunehmend finanzielle Herausforderung dar. Der Verbesserung aktueller Therapiestrategien kommt daher in der Wissenschaft eine erhebliche Bedeutung zu. So gilt es zum einen, die Ansätze der Therapie weiterzuentwickeln, zum anderen aber auch, bestehende Behandlungen für die Patienten erträglicher zu gestalten. Im Zuge dieser Tendenz kommt einer zielgerichteten, individuellen Krebstherapie eine immer gewichtigere Bedeutung zu. Leider kommt es jedoch auch heute noch durch die medizinische Behandlung, bedingt durch Strahlen- oder Chemotherapie, zu einer iatrogenen Induktion von Sekundärneoplasien. Fortschritte in der Diagnostik oder in der prätherapeutischen Erhebung von prognostischen Parametern wären ein enormer Zugewinn für Patienten und deren Prognose.

Maligne Lymphome (Neubildungen aus Zellen des lymphatischen Systems) haben eine Inzidenz von ca. 25 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Das Hodgkin-Lymphom ist darunter mit einer Inzidenz von 0,5–2 pro 100.000 Einwohner vertreten. Verglichen mit

anderen Neoplasien (z. B. dem Plattenepithelkarzinom) sind maligne Neubildungen des lymphatischen Systems jedoch selten.

Die Einteilung der malignen Lymphome wurde in den vergangenen Jahren ständig geändert. Ausgehend von morphologischen oder klinischen Parametern werden zunehmend auch molekulare Charakteristika als Kriterium verwendet. Die Erkennung molekularer Veränderungen ermöglichte den Einsatz von Immuntherapien mit monoklonalen Antikörpern, wodurch eine differenzierte, häufig kurativ ausgerichtete Behandlung maligner Lymphome möglich geworden ist. Die Einteilung in die einzelnen Arme der therapeutischen Strategien wird durch die Weiterentwicklung der prognostischen Score-Systeme ermöglicht. Diese enthalten klinische, aber immer häufiger auch molekular-zytogenetische Parameter. So ist anzunehmen, dass in Zukunft ebendiesen biologischen Variablen sowohl in der pathologischen Diagnostik als auch in der differentialtherapeutischen Entscheidung verstärkt Gewicht zukommt.

1.2 Hodgkin-Lymphom

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL, Morbus Hodgkin, Lymphogranulomatose) wurde erstmals 1832 von Thomas Hodgkin beschrieben.[43] Es handelt sich dabei um eine maligne Erkrankung von Zellen des lymphatischen Systems. Die Inzidenz der Erkrankung blieb über die letzten Jahrzehnte mit ca. 0,5–2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner konstant. Das Erkrankungsalter weist in Abhängigkeit von der demografischen Verteilung zwei Häufigkeitsgipfel auf: einen um das dritte und einen weiteren um das siebente Lebensjahrzehnt. Die Inzidenz der einzelnen histologischen Subtypen variiert, jedoch tritt die nodulär-sklerosierende Form gehäuft bei Jugendlichen auf, wohingegen der mischzelluläre Typ eher im Alter vorkommt.

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Erkrankung ist weitgehend unbekannt. Diskutiert werden u. a. eine virale Infektion in der Vorgeschichte sowie Immundefekte. Im Rahmen von Zwillingsstudien konnte auch eine genetische Komponente nachgewiesen werden.

Die genaue Herkunft der für das cHL charakteristischen Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) war lange Zeit unbekannt, da sie keinerlei B-Lymphozyten-spezifische Oberflächenantigene (CD19, CD20, CD79a) exprimieren.[115] Genauere Untersuchungen wurden dadurch erschwert, dass die malignen Zellklone nur ca. 0,1–1 % der gesamten Zellpopulation innerhalb eines Lymphknotens ausmachen. Die Untersuchung einzelner Zellen mittels mikromanipulativer Methoden ermöglichte erstmals eine genauere molekulare Diagnostik.[62] 1998 konnten in den HRS-Zellen Umlagerungen von Immunglobulin (Ig)-Genen aufgezeigt[59] und die Zellen der lymphoiden B-Zellreihe zugeordnet werden. Die Fähigkeit, diese Immunglobuline zu transkribieren oder gar zu sezernieren, haben die Zellen jedoch eingebüßt.[76]

1.2.3 Abstammung der HRS-Zellen

Durch eine Sequenzanalyse der umgelagerten Immunglobulin-Gene konnte gezeigt werden, dass HRS-Zellen somatische Hypermutation aufweisen[60,61], wie sie physiologisch bei B-Zellen im Keimzentrum von Lymphfollikeln stattfindet. Bei diesem zufälligen Vorgang handelt es sich um eine Affinitätsreifung des Rezeptors an das Antigen.[62] Zellen, deren Rezeptorpassform an das Antigen verbessert werden konnte, exprimieren Gene (z. B. BCL-2), die eine Apoptoseinduktion verhindern. Mutationsanalysen der Immunglobulin-Sequenz von HRS-Zellen zeigen jedoch keine gesteigerte Antigenaffinität auf (sog. crippling mutations),[49] sodass die Zellen eigentlich apoptotisch werden müssten. Dennoch überstehen die malignen Zellklone dieses normalerweise nicht mit dem Überleben vereinbare Mutationsereignis. Die genaue Ursache der Apoptoseresistenz kann bis heute nicht vollständig erklärt werden. Ein möglicher Mechanismus ist eine Infektion mit dem EBV-Virus, die in ca. 60 % der Lymphomzellen nachgewiesen werden kann.[134] Diese Zellen exprimieren die EBV-spezifischen Gene LMP-1 und LMP-2A. LMP-1 aktiviert BCL-2 sowie NF-κB, was in beiden Fällen einen antiapoptotischen Stimulus bewirkt.[9,72] LMP-2A kann Signale des B-Zell-Rezeptors imitieren und so in der Keimzentrumsreaktion zum Überleben beitragen.[1] Die konstitutive Aktivierung des NF-κB-Signalweges fördert in HRS-Zellen Überleben, Proliferation und Differenzierung.[57] Dies konnte z. B. durch Alteration des NF-κB-Inhibitors IκBα auch an HRS-Zellen gezeigt werden.[132] 2005 konnten Melzner et al. aufzeigen, dass durch Mutationen im Tumorsuppressorgen *SOCS-1* eine vermehrte Aktivierung des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges vorlag.[79] Die dadurch bedingten antiapoptotischen Signale spielen auch eine entscheidende Rolle in vielen anderen Neoplasien (vgl. 1.3.4), konnten jedoch hier erstmals für das Hodgkin-Lymphom aufgezeigt werden. Die HRS-Zellen sind im Lymphfollikel von vielen reaktiven Zellen umgeben, deren Signale und Zellkontakte für die HRS-Zelle ein überlebenswichtiges Mikromilieu schaffen.[114] Diese These wird durch die Unfähigkeit von HRS-Zellen, in immundefizienten Mäusen zu überleben, untermauert.[50] Die Hauptpopulation dieses Begleitinfiltrates stellen aktivierte T-Helferzellen dar.[103] Auf der Zelloberfläche der HRS-Zellen sind viele Adhäsionsmoleküle und anderen Antigene exprimiert, die die Lymphomzelle als eine

antigenpräsentierende Zelle ausweisen. Möglicherweise lockt ein bisher noch nicht näher identifiziertes Antigen die T-Zellen an.carbone[16,82,101] Die Immunantwort dagegen ist jedoch ineffektiv. Dies könnte den zellulären Immundefekt vieler Hodgkin-Patienten erklären.[102]

Zu einem geringen Anteil von 1–2 % scheinen die HRS-Zellen einen T-zellulären Ursprung zu haben. In diesen Fällen wurden Umlagerungen in Genen beobachtet, die für den T-Zell-Rezeptor (TCR) kodieren.[88,116,126,131] Auch in zwei bekannten cHL-Zelllinien (HDLM2 und L540) kann die Expression von T-Zell-Markern beobachtet werden.[23]

1.2.4 Pathologie und Subtypisierung

Die einkernige Hodgkin-Zelle und die mehrkernige Reed-Sternberg-Zelle bilden zusammen die Population der für das Hodgkin-Lymphom charakteristischen HRS-Zellen. Der Anteil dieser malignen Zellklone macht nur etwa 1 % des gesamten Tumorinfiltrates aus.[68] Die restlichen Zellen des sog. Microenvironments setzen sich zusammen aus einer Vielzahl reaktiver Lymphozyten, Granulozyten, Histiozyten und Fibroblasten. Die verschiedenen Subtypen des klassischen Hodgkin-Lymphoms werden aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des Zellinfiltrates sowie der histologischen Umgebung differenziert.[36] Die von der WHO 1999 erarbeitete Klassifikation grenzt eine lymphozytenprädominante Form (auch Paragranulom) von den anderen Formen des klassischen Hodgkin-Lymphoms ab.[34,35] Der Anteil dieses Subtyps macht ca. 10 % aus, die restlichen 90 % verteilen sich auf die Untergruppen des cHL.

Die HRS-Zellen exprimieren im Gegensatz zu den L&H-Zellen des lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphoms keine B-Lymphozyten-spezifischen Oberflächenantigene.[40] In der Mehrzahl der Fälle finden sich hingegen der Aktivierungsmarker Ki-1 (CD30), das Leu-M1-Antigen (CD15), der Interleukin-2-Rezeptor (CD25), der Transferrin-Rezeptor (CD71) sowie HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR).[122] Die L&H-Zellen des lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphoms wurden aufgrund ihrer charakteristischen B-Zell-Marker (CD19 und CD20) schon früh der B-zellulären Linie zugeordnet.[11,75,95]

Die klassische HRS-Zelle ist ca. 15–45 µm groß. Sie besitzt einen vergrößerten, typischerweise gespiegelten Kern mit einem prominenten, basophilen Nukleolus. Die Reed-Sternberg-Zellen besitzen einen größeren, multinukleären Kern und entstehen aus den klassischen Hodgkin-Zellen durch Endomitose.[24] Nicht jeder cHL-Subtyp weist diese klassische Zellmorphologie in seinen neoplastischen Klonen auf. So ist sie z. B. für den gemischtzellulären Typ typisch, während der nodulär-sklerosierenden Typ eine andere Morphologie aufweist.

Klassisches Hodgkin-Lymphom

Nodulär-sklerosierender Typ (NS)

Mit 60–65 % ist dies der mit Abstand häufigste Subtyp. Er tritt vermehrt bei jüngeren Patienten auf und befällt vorzugsweise die zervikalen, subklavikularen und mediastinalen Lymphknoten (LK). Im Allgemeinen ist dieser Subtyp mit einer lokal begrenzten Progression und dementsprechend guter Prognose vergesellschaftet. Histologisch fallen aus der LK-Kapsel ausstrahlende Kollagenfaserbündel auf, welche die neoplastischen Infiltrate nodulär einschließen. Die HRS-Zellen besitzen einen großen, multilobulären Kern mit vielen kleinen Nukleoli. In formalinfixiertem Gewebe ist das Zytoplasma retrahiert, sodass es den Anschein hat, als würden die Zellkerne in Lakunen liegen. Dieses Phänomen brachte der Erscheinung den Namen „Lakunar Zelle“ ein. Immunphänotypisch entsprechen diese Zellen der klassischen HRS-Zelle.

Gemischtzellulärer Typ (MC)

Mit 27 % ist dies die zweithäufigste Form. Sie tritt gehäuft bei älteren Patienten auf. Die Morphologie entspricht der einer klassischen binukleären HRS-Zelle. Das Umgebungsinfiltrat ist mit Lymphozyten, Eosinophilen, Plasmazellen und Histiozyten sehr heterogen. Die Fibrose ist hier längst nicht so ausgeprägt wie beim NS-Typ. Die Prognose ist hier aufgrund des häufig diffusen Befallsmusters schlechter als bei den übrigen Subtypen.

Lymphozytenreicher Typ (LR)

Mit 3–5 % zählt diese Form zu den eher selteneren Hodgkin-Typen. Morphologisch ergeben sich viele Gemeinsamkeiten mit dem nodulären Paragranulom. Die HRS-Zellen sind nicht sehr zahlreich. Das Umgebungsinfiltrat besteht größtenteils aus reifen Lymphozyten. Die malignen Zellen treten oft in kleinen Zellgruppen auf. Diese Noduli sind von einer verbreiterten Mantelzone umgeben, in der oft kleine Keimzentren zu finden sind. Dieser Subtyp weist die typischen immunhistologischen Merkmale des cHL auf.

Lymphozytenarmer Typ (LD)

Mit 0,8–1 % ist dies der seltenste Subtyp. Er tritt gehäuft bei Männern im höheren Lebensalter und/oder bei HIV-Infektion auf. In solchen Fällen ist oftmals ein aggressiver Verlauf zu beobachten. Histologisch zeigt sich eine diffuse HRS-Zellinfiltration bei nur spärlicher nicht neoplastischer Begleitreaktion. Dieser Typ hat Ähnlichkeit mit dem anaplastischen Non-Hodgkin-Lymphom.

Nodulär-lymphozytenprädominanter Typ (Paragranulom)

Das nodulär-lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom macht ca. 5–10 % aller Hodgkin-Diagnosen aus. Das neoplastische Korrelat der HRS-Zelle ist hier die L&H-Zelle. Ihr Zellkern ist multilobulär und wirkt aufgedunsen, weshalb diese Zelle auch „Popcorn-Zelle“ genannt wird. Mikroskopisch zeigt sich eine fast gänzlich aufgehobene LK-Struktur. Das Begleitinfiltrat besteht aus Lymphozyten und Histiozyten; Neutrophile, Eosinophile oder Plasmazellen sind selten zu finden. Immunhistologisch exprimieren diese Zellen die typischen B-Zellmarker (CD19, CD20), jedoch nicht die des cHL (CD15, CD30). Unter allen Subtypen ist dieser mit der besten Prognose vergesellschaftet.

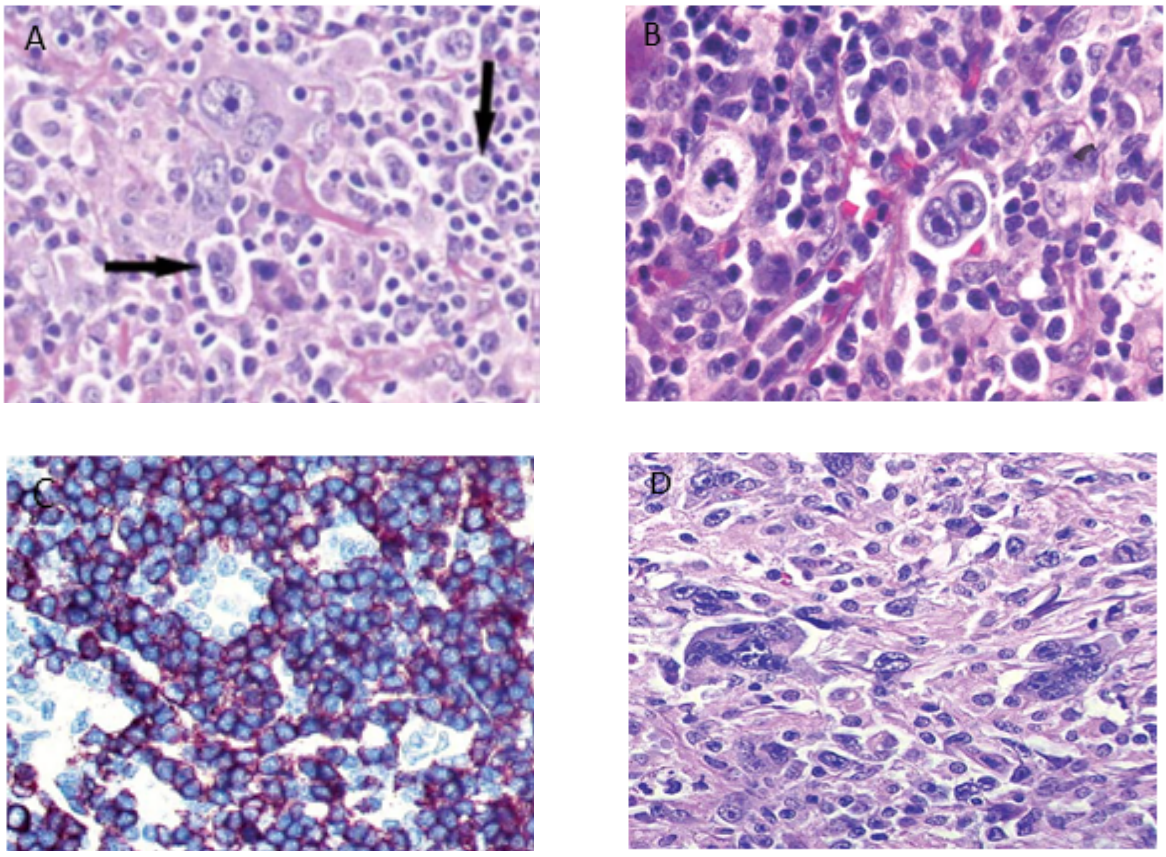


Abbildung1 Histomorphologie der Subtypen im klassischen Hodgkin-Lymphom A: Die lakunaren Zellen im Nodular-Sclerosis-Subtyp (Pfeile) zeigen eine Retraktion der Zytoplasmamembran. Die malignen Zellen dieses Subtyps liegen oft in Aggregaten vor. **B:** Die Reed-Sternberg-Zellen im Mixed-Cellularity-Subtyp sind binukleär und umgeben von einem gemischten Infiltrat aus Lymphozyten, Makrophagen und Eosinophilen. **C:** Immunhistochemische Färbung CD20+B-Zellen, die die CD20-HRS-Zellen im Lymphocyte-rich-Subtyp umgeben. Die malignen Zellen werden ebenfalls von CD20-T-Zellen unmittelbar umringt. **D:** Beim lymphozyten-depletierten Subtyp sind große, bizarre HRS-Zellen zusammen mit wenigen Lymphozyten in einem Geflecht aus fibrillärer Matrix eingebettet. (Foto: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed. 2008; Steven H. Swerdlow, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization)

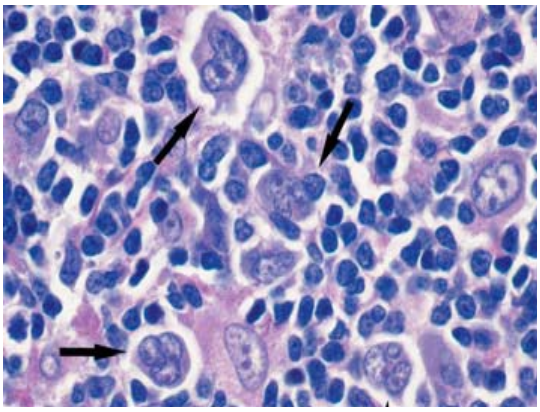


Abbildung 2 Histomorphologie des nodulär lymphozytenprädominanten Hodkgin-Lymphoms Die Pfeile zeigen drei L&H-Zellen mit typisch lobulierter Kernstruktur, weshalb sie auch Popcorn-Zellen genannt werden. Sie liegen in einem Umgebungsinfiltrat aus kleinen Lymphozyten und Histiozyten. **Abkürzungen:** L&H, lymphocytic and histocytic. (Foto: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed. 2008; Steven H. Swerdlow, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization)

1.2.5 Klassifikation und Stadieneinteilung

Die heutige Stadieneinteilung erfolgt nach der auf der Ann Arbor Konferenz verabschiedeten Klassifikation.[17] Man unterscheidet vier Stadien, wobei die ersten drei durch einen Befall lymphatischer Organe gekennzeichnet sind und das vierte Stadium durch einen diffusen Organbefall charakterisiert ist. Die Einteilung erfolgt klinisch (CS) unter Zuhilfenahme der Anamnese, einer körperlichen Untersuchung und bildgebender Verfahren wie Computertomografie, Ultraschall, Röntgen und Skelettszintigrafie. Eine pathologisch-anatomische Einteilung (PS) mittels Laparotomie ist heute bis auf wenige Ausnahmen obsolet.

Tabelle 1 Stadieneinteilung der Hodgkin-Lymphome nach Ann Arbor N: zum lymphatischen Gewebe gehörige Organe (Lymphknoten, Milz, Thymus, Waldeyer-Rachenring, Appendix). E: extranodaler Befall (S = Milz, M = Knochenmark, D = Haut, H = Leber, L = Lunge, O = Knochen, P = Pleura). Die Stadien I–IV erhalten den Zusatz B, wenn eine B-Symptomatik (nicht erklärbares Fieber über 38 °C, nicht erklärbarer Nachtschweiß, nicht erklärbarer Gewichtsverlust von über 10 % des Körpergewichtes innerhalb von 6 Monaten) vorliegt, oder den Zusatz A, wenn diese Symptomatik fehlt. **Abkürzugen:** Lk = Lymphknoten.

Stadium	Ausbreitung
I	Befall einer einzigen LK-Region (I/N) oder Vorliegen eines einzigen extranodalen Herdes (I/E).
II	Befall von 2 oder mehr LK-Regionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde und Befall einer oder mehrerer LK-Regionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/E).
III	Befall von 2 oder mehr LK-Regionen auf beiden Seiten des Zwerchfells (III/N) oder Befall von lokalisierten extranodalen Herden und LK-Befall, sodass ein Befall auf beiden Seiten des Zwerchfells vorliegt (III/E).
III 1	Subphrenische Lokalisation beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale LK allein oder gemeinsam.
III 2	Subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraaortaler, mesenterialer, iliakaler und/oder inguinaler LK allein oder gemeinsam.
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von LK.

1.2.6 Prognose und Prognosefaktoren

Die Prognose von Hodgkin-Patienten ergibt sich aus einer Reihe prätherapeutisch erhobener klinischer und biologischer Parameter. Der wichtigste Parameter ist dabei das Stadium der Erkrankung. Auch der histologische Subtyp geht teilweise mit einer prognostischen Tendenz einher (vgl.1.2.4). Diese hat keinen direkten Einfluss mehr auf Therapieentscheidungen, soll an dieser Stelle jedoch der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Der nodulär-sklerosierende Typ tritt gehäuft bei jungen Patienten auf und ist mit einer guten Prognose vergesellschaftet. Der gemischtzelluläre Typ hingegen tritt vermehrt bei älteren Patienten auf. Die Prognose ist schlechter als bei den übrigen Subtypen, nicht

zuletzt, weil diese Unterform vermehrt zu disseminiertem Befall und systemischen Manifestationen neigt. Das noduläre Paragranulom hat unter allen Formen die beste Prognose.

Um innerhalb fortgeschrittener Stadien eine Patientengruppe mit besonders schlechter Prognose herauszuarbeiten, wurde im Rahmen eines „International Prognostic Factors Project“ (IPFP) ein allgemein anerkannter prognostischer Index entwickelt, in den 7 Risikofaktoren gleichberechtigt eingehen:

1. Alter >45 Jahre
2. männliches Geschlecht
3. Stadium IV
4. Anämie (Hb <10,5 g/dl)
5. Albumin <4 g/dl
6. Leukozytose >15.000/mm^3
7. Lymphopenie <600/mm^3

Durch moderne Therapieverfahren ist es heute möglich, auch für Patienten mit ehemals ungünstiger Prognose eine Remission oder gar Heilung zu erzielen. Daher tritt die Relevanz dieser Prognoseindikatoren zunehmend in den Hintergrund. Eine Patientengruppe von ca. 15–20 % zeigt jedoch trotz moderner Therapieanstrengungen einen besonders aggressiven Verlauf. Bei den Betroffenen versagen aktuelle Therapieversuche oder es wird ein frühes Rezidiv beobachtet. Ein mindestens ebenso großer Anteil an Patienten ist übertherapiert, was sich in einem signifikant gesteigerten Auftreten an therapieinduzierten Nebenwirkungen manifestiert.[10] Bisher wurde präklinisch noch kein histopathologischer oder zytogenetischer Marker identifiziert, der von Beginn an mit einem therapierefraktären Verlauf korreliert werden könnte. Mit einem solchen klinischen Marker könnten betroffene Patienten gezielter hoch dosiert therapiert werden. Im Gegenzug wäre eine Dosisreduktion bei den übrigen Patienten denkbar. Therapieinduzierte Nebenwirkungen wie die folgenden könnten so reduziert oder gar verhindert werden: Infertilität, Fatigue-Syndrom, interstitielle Pneumonie, Sekundärmalignome, Knochenmarkdepression, Myokardinfarkt, Nephro- und Hepatotoxizität.

1.2.7 Klinik

Die häufigste Primärmanifestation der Erkrankung ist eine indolente LK-Schwellung. In ca. 70 % sind dabei die zervikalen LK betroffen. Erstmanifestationen in inguinalen, axillären, mesenterialen LK oder dem Waldeyer'schen Rachenring sind selten. Charakteristisch ist eine zunächst lokale Ausbreitung über den Lymphweg. Frühe Fernmetastasierungen sind, genau wie ein extranodaler Befall, untypisch. Im Verlauf der Erkrankung tritt häufig eine B-Symptomatik (Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsverlust) auf. Mit den genannten Symptomen grenzt sich das Hodgkin-Lymphom klinisch von den Krankheitserscheinungen der Non-Hodgkin-Lymphome ab. In fortgeschrittenen Stadien können durch extranodalen Organbefall neurologische oder endokrinologische Störungen sowie Knochenschmerzen auftreten.

Die Diagnose eines Hodgkin-Lymphoms wird nur histologisch aus einem LK-Biopsat gestellt. Die zuvor genannten Parameter aus Anamnese und körperlicher Untersuchung sind dafür richtungsweisend und helfen bei der differentialdiagnostischen Abgrenzung. Nach Diagnosestellung erfolgten die für eine Therapie notwendigen Staging-Untersuchungen sowie eine Bestimmung der für die Kontrolle des Krankheitsverlaufes nötigen Laborparameter.

1.2.8 Therapie

Die Therapie des Hodgkin-Lymphoms kann dank moderner Behandlungsmethoden auch in fortgeschrittenen Stadien in kurativer Absicht erfolgen. 80–90 % der Patienten können geheilt werden.[22] Mit Ausnahme der zuvor genannten therapierefraktären Hodgkin-Lymphome ist das Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie gut. Die Behandlungsmodalitäten sowie deren Intensität richten sich nach den in Tabelle 2 aufgeführten Einteilungsmodalitäten.

Tabelle 2 Risikofaktoren und prognostischer Index In Bezug auf die Therapiestratifizierung lassen sich 3 prognostische Gruppen unterscheiden (günstige, intermediäre und ungünstige Prognose), die durch das Erkrankungsstadium und weitere klinische Risikofaktoren definiert sind. **Abkürzungen:** BSG, Blutsenkungsgeschwindigkeit; LK, Lymphknoten.

Risikofaktoren	Stadium		
	IA, IB, IIA	**IIB**	**III, IV**
Keine	Günstige Prognose		Ungünstige Prognose
Großer Mediastinal-Tumor	Intermediäre Prognose	Ungünstige Prognose	
Extranodalbefall	Intermediäre Prognose	Ungünstige Prognose	
Hohe BSG	Intermediäre Prognose		Ungünstige Prognose
≥3 LK-Areale	Intermediäre Prognose		Ungünstige Prognose

1.3 Die Rolle von *SOCS-1* in der Signaltransduktion

1.3.1 JAK-STAT-vermittelte Signaltransduktion

Zytokine sind eine große Familie von Glykoproteinen. Sie steuern als extrazelluläre Linganden für verschiedenste Oberflächenrezeptoren eine Vielzahl physiologischer Vorgänge innerhalb einer Zelle.[54] Januskinasen (JAKs) sind dem Zytokinrezeptor zytoplasmatisch assoziierte Proteine und zählen mit ihren vier bekannten Mitgliedern (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) zur Familie der Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Der Zytokinrezeptor besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Transmembranrezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Diese wird daher von den JAKs bereitgestellt. Nach Lingandenbindung kommt es zur Autophosphorylierung zweier JAK-Moleküle an ihren Tyrosinresten. Dies erhöht deren Kinaseaktivität und bedingt eine weitere Phosphorylierung von Tyrosinresten am Rezeptor. Die Phosphotyrosinreste stellen Bindungsstellen für Proteine mit einer SH2-Domäne dar. Physiologische Linganden dieser Bindungsstelle sind STATs, die an ihrem carboxyterminalen Ende eine SH2-Domäne besitzen. Durch Bindung an die Rezeptortyrosine werden die STATs an ihren Tyrosinresten

phosphoryliert. Zwei STAT-Moleküle können sich gegenseitig an ihren phosphorylierten Tyrosinresten erkennen und zu einem aktivierten Dimer verbinden. Die Dimere exponieren ein Kernlokalisationssignal, was sie unmittelbar in den Kern translozieren lässt. Mit ihren DNA-Bindungsdomänen wirken sie an der Promotorregion vieler Gene als Transkriptionsfaktoren. Diese Signalkaskade stellt für die Zelle eine extrem schnelle Möglichkeit dar, Signale von der Membran zum Nukleus zu leiten. Daher bezeichnet man diesen Signalweg auch als „JAK/STAT canonical pathway".

Neben Genen für Proliferation und Wachstum werden von STATs auch negative Rückkopplungsmechanismen eingeleitet (vgl. Abbildung 3). Dies geschieht beispielsweise durch Induktion der Transkription von SOCS-Proteinen. Für die initiale Induktion der SOCS-Proteine sind heute mehr als 30 verschiedene Zytokine bekannt, deren typische Vertreter nicht nur Hormone und Interleukine (IL2, 3, 4, 6), sondern auch IFN-γ, G-CSF oder GM-CSF sein können.[2,7,55,56,66,74,81,84,119,125] SOCS-Proteine unterbinden die zytokin-induzierte Signaltransduktion an mehreren Stellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der SOCS-Protein-Expression nicht nur auf der Ebene der Transkription, sondern auch durch alternatives Splicing und mRNA-Stabilisierung sowie posttranslationelle Regulation stattfindet.[5,31,111]

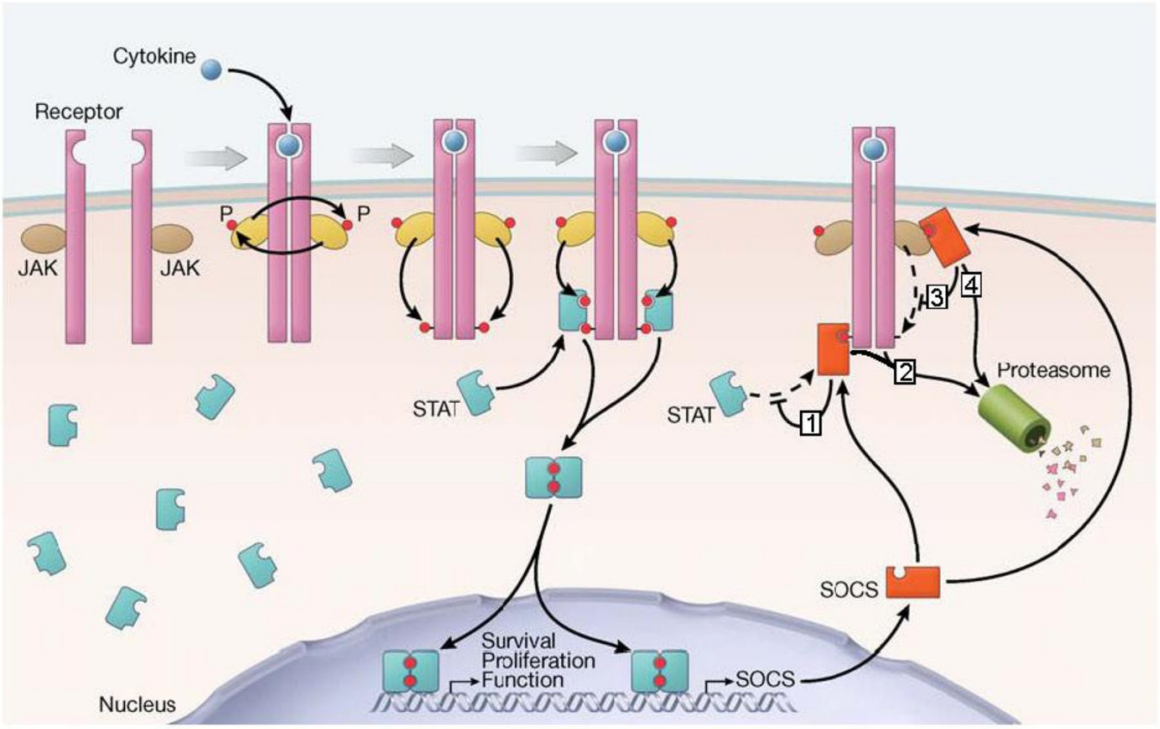


Abbildung 3 SOCS-vermittelte Inhibition von JAK-STAT-Signaltransduktion SOCS-Moleküle wirken an mehreren Stellen als negativer Feedback-Mechanismus des JAK-STAT-Signalweges: 1. Blockade der STAT-Bindungsstelle am Rezeptor, 2. Initiation der proteasomalen Degradation des Rezeptors, 3. Inhibition der Kinaseaktivität der JAKs, 4. Initiation der proteasomalen Degradation von JAKs. (Abb. von Palmer et al. 2009)

Durch den in Abbildung 3 dargestellten negativen Rückkopplungsmechanismus wird eine überschießende Zytokinantwort innerhalb der Zelle unterbunden. Gleichzeitig wird deutlich, welche Vorteile Störungen dieses Regelkreises für eine maligne Proliferation haben könnten.

1.3.2 Die Rolle des JAK-STAT-Signalweges in der Onkogenese

Veränderungen in der zellulären Signaltransduktion haben eine Schlüsselrolle in der Entstehung vieler Neoplasien. Maligne Neubildungen entziehen sich durch die überschießende Aktivierung von Signalwegen der Regulation durch den Zellzyklus und somit auch der Apoptose. Neben den vielfach beschriebenen Veränderungen der durch den Nuklear-Faktor kappa B (NF-κB) bedingten Signaltransduktion[8,42] ist auch der JAK-STAT-Signalweg in vielen Neoplasien dysreguliert. Bei hämatologischen Neubildungen ist das wohl bekannteste Beispiel das TEL-JAK2-Fusionsprotein in lymphatischer und myeloischer Leukämie, was eine konstitutiv aktive Kinaseaktivität der JAKs bedingt. In beiden Fällen

sind unterschiedliche Chromosomentranslokationen für die Genfusion verantwortlich: t(9;12)(p24;p13) im Falle einer akuten lymphoblastischen B-Zell-Leukämie und t(9;15;12)(p24;q15;q12) bei der chronisch myeloischen Form[63,98]. Darüber hinaus ist eine gestörte Regulation dieser Signalkaskade oftmals auch in der Entwicklung und Funktion von T-Zellen und der daraus resultierenden Autoimmunphänomene zu beobachten.[4,33,87,97]

1.3.3 Aufbau und Funktion von *SOCS-1*

Das *SOCS-1*-Protein ist Teil einer 8 Mitglieder umfassenden Proteinfamilie (CIS sowie *SOCS-1*-7).[56,97] Eine Klonierung des Gens gelang erstmals 1997 durch drei unabhängige Gruppen.[26,90,121] Die genomische Sequenz ist zwischen vielen Spezies hoch konserviert und beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p13) lokalisiert.[135] Das Gen besteht aus zwei Exons und wird in eine 1215 Nukleotide umfassende mRNA transkribiert, die für ein 211 aa großes Protein kodiert. Alle Mitglieder der Proteinfamilie teilen eine hoch konservierte SH2-Domäne sowie eine SOCS-Box (vgl. Abbildung 4), was die funktionelle Bedeutung dieser beiden Domänen unterstreicht. Die SH2-Domäne bindet phosphorylierte Tyrosinreste der Zytokinrezeptoren oder deren assoziierte Proteine.[140] Die SOCS-Box rekrutiert Faktoren, die den proteasomalen Abbau der gebundenen Proteine einleiten.[48,51]

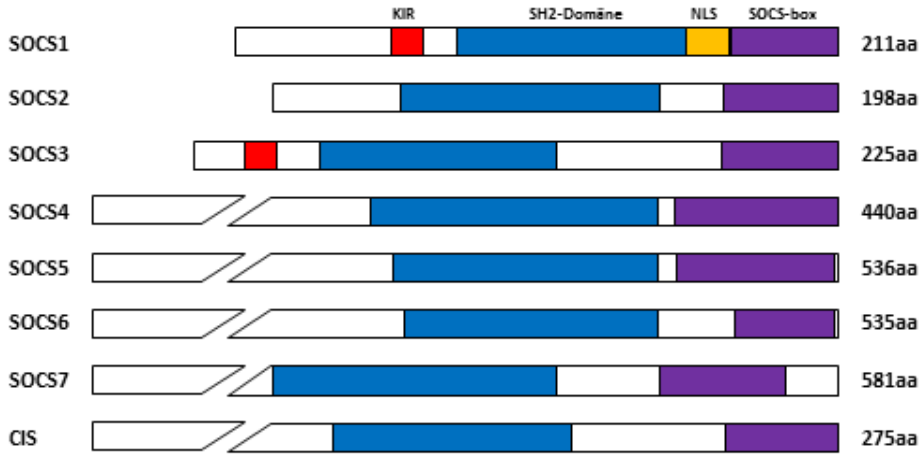


Abbildung 4 Die SOCS-Proteinfamilie Die SOCS-Proteinfamilie umfasst 8 Mitglieder, deren gemeinsames Merkmal eine zentrale Src Homology Domain 2 (SH2) sowie eine SOCS-Box ist. *SOCS-1* + 3 teilen viele funktionelle, aber auch strukturelle Eigenschaften, zu denen unter anderem eine N-terminale Kinase Inhibitory Region (KIR) zählt (nach Zhang et al. 2011).

Die genaue Funktion der einzelnen Domänen wird im Folgenden beschrieben. Eine schematische Illustration zeigt Abbildung 5.



Abbildung 5 Domänenstruktur des *SOCS-1*-Proteins Im N-terminalen Anteil des SOCS-Moleküls liegt die serinreiche Region Poly-Serine (PS), die als eine Src Homology 3 (SH3)-Bindungsstelle fungiert. Die Kinase Inhibitory Region (KIR) und die Extended SH2 Subdomain (ESS) bilden mit dem restlichen N-terminalen Anteil des Proteins die TEC-Kinase-Domäne. Letztere dient auch zusammen mit der Src Homology Domain 2 (SH2) als Bindungs- und Inaktivierungsbereich für JAKs. Das Nuclear Localisation Signal (NLS) befindet sich als Sequenzabschnitt zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box. Es ermöglicht die nukleäre Lokalisation von *SOCS-1*. Die SOCS-Box besitzt eine 10 aa lange Konsensussequenz für den BC-Elongationskomplex und enthält das SC-Motiv 1 und 2. **Abkürzungen:** PS, Poly-Serine; SH3, Src Homology Domain 3; KIR, Kinase Inhibitory Region; SH2, Src Homology Domain 2; ESS, Extended SH2 Subdomain; NLS Nuclear Localisation Signal; SC1, SC-Motiv-1; SC2, SC-Motiv-2.

Poly-Serine Domain (PS) Am N-terminalen Ende des *SOCS-1*-Proteins (aa 26-32)[20] befindet sich eine Stelle mit sieben aufeinanderfolgenden Serinresten sowie zwei Diprolin- Motiven (Typ I und Typ II), die mit der Src Homology Domain 3 (SH3) des Signalmoleküls Grb-2 interagieren. Der GC-Gehalt in diesem Genbereich beträgt 96,5 %.[20]

Kinase Inhibitory Region (KIR) Diese Domäne findet sich nur bei 2 der 8 SOCS-Mitglieder (vgl. Abbildung 4). Sie ist 11 aa lang (aa 55-66)[136] und dient als Pseudosubstrat für JAKs und inhibiert so deren Kinaseaktivität.[91,93,136] Zusätzlich verstärkt sie die Bindung des SOCS-Moleküls an pY1007 im Activation Loop der JAKs.[48,136,142] Von Palmer et al. konnte mit einem Knock-out der KIR-tragenden Proteine *SOCS-1* und SOCS-3 die Bedeutung

dieser Domäne gezeigt werden. Es resultierte ein fataler Phänotyp, der in der Form bei keinem der anderen SOCS-Mitglieder beobachtet werden konnte.[97]

Extended SH2 Subdomain (ESS) Dieses Motiv des Proteins schließt sich N-terminal unmittelbar an die SH2-Domäne an (aa 67-78)[136] und bildet zusammen mit dieser die Bindungsstelle für Zielmoleküle wie z. B. JAKs.[112,136] Besonders die Aminosäuren I68 und L75 spielen dabei eine essenzielle Rolle. Die Domäne dient bei einer Proteinbindung zur Orientierung an der Zielstruktur.[5]

Zusammen mit der P- und KIR-Domäne blockiert dieser Teil des SOCS-Proteins die Kinaseaktivität von TEC, einer zytoplasmatischen Non-Rezeptor-Tyrosinkinase.

Src Homology Domain 2 (SH2) Jedes Mitglied der SOCS-Familie weist eine zentrale SH2-Domäne auf (aa 75-174).[136] Dieser Proteinabschnitt fungiert zusammen mit der ESS-Domäne als Bindungsstelle für die zur Degradation bestimmten Proteine. Im Falle von JAK2 bindet die SH2-Domäne an pY1007 im Activation Loop der JAKs. Bei einer Bindung an diese Stelle wird die Kinasefunktion der JAKs sterisch unterbunden.

Nuclear Localisation Signal (NLS) Diese 14 aa lange Domäne ist unmittelbar zwischen der SH2-Domäne und der SOCS-Box lokalisiert (aa 159-173).[6] Diese Region ermöglicht es dem Protein, in den Nukleus zu translozieren. In Experimenten zeigte sich, dass bei Mutationen oder gar Verlust dieser Region durch C-terminale Deletion eine nukleäre Lokalisation von *SOCS-1* nicht mehr nachzuweisen ist.[6,52] Umgekehrt ermöglicht eine Fusion dieser Domäne mit zytoplasmatischen Proteinen wie CIS deren Permission in den Nukleus.[6]

SOCS-Box Diese Domäne (aa 161-210)[41] interagiert mit den Elongationsfaktoren B und C sowie Cullin 5 (Cul5), Ring-Box 2 (Rbx2) und einer E2-Ubiquitin-Transferase.[67] Zusammen agieren sie als E3-Ubiquitin-Transferase, welche Proteine wie Zytokinrezeptoren oder Jak2 mit Ubiquitin markiert und dadurch deren proteasomalen Abbau bewirkt.[3,12,100,128] Die Interaktionsstelle der Elongationsfaktoren wird dabei durch die 10 aa lange Sequenz „PLQELCRQRI“ gebildet (vgl. Abbildung 6).

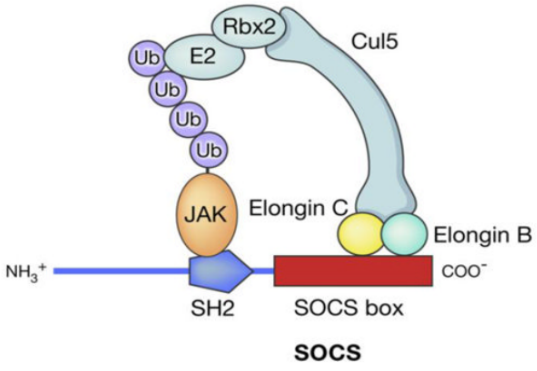


Abbildung 6 Molekularer Mechanismus der *SOCS-1*-vermittelten Protein-Degradation Die SOCS-Box dient dem BC-Elongationskomplex als Bindungsstelle. Dieser leitet dann über die Akkumulation weiterer Moleküle (Cul5, Rbx2, E2) die proteasomale Degradation des an der SH2-Domäne gebundenen Proteins (hier JAK) ein. **Abkürzungen:** SH2, Src Homology Domain 2; Elongin B/C, Elongationsfaktor B bzw. C; Cul5, Cullin 5; Rbx2, Ring-Box 2; E2, E2-Ubiquitin-Transferase; Ub, Ubiquitin; JAK, Januskinase (Palmer et al. 2009).

Die Hauptfunktion von *SOCS-1* besteht in der zytoplasmatischen Regulation des JAK-STAT-Signalweges. Durch den proteasomalen Abbau verschiedener Januskinasen (JAK1, JAK2, JAK3, und TYK2) inhibiert *SOCS-1* deren Funktion und nimmt Einfluss auf Proliferation, Entwicklung, Differenzierung und Überleben der Zellen. Der Promotor von *SOCS-1* besitzt eine Bindungsstelle für STATs, sodass die Bildung von *SOCS-1* via JAK-STAT-Signaling von vielen Zytokinen (IFN-γ,[108] IL-6,[121] IL-2,[120] IL-4[21] und IL-7[18]) induziert werden kann. Im Rahmen einer negativen Rückkopplung erfolgt via *SOCS-1*-vermittelter Degradation die Inhibition einer überschießenden Zytokinantwort.

Neben der klassischen Rolle im JAK-STAT-Signalweg fungiert *SOCS-1* auch als Negativ-regulator des LPS-induzierten TLR-Signalings.[141] Erstmals konnte von Hwang et al. auch eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden,[45,64] die eine Inhibition zytokininduzier-ter Signaltransduktion verstärkt.[6,45] So bewirkt nukleäres *SOCS-1* die proteasomale De-gradation von p65, einem Effektor-Molekül des NF-κB-Signalweges.[107,123] Zusätzlich bildet *SOCS-1* mit ATM und ATR einen Komplex, der im Nukleus zu einer Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von p53 führt. Dies fördert den p53-abhängigen Prozess Onkogen-induzierter Zellseneszenz.[14,71,105] In Studien an *SOCS-1* $^{-/-}$ Mäusen konnten Hashimoto et al. zeigen, dass sich die Rolle von *SOCS-1* nicht nur auf maligne Zellen beschränkt. In Antigen präsentierenden Zellen (APCs) schwächt *SOCS-1* die Intensität der Antigen-präsentation[38] und in T-Zellen nimmt es entscheidenden Einfluss auf deren Entwicklung, Differenzierung und Funktion. Eine Regulation der SOCS-Proteine untereinander wird

ebenfalls beschrieben. So gibt es Hinweise darauf, dass SOCS-2 die Degradation von *SOCS-1* und SOCS-3 bedingt.[99]

Aus den zuvor aufgezeigten Erkenntnissen wird deutlich, dass es sich bei *SOCS-1* nicht in allen Belangen um einen alleinigen Negativregulator handelt, sondern vielmehr um eine zentrale Schaltstelle vieler zellulärer Regulationsmechanismen.

1.3.4 Bedeutung von *SOCS-1* in malignen Erkrankungen

Zytokinsignale und deren Regulation sind eingebunden in eine Vielzahl von Immun- und Entzündungsreaktionen. Deren Dysregulation hätte Veränderungen im Ablauf von allergischen Reaktionen,[19,32] Autoimmunität,[25,118] Entzündungsreaktionen[117,118] und Kanzerogenese zur Folge. *SOCS-1* ist dabei ein wichtiger Modulator von Zytokinantworten. Deren Dysregulation und die damit oftmals verbundene konstitutive Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges ist als wichtiger Schritt für die Onkogenese vieler humaner Neoplasien beschrieben. So ist die Expression von *SOCS-1* in Hirnmetastasen des malignen Melanoms vermindert und führt über eine gesteigerte Expression von MMP-2, bFGF und VEGF zu vermehrter Invasion und Angiogenese der malignen Zellen im Erfolgsorgan.[44] Im Prostatakarzinom verhindert *SOCS-1* überschießendes Zellwachstum durch den Abbau von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs).[92] Neben den genannten Beispielen bestätigt sich in vielen anderen Malignomen die Rolle von *SOCS-1* als klassischer Tumorsuppressor: Hepatozelluläres Karzinom (HCC)[23], Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom[30], Mesotheliom[36], Plattenepithelkarzinom[87], Cholangiozelluläres Karzinom[91], Barrett-Adenokarzinom[92] und myeloproliferative Erkrankungen[99]. Auf der anderen Seite beschreiben einige Studien eine gegenteilige Funktionsweise; ja sogar eine Tumor fördernde Wirkung von *SOCS-1*. So konnten Raccurt et al. eine höhere Expression des vermeintlichen Tumorsuppressors in Brustkrebsgewebe nachweisen, als dies im übrigen Gewebe der Patienten der Fall war.[104] Als mögliche Ursache wird die Induktion der *SOCS-1*-Genexpression durch inflammatorische Zytokine des Umgebungsinfiltrates diskutiert. Letztlich bleibt die Ursache dieser paradoxen Wirkung jedoch ungeklärt. Dies zeigt, dass noch nicht alle Funktionen dieses

Moleküls vollständig verstanden sind und es noch weiterer Anstrengungen bedarf, diese aufzuklären.

Als Ursache einer verminderten Genexpression wurde anfangs ein Verlust der Heterozygosität, eine Hypermethylierung der SOCS-Promotorregion[138] sowie deren Kombination diskutiert.[89,124] Im Gegenzug kann eine experimentelle Überexpression die Aktivität von STATs reduzieren und so einer Zellproliferation durch Induktion der Apoptose entgegenwirken.[39,96,129,139] 2005 konnten Möller et al. erstmals Deletionen innerhalb des kodierenden Genbereichs als Ursache für eine gestörte Tumorsuppressorfunktion verantwortlich machen. So führte eine biallelische Mutation im *SOCS-1*-Gen der primär mediastinalen B-Zell-Lymphomlinien Med-B1 und Karpas1106 zu einer gesteigerten Aktivität und verminderten Degradation von Phospho-JAK2 und in der Folge auch von Phospho-STAT5. Dieser Zusammenhang bestätigte sich bei der Untersuchung von PMBL-Patienten in 9 von 20 Fällen (45 %).[79,80] Untersuchungen mikrodissektierter HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms wiesen ähnliche Veränderungen auf. Die Sequenzanalysen zeigten Veränderungen in 3 von 5 cHL-Zelllinien und 8 von 19 Patientenproben. Auch hier stand die kompromittierte Funktion von *SOCS-1* in Zusammenhang mit einer nukleären Phospho-STAT5-Akkumulation.[130] Dies unterstreicht den Funktionsverlust von *SOCS-1* als wichtigen Schritt in der malignen Transformation beider Lymphome.

Da ein Verlust von Tumorsuppressoren in der Regel mit aggressiverem Tumorwachstum einhergeht, liegt die Vermutung nahe, *SOCS-1* als potenziellen Biomarker zur Prädiktion von Tumorverläufen oder Therapieansprache zu verwenden. So ist eine hohe Expression von *SOCS-1* mRNA im Brustkrebs mit geringerem Tumorstadium und besserem klinischen Outcome assoziiert. Auch der Methylierungsstatus wird zur klinischen Charakterisierung einiger Malignome eingesetzt. Hypermethylierung von *SOCS-1* in Plasma-DNA ist ein guter diagnostischer Biomarker im Pankreaskarzinom und übertrifft etablierte Marker wie CA-19.9 oder CA-12.5 in Sensitivität (76 %) und Spezifität (59 %).[78,113] Auch eine Kombination aus Methylierungsstatus und anderen Markern wurde von vielen Studien angestrebt. Ein definitives Ergebnis konnte jedoch in keinem Fall erzielt werden.[94,109,133]

In dieser Arbeit untersuchten wir den *SOCS-1*-Mutationsstatus mikrodissektierter HRS-Zellen im cHL. In Vorarbeiten wird einem mutationsbedingten Funktionsausfall dieses Tumorsuppressors eine wichtige Rolle in der Onkogenese maligner Lymphome zugeschrieben. Die Kenntnis des *SOCS-1*-Status als Einzelgen-Biomarker könnte daher Bedeutung für Klinik und Prognose von Hodgkin-Patienten haben. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der klinischen und prognostischen Relevanz des *SOCS-1*-Mutationsstatus an einem unabhängigen Patientenkollektiv. Da die Mikrodissektion eine für die klinische Routinediagnostik zu zeit- und ressourcenintensive Untersuchung darstellt, bleibt zu zeigen, mit welcher Methode der Status eines solchen Einzelgen-Prognostikators erhoben werden könnte.

1.4 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

- Amplifikation von DNA und RNA aus mikrodissektierten HRS-Zellen und Sequenzierung mit anschließender Mutationsanalyse. Optimierung der Methodik, um bei möglichst geringer Zellzahl konstante Ergebnisqualität zu gewährleisten.

- Erstellen eines Wichtungsschemas für Mutationen innerhalb des *SOCS-1*-Gens. Hat eine zunehmende Trunkierung des Proteins Einfluss auf Prognose oder Rezidivwahrscheinlichkeit der Patienten?

- Lässt sich das Auftreten von Mutationen durch Polymorphismen oder aberrante somatische Hypermutation erklären?

- Haben *SOCS-1*-Mutationen im Hodgkin-Lymphom prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben oder die Rezidivwahrscheinlichkeit?

- Lässt sich durch epidemiologische, klinische oder immunhistochemische Parameter ein Phänotyp identifizieren, der mit dem *SOCS-1*-Mutationsstatus korreliert?

2 MATERIAL

2.1 Geräte und Software

2.1.1 Geräte

Gefrierschrank –20 °C	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank –80 °C	Heraeus, Hanau
Alpha Imager EP	Alpha Innotech, Santa Clara, USA
Analog Vortex Mixer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG,
Analysewaagen	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Melag, Berlin
Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Brutschrank Cytoperm	Heraeus, Osterode
Diverse Glasbehältnisse	Schott, Zwiesel
Eismaschine	Inco-Ziegra, Isernhagen
Elektrophorese-Systeme	VWR, Darmstadt
Gelkämme	VWR, Darmstadt
Gelträger	VWR, Darmstadt
Heizplatte	W. Pfennig El. med. Apparatebau, Kiel
iCykler Detektionssystem	BioRad Laboratories GmbH, München
Kryostat CM3050-S	Leica, Wetzlar
Kühlschrank	Liebherr, Biberach
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Osterode
Laminar-flow sterile grade class II, Typ A/B3	Labotect, Göttingen
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Kelheim
Mikropipetten 2,5, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Exiophot	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Millipore Anlage QUF plus	Millipore GmbH, Schwalbach
Neubauer improved Zählkammer	Brand, Wertheim
P.A.L.M Olympus IX 70	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
P.A.L.M Robot-MicroBeam	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
PCR-Thermocycler Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Reinraumwerkbank	Labotect, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR, Darmstadt
Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences Europe GmbH,
UV-Bank TFL 20C	Bios Corporations Germany, München
Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Software

Agilent 2100 Expert Software	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
ChromasPro	Technelysium Pty Ltd.
Endnote X5	Thomson Reuters
Prism 5	GraphPad Software, Inc.
Office professional plus 2012	Microsoft
Gel Image Software	AlphaEase 6.0.0.
Objektträger Foto Software	Diskus 4.0
PALM Software	Robot Microbeam 4.0
Primer Auswahl Software	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
NCBI/Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
GraphPad QuickCalcs	http://www.graphpad.com/quickcalcs/

2.2 Verbrauchsmaterial

Adhesive Cabs	Zeiss, Göttingen
RNA Pico Chips	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Agarose	Lonza, Rockland, ME USA
Einmalpipetten (1 ml)	VWR, Darmstadt
Falcons (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe Peha-soft	Hartmann, Heidenheim
Handschuhe Micro-Touch	Ansell, Staffordshire, United Kingdom
Objektträger Superfrost Color	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
PEN Membrane slides	Carl Zeiss Microimaging GmbH, München
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß Halter (diverse)	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße (Tubes) 0,5 und 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Reagenzien und Chemikalien

100 bp-Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aqua dest.	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

ddH_2O	Qiagen, Hilden
DNA Polymerisation Mix (20 mM, pH: 7,5)	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl (0,9 %)	VWR Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hämatoxylin	Fluka, München
Kresylviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamine	Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin 100 U/ml	Lonza, Basel, Schweiz
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNAsin	Promega, Mannheim
Trypanblau (0,4 %)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Tween 20 (0,6 mM)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAB	Dako Cytomation GmbH, Hamburg

2.4 Lösungen und Puffer

10x TAE Puffer (pH 8)

96,8 g Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
22,8 ml Essigsäure	Fluka, München
40 ml EDTA	Merck, Darmstadt
Auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen	aus Millipore-Anlage

PCR Ladepuffer (10x)

0,25 % Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
30 % Glycerol	Roth, Karlsruhe
Auf 100 % mit Aqua dest. auffüllen	aus Millipore-Anlage

PBS (pH 7,4) — Lonza, Verviers, Belgien

Chromogen-Alk. Phosphatase Substrat — Dako, Glostrup, Dänemark

Puffer (Endvolumen 1,01 ml)

- 900 µl AP-Substrat-Puffer
- 36 µl Chromogen RED 1
- 36 µl Chromogen RED 2
- 36 µl Chromogen RED 3

2.5 Antikörper, Enzyme, Oligonukleotid-Primer

2.5.1 Primärantikörper

Primär-AK	Verdünnung	Firma	Klonname	Ig-Typ
CD30	1 : 100	Dako, Glostrup, Dänemark	Ber-H2	IgG
CD15	1 : 300	Dako, Glostrup, Dänemark	MMA	IgG

2.5.2 Sekundärantikörper

Färbung	Herkunft	Firma	Substrat
ABC	anti-mouse anti-rabbit	Dako, Glostrup, Dänemark	Streptavidin – alk. Phosphatase + RED
Envision	anti-mouse anti-rabbit	Dako, Glostrup, Dänemark	DAB

2.5.3 Enzyme

KAPA 2G Robust DNA Polymerase	Peqlab Biotechnolgie GmbH, Erlangen
KAPA Blood PCR MixB	Peqlab Biotechnolgie GmbH, Erlangen
KAPA HiFi DNA Polymerase	Peqlab Biotechnolgie GmbH, Erlangen
peqGOLD HOT Start MixS	Peqlab Biotechnolgie GmbH, Erlangen
Proteinase K	Applied Biosystems, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen, Hilden
rRNAsin (40 U/µl)	Promega, Mannheim
SuperScript II RT (200 U/µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
Illustra Taq DNA Polymerase	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, United Kingdom

2.5.4 Oligonukleotid-Primer

Die Sequenzen des *SOCS-1*-Gens wurden aus der humanen Genbank des NCBI entlehnt (*SOCS-1*: Ensembl:ENSMUSG00000038037). Für die Ermittlung einer optimalen Primerbindungsstelle innerhalb der Gensequenz sowie der Annealing-Temperatur wurde die Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) verwendet. Die Primerpaare wurden in hochreiner, lyophilisierter Form von der Firma biomers.net GmbH Ulm bezogen. Alle Primer wurden mit ddH_2O auf eine Konzentration von 100 pmol/µm eingestellt.

Tabelle 3 Primerpaare zur Amplifikation von DNA DNA, Desoxyribonukleinsäure; bp, Basenpaar; A, Adenosin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin.

Name	5´-3´DNA-Sequenz	Produktlänge
BS *SOCS-1* a	CACCCCCGGACGCTATG	761 bp
BS *SOCS-1* b	CCACATGGTTCCAGGCAAGTA	
KH *SOCS-1* a	GGCTGGCCCCTTCTGTAG	698 bp
KH *SOCS-1* b	ACGGCATCCCAAGTTAATGCT	

Tabelle 4 Primer zur Amplifikation von cDNA cDNA, complementary Desoxyribonukleinsäure; bp, Basenpaar; A, Adenosin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin.

Name	5´-3´DNA-Sequenz	Produktlänge
Hexamer Primer	Variabel	Variabel
BS *SOCS-1* a	CACCCCCGGACGCTATG	761 bp
BS *SOCS-1* b	CCACATGGTTCCAGGCAAGTA	
KH *SOCS-1* a	GGCTGGCCCCTTCTGTAG	698 bp
KH *SOCS-1* b	ACGGCATCCCAAGTTAATGCT	

2.6 Reagenziensysteme (Kits)

Agilent RNA 6000 pico Kit — Agilent Technologies, Santa Clara, USA

25 RNA Pico Chips, 3 Electrode Cleaners,(blue) RNA 6000 Pico DyeConcentrate, (green) RNA 6000 Pico Marker (4 vials), (white) RNA 6000 Pico Conditioning Solution, (red) RNA 6000 Pico Gel Matrix (2 vials), (yellow) RNA 6000 Pico Ladder

(reorder number 5067-1535) (1 vial, 10x concentrate),4 Spin Filters, 30 Safe-Lock Eppendorf Tubes PCR clean (DNase/RNase free) for gel-dye mix

Taq DNA Polymerase PCR Kit — Qiagen, Hilden

250 units Taq DNA Polymerase, 10x PCR Buffer, 10x CoralLoad PCR Buffer, 5x Q-Solution, 25 mM MgCl2

QIAamp DNA Micro Kit — Qiagen, Hilden

QIAamp MinElute Columns 50, Collection Tubes (2 ml) 200, Buffer ATL 50 ml, Buffer AL 33 ml, Buffer AW1 (concentrate) 19 ml, Buffer AW2 (concentrate) 13 ml, Buffer AE 12 ml, Carrier RNA (red cap) 310 µg, Proteinase K 1,25 ml

peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit (200 Reinigungen) — Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

200 PerfectBind DNA Columns, 200 2 ml Collection Tubes, 120 ml Binding Buffer, 3x 20 ml CG Wash Buffer, 30 ml Elution Buffer (10 mM Tris-HCL, pH 9,0)

Pico Pure RNA Isolation Kit — Applied Biosystems, Darmstadt

Conditioning Buffer, Extraction Buffer, 70 % Ethanol, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Elution Buffer, RNA purification columns with collection tubes, Microcentrifuge tubes

Super Script II Reverse Transcriptase — Invitrogen GmbH, Karlsruhe

SuperScript™ II RT, 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl; 15 mM MgCl2), 0,1 M DTT

PicoPure DNA Extraction Kit — Applied Biosystems, Darmstadt

Proteinase K 10 x 0,5 ml Vials, Reconstitution Buffer 1 x 2,0 ml Vials

Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit — MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, Canada

Conditioning Buffer, Extraction Buffer, 70 % Ethanol, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Elution Buffer, RNA purification columns with collection tubes, Microcentrifuge tubes

2.7 Zellen und Kulturmedien

cHl-Zelllinien:	L-1236, L-428, U-HO1, L-540, HDLM-2
PMBL-Zelllinien:	Karpas 1106, Med-B1
NHL-Zelllinien:	RAJI, DAUDI, Karpas-707, Karpas-422, REH, NALM-6, DOHH-2, SUDHL-5, SUDHL-6, KM-H2, Ramos, HT-29, KS-61, NAMALWA, WSU-NHL, PFEIFFER, KI-1718, SSK-41, RIVA, RCA8

Mit Ausnahme von Med-B1 und U-HO1 wurden sämtliche Zelllinien von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) aus Braunschweig bezogen. Med-B1 und U-HO1 wurden vom Institut für Pathologie der Universität Ulm eigens etabliert[69,83] und mir für meine Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Alle Zellen wurden in folgendem Medium kultiviert: Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium (IMDM) und RPMI 1640 im Verhältnis 4 : 1; angereichert mit Glutamin (2 mM). 8 % fötales Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

2.8 Patientenkollektiv

Die humanen Lymphombiopsate wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und Rechtsmedizin der Universität Ulm entnommen. Das Gewebe wurde gemäß den deutschen Richtlinien für die Verwendung von menschlichen Körpermaterialien für Zwecke der medizinischen Forschung (Bundesärztekammer 2003, Deutsches Ärzteblatt 2003, 100 A1632) gehandhabt. Diese Studie wurde von der hiesigen Ethikkommission genehmigt. Es wurden dazu 84 Biopsate von 46 weiblichen und 38 männlichen Patienten untersucht. Das mittlere Alter lag bei 31,19 (8,79–76,04) Jahren. Die Subtypisierung wurde vom Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie der Universität Ulm anhand der aktuellen WHO-Klassifikation[15,73] vorgenommen. Die Verteilung der einzelnen Subtypen ergab sich dabei wie folgt: 54 Fälle nodulär-sklerosierender Typ, 2 lymphocyte depletion, 10 mixed cellularity, 15 lymphocyte rich. In 3 Fällen war der Subtyp nicht näher klassifizierbar.

Als Ausgangsmaterial wurde ausschließlich bei –80 °C gelagertes Material aus Lymphknotenbiopsien verwendet; alle Patienten wurden in CREDOS erfasst (CCCU, Ulm).

3 METHODEN

3.1 Präparation von PEN-Membranslides

Die Laser Capture Microdissection (LCM) erfordert für die Isolation einzelner Gewebeareale spezielle Objektträger. Die Firma Leica Microsystems bietet, je nach Verwendungszweck, verschiedene Arten sogenannter Membranslides an, die sich in Aufbau und Membranzusammensetzung unterscheiden:

PEN (Polyethylenenaphthalate)	a. e. für Mikrodissektion
PET (Polyethyleneterephthalate)	a. e. für Fluoreszenzmikroskopie
POL (Polyester)	a. e. für Mikromanipulation

Für die Isolation von Einzelzellen aus Gewebeschnitten besitzen die PEN-Membranslides die günstigsten Eigenschaften. Ihre Membran besteht aus UVA-absorbierendem Polyethylennaphtalat. Bei Lasereinwirkung wird die Membran zusammen mit dem auf ihr haftenden Gewebe vaporisiert. Auf diese Weise umschnittene Gewebeareale können durch einen Laserimpuls mitsamt der Membran in den Deckel eines Reaktionsgefäßes hochkatapultiert werden (vgl. Abbildung 7).

Für die Präparation von Gewebeschnitten wurden die PEN-Membranslides zunächst 30 Min. unter einer UV-Lampe ($\lambda = 302$ nm) sterilisiert, um den Gehalt von DNasen und RNasen auf der Membran auf ein Minimum zu reduzieren. Die Objektträger wurden im Folgenden auf 37 °C erhitzt, um ein besseres Antauen der Gefrierschnitte auf der Membran zu gewährleisten. Unmittelbar nach dem Aufbringen des ca. 10 µm dicken Gewebeschnittes auf die Membran erfolgte eine 2-minütige Fixation des Gewebes mit 75 % Ethanol, das auf –20 °C gekühlt war. Für die im Anschluss folgenden Färbungen siehe 3.2.

3.2 Färbungen von Gefrierschnitten

Die Identifikation der HRS-Zellen innerhalb eines Lymphfollikels erfordert das Anfärben der Gewebeareale. Zu diesem Zweck eignen sich besonders die Hämatoxylin-Eosin- (HE-) und die Kresylviolett-Färbung. Eine immunhistochemische Färbung ist ebenfalls möglich.

Um sowohl Kontaminationen der Proben untereinander als auch das Abschwemmen des Gewebeschnittes von der Membran zu vermeiden, wurden die Objektträger nicht in die Färbelösungen getaucht, sondern die Reagenzien wurden mit einer Pipette einzeln auf die Gewebeareale aufgebracht. Als Wasser wurde Aqua dest. verwendet. Nach der Färbung wurden alle Objektträger zur kontaminationsfreien Lagerung in Falcons verschlossen. Im Folgenden wird der Ablauf der jeweiligen Verfahren beschrieben.

Hämatoxylin-Eosin ist eine Übersichtsfärbung. Das Hämatoxylin färbt dabei die basophilen Strukturen wie Kerne und Nukleoli blau an. Eosin ist ein Farbstoff, der alle azidophilen Strukturen wie z. B. Proteine des Zytoplasmas rot anfärbt. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Nach 2-minütiger Alkoholfixierung mit –20 °C kaltem 75 % Ethanol wurde der Objektträger gründlich mit Aqua dest. abgespült. Anschließend 3-minütige Färbung mit Mayers Hämatoxylin-Lösung. Abspülen der Färbelösung mit Wasser. 3-minütiger Bläuungsvorgang mit Wasser. Färbung mit Eosin für 15 Sek. Abspülen mit Wasser. Kurze Exposition des Gewebes (20 Sek.) mit Ethanol in aufsteigender Konzentration (75 %, 95 %, 100 %). Objektträger lufttrocknen.

Kresylviolett bindet an basophilen Substanzen wie DNA, RNA oder Ribosomen und färbt diese violett/blau an. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Nach 2-minütiger Alkoholfixierung mit –20 °C kaltem 75 % Ethanol wurde der Gefrierschnitt für 30 Sek. mit Kresylviolett inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde abgekippt. Kurze Exposition des Gewebes (20 Sek.) mit Ethanol in aufsteigender Konzentration (75 %, 95 %, 100 %). Objektträger lufttrocknen.

Immunhistochemische Färbungen: Die Immunhistochemie ermöglicht die Detektion von Zellen mit definierten Oberflächenepitopen in Kryostatschnitten. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein erster, unkonjugierter Antikörper das Epitop eines Zelloberflächenproteins. Ein enzymgekoppelter Zweitantikörper wird gegen den ersten auf das Gewebe aufgetragen. Abschließend wird ein Substrat beigefügt, das mit dem Enzym des Zweitantikörpers reagiert. Dadurch wird das Substrat an Stellen der Antikörperbindung in einen sichtbaren Niederschlag umgewandelt. Die immunhistologische Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Envision-Methode: 2-minütige Alkoholfixierung mit –20 °C kaltem 100 % Ethanol, danach Lufttrocknung der Schnitte für 5 Min. Auftragen des Erstantikörpers (CD30/CD15). 30 Min. Inkubationszeit. Abspülen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Auftragen des Zweitantikörpers (Envision). 30 Min. Inkubationszeit. Abspülen mit PBS. Auftragen von 3,3´-Diaminobenzidin (DAB) und 10 Min. inkubieren. Überschüssigen Niederschlag mit Wasser abspülen. 3-minütige Gegenfärbungen mit Hämatoxylin. Hämatoxylin mit Wasser abspülen und 3 Min. in Aqua dest. bläuen.

ABC-Methode: Der Ablauf entspricht weitgehend dem der Envision-Methode (s. o.). Unterschiede bestehen darin, dass der Sekundärantikörper Biotin markiert ist. In der Folge wird Streptavidin (gekoppelt an alk. Phosphatase) zugegeben, ein Protein, das Biotin mit sehr hoher Affinität binden kann. Als letzter Schritt erfolgt die Zugabe von RED, einem Chromogen, das die alk. Phosphatase in einen roten Niederschlag umwandeln kann. Dieser entsteht folglich nur dort, wo Sekundärantikörper gebunden haben. Die immunhistologische Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: 2-minütige Alkoholfixierung mit –20 °C kaltem 100 % Ethanol. Lufttrocknung der Schnitte für 5 Min. Auftragen des Erstantikörpers (CD30/CD15). 30 Min. Inkubationszeit. Abspülen PBS. Auftragen des biotinmarkierten Zweitantikörpers. 30 Min. Inkubationszeit. Abspülen mit PBS. Auftragen von Streptavidin (1 : 2.000) und erneut 30 Min. inkubieren. Mit PBS abspülen. RED auftragen und 15 Min. bei Raumtemperatur einwirken lassen. 3-minütige Gegenfärbungen mit Hämatoxylin. Hämatoxylin mit Wasser abspülen und 3 Min. in Aqua dest. bläuen.

3.3 Lasermikrodissektion

Die Mikromanipulation von neoplastischen Einzelzellen dient deren Anreicherung aus dem Zellinfiltrat eines Gewebeabschnittes. Die HRS-Zellen können anhand ihrer charakteristischen Morphologie und Färbeeigenschaften unter mikroskopischer Sicht identifiziert und sicher vom umliegenden Gewebe separiert werden. Für diesen Vorgang wurde das PALM Robot MicroBeam System der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH eingesetzt.

Bei der Mikrodissektion wird Laserlicht durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apparatur geleitet und fokussiert. Dabei wird eine Bearbeitungsgenauigkeit von 1–2 µm er-

reicht. Die Einwirkdauer der Energie beträgt lediglich ca. 1 ns, sodass die Probe in dieser kurzen Zeit keine Wärme aufnehmen kann. Umliegendes Gewebe wird daher nicht geschädigt. Für den Katapultierungsvorgang wird der Fokus etwas vergrößert, sodass die Laserenergie auf ein größeres Gewebeareal trifft. Der Energieimpuls bewirkt das Abheben des umschnittenen Areals, sodass es entgegen der Schwerkraft in einen darüber befindlichen Deckel eines Reaktionsgefäßes katapultiert werden kann. Das Areal bleibt an dessen beschichteter Oberfläche haften (vgl. Abbildung 7). Dazu erwiesen sich Caps mit selbstklebender Deckeloberfläche, sog. Adhesive Caps, als besonders geeignet. Der gesamte Vorgang läuft berührungsfrei und entgegen der Schwerkraft ab, wodurch Kontaminationen weitgehend vermieden werden können.

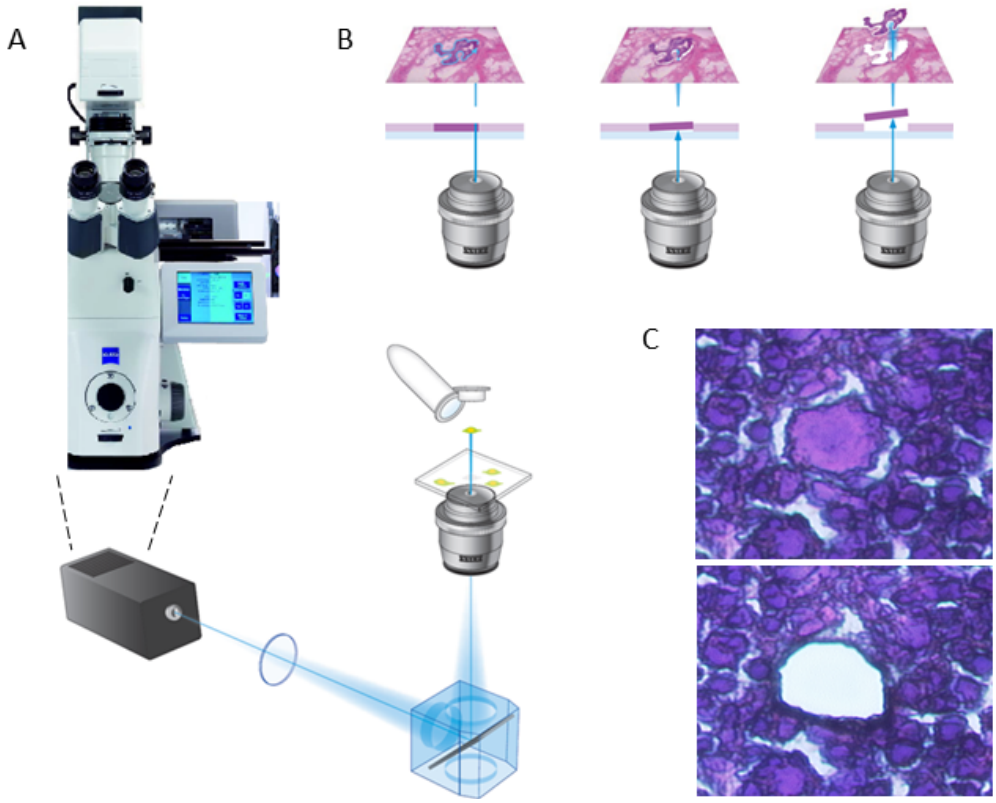


Abbildung 7 Prinzip der Laser Capture Mikrodissektion beim PALM MicroBeam System A: Im Objektiv des Mikroskops synergiert das Laserlicht mit dem optischen Licht. Dies ermöglicht die Nutzung von Laserlicht unter optischer Kontrolle. **B:** Der Laserstrahl umschneidet ein Gewebeareal und katapultiert es anschließend gegen die Schwerkraft in den Deckel eines Reaktionsgefäßes. **C:** Mikroskopische Sicht auf eine HRS-Zelle vor und nach der Mikromanipulation. (Fotos A und B – Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland)

Für die verschiedenen Arbeitstechniken wurden die Parameter wie folgt gewählt:

	Schneiden	**Katapultieren**
Power:	43 mW	70 mW
Fokus:	85	80
Dauer:	1–2 ns	1–2 ns
Puls:	30/Sek.	30/Sek.

Auf diese Weise wurden aus den betreffenden Schnitten 60–100 Zellen angereichert und einem anschließenden Verdau durch Proteinase K zugeführt.

3.4 DNA-Extraktion aus Zellkultur

Die Zellen wurden aus der Zellkultur entnommen und deren Konzentration mit einer Neubauer improved-Zählkammer bestimmt. Zur Differenzierung zwischen toten und vitalen Zellen verdünnt man die Zellsuspension mit Trypanblau. Nach 30-minütiger Inkubation färben sich tote Zellen blau an, wohingegen die lebenden ungefärbt bleiben.

Zur Bestimmung der Zellanzahl wurden 4 Gruppenquadrate der Zählkammer ausgewertet, wobei jedes aus 4 x 4 Einzelfeldern besteht. Ein Gruppenquadrat besitzt eine Kantenlänge von 1 mm und ergibt zusammen mit dem 0,1 mm darüber befindlichen Deckglas eine Volumeneinheit von 0,1 mm^3. Multipliziert mit 10^4 und einem Verdünnungsfaktor, ergibt sich daraus die Zellzahl in einem Milliliter:

Zellzahl/ml = Zellen pro Gruppenquadrat x 10^4 x Verdünnungsfaktor

Für die Weiterverarbeitung wurden ca. 10^5 Zellen in entsprechendem Volumen entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die im Reaktionsgefäß befindlichen Zellen wurden 3 Min. bei 1.500 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml PBS-Puffer gründlich resuspendiert und wieder für 3 Min. bei 1.500 rpm zentrifugiert. Nun wurden 100 µl 1x PCR-Puffer sowie 0,5 µl Tween (0,05 %) und 1 µl Proteinase K (20 µg/µl) hinzugegeben. Der gesamte Ansatz wurde für 1 Std. bei

65 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Denaturierung der Proteinase K bei 95 °C. Das Zelllysat wurde für 2 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet verworfen. Die Konzentration der in Lösung befindlichen DNA konnte nun fotometrisch bestimmt werden. In einer PCR-Reaktion wurden jeweils 100 ng DNA eingesetzt.

3.5 DNA-Extraktion mikrodissektierter Zellen

Die Isolation von DNA/RNA aus mikrodissektierten Zellen stellt aufgrund einer geringen Menge an Ausgangsmaterial und der Gewebekompromittierung durch Fixation und Färbung eine große Herausforderung dar. Hier hat sich gezeigt, dass für die Weiterverarbeitung eine Aufreinigung der DNA vorteilhaft ist. Dazu wurde der QIAamp DNA Micro Kit verwendet. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt; auch die Temperaturen von AE-Puffer und destilliertem Wasser wurden auf Raumtemperatur angeglichen.

Zu den mikrodissektierten Zellen im Deckelboden eines Adhesive Caps wurden 15 µl ATL-Puffer sowie 10 µl QIAamp Proteinase K zugegeben. Für den Zellverdau wurden die Reaktionsgefäße mind. 3 Std. bei 56 °C in einer Brutkammer inkubiert. Während dieses Vorgangs wurden die Reaktionsgefäße von Zeit zu Zeit leicht geschüttelt, um ein Abheben der Zellen von der Deckeloberfläche zu bewirken und die Effizienz des Verdaus zu steigern. Nach dem Verdau wurden 25 µl ATL und 50 µl AL-Puffer hinzugefügt. Der AL-Puffer enthält geringe Mengen einer Carrier-RNA, die entsprechend den Angaben des Herstellers zuvor in AE-Puffer gelöst wurde, sodass eine Konzentration von 1 µg RNA pro 1 µl AE-Puffer erreicht wurde. In 50 µl AL-Puffer wurden 1 µl gelöste Carrier-RNA eingesetzt. Die Puffer wurden nun zusammen mit dem verdauten Gewebe für 15 Sek. vermischt. Der nachfolgende Waschvorgang wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Elution der DNA von der Membran der QIAamp MinElute Säule wurden 20 µl dH_2O auf die Mitte der Membran pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Säule mit 14.000 rpm 1 Min. lang zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt ca. 15–20 µl gelöste DNA, die als Ausgangsmaterial in einer PCR-Reaktion eingesetzt wurden.

3.6 RNA-Extraktion und RT-PCR

RNA-Extraktion: Für die Isolation von RNA wurden die 5 bekannten Hodgkin-Zelllinien oder mikrodissektierte Zellen verwendet. Dies geschah mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Dazu wurde die aus der Zellkultur entnommene Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß für 3 Min. in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf das Zellpellet abgesaugt und verworfen und die Probe unmittelbar auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde die Probe mit 350 µl RLT-Puffer (1000 µl RLT-Basispuffer + 10 µl β-Mercaptoethanol) versetzt und durch mehrmaliges Auf-und Abziehen mittels Einwegpipetten homogenisiert. Der RLT-Puffer bedingt eine Lyse der Zellmembran. β-Mercaptoethanol bedingt die Inhibition unerwünschter RNasen. Das komplette Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule überführt und 2 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zellfragmente bleiben so an der Säule haften, wohingegen DNA/RNA der Durchfluss ermöglicht wird. Die Säule wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde die Suspension zur Fällung der RNA im Verhältnis von 1 : 1 mit 70 % Ethanol versetzt und vermischt. Der gesamte Inhalt wurde nun auf eine RNeasy-Säule überführt und 30 Sek. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die übrigen Waschschritte wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem ddH_2O. Nach der fotometrischen Konzentrationsbestimmung (Ultrospec 2100) (vgl. 3.8) wurde die RNA bei –80 °C gelagert oder im Anschluss umgehend einer Reversen Transkription (RT) zugeführt (s. u.).

Reverse Transkription: Die Reverse Transkription (RT) dient der Herstellung einer komplementären DNA (cDNA) aus einer RNA-Matrize. Spezifische cDNAs können in einer anschließenden Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden. Aufgrund omnipräsenter RNasen ist im Umgang mit RNA auf besondere Sauberkeit zu achten. Die Lagerung erfolgt bei –80 °C und eine Weiterverarbeitung sollte nur auf Eis gekühlt stattfinden.

Die Isolation der RNA erfolgt mittels PicoPure RNA Isolation Kit. Die RNA wurde zu Beginn 10 Min. bei 75 °C erhitzt und anschließend auf 12 °C abgekühlt, um evtl. vorhandene Sekundärstrukturen zu denaturieren. Für die Umwandlung zur cDNA wurden zunächst

von der aus einer Zellkultur isolierten RNA 2 µg/µl mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Der RNA wurden 1 µl 5x RT Puffer, 1 µl Hexamer Primer sowie 8 µl Mastermix (MM) zugefügt, sodass das gesamte Reaktionsvolumen 20 µl betrug. Der MM beinhaltete folgende Komponentenkonzentrationen:

4 µl	5x RT-Puffer
2 µl	Dithiotreitol (DTT) (0,1 M)
1 µl	RNaseOut (40 U/µl)
1 µl	SuperScript II RT (200 U/ml)
8 µl	

Die Produktvolumina der Einzelkomponenten im MM wurden je nach Probenanzahl multipliziert. Die RT-Reaktion wurde mit folgenden Temperaturschritten durchgeführt:

10 Min. bei 25 °C	Primer-Annealing
50 Min. bei 42 °C	RT-Arbeitstemperatur
15 Min. bei 70 °C	RT-Inaktivierung

Die entstandene cDNA wurde als Matrize zur Amplifikation einer Polymerase-Kettenreaktion zugeführt.

Mikrodissektierte Zellen: Die RNA-Isolation und RT-Reaktion bei mikrodissektierten Zellen stimmt weitgehend mit dem oben beschriebenen Ablauf für Zellen aus der Zellkultur überein; aufgrund der geringen RNA-Menge waren jedoch einige Abwandlungen des Protokolls nötig:

Die Elution der RNA bei der Extraktion erfolgte mit 12 µl anstelle von 30 µl RNase-freiem Wasser. Dadurch konnte eine stärkere Konzentration der RNA im Durchfluss erreicht werden. Von den 12 µl wurden 2 µl für eine Qualitätskontrolle im Agilent 2100 Bioanalyzer verwendet (vgl. 3.8). Die verbliebenen 10 µl wurden gänzlich als Template bei der RT-Reaktion eingesetzt.

3.7 Fotometrische Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Für die spektralfotometrische Bestimmung der extrahierten DNA/RNA aus Zellkulturmaterial wurde ein Ultrospec 2100 pro Fotometer verwendet. Vor jeder Messungsreihe wurde das Fotometer bei einer Messung gegen destilliertes Wasser auf einen Leerwert geeicht. Für die Messungen wurden die Parameter am Gerät wie folgt gewählt:

single cell mode
nucleic acids
RNA/DNA
pathlength 10
units (µg/µl)
dilution factor 10
320 nm correction

Die Konzentrationsmessung erfolgt durch die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm. Beträgt die optische Dichte = 1, entspricht dies bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl und einer DNA-Konzentration von 50 µg/µl. Über den Reinheitsgrad der Lösungen gibt das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (die sog. Ratio) Aufschluss. Es sollte hierbei ein Wert um 1,7 erreicht werden, wobei 2,0 charakteristisch für reine DNA/RNA ist. Bei den verwendeten Proben wurde eine Ratio von 1,8 nicht unterschritten.

3.8 RNA-Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer

Aufgrund der Instabilität sowie des ubiquitären Vorkommens von RNasen wurden Qualität und Konzentration der RNA aus mikrodissektierten Zellen mittels Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft.

Die Qualitätskontrolle erfolgt nach dem Prinzip einer Kapillarelektrophorese. Dabei werden die einzelnen Proben in einen Trennkanal eingespritzt und dort elektrophoretisch separiert. Durch einen eingelagerten Fluoreszenzfarbstoff können die Fragmente detektiert und in gelartige Bilder oder Elektropherogramme übersetzt werden. Als Marker für intakte RNA wurden die Peaks der ribosomalen RNA herangezogen. Diese entsprechen den 18S und 28S ribosomalen Untereinheiten (vgl. Abbildung 8). Die Erstellung einer standardisierten RNA-Integritätsnummer (RIN) war aufgrund des geringen RNA-Gesamtgehaltes nicht möglich. Die benötige RNA-Mindestmenge in diesem System beträgt 50 pg,

dieser Wert konnte nicht in allen Fällen erreicht werden. Zur Analyse wurden 1 µl isolierte RNA eingesetzt. Der Ablauf wurde gemäß den Anweisungen im Agilent RNA 6000 Pico Kit Quick Start Guide durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde besonderer Wert auf sauberes Arbeiten sowie die Verwendung von RNase-freien Reagenzien und Chips gelegt.

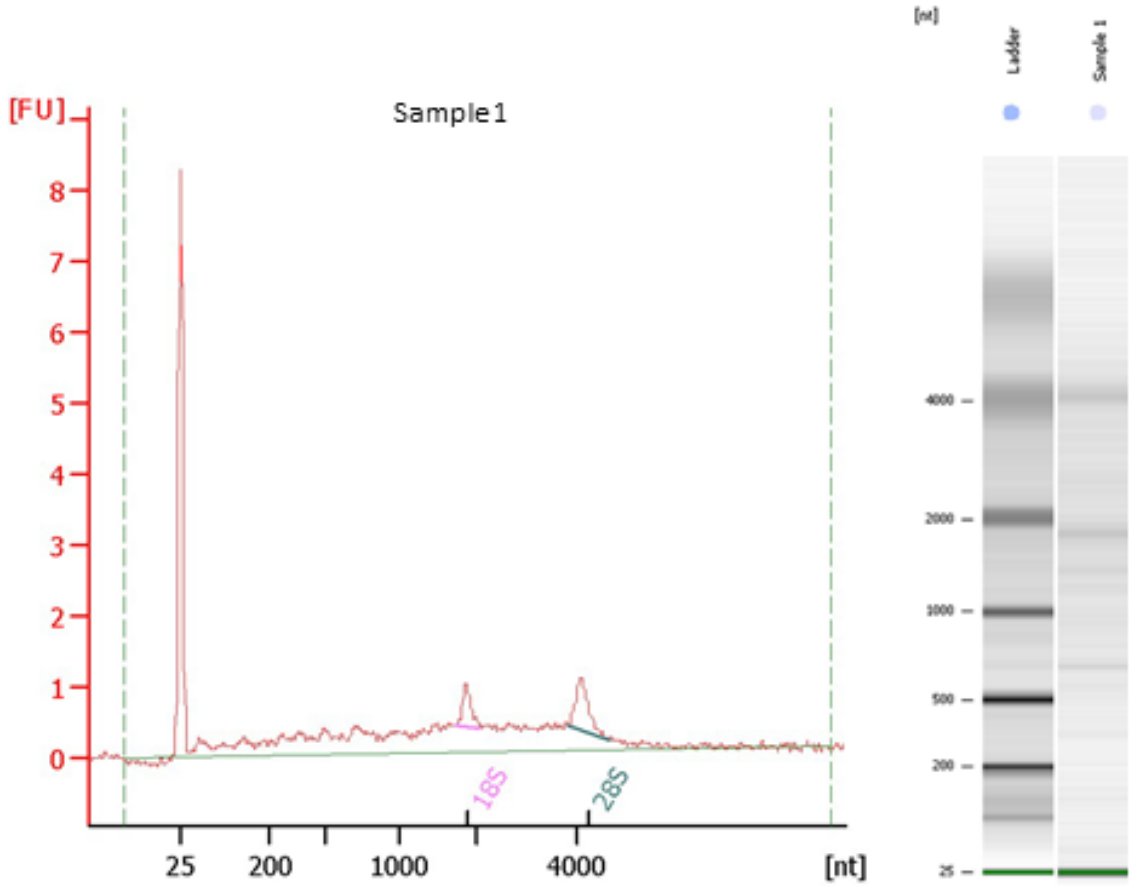


Abbildung 8 RNA-Analyse aus 70 mikrodissektierten Zellen Im Elektropherogramm sind 3 Peaks erkennbar. Der höchste bei ca. 25 nt entspricht einer Positivkontrolle durch eine hinzugegebene Test-RNA. Die hinteren beiden Peaks entsprechen den ribosomalen RNA-Fragmenten der Probe: 18S- und 28S-RNA mit einer Größe von jeweils 1874 bzw. 4718 nt. Rechts ist das Elektropherogramm der Probe neben einer Basenleiter als Gelbild dargestellt. Auch hier sind die ribosomalen Banden als Peaks bei ca. 2000 bzw. 4000 nt erkennbar. **Abkürzungen:** FU, Fluoreszenz; nt, Nukleotid.

3.9 Polymerase-Kettenreaktion

PCR: Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, welche gegenläufig an komplementäre DNA-Abschnitte binden. Diese werden in lyophilisiertem Zustand geliefert und mit ddH_2O zu einer 100-µM-Stammlösung resuspendiert. In einem PCR-Zyklus erfolgt zunächst eine Hitzedenaturierung, um den komplementären DNA-Doppelstrang aufzutren-

nen. Der Reaktionsansatz wird auf die sog. Annealing-Temperatur abgekühlt, bei der die Primerpaare an ihre korrespondierenden DNA-Abschnitte binden können. Nach Zugabe von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) können die Primer von einer thermostabilen DNA-Polymerase verlängert werden. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet. Eine Anhebung der Temperatur auf initiale 95 °C unterbricht den Synthesevorgang und separiert die DNA-Stränge erneut. Diese Temperaturänderung stellt gleichzeitig wieder den ersten Schritt im nächsten Zyklus dar.

Semi-nested bzw. nested-PCR: Bei einer nested-PCR (verschachtelte PCR) wird ein Aliquot einer vorangehenden Amplifikation als Matrize für eine erneute PCR eingesetzt. Die Bindungsstelle eines neuen Primerpaares befindet sich dabei innerhalb dieser Matrize. Dies erhöht die Sensitivität und Spezifität des Vorgangs enorm, da alle unspezifischen Produkte der ersten Amplifikation unberücksichtigt bleiben, denn sie stellen keine komplementäre Sequenz für das innere Primerpaar mehr dar. Sie stehen dann bei einer erneuten Amplifikation nicht mehr als Matrize zur Verfügung. Bei der semi-nested-PCR rückt nur ein – und nicht beide Primer – innerhalb der Matrize ein.

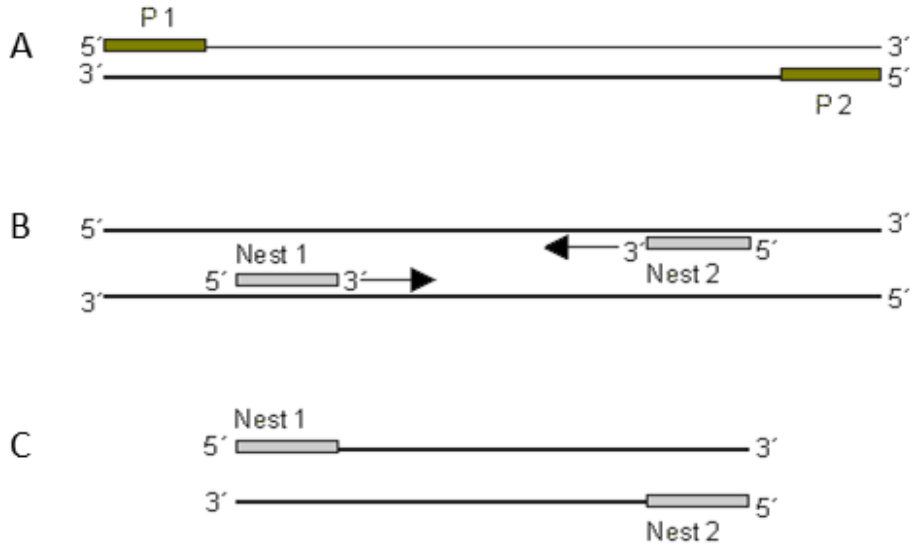


Abbildung 9 Darstellungsprinzip einer nested-PCR A: Das Produkt des ersten Amplifikationszyklus wird als Vorlage für eine erneute PCR eingesetzt. P1 und P2 entsprechen den komplementären Primersequenzen im ersten Zyklus. **B:** Das Produkt des ersten Zyklus dient als Matrize für den zweiten. Ein neues Primerpaar (Nest 1 und Nest 2) bindet innerhalb dieser Matrize und eine zweite Amplifikation kann durchgeführt werden. **C:** Das Produkt des zweiten, spezifischeren Zyklus ist, entsprechend den Primerbindungsstellen, kürzer.

Durchführung einer PCR: Alle Schritte des Vorgangs wurden unter einer Sterilbank auf Eis gekühlt durchgeführt. Der Gesamtansatz pro Probe beträgt (wenn nicht anders angegeben) 50 µl. Zuerst wird ein Mastermix (MM) vorbereitet, der Q-Solution, 10x Puffer, Taq-Polymerase, dNTPs, Primer und H_2O in folgenden Konzentrationen enthält:

5 µl	Q-Solution
5 µl	10x Puffer
0,5 µl	Taq-Polymerase
0,5 µl	dNTPs
0,5 µl	Primer
37,5 µl	ddH_2O
49 µl	

Die Gesamtmenge des MM wird an die Probenanzahl angepasst. Pro Probe werden 49 µl des MM auf 1 µl (entspricht 100 ng) Matrizenmaterial pipettiert. Der Ansatz wird vermischt und kurz herunterzentrifugiert. Im Anschluss werden die Reaktionsgefäße in eine vorgeheizte PCR-Maschine gegeben. Das Programm kann nun gestartet werden. Es enthält folgende Schritte:

	Deckelheizung	110 °C	
	Denaturierung	95 °C	5 Min.
2x	Denaturierung	95 °C	35 Sek.
	Annealing	62 °C	35 Sek.
	Elongation	72 °C	1 Min.
2x	Denaturierung	95 °C	35 Sek.
	Annealing	60 °C	35 Sek.
	Elongation	72 °C	1 Min.
2x	Denaturierung	95 °C	35 Sek.
	Annealing	58 °C	35 Sek.
	Elongation	72 °C	1 Min.
35x	Denaturierung	95 °C	35 Sek.
	Annealing	56 °C	35 Sek.
	Elongation	72 °C	1 Min.
	Elongation	72 °C	10 Min.
	Deckelheizung	aus	
	Warten	4 °C	∞

Die Annealing-Temperatur wird in den ersten 3 Abschnitten des Protokolls um je 2 °C gesenkt, um eine noch spezifischere Amplifikation zu erreichen. Je niedriger die Temperatur wird, desto spezifischer können die Primer nur noch exakt an ihre komplementäre Basensequenz binden. Bei jedem PCR-Durchlauf wurde auch eine Positiv- sowie Negativkontrolle als Template aufgebracht. Als Positivkontrolle wurde zuvor getestete, aus Zelllinien extrahierte DNA/cDNA verwendet, bei der Negativkontrolle ddH_2O.

3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese ist eine größenspezifische Auftrennung negativ geladener DNA-Fragmente in einer Gelmatrix. Im elektrischen Feld bewegen sich die Moleküle zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller durch die Gelzwischenräume wandern können als große. Die exakte Fragmentgröße wird anhand einer Skala bestimmt. Dazu wird eine sog. DNA-Leiter in eine Geltasche eingebracht, die sich aus DNA-Fragmenten definierter Größe zusammensetzt (Längen von 100–2000 bp). Mit diesem Standard werden die jeweiligen Proben verglichen.

Für eine 2%ige Gelmatrix werden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst. Dies geschieht durch Erhitzen in einer Mikrowelle (2 Min. bei 900 W). Im Anschluss wird das Gewicht des verdampften Wassers mit Aqua dest. aufgefüllt und das nun flüssige Gel mit einigen Tropfen Ethidiumbromid (50 mg/ml) versetzt. Nach dem Ausgießen in einen Gelträger kühlt die Flüssigkeit bis zur vollständigen Polymerisierung ab. Jede PCR-Probe wurde zusammen mit 2 µl 10x Ladepuffer in eine Geltasche pipettiert. An erster Stelle wurde die DNA-Leiter eingebracht. Zwischen den Proben wurde eine Kammer frei gelassen, um eine irrtümliche Verteilung der Proben in benachbarte Kammern zu verhindern. Nach ca. 90 Min. bei 120 V können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter einer UV-Bank beurteilt werden.

3.11 Gelextraktion und Sequenzierung

Um die amplifizierten DNA-Fragmente einer Sequenzierungsreaktion zuführen zu können, müssen diese zunächst aus dem Gel isoliert werden. Dazu wurden zunächst die DNA-Fragmente im Gel identifiziert. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert beim Auftrennungsvorgang zwischen die Basen der DNA. Dabei ändert sich dessen Absorptionsspektrum. Die Fluoreszenz der Substanz steigt nach Anregung mit ultraviolettem Licht (302 nm) um den Faktor 50–100. Im Gel leuchten unter der UV-Bank nun die Stellen, an denen sich DNA-Fragmente befinden. Zur Darstellung und Dokumentation der Gele wurde die AlphaEase 6.0.0. Software verwendet. Die Expositionszeit der DNA wurde aufgrund einer möglichen Alteration im UV-Licht so gering wie möglich gehalten.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell eng aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mittels peqGOLD MicroSpin Gel Extraction Kit der Firma Peqlab. Dazu wurden die ausgeschnittenen Banden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 Min. mit 500 µl GP-Puffer versetzt. Die Proben wurden dabei unter ständiger Bewegung auf 62 °C erhitzt. Anschließend wurden 250 µl CP Puffer hinzugefügt und vermischt. Das Material wurde nun zur DNA-Bindung auf eine im Kit enthaltene Säule gegeben und 1 Min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die nun folgenden Waschschritte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Elution wurden 20 µl Elutionspuffer auf die Membran der Säule aufgetragen, für 1 Min. inkubiert und im Anschluss 1 Min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss mit der DNA wurde auf jeweils 2 Reaktionsgefäße zu je 10 µl aufgeteilt. Als Sequenzierungsprimer wurden die Primer der vorangegangenen PCR-Reaktion verwendet, wobei in ein Reaktionsgefäß 4 µl des Vorwärtsprimers und in das andere 4 µl des Rückwärtsprimers hinzugegeben wurden. Die Konzentration der Primer in diesem Schritt betrug 5 pmol/µl. Die nun mit Primern versetzten Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma Agowa Ulm verschickt. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit der ChromasPro Software, Technelysium Pty Ltd., vorgenommen.

3.12 Statistik

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen quantitativen Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel ausgewertet. In der statistischen Analyse wurde für Werte mit dichotomem Verteilungsmuster der Fisher‘s exact test oder der χ^2-Test verwendet. Beim Vergleich der Mittelwerte zwischen den verschiedenen Mutationsgruppen wurde der Student‘s t-Test angewendet. Zur Berechnung dieser statistischen Tests wurde die Rechenoberfläche von GraphPad QuickCalcs (http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm) verwendet. Die Kaplan-Meier-Methode wurde benutzt, um Gesamtüberleben (Zeitpunkt der Diagnose bis zum Tod oder lost to follow-up) sowie Rezidivwahrscheinlichkeit zu veranschaulichen. Dabei wurden die einzelnen Patientenkohorten mittels Log-Rank-Methode verglichen. Für diese Analyse wurde die Software GraphPad Prism 5.03 verwendet.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,1$ wurde bei Werten eine Tendenz prädiziert. Ab einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde von signifikant, bei $p < 0,01$ von hochsignifikant gesprochen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Patientenkollektiv

Das bei den Mutationsanalysen verwendete Lymphomkollektiv umfasste 84 Patienten. In Einzelfällen standen die Daten bestimmter Parameter nicht für alle Patienten vollständig zur Verfügung. Daher beziehen sich im Folgenden nicht alle Zahlenangaben auf die gesamte Patientenzahl (n = 84), sondern auf die Fallzahl mit für den jeweiligen Parameter vorhandenen Daten.

4.1.1 Epidemiologische Parameter

Die Geschlechtsverteilung im Gesamtkollektiv gliedert sich in 38 Männer und 46 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 31,19 Jahre (Altersspanne von 8,79–76,04). Die Patienten wurden in 3 Altersklassen aufgeteilt: Alter ≤25, 37 Patienten; Alter 26–49, 36 Patienten und Alter ≥50, 11 Patienten.

4.1.2 Morphologische Diagnose

Die Verteilung der unterschiedlichen Subtypen des klassischen Morbus Hodgkin gestaltete sich wie folgt: 54 Patienten mit nodulär-sklerosierendem Typ, 15 Patienten mit lymphozytenreichem Typ, 2 Patienten mit lymphoztyenarmem Typ, 10 Patienten mit gemischtzellulärem Typ, 3 Patienten mit nicht näher klassifiziertem Typ.

4.1.3 Klinische Parameter

Im Folgenden wird die Verteilung klinischer Parameter im Kollektiv beschrieben. Stadien-Aufteilung: Stage I: 4/(84) Patienten; Stage II: 42/(84) Patienten; Stage III: 21/(84) Patienten; Stage IV: 17/(84) Patienten. Als Risikofaktoren der Erkrankung konnte für 55/(84)

Patienten ein Befall von mehr als 3 LK-Arealen gezeigt werden. 12/(84) Patienten waren älter als 45 und bei 42/(82) trat eine B-Symptomatik auf. Ein großer med. Tumor wurde bei 28/(82) Patienten festgestellt. In 76,2 % fand man keine extranodalen Manifestationen der Erkrankung. Für 15,5 % konnte jedoch eine, in 8,3 % sogar zwei oder mehr extranodale Manifestationen nachgewiesen werden. Bei den lymphatischen Organen konnte ein Befall der Milz bei 8/(84) Patienten festgestellt werden. Das Mediastinum war in 61/(84) Fällen betroffen. Inguinalen LK Befall hatten 4/(84) Patienten.

4.1.4 Laborparameter

Der Eppstein-Barr-Virus-Status wurde bei 76 Patienten bestimmt, wobei in 13 Fällen (17,1 %) ein positives Testergebnis nachgewiesen wurde. Weitere klinische Laborparameter waren eine erhöhte LDH >250 U/l, die bei 10/(78) Patienten gezeigt werden konnte. Leukozyten ≥15000/µl besaßen 12/(82) Patienten. Albumin >4 g/dl war bei 34/(65) erhöht. Einen Hb <10,5 g/dl hatten 16/(81) und eine BSG >50 mm/h 34/(61) Patienten.

4.1.5 Therapie

Da sowohl Therapieverfahren als auch Dosierung unter den Patienten stark variieren, wurden die Therapieschemata in drei große Gruppen unterteilt. Die Bestrahlung wurde abschließend als separater Parameter aufgeführt. Zur sog. ABVD-like-Gruppe gehören folgende Chemotherapien: ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin), ABV (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin), PVAG (Prednison, Vinblastin, Doxorubicin, Gemcitabin). Diese Therapie erhielten 38,1 % der Patienten. Eine weitere Therapiegruppe stellen die Patienten dar, die mit einer BEACOPP-Chemotherapie (Cyclophosphamid, Etoposid, Adriamycin, Procarbazin, Vincristin, Bleomycin, Prednisolon) behandelt wurden: Ihr Anteil betrug 44,0 %. Eine Kombination aus beiden der o. g. Chemotherapien einer anderen Art von Chemotherapie, unterzogen sich 14,3 %. Eine Bestrahlung erfolgte bei 50,0 % aller Patienten.

4.1.6 Immunhistochemische Parameter

Zur Charakterisierung der HRS-Immunphänotypen in den untersuchten Fällen wurden 16 verschiedene Marker herangezogen. CD45RA war bei 4/(84) Fällen positiv. CD45RO bei 1/(76). CD40, PU-1, c-Met- und der HGF-Status wurden nach subjektiver Färbeintensität in Subgruppen unterteilt (1 = schwache Färbung, 2 + 3 = mittlere/starke Färbung bzw. 1 + 2 = schwache Färbung, 3 + 4 = starke Färbung). Eine schwach positive CD40-Färbung konnte in 74/(84) Fällen, eine Starke in 10/(84) Fällen gezeigt werden. c-Met1 wurde für 27/(84) Patienten aufgezeigt, die übrigen 57/(84) Patienten wurden der c-Met2 + 3-Kategorie zugeordnet. 26/(84) Patienten waren PU-1 1+2 positiv, wohingegen 58/(84) Personen PU-1 3+4 zugeordnet werden konnten. HGF1 kam bei 72/(84) Patienten vor, 12/(84) waren HGF2 + 3. HLA-DR war in 71/(82) Fällen positiv, T-bet in 50/(84) Fällen. Bcl-11a wurde sowohl in den HRS-Zellen (positiv in 33/(84)) als auch in den reaktiven Zellen des Umgebungsinfiltrates untersucht (Bcl-11a reaktiv: positiv in 28/(84) Fällen). PTPN1 konnte in 72/(83) Fällen nachgewiesen werden. SHP1 war positiv in 27/(37) Fällen. Phospho-STAT5 + 6 wurden jeweils nukleär und zytoplasmatisch bestimmt. p-STAT5 (nukleär) war in 19/(37) Fällen positiv, zytoplasmatisch bei 21/(37). p-STAT6 (nukleär) konnte in 27/(37) Fällen nachgewiesen werden. Zytoplasmatisch waren 13/(37) Patienten für diesen Marker positiv.

4.2 Optimierung der PCR-Reaktion aus mikrodissektierten Zellen

Die Amplifikation von Genen mittels Polymerase-Kettenreaktion aus mikrodissektiertem Ausgangsmaterial gestaltete sich als schwierig und gelang erst nach mehreren Anläufen. Dies hatte verschiedene Ursachen. Um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, war es unumgänglich, einzelne Schritte im Verfahrensablauf (vom gefrorenen Gewebe bis hin zur Sequenzierung) genauer zu beleuchten und gegebenenfalls zu optimieren. Die methodische Vorgehensweise ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Versuchs-bedingungen, die sich im jeweiligen Schritt durchsetzen konnten, sind grün hervor-

gehoben. Im Folgenden werden die einzelnen Unterpunkte des Ablaufes näher beschrieben und die Auswahl der festgelegten Parameter wird begründet:

Analysen von mikrodissektierten Zellen bewegen sich oftmals an der Untergrenze der Nachweisbarkeit. Neben der DNA-Qualität im Ausgangsmaterial ist der Umfang des gewonnenen Gewebes ein entscheidender Faktor. Die Anzahl erwerbbarer Zellen wird im Hodgkin-Lymphom zum einen durch deren Rarität im Lymphknotengewebe begrenzt und zum anderen durch den enormen zeitlichen Aufwand, den die Mikrodissektion einer hohen Zellanzahl mit sich bringt. Die Dicke der Gewebeschnitte ist daher ein simpler Faktor, bei gleicher Zellanzahl die Ausbeute an genomischem Material zu erhöhen. Folgende Schnittdicken wurden getestet: 4, 12 und 16 µm (vgl. Abbildung 10, A). Ab einer Schnittdicke von 12 µm verschlechtert sich die histologische Ansicht deutlich, sodass es in den meisten Fällen nicht mehr möglich war, die HRS-Zellen sicher von denen des Umgebungsinfiltrates zu unterscheiden. Zusätzlich kommt es zu einer immer stärker werdenden Überlagerung mit Nachbarzellen, sodass eine kontaminationsfreie Selektion nicht mehr sicher gegeben war. Eine Schnittstärke von 12 µm stellte sich als bester Kompromiss zwischen größtmöglicher DNA-Ausbeute und gleichzeitig kontaminationsfreier HRS-Zellselektion heraus.

Die 3 von der Firma Zeiss für die Mikrodissektion vorgesehenen Objektträger unterscheiden sich untereinander in der Zusammensetzung ihrer Membran. Auf diese wird der Gewebeschnitt aufgebracht, gefärbt, aber nicht eingedeckelt. Um ein besseres Antauen des Gewebes auf der Membran zu gewährleisten, wurden die Objektträger auf 37 °C erwärmt. Weitere wichtige Eigenschaften der Membran sind die Fähigkeit, sich nach Umschneiden eines Gewebeabschnittes gleichmäßig vom Objektträger abzulösen. Auch nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen sollte sich zwischen Objektträgerglas und Membran kein Wasserfilm bilden, da dieser die Optik stört und eine vorangegangene Entwässerung zunichtemacht. Unter Berücksichtigung dieser Punkte wurden die PEN-Membrane-Slides als zuverlässigste Variante für die Mikrodissektion aus Kryomaterial gewählt (vgl. Abbildung 10, B).

Gewebeschnitte, die nach der Färbung nicht eingedeckelt werden, trocknen aus. Dadurch wird die Gewebeoberfläche uneben, was das Fokussieren auf eine optische Schicht stark

einschränkt. Um bei dieser Problematik Abhilfe zu schaffen, bietet die Firma Zeiss verschiedene Lösungsstrategien: Ein Lichtdiffusor kann in den optischen Strahlengang eingebracht werden. Er verstärkt den Kontrast und fokussiert die Lichtstrahlen in einer Ebene. „Liquid Cover Glass“, eine Art Kunstharz, kann auf die raue Gewebeoberfläche aufgebracht werden, um diese zu glätten, ohne dabei die Gewebequalität zu beeinflussen. Als praktikabelste Lösung hat sich gezeigt, einen Tropfen 100 % Ethanol auf die Schnittfläche aufzubringen, die HRS-Zellen zu identifizieren und nach Verdunstung des Ethanols die ausgewählten Zellen zu mikrodissektieren.

Im Weiteren wird der optische Eindruck entscheidend von der Auswahl der Färbung beeinflusst (vgl. Abbildung 10, C). Diese nimmt auch Einfluss auf die Qualität der DNA. So konnte mit einzelnen Färbeverfahren keine erfolgreiche Genamplifikation in der PCR erzielt werden. Folgende Färbungen wurden durchgeführt und im Hinblick auf den optischen Eindruck sowie ein Kompromittieren der DNA-Qualität bewertet: (H) Hämatoxylin hat den geringsten negativen Einfluss auf die DNA-Integrität, die Beurteilbarkeit des Gewebes ist jedoch teilweise eingeschränkt und oft ist nur schwache Anfärbung der Zellen feststellbar. (HE) Hämatoxilin/Eosin ermöglicht eine gute visuelle Beurteilbarkeit der Zellen. Die Einwirkdauer von Eosin wurde wegen des negativen Einflusses auf die DNA-Qualität so kurz wie möglich gehalten. Kresylviolett verhält sich ähnlich der HE-Färbung, jedoch liegt der optische Eindruck etwas hinter dem der HE-Färbung zurück. Nuclear fast red + IHC-Färbeverfahren bieten einen hervorragenden visuellen Eindruck, jedoch konnten aus Zellen mit diesen Färbungen keine positiven PCR-Ergebnisse erzielt werden. Dies kann daran liegen, dass Farbstoffkomponenten nachfolgende Analysemethoden negativ beeinflussen oder Reagenzien aus dem Farbstoff selbst die DNA-Qualität kompromittieren.

Im Hinblick auf die zeitliche Praktikabilität und der hohen Fallzahl war es sinnvoll, die Anzahl geschossener Zellen pro Fall möglichst niedrig zu halten, ohne dabei die Nachweisgrenze einer nachfolgenden PCR zu unterschreiten. Analysen mehrerer Zellzahlen an verschiedenen Fällen ergaben, dass eine Mindestanzahl von 50 Zellen pro Fall einen zuverlässigen Nachweis ermöglichen (vgl. Abbildung 10, D).

Im Anschluss an die Mikrodissektion erfolgte ein Proteinase-K-Verdau. Eine Mindestmenge von 10 µl in Puffer gelöste Proteinase wurde benötigt, um den Deckelboden vollständig zu benetzen. Die größtmögliche Menge von 50 µl wurde durch das Deckelvolumen begrenzt. Es wurde angestrebt, das Genom der verdauten Zellen möglichst stark zu konzentrieren, um die Menge an Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktion so gering wie möglich zu halten und um Verunreinigungen durch Salze und Puffer entgegenwirken zu können. Geringere Mengen als 20 µl führten jedoch bei zu langen Inkubationszeiten gelegentlich zum Austrocknen der Probe. Die Inkubationsdauer wurde daher auf 2 Std. begrenzt (vgl. Abbildung 10, E).

Eine Aufreinigung des verdauten Zellmaterials (um potenzielle Störfaktoren in der PCR-Reaktion zu eliminieren) brachte keinen entscheidenden Vorteil gegenüber unbehandelten Proben. Bei ohnehin geringer DNA-Konzentration führt dieser Vorgang sogar zu einem Verlust an Ausgangsmaterial (vgl. Abbildung 10, F)

Der GC-Gehalt im Genbereich des SOCS-Proteins beträgt 71,22 %. Die Auswahl der Primerposition hat daher gewichtigen Einfluss auf ein positives Endresultat. Um dies sicherstellen zu können, wurden an 4 verschiedenen Stellen Primerpaare gelegt. Diese wurden so gewählt, dass der gesamte Genbereich eingeschlossen wurde. Die Primerpaare SOCS_a/b_3 und 4 erwiesen sich in zahlreichen Test-PCRs als die zuverlässigsten und wurden im Folgenden für einen nested-PCR-Ansatz verwendet (vgl. Abbildung 10, G).

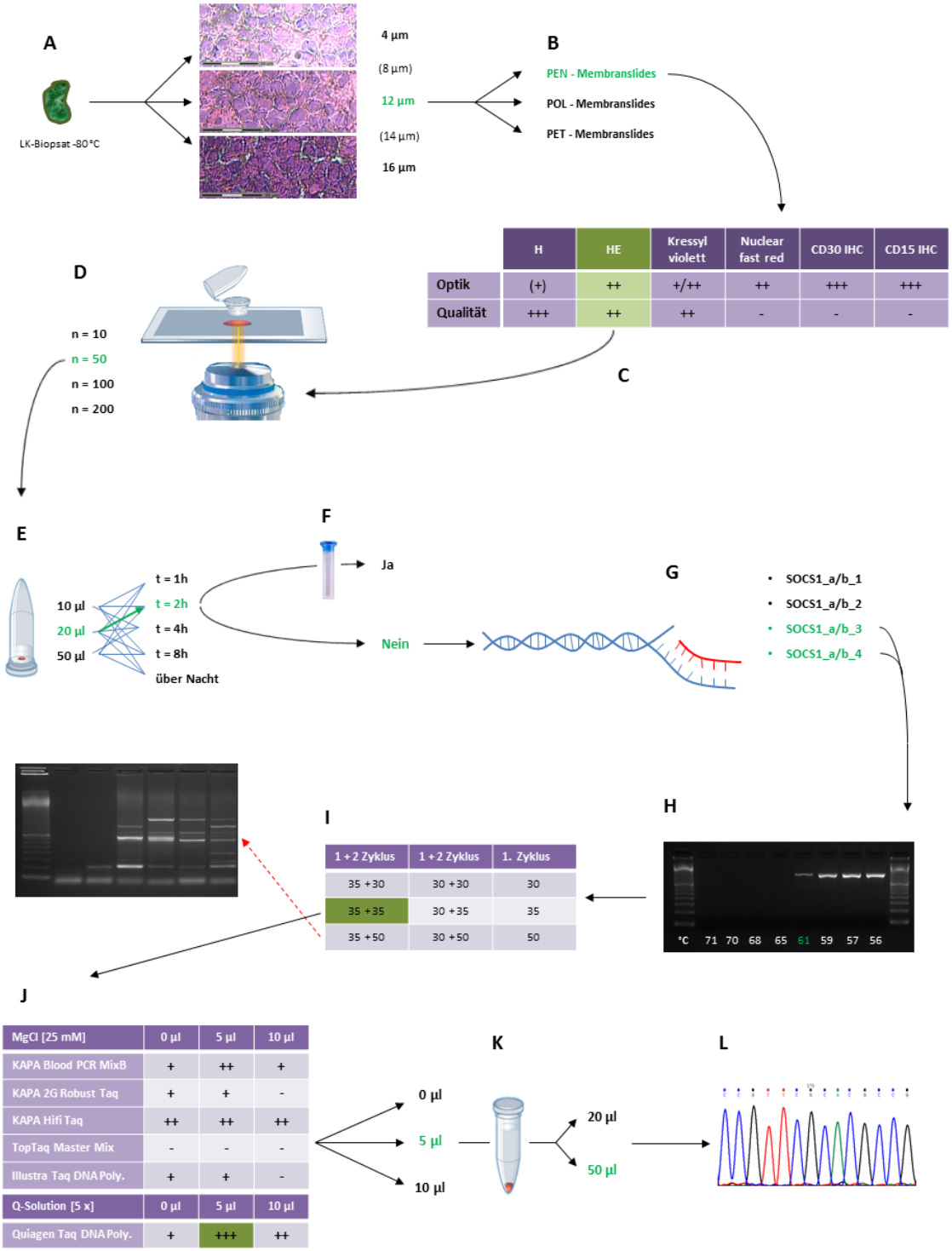


Abbildung 10 Verfahrensoptimierung der PCR-Reaktion aus mikrodissektiertem Zellmaterial Grüne Schriftfarbe bzw. Hinterlegung zeigt im jeweiligen Reaktionsschritt den für optimal befundenen Wert auf. **A:** Definition der Dicke von Gefrierschnitten **B:** Auswahl der für Mikrodissektion geeigneten Objektträger. **C:** Untersuchung verschiedener Gewebefärbungen im Hinblick auf Optik und DNA-Qualität. **D:** Definition einer Mindestanzahl geschossener Zellen, bei der eine DNA-Amplifikation noch erfolgreich ist. **E:** Gewebeverdau mittels Proteinase-K in definierten Volumina und bei verschiedenen Inkubationszeiten. **F:** Aufreinigung des verdauten Gewebes. **G:** Auswahl geeigneter Primerpaare. **H:** Bestimmung der optimalen Primer-Annealing-Temperatur. **I:** Auswahl einer geeigneten Zyklenzahl für die PCR-Reaktion. **J:** Auswahl verschiedener Polymerase-Systeme. **K:** Bestimmung der nötigen Templatemenge für das jeweilige PCR-Ansatzvolumen. **L:** Gelextraktion der PCR-Bande mit anschließender Sequenzierungsreaktion.

Für jedes der o. g. Primerpaare wurde die optimale Annealing-Temperatur bestimmt. Um die Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion in den ersten Zyklen zu erhöhen, wurde mit der höchsten Temperatur begonnen, bei der sich noch eine Bande in der PCR zeigte. In den folgenden Zyklen wurde die Temperatur schrittweise um 2 °C gesenkt. Die Hauptzyklenzahl wurde mit einer Annealing-Temperatur von 56 °C durchgeführt (vgl. Abbildung 10, H).

Der mittels PCR-Reaktion aus geschossenen Zellen erbrachte Nachweis konnte nur durch einen nested-PCR-Ansatz bewerkstelligt werden. Sämtliche Versuche, eine Gelbande schon mit einem einzigen PCR-Durchlauf zu erbringen, schlugen fehl. Die Zyklenzahl wurde dabei bis auf 50 gesteigert. In nested-PCR-Ansätzen mit hoher Zyklenzahl kam es zu verstärktem Auftreten unspezifischer Bandenmuster (vgl. Abbildung 10, I). Bei einer Zyklenzahl von 2 x 35 konnte ein Nachweis des *SOCS-1*-Gens gerade noch ohne das störende Auftreten unspezifischer Banden erbracht werden.

Nach anfänglichen Problemen, einen erfolgreichen PCR-Nachweis kontinuierlich zu gewährleisten, stellte sich heraus, dass auch die Auswahl des Taq-Polymerase-Systems entscheidend zu einem reproduzierbaren Ergebnis beitrug. Das Resultat einer *SOCS-1*-PCR mit 3 verschiedenen Polymerase-Systemen ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Q-Taq-Polymerase zeigte unter allen getesteten Polymerase-Systemen das kräftigste Bandenmuster. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes im Genbereich wurden zur weiteren Verbesserung MgCl in 3 aufsteigenden Konzentrationen hinzugegeben (vgl. Abbildung 10, J). Dem Q-Taq-Polymerase-System liegt eine vom Hersteller mitgelieferte Q-Solution bei. Diese wurde im Folgenden dem Mastermix hinzugegeben, sodass bei diesem System auf eine Zugabe von MgCl verzichtet werden konnte (vgl. 3.9).

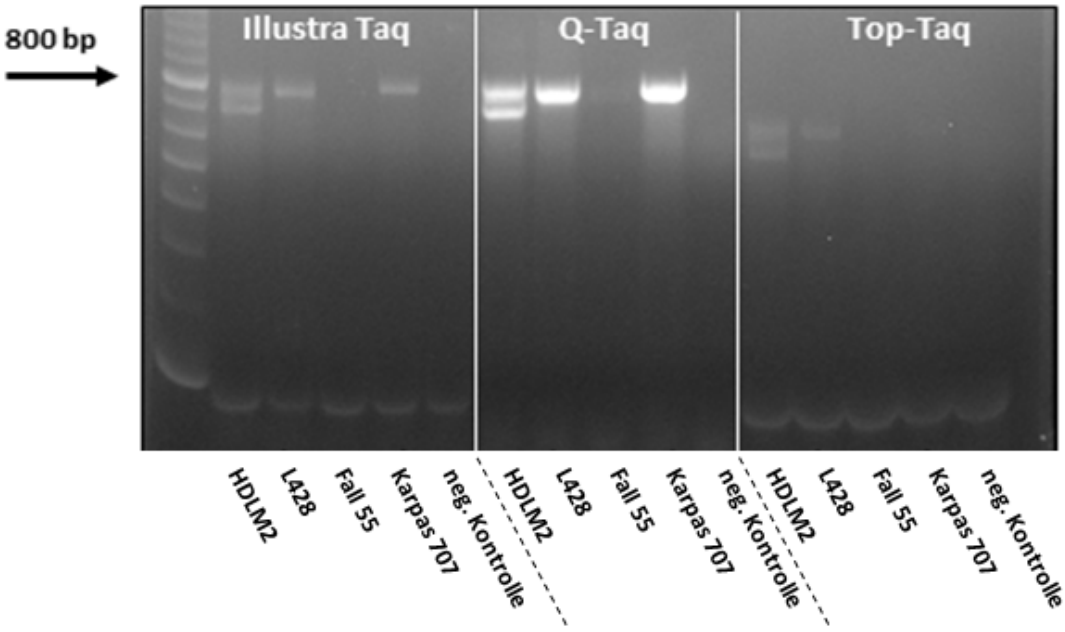


Abbildung 11 Vergleich verschiedener Polymerase-Systeme Exemplarisch für die in Abbildung 10 dargestellten Polymerase-Systeme zeigt dieses Gelbild eine PCR anhand von 3 ausgewählten Polymerasen. An jeder wurden 5 verschiedene Template-Materialien (inkl. neg. Kontrolle) getestet. Bei der Template-DNA handelt es sich in 3 Fällen um Zelllinien (HDLM2, L428, Karpas707) sowie um DNA aus mikrodissektiertem Gewebe eines Patientenfalles. Die Negativkontrolle wurde mit ddH2O durchgeführt. Bei allen Testdurchläufen herrschten identische Reaktionsbedingungen.

Um Störfaktoren wie z. B. Salze und Puffer in der PCR-Reaktion zu minimieren, wurde versucht, die eingesetzte Menge an Ausgangsmaterial so gering wie möglich zu halten. Weitere Verbesserungen ließen sich mit der Vergrößerung des Gesamtansatzvolumens von 20 µl auf 50 µl erzielen. Um Template für evtl. erforderliche Wiederholungsversuche einzusparen, konnte die Untergrenze der Nachweismenge in einem 50 µl-Ansatz auf 2 µl gesenkt werden (vgl. Abbildung 10, K).

4.3 Zelllinien aus cHL und NHL zeigen *SOCS-1*-Mutationen

Der Auswertung des *SOCS-1*-Mutationsstatus an einem unabhängigen Patientenkollektiv ging zunächst eine DNA-Analyse von Zelllinien aus cHL und NHL voraus. So konnte eine größere definierte Menge lymphomspezifischer DNA isoliert werden, was mittels Mikrodissektion in dieser Form nicht möglich war. Für die bei der PCR verwendeten Primer und Reaktionsbedingungen vgl. Kapitel 2.5.4 bzw. 3.9. Insgesamt wurden 6 Zelllinien aus dem

cHL sowie 24 aus dem NHL untersucht. Eine schematische Illustration der Zelllinien mit Defekten im *SOCS-1*-Gen zeigt Abbildung 12 . Aberrationen konnten in jeweils 3 Fällen im cHL (L-428, HDLM2, L1236) und 5 Fällen im NHL (MedB1, SUDHL-5, SUDHL-8, U2930 und Karpas-1106) nachgewiesen werden. Die NHL-Zelllinien U2930 und Karpas-1106 zeigen einen durch chromosomale Translokation bedingten Verlust des *SOCS-1*-Gens.[80,110]

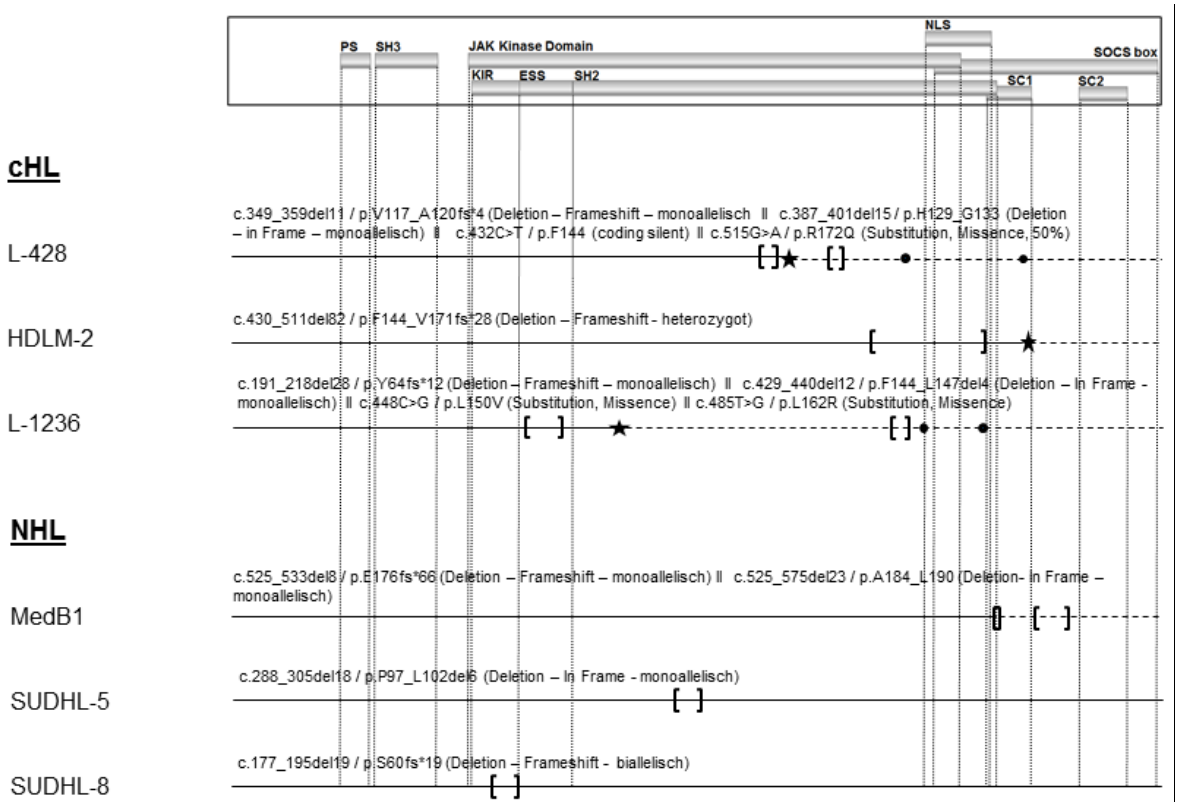


Abbildung 12 *SOCS-1* Mutationsanalyse in cHL- und NHL-Zelllinien Schematische Darstellung der *SOCS-1*-Domänen sowie deren Subdomänen. Für genaue Positionsangaben der Domänen vgl. Tabelle 10. Der *SOCS-1*-Genbereich in 3 mutierten Zelllinien des cHL sowie in 4 Zelllinien des NHL ist als Linie neben der jeweiligen Zelllinie dargestellt. Aberrationen sind nach Mutationsart und Position im Genbereich vermerkt. Eine detaillierte Beschreibung der Mutation (aa-Mutation sowie CDS-Mutation) befindet sich über der den jeweiligen Genbereich darstellenden Linie. **Symbole:** Geschlossene Klammern, Deletion; Punkte, Punktmutationen; Sterne, Stoppcodon; gestrichelte Linie, Nonsense-Sequenz**. Abkürzungen:** cHL, klassisches Hodgkin-Lymphom; NHL, non-Hodgkin-Lymphom; PS, Poly-Serine; SH3, Src Homology Domain 3; JAK, Januskinase; KIR, Kinase Inhibitory Region; ESS, Extended SH2 Subdomain; NLS, Nuclear Localisation Signal; SC1 bzw. SC2, SSI COOH-terminal motif (SSI, STAT-induced STAT Inhibitor) 1 bzw. 2.

Die Nomenklatur der Mutationsbeschreibung erfolgte nach dem HGVS-System, basierend auf den Richtlinien der Human Genome Variation Society (http://www.hgvs.org/mutnomen). In folgenden Zelllinien konnte ein *SOCS-1*-Wildtyp nachgewiesen werden: UHO-1, RAJI, DAUDI, Karpas-422, L540, REH, NALM-6, Karpas-707,

DOHH-2, SUDHL-6, KM-H2, Ramos, HT-29, KS-61, NAMALWA, WSU-NHL, PFEIFFER, Karpas-1718, SSK-41, RIVA, RCK8, SDFAD, Karpas-620. Insgesamt wiesen 8 (inkl. Karpas 1106 und U2930) der 30 untersuchten Zelllinien (27 %) eine Veränderung im *SOCS-1*-Genbereich auf. Das Gelbild einer *SOCS-1*-PCR ist in Abbildung 13 exemplarisch an 12 Zelllinien dargestellt.

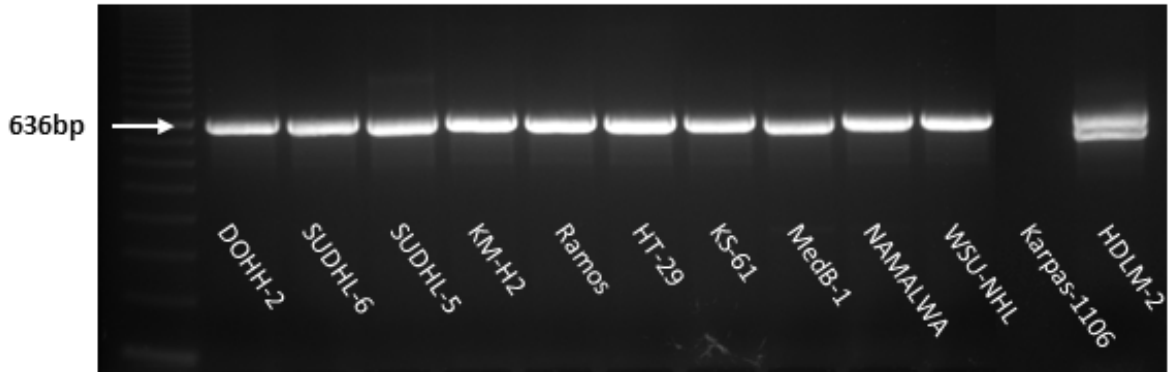


Abbildung 13 Gelbild einer *SOCS-1*-PCR Darstellung einer ***SOCS-1***-PCR anhand von 12 Zelllinien. Die monoallelischen Deletionen von SUDHL-5 und MedB1 sind zu klein, um beide Allele im Gelbild unterscheiden zu können. Gut sichtbar ist hingegen die Deletion in HDLM-2 sowie der ***SOCS-1***-Genverlust in Karpas-1106.

Bei allen Mutationsereignissen handelt es sich um Frameshift-Deletionen, die in den meisten Fällen eine merkliche Proteinverkürzung mit konsekutivem Stoppcodon zur Folge haben. Lediglich bei SUDHL-5 handelt es sich um eine In-Frame-Variante. Somit werden in diesen Fällen die für die *SOCS-1*-Funktion essenzielle SH2-Domäne und die SOCS-Box beschädigt. Die in den Lymhomzelllinien beobachteten Alterationen sind stets schwerwiegend (Deletionen), es steht daher kein Zellliniensystem zur Verfügung, in dem die Konsequenzen leichter Veränderungen (z. B. Punktmutationen) hätten untersucht werden können.

4.4 Mutationsanalysen am Patientenkollektiv

Die zuvor beschriebene *SOCS-1*-Mutationsanalyse wurde auch an dem in 4.1 beschriebenen Patientenkollektiv durchgeführt. Die Gesamtkohorte umfasste 116 Patienten. In 19

Fällen war kein Frischgewebe vorhanden, in 3 Fällen konnte mit dem zur Verfügung stehenden Material keine erfolgreiche PCR durchgeführt werden und in 10 Fällen lagen nur ungenügende Patienteninformationen vor, sodass für eine Mutationsanalyse des Frischgewebes eine Fallzahl von 84 Patienten erreicht werden konnte. In 30 Fällen wurde neben den HRS-Zellen auch eine separate Anzahl von ca. 500 Zellen des reaktiven Umgebungsinfiltrates mikrodissektiert. In diesen Zellen wurde ebenfalls ein *SOCS-1*-Mutationsstatus erhoben. Hier konnte in allen Fällen ein *SOCS-1*-Wildtyp nachgewiesen werden.

Eine ausführliche Auswertung jedes untersuchten Falles kann im Anhang in Abbildung 19 eingesehen werden. Das Prinzip der Mutationsanalyse entspricht dem schon für die Zelllinien verwendeten Verfahren (vgl. Abbildung 12). Mutationen im Bereich des *SOCS-1*-Gens konnten dabei in 52 von 84 Fällen beobachtet werden (61,90 %). Für jede Mutation wurden sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäure-Veränderungen angegeben. Auch Mutationen, die in der Sequenz nach einem mutationsbedingten Stoppcodon auftraten, wurden mitberücksichtigt. Im Rahmen dieser Analyse konnten neben stillen Missense- und Nonsense-Mutationen auch Deletionen und Insertionen beobachtet werden. In 11 Fällen kam es zu einer Deletion (13,09 %); eine In-Frame-Insertion wurde in einem Fall beschrieben (1,23 %). Die Deletionen gliederten sich in 10 Frameshift- und 4 In-Frame-Deletionen, wobei die Fälle 26 und 50 jeweils 2 bzw. 3 Deletionen aufwiesen. Es gab keine Duplikationen. Nonsense-Punktmutationen, die einen Aminosäurewechsel in einem Stoppcodon bedingen, kamen in 2 Fällen vor. In der Sequenzanalyse traten in einem Großteil der Fälle monoallelische Mutationen auf (84,62 %). In 8 von 52 mutierten Fällen (15,38 %) zeigten sich jedoch biallelische Verteilungsmuster. Punktmutationen und Deletionen waren dabei gleichermaßen betroffen. Bei Fällen, in denen biallelische Mutationen auftraten, waren auch bei den restlichen Mutationen stets beide Allele betroffen.

4.5 Korrelation von DNA-Mutationen mit denen der mRNA

Um die genomisch erworbenen Mutationen auch posttranskriptional nachweisen zu können, wurde der *SOCS-1*-Mutationsstatus auch auf Ebene der mRNA untersucht. Für die Isolation und die weitere Verarbeitung des Materials wurde wie in 3.6 beschrieben vorgegangen. Da eine Gewährleistung konstanter RNA-Qualität aufgrund ubiquitär vorhandener RNasen nicht immer problemlos möglich ist, erfolgte die Kontrolle der RNA-Integrität mittels Bioanalyzer. Als Indikator für eine potenziell erfolgreiche Weiterverarbeitung wurden neben dem Vorhandensein ribosomaler Banden (18S + 28S) auch die RIN-Nummer (RNA integrity number) sowie die RNA-Konzentration herangezogen. Die Menge und Qualität an mikrodissektiertem Ausgangsmaterial reichte jedoch in keinem der Fälle aus, um einen RIN-Wert zwischen 7 und 10 zu erzielen. Die durchschnittliche RIN-Nummer der untersuchten Proben betrug 2,4 (0–5,3). Die im Mittel bestimmte RNA-Konzentration der im Bioanalyzer eingesetzten Proben betrug 44 pg/µl (14–112 pg/µl).

Der *SOCS-1*-mRNA-Mutationsstatus wurde für 33 Proben bestimmt. In 6 Fällen reichte die RNA-Qualität für eine valide Mutationsanalyse nicht aus. Im Vergleich zwischen den auf DNA-Ebene bestimmten Mutationen und den Ergebnissen der RNA-Analyse konnten Übereinstimmungen gefunden werden. Abbildung 14 zeigt identische Mutationsergebnisse anhand 4 verschiedener Mutationstypen. Die WT-Sequenz (Wildtyp-Sequenz) wurde als Negativkontrolle aus der DNA mikrodissektierter Zellen des Umgebungsinfiltrates gewonnen. Darunter sind die mutierten DNA- bzw. c-DNA-Sequenzen aus HRS-Zellen gezeigt. Im Falle der PMT-Mutation handelt es sich um eine Mutation, bei der beide Allele verändert sind.

Da jedoch nur eine geringe Anzahl verglichener Fälle Übereinstimmung mit den Resultaten aus den DNA-Untersuchungen zeigte und die Konzentration der gewonnenen RNA sowie deren Integrität nicht immer zufriedenstellend waren, wurden die Mutationsanalysen der mRNA nach 33 Fällen eingestellt und für den Rest des Kollektivs nicht weiter verfolgt. Übereinstimmungen zwischen beiden Ebenen der genetischen Information konnten zwar in Einzelfällen aufgezeigt werden, für einen direkten Vergleich war die Übereinstimmung zwischen DNA- und mRNA-Analyse jedoch zu gering.

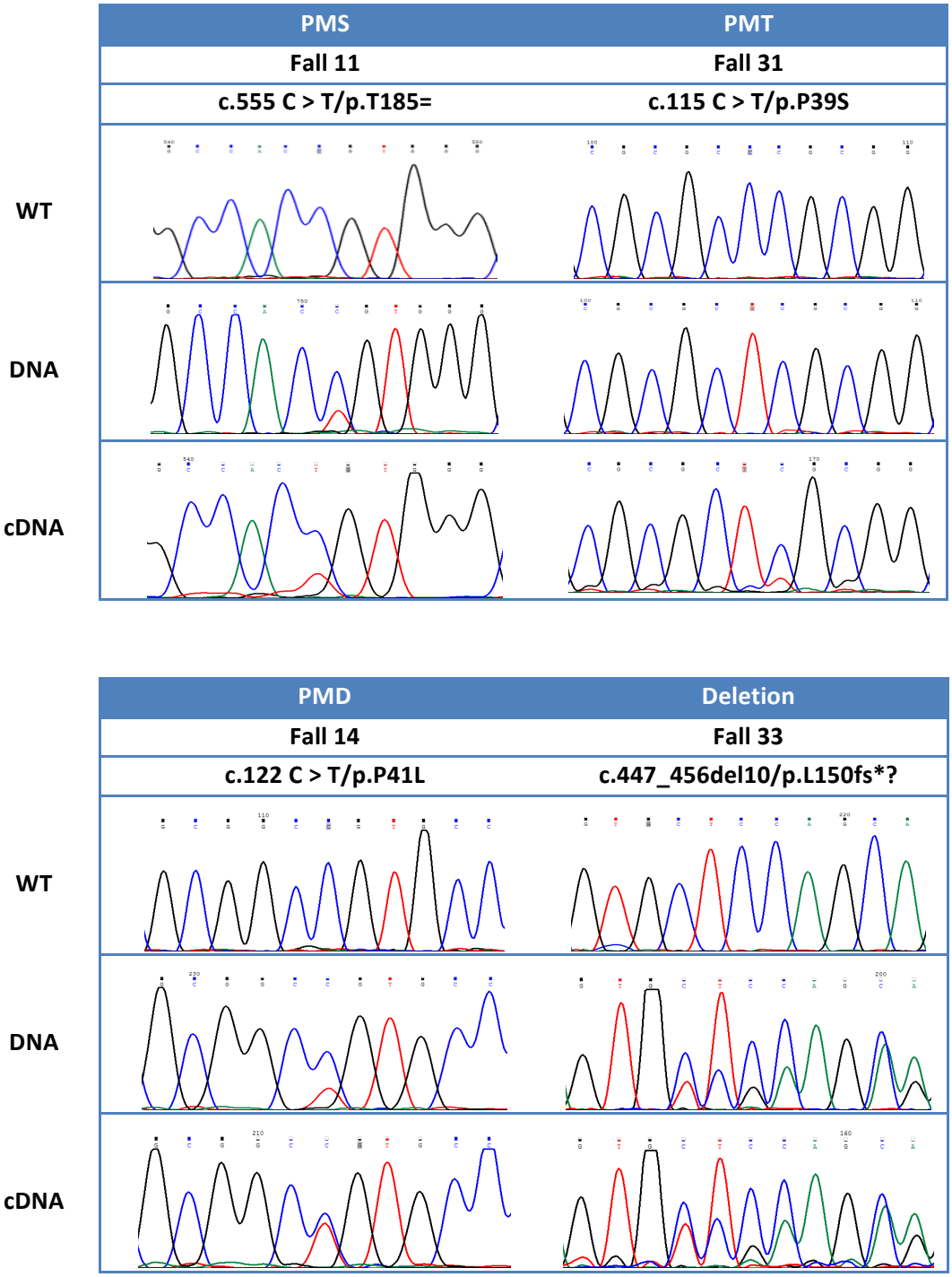


Abbildung 14 Korrelation der auf DNA-Ebene beobachteten Mutationen mit Ergebnissen der RNA-Analyse Die Abbildung zeigt 4 verschiedene Mutationstypen (PMS, PMT, PMD, nonPM) sowie die genaue Beschreibung der jeweiligen Mutation. Die Darstellung erfolgt in einem Sequenzabschnitt von 11bp. Die Zeilen WT und DNA zeigen Sequenzen aus DNA-Analysen, wobei für die Bestimmung des WT mikrodissektierte Zellen des Umgebungsinfiltrats als Analysegrundlage dienten. Die cDNA-Zeile zeigt Sequenzergebnisse nach RNA-Isolation aus mikrodissektierten HRS-Zellen. **Abkürzungen:** PMS, point mutation silent; PMT, point mutation tolerated; PMD, point mutation damaging; WT, Wildtyp; bp, Basenpaar.

4.6 Mutationsverteilung innerhalb des *SOCS-1*-Gens

In 58 der 84 Fälle (69 %) kann aufgrund der Basenabfolge im *SOCS-1*-Gen auf Veränderungen der kodierten Aminosäuresequenz geschlossen werden. Zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung dieser Mutationen innerhalb der kodierenden Region wurde ein Histogramm erstellt und die Anzahl der betroffenen Fälle an jeder Codonposition aufgetragen (vgl. Abbildung 15B). Dabei wurden alle Mutationsarten (Punktmutationen, Deletionen etc.) identisch gewichtet. Es zeigten sich neben dem Fehlen sogenannter Hotspots lediglich geringe regionale Unterschiede. So sind beispielsweise die ersten 30 Aminosäuren oder auch Positionen 154-163 oder 222-233 weitgehend unverändert. Im Gegensatz dazu ist der die SH3-Domäne kodierende Bereich relativ häufig betroffen. So finden sich in dieser Region einzelne Codons in bis zu 7 Fällen verändert. Aus der Auftragung der Mutationen nach betroffenen Domänen (vgl. Tabelle 10) anstatt betroffener Codons (wie in Abbildung 15) ergibt sich ein ähnlicher Zusammenhang. Übergangsbereiche zwischen den Domänen kommen jedoch in Abbildung 15B besser zur Geltung als in einer tabellarischen Darstellung. In Zusammenschau beider Darstellungsweisen, sind folgende Genbereiche vorwiegend betroffen: die SH3-Domäne, der KIR-ESS-Übergangsbereich sowie der den mittleren SH2-Bereich kodierende Genabschnitt (Aminosäure 96-122 bzw. 134-152).

In Vorarbeiten konnten *SOCS-1*-Mutationen und deren Konsequenz insbesondere mit den C-terminalen Domänen und dabei speziell mit der SOCS-Box in Verbindung gebracht werden. Jedoch zeigte sich diese Region in der Häufigkeitsverteilung eher nicht als bevorzugt betroffen (Abbildung 15B). Bei näherer Untersuchung dieser Auftragung kommen jedoch die distalen Konsequenzen von schwerwiegenderen weiter proximal lokalisierten Mutationen nicht zum Tragen. So führt beispielsweise in Fall 15 eine trunkierende Punktmutation zum Verlust aller C-terminalen Domänen einschließlich der SOCS-Box oder die Deletion c.197_221del25/p.R66fs*10 in Fall 46 führt zu einem Teilverlust der kodierenden Region mit Verschiebung der weiter distal kodierten Domänen. Um derartige Folgen adäquat zu berücksichtigen, betrachteten wir die C-terminalen Konsequenzen je Fall in zwei Wichtungen: Einerseits wurde nur ein kompletter Verlust des distal einer Mutation gelegenen Proteinanteils (beispielsweise bei einem Frameshift mit konsekutiv-trunkierender Mutation) als C-terminale Folge gewertet (konservative Wichtung); ande-

rerseits werteten wir auch Verschiebungen durch In-Frame-Deletionen mit Veränderung der distal kodierten Domänen als C-terminale Folge (aggressive Wichtung). Die Auftragung als Fraktion mutierter Fälle über die kodierende Region zeigte, dass ca. 33 % der mutierten Fälle mit distalen Veränderungen einhergehen. Basierend auf dieser Beobachtung führten wir in Ergänzung zur Mutationsanalyse aller 58 *SOCS-1*-mutierten Fälle („*SOCS-1*-all“) auch Subgruppenanalysen durch. Dabei wurde zwischen Fällen mit Mutationen, die mit C-terminalen Konsequenzen einhergehen (*SOCS-1*-Major), und solchen mit nicht trunkierenden Punktmutationen, die im Allgemeinen keine C-terminalen Konsequenzen nach sich ziehen (*SOCS-1*-Minor), unterschieden.

Mit n = 14 Fällen stellt die Major-Gruppe einen Anteil von 24,14 % der von Mutationen betroffenen Fälle dar. Bei der Minor-Gruppe beträgt dieser Anteil 75,86 %.

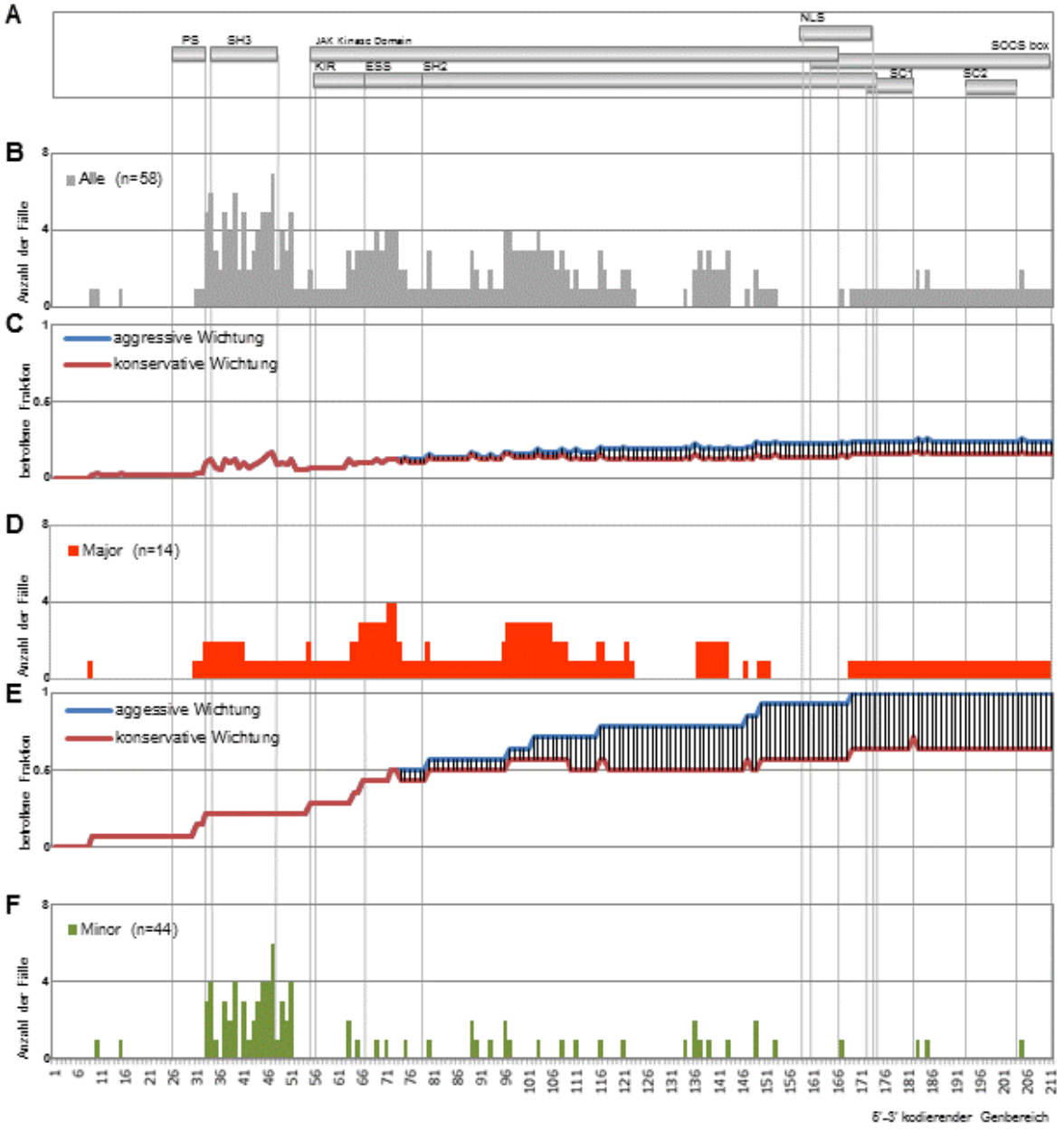


Abbildung 15 Häufigkeitsverteilung von Mutationen in *SOCS-1* sowie deren mögliche N-terminale Auswirkung auf die Proteinlänge A: Schematische Abbildung funktioneller Domänen des *SOCS-1*-Proteins. **B:** Relative Häufigkeitsverteilung der von Mutationen betroffenen Codons. Nur direkt in Mutationen involvierte Genbereiche wurden als mutiert gewichtet. **C:** Schwerwiegende Mutationen (Major: Insertionen, Deletionen, Nonsense-Punktmutationen) wurden in Bezug auf deren potenzielle Auswirkung auf die Proteinlänge differenziert. Dabei wurden die Genbereiche 3´ einer Out-of-Frame-Mutation oder Nonsense-Punktmutation als verändert bewertet (konservative Wichtung). Bei der aggressiven Wichtung wurden zusätzlich Genbereiche als verändert gewichtet, die sich 3´ von In-Frame-Mutationen befanden. Bei Missense-Punktmutationen (Minor) wurden in allen Wichtungen nur direkt betroffene Codons als mutiert bewertet. **D:** Identisches Darstellungsprinzip wie in A. Nur Major-Mutationen sind aufgetragen. **E:** Prinzip der Darstellung entspricht C. Nur Major-Mutationen sind aufgetragen. **F:** Darstellungsprinzip wie in A oder D, nur Minor-Mutationen wurden abgebildet**. Abkürzungen**: PS, Poly-Serine; SH3, Src Homology Domain 3; JAK, Januskinase; KIR, Kinase Inhibitory Region; ESS, Extended SH2 Subdomain; NLS, Nuclear Localisation Signal; SC1 bzw. SC2, SSI COOH-terminal motif (SSI, STAT-induced STAT Inhibitor) 1 bzw. 2.

In Abbildung 15 D + E wurden die beschriebenen Analysen isoliert an der Major-Gruppe dargestellt. Auch hier zeigte sich eine regelmäßige Verteilung der Mutationen auf den kodierenden Bereich (vgl. Abbildung 15). Keine Domäne erscheint gegenüber anderen Abschnitten gehäuft von Mutationen betroffen zu sein. Zieht man erneut die C-terminalen Konsequenzen von Major-Mutationen in Betracht, ergibt sich eine starke Zunahme der Proteinaffektion in C-terminaler Richtung. Legt man die „aggressive“ Wichtung als Grundlage zur Vorhersage von Funktionsverlusten im Proteinbereich zugrunde, ist die SOCS-Box in 100 % der Major-Fälle als Konsequenz vorgelagerter Mutationen in ihrer Funktion defizitär. Sogar in der konservativen Wichtung bedeuten die Konsequenzen von trunkierenden Mutationen einen Funktionsverlust der SOCS-Box in 64,29 % der Fälle.

Da sich aus Missense-Punktmutationen in beiden Wichtungsschemata keine C-terminale Konsequenz für die Proteinfunktion ergibt, ist eine konservative oder aggressive Wichtung per Definition nicht möglich. In Abbildung 15 F sind Fälle der Minor-Gruppe isoliert aufgetragen. Es zeigt sich eine Häufung von Mutationsereignissen im Bereich der aa 33-49, welche die SH3-Domäne einschließt. Klassische Hotspots einzelner Codons sind jedoch auch hier nicht klar abzugrenzen. Weitere Angaben zur genauen Domänenlokalisation und -funktion sowie der Häufigkeitsverteilung von Mutationen können im Anhang in Tabelle 10 eingesehen werden.

4.7 Subklassifikation der Punktmutationen

Um eine differenzierte Aussage darüber zu ermöglichen, in welcher Form Mutationen zur Genese von neoplastischen Zellen im Hodgkin-Lymphom beitragen, wurden vor allem die im Patientenkollektiv beobachteten Punktmutationen im *SOCS-1*-Gen weiter subklassifiziert. Generell wurden dabei Punktmutationen von Nicht-Punktmutationen (nonPM) wie Deletionen oder Insertionen unterschieden. Innerhalb der Punktmutationen kann man stille Mutationen von solchen abgrenzen, die eine Veränderung der aa bedingen. Eine genauere Analyse ermöglichen jedoch etablierte Scoring-Systeme. Diese werden verwendet, um sog. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) von Aberrationen zu separieren, die

die Entstehung einer Krankheit bedingen können. Für eine solche Unterteilung stehen im Moment folgende Kalkulationssysteme zur Verfügung:

- SIFT-Score (Sorting intolerant from tolerant)
- LogR.E-value algorithm
- Gene Ontology Similarity Score (GOSS)

Für die Analyse sämtlicher Punktmutationen wurde in dieser Arbeit der SIFT-Score verwendet, da dieser eine differenzierte Aussage über Substitutionen an jeder Stelle einer vorgegebenen Sequenz ermöglicht. Der SIFT-Score erlaubt eine prädiktive Vorhersage, wie sich eine aa-Substitution auf die Proteinfunktion auswirkt. Die korrekte Vorhersage ist dabei abhängig von zwei Hauptparametern. Zum einen wird die Sequenzhomologie innerhalb des untersuchten Proteins mit anderen sequenzanalogen Proteinen verglichen. Basierend auf der Prämisse, dass Proteinevolution mit Proteinfunktion korreliert, werden wichtige Aminosäuren oder Domänen innerhalb des Gens (wie die der SH2-Domäne oder SOCS-Box) konserviert und stellen damit essenzielle Bereiche für einen funktionstüchtigen Phänotypen dar. Veränderungen in konservierten Bereichen nehmen daher potenziell schwerwiegenderen Einfluss auf die Proteinfunktion als solche, die nicht konservierte Bereiche betreffen. Schlecht konservierte Regionen weisen erhöhte Diversität innerhalb einer Proteinfamilie auf. Die Berücksichtigung dieser Beobachtung ermöglichte es, bei der Mutationseinteilung die für eine Erkrankung potenziell verantwortlichen Substitutionen von „normalen“ Polymorphismen zu unterscheiden.

Der SIFT-Score wurde mit der Rechenoberfläche auf der Internetseite http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html ermittelt. Die Ausgabeinformation der Analyse ist in Tabelle 5 beispielhaft anhand von 5 im Kollektiv aufgetretenen Substitutionen dargestellt.

Tabelle 5 SIFT-Score-Analyse Die zur Berechnung des SIFT-Score in die Vorlage einzutragenden Eingabeinformationen umfassten die Ensemble Gene Protein Transcript Id (ENSP)(ENSP00000329418 für *SOCS-1*), die Aminosäureposition der Substitution (Position), die Referenzaminosäure des Wildtypen (Referenz) sowie die durch die Substitution veränderte Aminosäure (Substitution). Die Ausgabeinformation beinhaltet die von Score für eine Substitution errechnete Prognose (Prädiktion), den numerischen Score (SIFT-Score), die mediane content information (MCI) und die gefundene Anzahl homologer Sequenzen, die eine Aminosäure an der angegebenen Position hat (Seqs.). Zwei der abgebildeten Substitutionen liegen im SIFT-Score unter dem Grenzwert von 0,05 und werden als potenziell schwerwiegende (DEMAGING) Mutationen eingestuft. Stille Mutationen oder solche, die sich in nicht konservierten Proteinbereichen befinden, nähern sich im SIFT-Score dem Wert 1 an und werden für die Proteinfunktion als tolerabel (TOLERATED) gewertet (SIFT-Score >0,05).

ENSP	Position	Referenz	Substitution	Prädiktion	SIFT-Score	MCI	Seqs.
ENSP00000329418	116	S	N	DAMAGING	0	1,9	145
ENSP00000329418	96	E	K	TOLERATED	0,79	1,9	145
ENSP00000329418	90	H	D	TOLERATED	0,13	1,9	145
ENSP00000329418	41	P	L	DAMAGING	0,04	1,98	70
ENSP00000329418	38	R	R	TOLERATED	0,8	1,99	61

Nach Eingabe der ENSP-Id werden durch eine PSI-Blast-Suche alle verfügbaren Sequenzen ermittelt, die Homologien zur Eingabesequenz oder eine ähnliche Funktion aufweisen. In den Ausgabedaten wird die Nummer an Sequenzen (Seqs) angegeben, die an der Substitutionsposition eine Aminosäure besitzen. Aberrationen am Anfang oder Ende der vorgegebenen Sequenz resultieren daher meist in niedrigen Seqs-Nummern. Durch Informationen über Lokalisation und Art der Substitution wurde ein prädiktiver Vorhersagewert ermittelt. Der Grenzwert in dieser Arbeit wurde auf 0,05 festgelegt. Eine Erhöhung auf einen Wert von 0,1 zur Steigerung der Sensitivität zeigte keine relevanten Veränderungen. Eine Auflistung der Mutationen nach SIFT-Score-Schweregrad wurde nicht vorgenommen, da in vielen Fällen mehrere Substitutionen mit unterschiedlichen SIFT-Scores im demselben Fall auftraten. Fälle mit Substitutionen, bei denen sich ein Score von unter 0,05 ergab, wurden daher als „damaging“, solche über 0,05 als „tolerated“ klassifiziert. Fälle, in denen mehrere Substitutionen auftraten, die sowohl damaging als auch tolerated waren, wurden ebenfalls als „damaging“ klassifiziert. Der median conservation value (MCI) berücksichtigt die Diversität innerhalb der ermittelten Sequenzen, um einen Anhalt für die Validität der Aussage geben zu können. Die Werte dieses Parameters gehen von 0 bis 4,32 (entspricht log20). Es ergibt sich ein Wert von 4,32, wenn die betroffene Aminosäure in allen ermittelten Sequenzen vollständig iden-

tisch (und damit sehr gut konserviert) ist, oder 0, wenn alle 20 anderen Aminosäuren an dieser Position in den ermittelten Sequenzen vorkommen. Für Werte zwischen 2,75 und 3,5 lassen sich valide Aussagen treffen. Ab einem Wert von >3,25 besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, eine Substitution fälschlich als „damaging“ zu bezeichnen.

Der SIFT-Score gibt in Bezug auf Veränderungen der Proteinfunktion immer nur eine errechnete Wahrscheinlichkeit an. Vorgegebene Grenzwerte sind keinesfalls als fixe Parameter anzusehen und müssen bei Bedarf an die jeweilige Fragestellung angepasst werden. Trotzdem ermöglichen sie es, Substitutionen durch die o. g. Parameter zu kategorisieren. Die Wahrscheinlichkeit, eine für die Proteinfunktion schwerwiegende Veränderung von einem normalen SNP unterscheiden zu können, wird so erhöht.

Unter Berücksichtigung der SIFT-Klassifikation für Punktmutationen ergab sich eine Aufteilung der Minor-Gruppe in eine PMT (point mutation tolerated)- und PMD (point mutation damaging)-Kohorte. Die Major-Gruppe besteht aus Fällen, die mindestens eine sog. nonPM (non point mutation (Deletion, Insertion, Nonsense-Punktmutation) enthalten. Mit dieser Klassifikation ergibt sich eine Fallverteilung von 32 Wildtyp (WT), 29 PMT, 11 PMD und 12 nonPM.

4.8 Mögliche Ursachen von Punktmutationen im Hodgkin Lymphom

Der biologische Hintergrund von Mutationsereignissen in neoplastisch veränderten Zellen ist vielgestaltig. In den meisten Fällen sind Mutationen zufällig und durch eine hohe Proliferationsrate der Krebszellen begründet, sofern diese der Zelle einen Überlebensvorteil verschaffen. Das initiale Ereignis in der malignen Transformation ist oftmals unbekannt. In Zellen, die eine Keimzentrumsreaktion durchlaufen haben, könnte die sog. aberrante somatische Hypermutation eine mögliche Erklärung für die Akkumulation von Mutationen in bestimmten Sequenzbereichen sein. SNPs könnten auch Grund für das Auftreten von Punktmutationen sein, sofern sich bereits bekannte SNPs mit den im Kollektiv aufgetretenen Mutationen korrelieren lassen. Im Folgenden wurden daher beide der genannten Möglichkeiten überprüft.

4.8.1 Punktmutationen im *SOCS-1*-Gen sind keine Folge von Single-Nukleotid-Polymorphismen

Einzel-Nukleotid-Polymorphismen sind Variationen einzelner Basenpaare innerhalb des DNA-Stranges. Treten diese in kodierenden Regionen auf und bewirken einen Aminosäure-Austausch im betroffenen Triplet, werden sie als nicht synonyme Polymorphismen bezeichnet. Um auszuschließen, dass es sich bei den in Hodgkin-Patienten identifizierten Punktmutationen um Polymorphismen handelt, wurden alle Punktmutationen mit den in der NCBI-Datenbank gelisteten (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) Polymorphismen im *SOCS-1*-Gen verglichen. Alle der 10 bekannten SNPs wurden bei dieser Analyse berücksichtigt:

Tabelle 6 Einzelnukleotid-Polymorphismen im *SOCS-1*-Gen

NCBI-ID	Substitution	NCBI-ID	Substitution
rs182726276	c.58 C > A	rs11549428	c.558 G > A/C
rs147807471	c.381 C > G	rs144893532	c.593 C > T
rs144320077	c.384 G > C	rs149946047	c.595 G > C
rs112876299	c.421 C > T	rs139221703	c.597 C > T
rs140266462	c.577 C > T	rs61753383	c.630 G > T

Zwei Drittel aller Polymorphismen sind eine Substitution von Cytosin mit Thymin. Diese wurde zwar in 36 von 103 Fällen identifiziert (34,95 %), jedoch fand sich keine Übereinstimmung zwischen den aufgelisteten SNPs und den Punktmutationen im Hodgkin-Patientenkollektiv.

4.8.2 Konsensusregionen der SHM sind häufig Ausgangspunkt für schwerwiegende Mutationsereignisse

Eine weitere mögliche Erklärung für die Entstehung von Mutationsereignissen stellt die aberrante somatische Hypermutation dar. Dabei werden Punkmutationen irrtümlich in Gene eingefügt, die im Normalfall nicht von somatischer Hypermutation (SHM) betroffen sind. Dieses fehlgesteuerte Mutationsereignis tritt in der Regel in spezifischen Konsenussequenzen auf. Kommt eine Mutation also gehäuft in solchen Sequenzbereichen vor, deu-

tet dies auf eine Entstehung durch aberrante SHM hin. Die in der Literatur beschriebene Basenabfolge dieser Konsensusbereiche im *SOCS-1*-Gen ist:

RGWY		R = A/G
DGYW	wobei	Y = C/T
WA		W = A/T
		D = G/T/A

Das unterstrichene Nukleotid bezeichnet dabei die Lokalisation, an der das Mutationsereignis potenziell auftritt.

Im gesamten Hodgkin-Kollektiv konnten bei insgesamt 52 der 84 untersuchten Patienten Veränderungen im *SOCS-1*-Gen aufgezeigt werden. Diese setzten sich aus 104 Punktmutationen der Minor-Gruppe sowie 16 nonPM (Deletionen, Insertionen, Nonsense-Punktmutationen) der Major-Gruppe zusammen. Innerhalb der Minor-Gruppe wurde durch den SIFT-Score (vgl. 4.7) eine weitere Unterteilung der Punktmutationen vorgenommen. Patienten, in denen ausschließlich Punktmutationen auftraten, für die sich ein SIFT-Score >0,05 ergab, wurden als PMT (point mutation tolerated) klassifiziert. Ein SIFT-Score von <0,05 bedingte eine Zuordnung zur PMD (point mutation damaging)-Kohorte. Sowohl in der Majorgruppe als auch in den beiden Kohorten der Minor-Gruppe wurde verglichen, wie viele der Mutationen in den Konsensusbereich für aberrante somatische Hypermutation fallen. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 16 dargestellt. In der PMT-Kohorte fielen 2 von 75 Punktmutationen (2,66 %) in die Konsensusregion. Dieser Anteil betrug in der PMD-Gruppe 10,34 %. Für Ereignisse der Major-Gruppe ergab sich eine signifikante Häufung von Mutationen, die in Konsensusregionen anfingen oder endeten, gegenüber denen, die bei Patienten auftraten, die der PMT- oder PMD-Gruppe angehörten ((p = 0,001 bzw. p = 0,14) Fisher‘s exact test). In der Major-Gruppe traten 16 von 6 Mutationen (37,50 %) in Konsensusregionen auf.

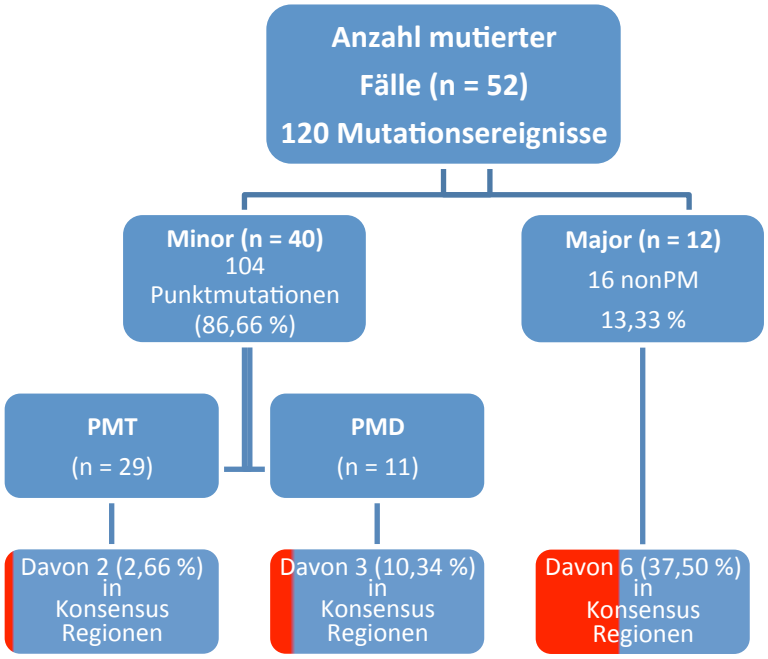


Abbildung 16 Anteil der in Bereichen aberranter somatischer Hypermutation auftretenden Mutationen Aufteilung der Fälle in Major und Minor. Weitere Unterteilung der Fälle mit Punktmutationen (gemäß SIFT-Score) in PMT (point mutation tolerated) und PMD (point mutation damaging). Innerhalb der Major-Gruppe wurden die nonPM (Insertionen, Deletionen, Nonsense-Punktmutationen) dargestellt. Der prozentuale Anteil der in Bereichen aberranter somatischer Hypermutation aufgetretenen Ereignisse ist rot dargestellt.

Ausgehend von der Hypothese, dass Mutationsereignisse in Post-Keimzentrums-lymphomen durch aberrante somatische Hypermutation verursacht sein könnten, wurden alle Hodgkin-Fälle in einer vereinfachten Mutationsdarstellung aufgelistet und in ihrer Position auf dem Protein vermerkt (vgl. Abbildung 17). Mutationsereignisse, die in Konsensusbereichen von SHM auftreten, wurden rot hervorgehoben. Auch diese Mutationen verteilten sich regelmäßig auf den gesamten Genbereich. Klassische Hotspots konnten nicht gezeigt werden, allerdings betreffen 90,90 % dieser Mutationsereignisse die SH2- bzw. eine damit assoziierte ESS-Domäne, und zwar unabhängig davon, ob es sich um eine Punktmutation, Deletion oder Insertion handelt. Alle 52 analysierten Sequenzen (Wildtyp-Fälle nicht gezeigt) wurden (sortiert nach Schweregrad der Beeinträchtigung der Proteinfunktion) untereinander aufgetragen; den Beginn bildet die Minor-Gruppe (PMT dann PMD), den Abschluss die Major-Gruppe. Innerhalb jeder Gruppe ergab sich die Reihenfolge aus Punktmutationen (in aufsteigender Anzahl und SIFT-Score) und schließ-lich Deletionen und Insertionen (aufgelistet nach Größe des verbliebenen intakten Genbereiches). Mit zunehmendem Schweregrad oder steigender Anzahl an Mutationen

häufen sich Ereignisse in den Konsensusregionen für aberrante SHM. Davon sind Deletionen mit 37,50 % stärker betroffen als Punktmutationen (2,66 % bzw. 10,34 %). Innerhalb der Gruppe von Patienten mit Punktmutationen zeigt sich ein Trend für das gehäufte Auftreten von Mutationen im Bereich SHM in der PMD-Kohorte.

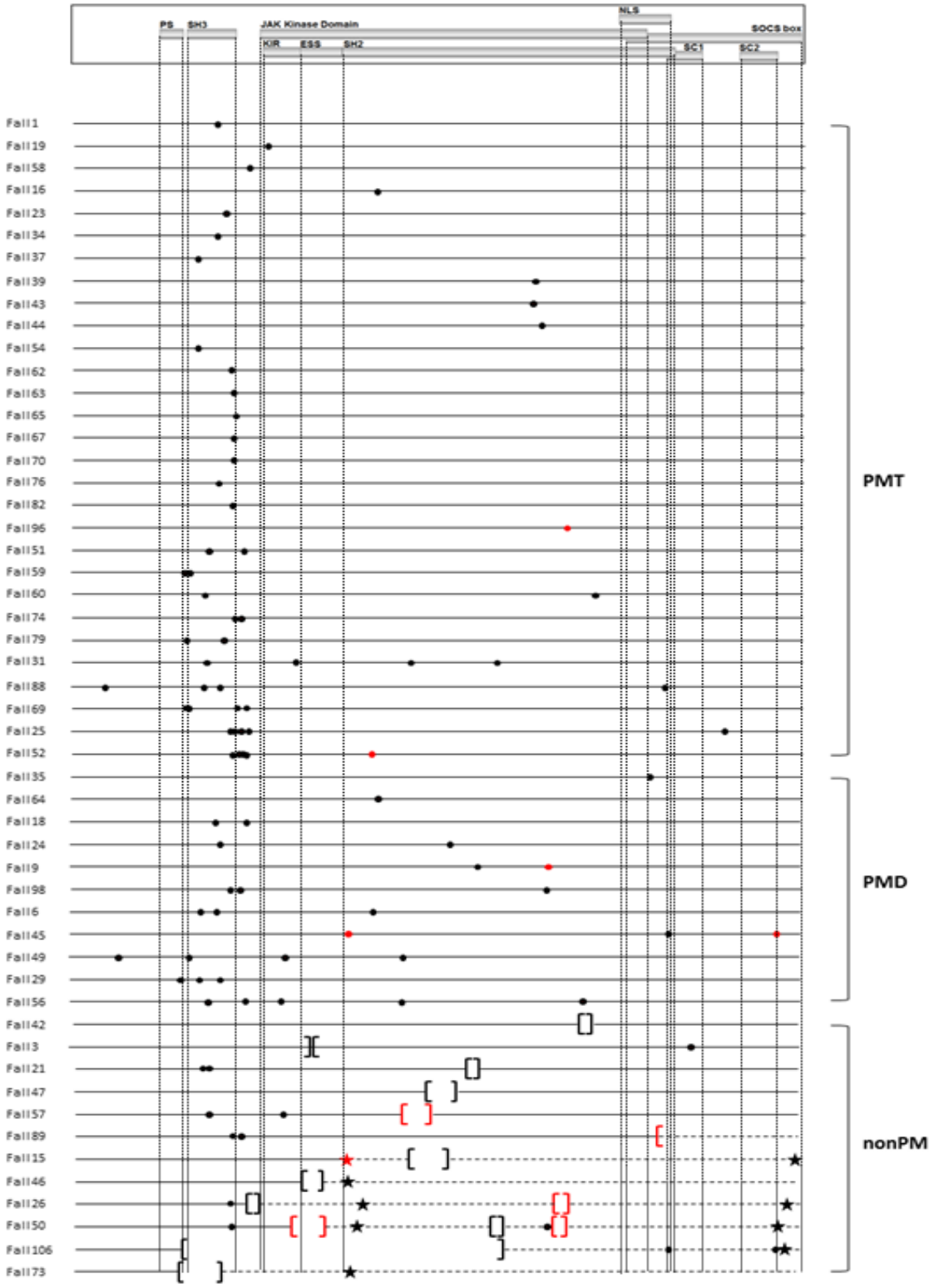


Abbildung 17 *SOCS-1*-Mutationen in Konsensusregionen aberranter somatischer Hypermutation Mutationsanalyse an 84 Patientenfällen. Auflistung nach zunehmendem Mutationsschweregrad (Wildtyp-Fälle nicht gezeigt), beginnend mit 29 PMT, 11 PMD und 12 nonPM. Die Fälle sind untereinander in Abhängigkeit von der *SOCS-1*-Domänenstruktur aufgetragen (1 Linie = 2 Allele). **Symbole:** Schwarze Punkte, Punktmutationen; Sterne, Stoppcodons; offene Klammern, Insertionen; geschlossene Klammern, Deletionen; gestrichelte Linie, Nonsense-Sequenz nach Stoppcodon; rote Farbe, Punktmutation im SHM-Konsensusbereich bzw. Deletion beginnend/endend im SHM-Konsensusbereich. **Abkürzungen:** PMT, point mutation tolerated; PMD, point mutation damaging; nonPM, Nicht-Punktmutation (Deletion, Insertion, Nonsense-Punktmutation).

4.8.3 Transversionen treten gehäuft in Konsensusregionen aberranter somatischer Hypermutation auf

Treten Punktmutationen im Rahmen von SNPs auf, beträgt das Verhältnis zwischen Transition und Transversion ca. 2 : 1. Bei PM, deren Genese auf eine aberrante somatische Hypermutation zurückzuführen ist, verändert sich dieses Verhältnis zugunsten der Transversion. Die in der Mutationsanalyse aufgetretenen PM wurden daraufhin in Transitions- und Transversionstypen aufgeteilt und ihr Verhältnis wurde bestimmt. Dies wurde getrennt für Punktmutationen vorgenommen, die im Konsensusbereich für aberrante somatische Hypermutation liegen. In dieser Gruppe ergab sich mit 4 Transitionen und 4 Transversionen ein Verhältnis von 1 : 1. Bei den PM, deren veränderte Base nicht im Konsensusbereich lag, gab es 74 Transitionen und 25 Transversionen (2,96 : 1). Punktmutationen in Konsensusregionen weisen gegenüber solchen, die in anderen Sequenzbereichen auftreten, eine erhöhte Anzahl an Transversionen auf.

4.8.4 Guanin und Cytosin sind mit 91,26 % die am häufigsten von Substitutionen betroffenen Basen

Bei den 103 im Kollektiv aufgetretenen Punktmutationen wurde analysiert, ob die im Rahmen von Punktmutationen auftretenden Substitutionen untereinander gleichmäßig verteilt sind. Dabei konnte die im Folgenden dargestellte Verteilung beobachtet werden:

Tabelle 7 Häufigkeitsverteilung der im Kollektiv beobachteten Substitutionen Abkürzungen: C, Cytosin; G, Guanin; A, Adenin; T, Thymin.

Substitution	Anzahl	Substitution	Anzahl
C > T	36	**C > G**	2
G > A	36	**T > C**	2
G > T	10	**T > G**	1
C > A	5	**A > C**	1
G > C	5	**A > G**	1
A > T	3	**T > A**	1

Zusammen stellen die Transitionen C > T bzw. G > A die häufigste Form der Basensubstitution dar (69,90 %). Die häufigste Transversion ist G > T (9,70 %). Punktmutationen treten gehäuft in Sequenzbereichen mit hohem Gehalt der Basen Guanin und Cytosin auf. Dieses Phänomen kann in 91,26 % aller Punktmutationen beobachtet werden.

4.9 Phänotyp-Analyse der Mutationsgruppen

Die statistische Korrelation von klinischen Parametern zwischen 2 Patientenkohorten wurde für die in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgeführten Konstellationen durchgeführt. Dabei wurden sowohl epidemiologische, laborchemische, histologische sowie immunhistochemische Parameter untersucht. Die Gesamtzahl der untersuchten Fälle betrug n = 84. Die Fallanzahl innerhalb der Subgruppen gestaltete sich wie folgt: WT: 32 Fälle; Minor: 40 Fälle; Major: 12 Fälle. In der statistischen Auswertung wurde der Exakte Fisher-Test verwendet. Unterschiede in der Altersverteilung wurden mit dem Student‘s t-Test berechnet. Im Vergleich der Subgruppen konnten folgende Unterschiede herausgestellt werden:

WT vs. mut.

Signifikante Unterschiede zwischen der WT-Gruppe und der aller *SOCS-1*-mutierten Patienten ergaben sich im Ann-Arbor Stadium der Erkrankung; so befand sich gegenüber der mut. Gruppe ein signifikant höherer Anteil der WT Patienten im Stadium 2 der Erkrankung (p = 0.04). In höheren Stadien ergab sich eine annähernd gleichmäßige Verteilung zwischen den Gruppen. Weiterhin wiesen Patienten der mut. Gruppe einen signifikant höheren Serumeiweißgehalt (Albumin >4g/dl) auf (p=0.05). Für WT Patienten ergab sich tendenziell ein geringeres Auftreten einer Hyperalbuminämie (p = 0.09). Sowohl der Gehalt an nukleärem, als auch an cytoplasmatischem p-STAT5 war in der WT Gruppe gegenüber den mut. Patienten erhöht (p = 0.06 bzw. p = 0.02).

WT vs. Minor

Der Anteil der unter 25-jährigen Patienten war in der WT Gruppe gegenüber den Minor Patienten tendenziell erhöht (p = 0.05). Auch hier befanden sich WT Patienten signifikant häufiger im Stadium 2 der Erkrankung (p = 0.03), es zeigten sich jedoch seltener multiple extranodale Manifestationen (p = 0.06). Auch die Milz war bei WT Patienten tendenziell weniger häufig affektiert (p = 0.06). Das in B-Zell-Lymphomen beschriebene Onkogen Bcl-11a in Tumorzellen der WT Gruppe gegenüber der Vergleichskohorte erhöht (p = 0.09).

WT vs. Major

In der Gegenüberstellung klinischer Parameter waren bei Patienten der Major Gruppe häufiger über 3 Lymphknotenareale betroffen (p = 0.07). Auch ein großer mediastinaler Tumor konnte mit 58% häufiger bei Major, als bei WT Patienten (28%) beobachtet werden (p = 0.09). Im Vergleich immnunhistochemischer Parameter zwischen den beiden Gruppen, zeigte sich als einziger Parameter der T-bet Gehalt in Tumorzellen der Major Gruppe gegenüber der Vergleichskohorte erniedrigt (p = 0.09).

Major vs. Minor

Bei Patienten der Major Gruppe konnte häufiger ein großer mediastinaler Tumor, als in der Vergleichskohorte beobachtet werden (p = 0.08). Der Risikofaktor „Alter ≥ 45“ trat tendenziell häufiger bei Patienten der Minor Gruppe auf (p = 0.09). Das für den HGF-Rezeptor (hepatocyte growth factor receptor) kodierende Proto-Onkogen c-Met fand sich in beiden Gruppen unterschiedlich verteilt. Schwach bis gar nicht anfärbbare Fälle traten seltener in der Major-Gruppe auf (p = 0,08). Umgekehrt zeigte sich dieses Phänomen für die positiv bis stark positiven Fälle (p = 0,08). Nukleäres p-STAT5 fand sich mit einer Verteilung von p = 0,08 öfter in der Major-Gruppe positiv.

Tabelle 8 Klinisch-epidemiologische Phänotypisierung der Mutationsgruppen Subgruppierung der Patientenkohorten nach *SOCS-1*-Mutationsstatus: WT, mut. (Minor + Major), Minor und Major. Für jeden Parameter wurden jeweils zwei Gruppen in insgesamt vier möglichen Konstellationen verglichen. Zur statistischen Signifikanzprüfung wurde Fisher's t-Test, beim Alter der Student's t-Test verwendet. Signifikante p-Werte wurden rot, solche, die lediglich einen Trend anzeigen ($p \leq 0,1$), gelb hervorgehoben. **Abkürzungen:** WT, Wildtyp; mut., mutiert; No., Fallzahl, NS, nodular sclerosis; LR, lymphocyte rich; LD, lymphocyte depletion; MC, mixed cellularity; NOS, not other specified; LK, Lymphknoten; SOCS-1, suppressor of cytocine signaling 1.

	WT (n = 32)		mut. (n = 52)		Minor (n = 40)		Major (n = 12)		P	P	P	P
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	WT vs. mut.	WT vs. Minor	WT vs. Major	Major vs. Minor
Alter bei Diagnose												
Alter (Median)	23.38		29.53		32.44		25.31		0,2411	0,1169	0,5991	0,1182
Alter ≤25	18	56	19	37	13	33	6	50	0,1128	0,0567	0,7456	0,3175
Alter 26–49	11	34	25	48	19	48	6	50	0,2605	0,3378	0,4889	1
Alter ≥50	3	9	8	15	8	20	0	0	0,5203	0,3251	0,5506	0,1737
Geschlecht												
weiblich	15	47	31	60	23	58	8	67	0,2696	0,4770	0,3182	0,7407
männlich	17	53	21	40	17	42	4	33	0,2696	0,4770	0,3182	0,7407
Morphologische Diagnose												
NS	23	72	31	60	23	58	8	67	0,3489	0,2281	1	0,7407
LR	5	16	10	19	9	23	1	8	0,7749	0,5568	1	0,4199
LD	1	3	1	2	1	3	0	0	1	1	1	1
MC	2	6	8	15	6	15	2	17	0,3050	0,2865	0,2967	1
NOS	1	3	2	4	1	3	1	8	1	1	0,4757	0,4118
Klinik												
Stage I	0	0	4	8	4	10	0	0	0,2926	0,1238	1	0,5621
Stage II	21	66	21	40	15	38	6	50	0,0424	0,0321	1	0,5120
Stage III	5	16	16	31	12	30	4	33	0,1938	0,1752	0,2274	1
Stage IV	6	19	11	21	9	23	2	17	1	0,7760	1	1
<3 LK-Areale	24	75	31	60	26	65	5	42	0,1656	0,4438	0,0715	0,1884
Alter ≥45	4	13	8	15	8	28	0	0	1	0,1996	0,5616	0,0794
B-Symptome	16	52	26	51	18	46	8	67	1	0,8101	0,4995	0,3238
gr. med. Tumor	9	28	19	37	12	30	7	58	0,4817	1	0,0855	0,0952
extranodale Manifestationen 0	26	81	38	73	29	73	9	75	0,4409	0,4184	0,6866	1
extranodale Manifestationen = 1	5	16	7	14	5	13	3	25	0,7605	0,7426	0,6625	0,3661
extranodale Manifestationen ≥2	1	3	6	12	6	15	0	0	0,2435	0,0684	1	0,3159
Milzbefall	1	3	8	15	7	18	1	8	0,1435	0,0684	0,4757	0,6634
mediastinaler Befall	25	78	40	77	32	80	12	100	1	1	0,1629	0,1737
inguinaler LK Befall	1	3	3	6	3	8	0	0	1	0,6239	1	1

Tabelle 9 Labor- und immunhistochemische Phänotypisierung der Mutationsgruppen Subgruppierung der Patientenkohorten nach *SOCS-1*-Mutationsstatus: WT, mut. (Minor + Major), Minor und Major. Für jeden Parameter wurden jeweils zwei Gruppen in insgesamt vier möglichen Konstellationen verglichen. Zur statistischen Signifikanzprüfung wurde Fisher´s t-Test, beim Alter der Student's t-Test verwendet. Signifikante p-Werte wurden rot, solche, die lediglich einen Trend anzeigen ($p \leq 0,1$), gelb hervorgehoben. **Abkürzungen:**; mut., mutiert; No., Fallzahl, NS, nodular sclerosis; LR, lymphocyte rich; LD, lymphocyte depletion; MC, mixed cellularity; NOS, not other specified; nukl, nukleär; LK, Lymphknoten; WT, Wildtyp; SOCS-1, suppressor of cytocine signaling 1; zytopl., zytoplasmatisch.

	WT (n = 32)		mut. (n = 52)		Minor (n = 40)		Major (n = 12)		P	P	P	P
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	WT vs. mut.	WT vs. Minor	WT vs. Major	Major vs. Minor
Laborparameter												
EBV-Status	4	13	9	20	8	22	1	11	0.5484	0.5252	1	0.6636
LDH >250	6	20	4	8	2	6	2	17	0.1708	0.1278	1	0.2569
Leukos ≥15000	6	19	6	12	4	10	2	17	0.3557	0.3203	1	0.6164
Albumin >4g/dl	9	36	25	63	20	69	5	46	0.0450	0.0278	0.7159	0.2732
Hb >10,5g/del	3	10	13	26	10	26	3	25	0.0901	0.1216	0.3249	1
BSG <50	14	54	20	54	17	63	3	38	1	0.5826	0.6880	0.2464
Chemotherapie												
ABVD like	11	34	22	42	18	45	4	33	0.4997	0.4693	1	0.5256
BEACOPP like	17	53	20	39	16	40	4	33	0.2581	0.3427	0.3182	0.7471
other	4	13	8	15	6	15	4	33	1	1	0.1847	1
Bestrahlung												
Ja	18	56	24	46	21	53	5	42	0.5006	0.8145	0.5037	0.7432
Nein	14	44	28	53	19	48	7	58	0.5006	0.8145	0.5037	0.7432
Immunphänotyp												
CD45 RA	2	6	2	4	2	5	0	0	0.6335	1	1	1
CD45 RO	1	3	0	0	0	0	0	0	0.3947	0.3571	1	1
CD40 1+2	27	84	32	61,5	35	88	12	100	0.4945	0.7426	0.3012	0.5687
CD40 3+4	5	16	5	10	5	13	0	0	0.4945	0.7426	0.3012	0.5687
HLA-DR	27	87	39	77	35	88	9	82	0.2687	1	0.6437	0.6353
T-bet	21	66	29	56	25	63	4	33	0.4929	0.8101	0.0876	0.1020
PU-1 1+2	12	38	14	27	11	28	3	25	0.3390	0.4484	0.5000	1
PU-1 3+4	20	63	38	73	29	73	9	75	0.3390	0.4484	0.5000	1
Bcl-11a +	16	50	17	33	12	30	5	42	0.1672	0.0952	0.7403	0.4959
Bcl-11a (reaktiv)	9	28	19	37	17	43	2	17	0.4817	0.2281	0.6983	0.1719
PTPN1	26	81	43	84	35	90	11	92	0.7684	1	0.6532	1
SHP1	7	70	18	64	14	70	6	86	1	1	0.6029	0.6334
c-Met +	21	66	36	69	25	63	11	92	0.8115	0.8101	0.1323	0.0776
HGF2 +	3	9	9	17	8	20	1	8	0.3588	0.3251	1	0.6655
p-STAT5 nukl.	8	80	11	41	6	30	5	71	0.0625	0.0187	1	0.0840
p-STAT5 zytopl.	9	90	12	44	3	21	3	43	0.0230	0.0028	0.1007	0.3544
p-STAT6 nukl.	8	80	19	70	15	75	5	71	0.6941	1	1	1
p-STAT6 zytopl.	2	20	11	41	8	40	3	43	0.4395	0.4195	0.5928	1

In Zusammenschau dieser Befunde konnte für jede Patientengruppen ein Phänotyp beschrieben werden, der sich aus einer Kombination mehrerer klinischer und immunhistochemischer Parameter ergibt. Dieser gestaltete sich für die einzelnen Gruppen wie folgt:

WT Patienten mit WT *SOCS-1* befinden sich gegenüber der mutierten Gruppe häufiger im Stadium II der Erkrankung (p = 0,04), der größte Unterschied zeigt sich gegenüber der Minor Gruppe (p = 0.03). Nur in 3.1% der Fälle wurden zwei oder mehr extranodale Manifestationen gefunden und mit 36 % zeigen Sie im Vergleich zu den mutierten Fällen (63 %) weniger häufig eine Hyperalbuminämie (p = 0,05). Auch immunhistochemisch heben sich Patienten der WT Gruppe durch einen erhöhten Gehalt an nukleärem bzw. zytoplasmatischem p-STAT5 vom übrigen Kollektiv ab (p = 0.06 bzw. p = 0.02).

Minor Verglichen mit der WT-Patienten, befanden sich Minor Patienten mit 40% deutlich seltener im Stadium 2 der Erkrankung (p = 0.03). In 69% der Fälle (gegenüber 36% WT bzw. 46% Major) konnte ein erhöhter Albumin Gehalt nachgewiesen werden. Immunhistochemisch zeichneten sich Patienten der Minor Gruppe durch einen niedrigen Gehalt an nukleärem bzw. zytoplasmatischem p-STAT5 aus – dieser Unterschied kam besonders gegenüber der WT Gruppe zur Geltung (p = 0.02 bzw. p = 0.03).

Major Keiner der 12 Patienten in der Major Gruppe war älter als 45 Jahre. Besonders gegenüber der Minor Kohorte konnten bei Major Patienten so Unterschiede aufgezeigt werden (p = 0.08). Ein großer, mediastinaler Tumor als Risikofaktor, wurde mit 58% in keiner der beiden anderen Gruppen so häufig beobachtet (WT = 28% bzw. Minor = 30%). Immunhistochemisch konnte die Major Gruppe durch einen hohen Gehalt an c-Met positiven Tumorzellen (92 %) von den anderen Patienten abgegrenzt werden (p = 0.07).

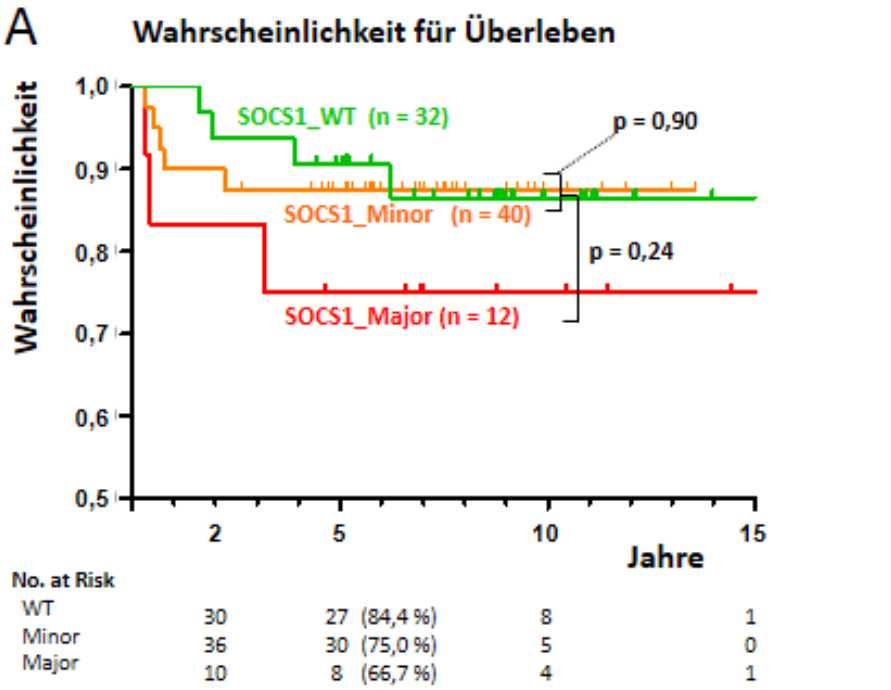
Die Ergebnisse aus der durchgeführten Phänotyp-Analyse können jeder Mutationsgruppe einen Phänotypen zuordnen, der sich aus der Kombination mehrerer untersuchter Parameter ergibt. Weder einem klinisch-epidemiologischen, noch einem labor- oder immunhistochemischen Einzelparameter gelang eine zuverlässige Unterscheidung der drei Mutationsgruppen. In Einzelbereichen wie z. B. dem Gehalt von zytoplasmatischem p-STAT5 zeigten sich signifikante Abweichungen (vgl. Tabelle 8). In der WT Gruppe konnte bei 90% der WT Patienten, jedoch nur bei 44% der mutierten Patienten eine positive Färbung von p-STAT5 beobachtet werden, sodass die Unterschiede zwar signifikant waren, jedoch einer klinisch praktischen Verwendbarkeit nicht standhalten konnten. Zur Untersuchung, ob sich die Prognose in den nach Mutationsstatus separierten Patientengruppen unterscheidet, wurden im folgenden Abschnitt der klinische Verlauf mittels verschiedener Kaplan-Meier-Analysen untersucht. Auf diese Auswertung wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

4.10 Kaplan-Meier-Analysen der Mutationsgruppen

Die für eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse notwendigen Parameter konnten von insgesamt 84 (Daten für Gesamtüberleben) bzw. 77 Patienten (Daten für progressionsfreies Überleben) erhoben werden. Die Fälle wurden nach der in 4.7 getroffenen Einteilung in WT, Minor, und Major unterschieden. Für den statistischen Vergleich der Daten wurde der Log-Rank-Test verwendet.

Die Überlebenswahrscheinlichkeiten der Gruppen ist in Abbildung 18 A grafisch veranschaulicht. Die mediane Beobachtungszeit für das Gesamtkollektiv betrug 7,2 Jahre. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) lag bei 86,87 %. Zu diesem Zeitpunkt waren 19 der 84 Patienten (22,61 %) entweder an den Folgen der Erkrankung verstorben oder „lost to follow-up“. In den einzelnen Subgruppen konnten für die 5-JÜR folgende Werte erhoben werden: WT, 90,63 %; Minor, 87,50 %; Major, 75,0 %. Verstorben oder lost to follow-up waren zu diesem Zeitpunkt jeweils 4 (12,50 %) WT-, 10 (31,25 %) Minor- bzw. 4 (33,33 %) Major-Patienten. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen einzelnen Subgruppen zeigten im Vergleich WT vs. Minor keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,90$). In

Abgrenzung zu Patienten der Major Kohorte zeigte sich eine Tendenz, dass es bei Patienten dieser Gruppe früher und häufiger zu einem Ereignis kommt. Dieser Trend erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p = 0,24). Auch bei isolierter Betrachtung der einzelnen Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt werden: WT vs. Major (p = 0,27) bzw. Minor vs. Major (p = 0.28).



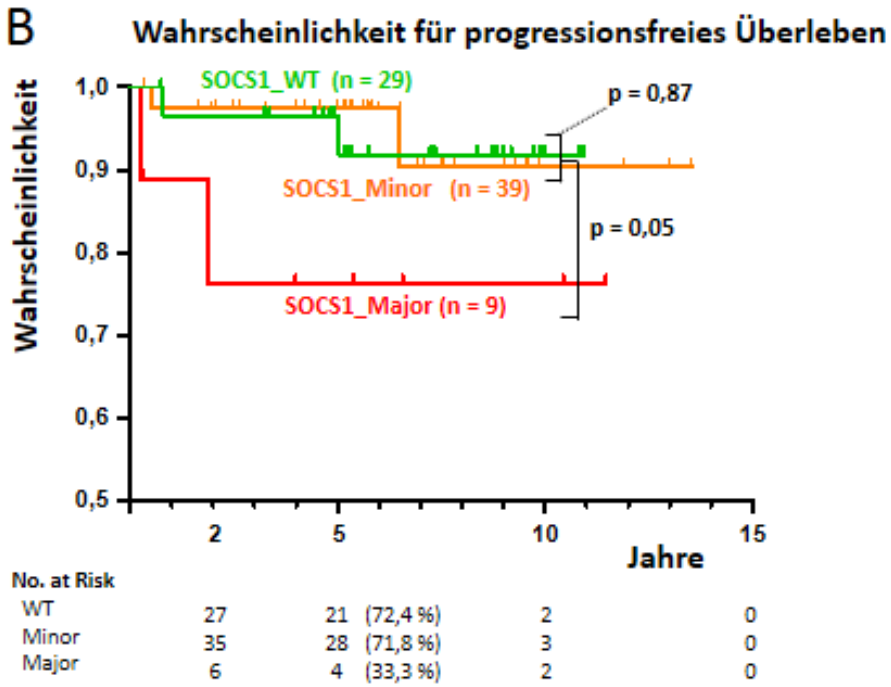


Abbildung 18 Wahrscheinlichkeit für Gesamt- und progressionsfreies Überleben der Patientenkohorten WT, Minor und Major A: Die Überlebenswahrscheinlichkeit von Hodgkin-Patienten wurde in Bezug auf ihren *SOCS-1*-Mutationsstatus miteinander verglichen. Patienten der WT- und der Minor-Gruppe zeigten dabei einen ähnlichen Verlauf (p = 0,90 Log-Rank-Test). Zusammengefasst zu einer Gruppe ergab sich im Vergleich zu Major-Fällen ein Trend für eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit (p = 0.24). **B:** Beim Vergleich der progressionsfreien Zeit, zeigten Patienten der WT bzw. Minor Gruppe einen ähnlichen Verlauf (p = 0.87) und unterscheiden sich von der Major Gruppe, in der es früher und häufiger zu Ereignissen kommt (p = 0.05). Die No. at Risk (in A und B) entspricht der Patientenanzahl, die nach dem jeweiligen Zeitintervall (2, 5, 10 und 15 Jahren) weder ein Ereignis hatten noch lost to follow-up waren. Nach 5 Jahren ist zusätzlich der prozentuale Anteil aufgeführt. **Abkürzungen**: WT, Wildtyp; No. at Risk, Number person at risk; 5-JÜR, 5-Jahres-Überlebensrate; 5JRR, 5-Jahres-Rezidivfreirate.

Die Berechnung für die Wahrscheinlichkeit des progressionsfreien Überlebens ist in Abbildung 18 B gezeigt. Hier konnten die Daten von insgesamt 77 Patienten erhoben werden. Der mediane Beobachtungszeitraum betrug 5,81 Jahre. Nach einem Zeitraum von 5 Jahren waren 94,80 % der Patienten progressionsfrei. Bei 24 Patienten (68,83%) kam es zu einem Ereignis oder sie waren lost to follow-up. Die maximale Nachbeobachtungszeit für das progressionsfreie Überleben betrug 13,53 Jahre, weshalb für keine der Gruppen ein 15 Jahreswert angegeben werden konnte. Überlebensanalyse entsprechend der *SOCS-1*-Mutationsgruppe (WT, n = 29; Minor, n = 39; Major, n = 9) zeigten eine 5-Jahres-Rate für progressionsfreies Überleben (5-PFS) von WT, 96,43 %, Minor, 97,37 % und Major, 76,19 %. Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Patienten, die bis zu diesem Zeitpunkt lost to follow up waren, ergaben sich für das progressionsfreie Überleben Werte von 27,59 % (WT), 28,21 % (Minor) sowie 44,44 % in der Major Gruppe. In Bezug auf die 5-PFS, trat in der Major-Gruppe ein Progress signifikant häufiger auf, als beim übrigen Patientenkollektiv (p = 0,05). Zwischen WT- und Minor-Fällen gab es keine signifikanten Unterschiede (p = 0,87). Auch die Proportionen der Progressionswerte zeigten innerhalb der untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede (p = 0,22 Chi-Square Test).

Im zeitlichen Verlauf zeigen Patienten, die Mutationen im *SOCS-1* Genbereich aufweisen, früher Ereignissen, als solche der WT Gruppe. So kommt es innerhalb des ersten Jahres zu 2 von 3 Ereignissen in der Major bzw. 4 von 5 Ereignissen in der Minor Gruppe. Bei keinem der Patienten mit *SOCS-1* WT konnte im ersten Jahr ein Ereignis beobachtet werden. Dies könnte als Anhalt für einen aggressiveren Krankheitsverlauf für Patienten mit mutiertem Tumorsuppressorgen gewertet werden – obgleich sich diese Tendenz bei der Minor Gruppe langfristig an die WT Patienten angleicht (vgl. Abbildung 18 A). Weitere Unterstützung erfährt diese These durch die Beobachtung, dass 2 von 3 Verstorbenen der Major-Gruppe, aber nur 2 von 5 der Minor- bzw. 2 von 4 der WT-Gruppe einen Progress im Rahmen ihrer Erkrankung zeigten. Ein Progress tritt signifikant häufiger bei Patienten der Major Gruppe auf (p = 0.05) (vgl. Abbildung 18 B) und bestärkt so abermals den Trend eines schlechteren Gesamtüberlebens, zumal beide der zwei Major Patienten, die einen Progress erleiden, auch an diesem versterben.

Aus den in Abbildung 18 A angedeutete Überlebenskurven geht eine Tendenz hervor, Patienten der Major Gruppe ein schlechteres Gesamtüberleben zu prädiktieren; dies erreichte jedoch in diesem Kollektiv keine statistische Signifikanz (p = 0,24). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Major Patienten

In Zusammenschau der Ergebnisse von Überlebens- und Progressionsalysen am Hodgkin-Kollektiv zeigte sich in der Major Gruppe ein Trend, Patienten dieser Gruppe ein schlechteres Gesamtüberleben zu prädiktieren (vgl. Abbildung 18 A) - eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht gezeigt werden (p = 0.24). Diese Tendenz findet sich auch in den Werten der 5JÜR wieder, die für Major Patienten mit 75,0 % gegenüber 87,50 % bzw. 90,63 % für Minor und WT angegeben werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Patienten der Major Gruppe signifikant häufiger einen Progress erleiden (p = 0,05) und kurze Zeit später an diesem versterben (vgl. Abbildung 18 B).

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit untersuchten wir den *SOCS-1*-Genstatus als prognostischen Biomarker im klassischen Hodgkin-Lymphom. Bei Patienten mit *SOCS1*-Gensequenzen, die für ein C-terminal trunkiertes Protein kodieren, zeigte sich eine Tendenz für ein schlechteres Gesamtüberleben. Damit legt das Kernergebnis dieser Arbeit nahe, dass es sich bei der Bestimmung des *SOCS-1* Mutationsstatus um einen prognostischen Biomarker im klassischen Hodgkin Lymphom handeln könnte.

Der mikroskopische Aufbau des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL), bei dem die Anzahl an malignen Reed-Sternberg-Zellen um mehr als das Hundertfache von umgebenden entzündlichen Infiltraten überstiegen wird,[58] schränkt auf spezielle Art und Weise die genomische Untersuchung ein. Folglich ist die gezielte Isolation von Nukleinsäuren aus malignen Zellen mit erheblichem methodischem Aufwand verknüpft. Dabei sind die zuverlässige phänotypische Identifizierung und die sensitive Isolation der Tumorzellen bei gleichzeitiger Vermeidung einer Kontamination durch reaktive Begleitzellen wichtige Voraussetzungen. Die Laser-Mikrodissektion (LCM) stellt dabei eine bewährte Möglichkeit der Einzelzellisolation dar.[46] Die LCM erfordert jedoch – neben den erheblichen technisch-apparativen Kosten für Ausrüstung, Materialien sowie Schulung des Personals – selbst bei etablierter Technik eine zeitaufwendige Isolation (pro Fall ca. 4 Std.). Bedingt durch den hohen zeit- und ressourcenintensiven Einsatz der Einzelzell-Mikrodissektion konnten bisher nur wenige Studien Ergebnisse genomischer Untersuchungen von HRS-Zellen zeigen. So konnte beispielsweise eine klonale Population von B-Zellen nachgewiesen werden, deren VDJ-Umlagerungen denen der HRS-Zellen im Lymphknoten entsprechen und die im Blut der meisten Hodgkin-Patienten zirkulieren.[47] In einer weiteren Studie konnte durch eine Analyse mikromanipulierter HRS-Zellen der klonale Ursprung von HRS-Zellen aus Keimzentrums-B-Zellen bewiesen werden, die ihre Fähigkeit verloren haben, Immunglobuline zu produzieren.[77]

Neben der eigentlichen Mikrodissektion trägt der methodische Ablauf sowohl im Vorfeld, als auch im Anschluss, entscheidend zum Gelingen dieser sensitiven Methode bei. So führen bereits kleinste Abweichungen von bewährten Abläufen zu Integritätseinbußen oder gar zum Verlust der DNA bzw. RNA. Der methodische Ablauf des gesamten Analysedurchgangs wurde dahingehend optimiert, dass auch bei geringer Zellzahl, eine konstante Ergebnisqualität gewährleistet werden konnte. Um die Manipulation am Genom so gering wie möglich zu halten, verwendeten wir in allen Fällen eine einfache HE-Färbung zur Identifikation der malignen Zellen. In vielen Studien werden HRS-Zellen immunhistochemisch behandelt, um sie leichter identifizieren zu können. Dies geht oftmals mit einem Verlust von DNA (bis zu 89 %) einher,[37] was eine höhere Anzahl mikrodissektierter Zellen bedingt.[47]

Zur Mikrodissektion stehen im Moment mehrere Systeme zur Verfügung (Arcturus XT, Leica LMD 6000, PALM MicroBeam), die sich hauptsächlich in der Art und Weise, wie die isolierten Zellen „eingesammelt“ werden, unterscheiden. In dieser Arbeit wurde das PALM MicroBeam System der Firma Zeiss verwendet. Im Gegensatz zu den anderen Systemen, werden hier die Zellen entgegen der Schwerkraft in einen Tubendeckel katapultiert, was in hohem Maße eine manipulations- und kontaminationsfreie Kollektion der Einzelzellen ermöglicht. Trotz Weiterentwicklung und Vereinfachung der Methodik, wurde in der Vergangenheit oft nach Alternativmethoden gesucht, spezifische Zellen aus Geweben zu isolieren. Eine dieser Methoden stellt das sog. High-Gradient Magnetic Cell Sorting (MACS) dar, bei dem die gesuchten Zellen magnetisch markiert und so von den anderen separiert werden können. Auf diese Weise ließen sich CD30+HRS-Zellen auf ca. 50 % anreichern.[46] Eine nachfolgende Kontrolle der Reinheit des Isolates mittels Durchflusszytometrie, ergab eine hohe Kontamination mit nicht malignen Zellen, da HRS-Zellen in engem Kontakt zu den Zellen im Umgebungsinfiltrat stehen.[47] Genomische Amplifikation mittels PCR war nach diesen Untersuchungen ebenfalls nicht mehr erfolgreich. Ausreichende Mengen intakter DNA oder RNA könnten aus Zelllinien des cHL extrahiert werden. Insgesamt existieren jedoch nur 6 Modelle, wovon 3 Veränderungen im *SOCS-1*-Genbereich aufweisen, die allesamt zu einem C-terminal trunkierten Protein führen und daher am ehesten dem Major-Typ entsprechen. Eine Zelllinie, die nur Punktmutationen beherbergt (Minor-Typ) ist bisher nicht bekannt. Viele Versuche, HRS-

Zellen zur Proliferation anzuregen, um neue Zelllinien zu etablieren, scheitern jedoch in Anbetracht des speziellen Umgebungsinfiltrates, das sich in vitro nicht zufriedenstellend imitieren lässt.[127] Aufgrund dieser schwierigen Bedingungen bleiben erfolgreiche Kultivierungsversuche wie die Etablierung von UHO-1[70], seltene Erfolgserlebnisse. Die geringe Anzahl an Zelllinien, sowie das Fehlen eines repräsentativen Modelles der Minor-Gruppe, limitieren daher weitere Anstrengungen in diesem Bereich.

Zusammengenommen stellt die Mikrodissektion ein Standardverfahren zur Isolation von Einzelzellen aus Gewebeschnitten dar. Dieser Methode sind viele Fortschritte in der Pathobiologie des Hodgkin-Lymphoms zu verdanken. So konnte 1998 durch den Nachweis von Umstellungen in der VDJ-Region des Immunglobulin-Genbereichs erstmals der B-zelluläre Ursprung der HRS-Zelle aufgedeckt werden.[59] Zudem wurde der Mutationsstatus des Tumorsuppressors SOCS1 erstmals aus Genanalysen mikrodissektierter HRS-Zellen erhoben.[130] Auch in dieser Studie wurde die Mikrodissektion zur Isolation der malignen Zellen herangezogen. Nach der Optimierung des methodischen Ablaufs (vgl. 4.2), gelang die En-bloc-Sequenzierung von Exon –2 des *SOCS-1*-Gens aus einer Anzahl von ca. 50 mikrodissektierten Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die in Vorarbeiten gezeigte pathobiologische Bedeutung von *SOCS-1* im cHL. Das *SOCS-1*-Protein fungiert dabei als wichtiger Tumorsuppressor, dessen Funktionsausfall mit einer gesteigerten Aktivität der JAK-STAT-vermittelten Signaltransduktion, sowie mit einer nukleären Akkumulation von Downstream-Molekülen wie pSTAT5 einhergeht.[130] Diese Beobachtung bestärkt die Hypothese, dass der Grund für die Entwicklung und Proliferation vieler Krebsentitäten in fehlregulierten Signalwegen liegen könnte.[105,124] In der Literatur wird als mögliche Ursache für einen Funktionsausfall des *SOCS-1*-Gens, die aberrante somatische Hypermutation diskutiert. Sie stellt einen etablierten Mechanismus des Gen-Silencings dar.[53] Erstmals 2005 konnte an PMBL-Patienten und in den Zelllinien MedB-1 und Karpas1106 gezeigt werden, dass auch biallelische Deletionen den Grund solcher Funktionsverluste darstellen können.[79,80] Aufgrund der engen Verwandtschaft zum Hodgkin-Lymphom lag die Vermutung nahe, den *SOCS-1*-Mutationsstatus auch in diesem Lymphom zu überprüfen. Hier zeigten sich in

3 von 5 Zelllinien sowie bei 8 von 19 untersuchten Patienten Mutationen im kodierenden Bereich von *SOCS-1*. Auch hier bestand ein Zusammenhang zwischen *SOCS-1* und nukleärer pSTAT5-Akkumulation (p = 0,01).[130] Die Ergebnisse dieser Studie konnten diese Beobachtungen mit einer Mutationsfrequenz von ca. 60 % bestätigen, liefern aber den Zusatz, die Analysen an einer größeren, unabhängigen Patientenkohorte mit klinischem Follow-up von bis zu 17,08 Jahren durchgeführt zu haben.

Das Patientkollektiv umfasste 46 Frauen und 38 Männer mit einem mittleren Alter von 31,19 Jahren (8,79–76,04). Die Verteilung der vier histologischen Subtypen, ergab 54 Fälle vom nodulär-sklerosierenden Typ, 2 Fälle vom lymphozytenarmen Typ, 10 vom gemischtzelligen Typ und 15 vom lymphozytenreichen Typ. Des Weiteren wurden insgesamt 41 weitere klinische sowie immunhistochemische Parameter in die Analyse einbezogen (vgl. Tabelle 8 und Tabelle 9). Zudem standen bei 84 Patienten Daten zum Gesamt- und bei 77 Daten zum progressionsfreien Überleben zur Verfügung.

Bei der Mutationsanalyse zeigte sich der *SOCS-1*-Genbereich in 61,90 % (52 von 84 Fällen) mutiert und bestätigte damit die in Vorarbeiten beschriebene Frequenz von 50 %.[130] Während es sich bei Mutationen der Vorstudie hauptsächlich um Out-of-Frame-Deletionen mit konsekutivem Stoppcodon handelte, waren in diesem Kollektiv Punktmutationen das häufigste Mutationsereignis. Insgesamt wurden 120 Mutationsereignisse nachgewiesen, wobei in vielen Fällen mehrere Ereignisse pro Fall beobachtet werden konnten. Davon waren 102 Missense-PM (85 %), 2 Nonsense-PM (1,66 %), 15 Deletionen (12,5 %) und 1 Insertion (0,83 %). Als mögliche Ursache dieser Veränderungen wurden in diesem Kollektiv Einzelnukleotid-Substitutionen, sog. SNPs, und die somatische Hypermutation (SHM) untersucht. In Arbeiten von Butterbach et al. wurde die Assoziation von genetischen Polymorphismen in bestimmten Genen mit dem Lymphomrisiko verglichen.[13] Für das *SOCS-1*-Gen wurden 10 solcher Polymorphismen beschrieben. Die Analyse sämtlicher Punktmutationen des Hodgkin-Kollektivs konnte in keinem Fall eine Übereinstimmung mit den in 4.8.1 genannten Prädilektionsstellen feststellen. Des Weiteren wurde die aberrante SHM als mögliche Mutationsursache untersucht. Dieser Prozess ist weitgehend auf rearrangierten V-Regionen der Immunglobulin-Gene von Keimzentrums-B-Zellen beschränkt. In naiven B-Zellen fehlen die durch SHM verursachten Aberrationen. Betrifft die SHM jedoch auch Gene, für die normalerweise ein solches

Ereignis nicht vorgesehen ist, bezeichnet man dies als aberrante SHM. Diese ist in diversen B-Zell-Lymphomen für viele Gene vorbeschrieben (PAX5, c-MYC, RHOH, PIM1)[80,110] und tritt vermehrt in sog. Konsensusregionen wie z. B. RGYW-Hotspot-Motiven auf. Um die beschriebenen Hotspot-Motive (RGYW/WRCY, DGYW/WRCH, WA/TW) beider DNA-Stränge innerhalb der *SOCS-1*-Gensequenz identifizieren zu können, wurde das Gene Infinitiy LLC tool (http://www.geneinfinity.org/sms/sms_DNA patterns) verwendet.

Untersuchungen von Mottok et al. an DLBCL- und FL-Patienten beschreiben das Auftreten von Mutationen in Hotspot-Motiven von bis zu 30 %. Da nur 5,6 % des Genbereiches solchen Konsensusregionen entsprechen, ist dies 5,4-mal so häufig, wie bei einer zufälligen Verteilung erwartet wird. Hierbei traten Punktmutationen häufiger in Konsensusregionen auf als Deletionen (23 vs. 6). In unseren Untersuchungen fanden wir in 52 von 84 untersuchten Fällen Mutationen. Fälle mit Punktmutationen wurden gemäß möglicher Konsequenzen auf die Proteinfunktion durch den SIFT-Score (vgl. 4.7) in PMT und PMD unterteilt. Dabei stieg mit zunehmendem Schweregrad einer Mutation der Anteil von Mutationen, die in Konsensusregionen aberranter somatischer Hypermutation lagen: PMT 2,66 %; PMD 10,34 %; nonPM 37,50 %. Außerdem konnten Mutationen im Bereich aberranter SHM oftmals in den C-terminal gelegenen Domänen lokalisiert werden, welche die für die Genfunktion wichtige SH2-Domäne sowie die SOCS-Box enthalten (vgl. Abbildung 17). Dies legt die Vermutung nahe, dass im cHL die Ursache – insbesondere im Falle schwerwiegender Mutationsereignisse – die aberrante SHM sein könnte (vgl. Abbildung 16), wohingegen im DLBCL oder FL eher Punktmutationen mit Konsensusregionen korrelieren.[85] Punktmutationen, die als Folge von SNPs entstehen, beschreiben ein Verhältnis von Transition zu Transversion von ca. 2 : 1. Bei Punktmutationen, die als Folge aberranter SHM entstehen, wird dieses Verhältnis zugunsten der Transversion verschoben. Die im Hodgkin-Kollektiv untersuchten Punktmutationen, die in den besagten Konsensusregionen auftraten, zeigten ein Verhältnis von Transition zu Transversion von 4 : 4, wohingegen bei den übrigen PM 74 Transitionen und 25 Transversionen beobachtet wurden (2,96 : 1). Bei der Untersuchung naiver Keimzentrums-B-Zellen von Patienten, die an DLBCL, FL oder PMBL erkrankt waren, konnten keine Mutationen im *SOCS-1*-Genbereich nachgewiesen werden.[27] Auch im

Hodgkin-Lymphom wurden bei der Untersuchung reaktiver Begleitzellen in keinem Fall Mutationen im *SOCS-1*-Genbereich nachgewiesen.

Die für diese Keimzentrumslymphome beschriebenen Daten deuten zusammen mit den hier aufgezeigten Beobachtungen im cHL darauf hin, dass in den Lymphom-Entitäten mit aberranter SHM die Mutationen im *SOCS-1*-Gen häufig eine Folge fehlgeleiteter Hypermutation sein könnten. Da die meisten dieser Veränderungen den kodierenden Bereich des Gens betreffen, legt dies die mögliche Beeinträchtigung der Genfunktion nahe und bestärkt die Vermutung, dass durch aberrante SHM die maligne Transformation in Keimzentrumslymphomen gefördert werden könnte. In vielen Fällen setzt jedoch der Funktionsverlust eines Gens voraus, dass beide Allele gleichermaßen von einer Veränderung beeinträchtigt sind. Dies konnte durch alleinige Sequenzierung nicht abschließend beantwortet werden. In den Fällen 29, 31, 34, 50, 51, 54, 73, 106 (s. Anhang Abbildung 19) wurde zwar nur das mutierte Allel in der Sequenzierung abgebildet, jedoch kann ursächlich dafür neben biallelischen Mutationen auch ein Verlust des anderen Allels, sog. loss of heterozygosity, oder eine Methylierung der Promotorregion in Frage kommen. So wurde im Leberzellkarzinom eine aberrante Methylierung des *SOCS-1*-Gens mit einer Inzidenz von 65 % der untersuchten Fälle beobachtet.[139] Dabei erfolgte die Methylierung im Intron-1 des *SOCS-1*-Gens, was die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die für eine Transkription nötig sind, behindert.[106,137] Dies deutet auf ein Zusammenspiel mehrerer Pathomechanismen, die in der Folge einen vollständigen Verlust der *SOCS-1*-Genfunktion bedingen können, hin.

Bei der Mutationsanalysen wurde der kodierende Genbereich des *SOCS-1* Gens untersucht, weshalb sich für jede beobachtete Mutation die Möglichkeit einer funktionellen Konsequenz ergibt. Vorarbeiten beschreiben neben der SH2-Domäne vor allem die SOCS-Box als eine für die Proteinfunktion essenzielle Domäne. Nach einer Analyse der Lokalisation aller Mutationen konnten jedoch keine klassischen Hotspots identifiziert werden. Bezieht man jedoch distale Konsequenzen schwerwiegender Mutationsereignisse in die Wichtung mit ein, so konnte eine Patientengruppe identifiziert werden, bei der die SOCS-Box (je nach Wichtung) in ca. 70–100 % der Fälle betroffen war (vgl. Abbildung 15). Diese Patientengruppe, die ein C-terminal trunkiertes *SOCS-1*-Gen aufweist, wurde als „Major“ klassifiziert. Solche Fälle, in denen lediglich Silent- oder

Missense-PM auftraten, wurden als „Minor“ bezeichnet. Einen Vergleich der Mutationsverteilung mit der COSMIC-Datenbank (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)[27,28] zeigt Tabelle 10 (s. Anhang). Die COSMIC-Datenbank enthält 49 Einträge, bestehend aus 31 Patienten und 18 Zelllinien, wobei 6 Fälle keine Angaben zur Position der jeweiligen Mutation enthalten. Insgesamt sind 67 Mutationsereignisse verzeichnet (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/). Unter Berücksichtigung der 3´-Konsequenzen der Mutationen aus Major- und Minor-Kohorte, sowie deren Wichtung, ergab sich eine Fraktion von Fällen mit trunkiertem *SOCS-1*-Protein von 53–75 %. Diese lag damit ungleich höher als der für das Hodgkin-Kollektiv dieser Studie beobachtete Anteil von 15,52–24,14 %. Diese Abweichung erklärt sich aus dem höheren Anteil an Major-Fällen in der COSMIC-Kohorte. In der Gegenüberstellung von Major vs. Minor ergab sich dort eine Verteilung von 23 Fällen und 10 Zelllinien gegenüber 8 Fällen und 6 Zelllinien. Dies entspricht einem Verhältnis von 2,35 : 1, das von dem im Hodgkin-Kollektiv beobachteten (0,3 : 1) zugunsten der Major-Gruppe verschoben ist. Diese Gruppe umfasst 12 von 52 mutierten (23 %) bzw. 104 aller untersuchten Patienten (8,6 %). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Zunahme der Krankheitsprogression innerhalb der Major Gruppe (P = 0,05) sowie eine Tendenz zu schlechterem Gesamtüberleben. Dem *SOCS-1*-Mutationsstatus könnte somit prognostische Bedeutung im Hodgkin-Lymphom zukommen.

Die Zuverlässigkeit aktueller Prädikatoren von Krankheitsverläufen ist ernüchternd. Das Hodgkin-Lymphom ist mit einer 5-JÜR von 80–90 % unter aktuellem Therapiestandard eine maligne Erkrankung mit vergleichsweise guter Prognose. In ca. 15 % der Fälle kommt es jedoch zu einem Therapieversagen mit rasch progredientem Krankheitsverlauf. Die Ursache dafür ist ungeklärt. Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Identifikation eines guten Prognostikators, der eine Einteilung der Patienten in Risikogruppen erlaubt, sodass eine risikoadaptierte Therapie erfolgen kann und eine Über- bzw. Untertherapie vermieden wird. Bis dato ist der erste diagnostische Schritt bei allen Lymphomen das Staging durch die Ann-Arbor-Klassifikation. Diese gibt jedoch nur unzureichend Auskunft über die Entwicklung der Erkrankung. Spezifische Scores – wie der IPI bei agressiven Lymphomen oder der IPS (International Prognostic Score) für fortgeschrittene Hodgkin-

Lymphome, sollten hier Abhilfe schaffen. Doch auch hier gelingt die genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufes nur unzureichend. Ein prognostischer Prädiktor solch fulminanter Krankheitsverläufe könnte sowohl das Verständnis der Erkrankung, als auch die Therapie dieser Patienten enorm verbessern. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, einen Indikator für die 15 % therapierefraktären Verläufe zu finden. Es ist bekannt, dass das *SOCS-1*-Gen in vielen Neoplasien mit bestimmten Krankheitsverläufen assoziiert ist. So geht eine gesteigerte Expression von *SOCS-1*-mRNA in Brustkrebs mit frühem Tumorstadium und besserem Outcome einher,[113] im cHL konnte eine solche Bedeutung noch nicht aufgezeigt werden. Hier wurde bisher mit anderen Markern versucht, eine prognostische Aussage zu treffen. So zeigt eine Studie, dass erhöhte Expression von c-Met mit gutem Outcome assoziiert ist. Eine andere Studie beschreibt das Auftreten von CD68+, tumorassoziierter Makrophagen, als Prädiktor für Therapieversagen, vermindertes progressionsfreies Überleben (PFS) sowie Rezidivneigung nach Stammzell-Transplantation.[80,110] Leider sind die Fallzahlen der meisten Studien oft zu klein oder nicht alle Subtypen sind enthalten, um fundierte Aussagen zur Gesamterkrankung zuzulassen. So findet derzeit keiner dieser Faktoren Anwendung in der klinischen Praxis und man bleibt auf altbewährte Prognosefaktoren wie die körperliche Untersuchung oder die radiologische sowie funktionelle Bildgebung angewiesen.

Der Vergleich von Überlebensparametern in unserer Kohorte mit vorpublizierten Patientenkollektiven bestätigte unsere Kohorte als repräsentativ. Wir konnten eine Subgruppe mit *SOCS-1*-trunkierenden Mutationen identifizieren, deren Größe etwa dem Anteil, der in der Literatur beschriebenen Anzahl therapierefraktärer Fälle entspricht (ca. 15 %).[30] Der pathophysiologische Rückschluss, dass der Funktionsausfall eines Tumorsuppressors einen aggressiveren Krankheitsverlauf bedingen könnte, veranlasste uns, therapierefraktäre Patienten im Hinblick auf einen möglichen Major-Mutationsstatus zu untersuchen. Da die Mikrodissektion ein sehr zeit- und ressourcenintensives Verfahren darstellt, suchten wir nach einem einfacheren Weg *SOCS-1*-trunkierte Patienten zu identifizieren. Wir führten dazu eine Phänotyp-Analyse der Patientengruppen (WT, Minor, Major) mit epidemiologischen, klinischen sowie immunhistochemischen Parametern durch. Die Major-Gruppe korrelierte jedoch gegenüber der WT- bzw. Minor-Gruppe weder mit hohem Tumorstage ($p = 1,0$; $p = 0,51$) noch extranodaler Manifestation

(p = 0,69; p = 1,00) oder anderen Parametern, die laut aktueller Prognosesysteme wie der Ann-Arbor-Klassifikation[17] oder dem International Prognostic Index (IPI)[37], eine schlechte Prognose prädizieren. Alternativ analysierten wir die Fälle mittels immunhistochemischer Färbungen, um auf diesem Wege die genannten Patientengruppen identifizieren zu können. Hierzu wurden 15 für das Hodgkin-Lymphom relevante Marker zur Identifikation herangezogen (vgl. Tabelle 9). So gab es Hinweise für ein vermehrtes zytoplasmatisches, sowie nukleäres Auftreten von pSTAT5 in der WT-Gruppe gegenüber der *SOCS-1* mutierten Patientengruppe (p = 0,06) bzw. (p = 0,02). Bei isoliertem Vergleich der WT mit der Major Gruppe, konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigt werden (p = 1,0 bzw. p = 0,1), sodass anhand dieses Biomarkers keine klare Differenzierung der *SOCS-1* Mutationstypen erfolgen kann, zumal die Tatsache eines durch p-STAT5 gesteigerten Jak-STAT Signalweges innerhalb der WT Gruppe, einer pathobiologischen Erklärung entbehrt. Auch bei den übrigen Einzelparametern ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass es letztlich bei keinem der herangezogenen Parametern möglich war, eine sichere Unterscheidung der SOCS-1 Mutationsgruppen zu gewährleisten. Bei der Kombination mehrerer Einzelparameter ergab sich für die Major-Gruppe im Vergleich zu den WT- bzw. den Minor-Patienten ein vermehrtes Auftreten eines mediastinalen Tumors. Keiner der Patienten innerhalb der Major Gruppe war älter als 45 Jahre. Weiterhin konnte sich die Gruppe durch einen hohen Gehalt an c-Met positiven Tumorzellen (92%) von den anderen Patienten unterschieden (p = 0,07). So kann für Major-Patienten zwar ein Phänotyp der molekularen Subgruppe angenähert werden (vgl. 4.9), jedoch fehlt für eine Verwendung als Surrogate-Marker in klinischer Diagnostik, die nötige Spezifität. Dies bedeutet, dass zum jetzigen Zeitpunkt, der SOCS-1 Mutationsstatus durch Genotypisierung bestimmt werden muss.

Bei Untersuchung der Daten über den Krankheitsverlauf der Patienten ergaben sich Unterschiede im Hinblick auf Prognose und Progressionswahrscheinlichkeit. Trotz sehr heterogener Therapie konnten Unterschiede in den Überlebenskurven der Patientengruppen dargestellt werden. Basierend auf den Ergebnissen von 4.10 lässt sich für Patienten, die der Major-Gruppe angehören, ein aggressiverer Krankheitsverlauf vorhersagen. Es kommt in dieser Gruppe signifikant häufiger zu einer Progression, an deren Folge die meisten Patienten verstarben. Diese Beobachtung innerhalb der

Patientenkohorte, für die ein trunkiertes, und somit möglicherweise funktionskompromittiertes Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden konnte, spiegelt sich auch im Gesamtüberleben wieder. Hier zeigte sich für die Major Gruppe ein ähnliches Phänomen, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,21$). Bei isolierter Betrachtung des Gesamtüberlebens kann in dieser Studie daher nur ein Trend festgehalten werden. Die Theorie eines aggressiveren Verlaufes von Major-Patienten könnte zusätzlich mit einem Wachstums-Assay untermauert werden, in dem Zelllinien mit trunkiertem *SOCS-1*-Protein gegenüber Zelllinien mit Punktmutationen (Minor) oder WT-Zellen, ein schnelleres bzw. aggressiveres Wachstum zeigen. Aktuell existiert allerdings keine Hodgkin Zelllinie mit mutiertem *SOCS-1*-Gen, die nur Punktmutationen ausweist. Darüber hinaus ist bisher nicht geklärt, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden im Krankheitsverlauf um einen Therapieeffekt handelt.

Als Ausblick für weitere Forschungsbemühungen könnte daher angeregt werden, im Rahmen weiterführender Projekte das Hodgkin-Kollektiv mit Therapieversagern anzureichern (in der aktuellen Studie wiesen lediglich 8 von 84 Patienten (9,52 %) einen solchen Verlauf auf). Sollte eine derartige Untersuchung mittels Genotypisierung ein vermehrtes Auftreten von trunkierenden *SOCS-1* Mutationen bei solchen Patienten ergeben, könnten diese Beobachtungen den hier beschriebenen Trend festigen und *SOCS-1* als prognostischen Einzelgen-Biomarker im klassischen Hodgkin Lymphom etablieren. Dies hätte klinische Relevanz, da nun die Möglichkeit bestünde, diese Patientengruppe im Vorfeld zu identifizieren. Unter diesen Voraussetzungen könnte in Zukunft eine Anpassung der Therapie sowie ggf. eine Dosissteigerung vorgenommen werden. Umgekehrt könnten Patienten der übrigen Gruppen frühzeitig über einen, mit 5-JÜR von ca. 90 %, vergleichsweise gutartigen Erkrankungsverlauf, gegenüber der Major-Gruppe (75,0 %) aufgeklärt werden. Trotz heterogener Therapie wurde in keiner der Patientengruppen eine bestimmte Chemotherapie oder Bestrahlung bevorzugt, sodass ein besseres Gesamtüberleben nicht durch eine bestimmte Art der Therapie hervorgerufen wurde (vgl. Tabelle 9). In nachfolgenden Studien wird sich zeigen, ob die Ermittlung des *SOCS-1*-Status zwangsläufig an das Verfahren der Mikrodissektion gebunden bleiben muss. Sollten sich diese Beobachtungen weiter festigen lassen, unterstreicht dies die Bedeutung von *SOCS-1* im cHL und verweist neben einer

Verwendung als prognostischer Marker, auch auf die Möglichkeit, dass *SOCS-1* als Ziel für eine antineoplastische Therapie in Frage kommen könnte.[29,65,143] Da die Mikrodissektion sehr arbeitsaufwendig ist, wäre nach unseren Überlegungen der nächste Schritt, die Entwicklung eines Antikörpers für die immunohistochemische Detektion, der insbesondere C-terminal trunkierte Proteine identifiziert, um anhand dieser Eigenschaft Major Fälle einfacher in der Routinediagnostik bestimmen zu können.

Eine Limitation dieser Studie wird durch die Eigenschaften des Patientenkollektivs selbst definiert. Sämtliche Fälle wurden vom Institut für Pathologie und Rechtsmedizin der Universität Ulm und somit monozentrisch erhoben. Die der Genanalyse angeschlossene Auswertung von Patientendaten erfolgte retrospektiv. Insgesamt wurden 84 Patienten in diese Arbeit eingeschlossen, dennoch ist diese Fallzahl für eine Überlebensanalyse eher gering. Verglichen mit anderen Studien, die Genanalysen aus mikrodissektierten HRS-Zellen zeigen, ist die hier gezeigte Fallzahl jedoch vergleichsweise hoch.[86,130] Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Validation der hier gezeigten Daten durch Fälle, um die das Kollektiv seit Beginn dieser Arbeit (13.08.2009) angewachsen ist.

Bedingt durch den langen Beobachtungszeitraum von bis zu 17 Jahren und ständige Neuerungen moderner Krebstherapien, war die Einteilung der Patienten in einheitliche Behandlungsgruppen nur schwer umsetzbar. Wir unterschieden daher bestrahlte von nicht bestrahlten Patienten, sowie 3 Gruppen der Chemotherapie (ABVD, BEACOPP, und „other“). Dennoch ist es erstaunlich, dass trotz verschiedenster Therapieschemata und der zunehmend personalisierten Krebstherapie, Unterschiede zwischen den Überlebenskurven der Patientengruppen gezeigt werden konnten (vgl. Abbildung 18). Auch der Anteil therapierefraktärer Fälle blieb mit ca. 15 % seit einigen Jahren annähernd konstant.[30]

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen geben keinen Hinweis auf die Zygotie der jeweiligen Mutation. Der Funktionsverlust eines Gens setzt oftmals einen biallelischen Verlust der kodierenden Region voraus. Eine allelspezifische Amplifikation war bei fehlenden Hotspots und stark heterogener Mutationsart nicht möglich. In einigen Fällen konnte bei der Sequenzierung nur das mutierte Allel nachgewiesen werden (Fall

29, 31, 34, 50, 51, 54, 73, 106 (vgl. Anhang Abbildung 19)), jedoch kommt neben einer biallelischen Mutation auch ein Verlust des Allels (loss of heterozygoty) oder die Methylierung der Promotorregion in Frage. Beide Ereignisse sind für das *SOCS-1*-Gen in der Literatur als Eigenschaft von neoplastischen Zellen beschrieben,[139,141] sodass die Möglichkeit eines kombinierten Auftretens naheliegend erscheint.

Die Analyse von genomischen Veränderungen erlaubt nicht zwangsläufig einen Rückschluss darauf, inwieweit ein Protein bei Transkription, Translation oder Funktionalität tatsächlich kompromittiert ist. Scoring-Systeme wie der in 4.7 erwähnte SIFT-Score errechnen lediglich einen prädiktiven Vorhersagewert. In Einzelfällen gelang es jedoch, *SOCS-1*-mRNA nachzuweisen und so genomische Mutationen im RNA-Transkript zu bestätigen (vgl. 4.5). Dies bestätigt, dass die Transkription mutierter Genbereiche grundsätzlich möglich ist, lässt jedoch mögliche Auswirkungen auf die Translation unbeantwortet. Diese Studie erhebt allerdings keinen Anspruch auf einen kausalen oder biologischen Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben bzw. Progressionswahrscheinlichkeit und dem *SOCS-1*-Genstatus, sondern zeigt lediglich eine Assoziation beider Beobachtungen auf. In der Zusammenschau aktueller Publikationen, deutet vieles auf eine biologische Verknüpfung beider Phänomene hin, jedoch sind für eine fundierte Aussage weitere Forschungsanstrengungen nötig.

In dieser Arbeit untersuchten wir die Bedeutung des *SOCS-1*-Mutationsstatus mikrodisseztierter HRS-Zellen im cHL. Vorarbeiten bestätigen die wichtige, biologische Rolle des Tumorsupressors *SOCS-1* in der Onkogenese maligner B-Zell-Lymphome. Dem Mutationsstatus dieses Gens könnte daher im klinischen Verlauf und bei der Prognose von Hodgkin-Patienten Bedeutung zukommen. Da die Mikrodissektion eine für die Routinediagnostik zu zeit- und ressourcenintensive Untersuchungsmethode darstellt, bleibt zu zeigen, ob andere Methoden zukünftig in der Lage sein könnten, den Mutationsstatus des *SOCS-1* Gens zuverlässig zu bestimmen. Durch genomweite Analysemethoden könnte es bald einfacher möglich sein, den *SOCS-1*-Mutationsstatus von HRS-Zellen zu ermitteln. Da wir in allen Zellen des Begleitinfiltrates einen *SOCS-1*-WT nachweisen konnten, müssten die Methoden die nötige Sensitivität besitzen, die seltenen

Sequenzen der Tumorzellen aus denen des Umgebungsinfiltrates herauszustellen. Sollte die Mikrodissektion weiterhin als Goldstandard zur Zellisolation im cHL bestehen bleiben, stellen automatische Zell-Erkennungs-Softwares eine vielversprechende Alternative dar, zeitintensive Vorgänge zu automatisieren. Zurzeit arbeiten wir an einer immmunhistochemischen Detektionsmethode von C-terminal trunkiertem *SOCS-1*. Ein Versuch, mit derartigen Antikörpern den *SOCS-1*-Status in cHL-Gewebeproben zu bestimmen (sog. „epitope walking"), hat bereits begonnen. Diese Arbeit liefert damit einen wichtigen Ausgangspunkt für nachfolgende klinische und translationale Fragestellungen.

Zusammenfassend konnten wir in einer für das Hodgkin-Lymphom repräsentativen Kohorte eine Tendenz aufzeigen, bei der Patienten mit trunkierenden Mutationen im *SOCS-1* Genbereich einen aggressiveren Krankheitsverlauf aufwiesen. Es bleibt jedoch zu bestätigen, ob sich dieser Trend weiter festigen lässt, um den SOCS-1 Genstatus als prognostischen Einzelgen-Biomarker im Hodgkin-Lymphom zu etablieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Hodgkin-Lymphom besitzt im Gegensatz zu vielen anderen malignen Erkrankungen eine vergleichsweise gute Prognose. Trotz optimaler Therapie versterben ca. 15 % aller Patienten an einem fulminanten Krankheitsverlauf. Weder Ursache noch Auftreten dieses Prozesses kann durch aktuelle prognostische Scores vorhergesagt werden. Untersuchungen der malignen Zellen stellen aufgrund der speziellen Tumormorphologie eine enorm zeit- und ressourcenintensive Herausforderung dar. In Vorarbeiten wurden Mutationen im *SOCS-1* (suppressor of cytokine signaling-1)-Gen von Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen beschrieben, welches für einen Negativregulator im JAK-STAT (Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription)-Signalweg kodiert. Die Rolle des *SOCS-1*-Status als prognostischer Biomarker im Hodgkin-Lymphom konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden und war daher Gegenstand dieser Arbeit.

Genomische Untersuchungen der DNA von Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen erfordern deren Isolation aus einem Umgebungsinfiltrat reaktiver Zellen mittels Mikrodissektion. Das Material entstammt dem Archiv des Instituts für Pathologie und Rechtsmedizin der Universität Ulm. Der methodische Ablauf wurde angepasst, um bei möglichst geringer Anzahl von Zellen eine konstante Ergebnisqualität gewährleisten zu können. Durch Sequenzierung des *SOCS-1*-Genbereichs konnte der Mutationsstatus von 96 Patienten erhoben werden. In Einzelfällen gelang es, genomische Mutationen auch posttranskriptionell in isolierter RNA zu bestätigen. Wir konnten zeigen, dass in ca. 61 % der untersuchten Fälle Mutationen im *SOCS-1*-Genbereich vorlagen. Unter Berücksichtigung der distalen Konsequenzen einer Mutation wurden alle Patienten gemäß dem Schweregrad ihrer Mutation den Gruppen „Wildtyp“, „Minor“ und „Major“ zugeordnet. Punktmutationen wurden durch den SIFT-Score (sorting intolerant from tolerant) weiter in „tolerated“ und „damaging“ subklassifiziert. Schwerwiegende Mutationen traten vermehrt in Konsensusregionen aberranter somatischer Hypermutation auf. Die von uns definierten Patientengruppen (Wildtyp, Minor, Major) unterschieden sich weder in klinisch-epidemiologischen noch in immunhistochemischen Parametern. Beim Krankheitsverlauf jedoch zeigten Patienten der Major Gruppe einen aggressiveren Krankheitsverlauf mit signifikant

häufigerem Auftreten einer Krankheitsprogression sowie einem Trend zu kürzerem Gesamtüberleben.

SOCS-1-Sequenzmutationen fanden sich in 60 % der klassischen Hodgkin-Lymphome. Dabei zeigten die schwerwiegenderen Mutationen eine signifikant häufigeres Vorkommen einer Krankheitsprogression mit anschließender Todesfolge, sowie einen Trend zu kürzerem Gesamtüberleben. Damit liefert diese Arbeit erste wichtige Hinweise darauf, dass SOCS-1 einen Tumorzellspezifischen prognostischem Biomarker im klassischen Hodgkin-Lymphom darstellt.

LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichniss

1. Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L. & Rickinson, A.B. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol* **64**, 2126-2134 (1990).

2. Alexander, W.S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 410-416 (2002).

3. Alexander, W.S. & Hilton, D.J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* **22**, 503-529 (2004).

4. Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpinarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* **174**, 2591-2601 (2005).

5. Babon, J.J., McManus, E.J., Yao, S., DeSouza, D.P., Mielke, L.A., Sprigg, N.S., Willson, T.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Baca, M., Nicholson, S.E. & Norton, R.S. The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* **22**, 205-216 (2006).

6. Baetz, A., Koelsche, C., Strebovsky, J., Heeg, K. & Dalpke, A.H. Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *FASEB J* **22**, 4296-4305 (2008).

7. Banks, A.S., Li, J., McKeag, L., Hribal, M.L., Kashiwada, M., Accili, D. & Rothman, P.B. Deletion of SOCS7 leads to enhanced insulin action and enlarged islets of Langerhans. *J Clin Invest* **115**, 2462-2471 (2005).

8. Bargou, R.C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M.Y., Arnold, W., Royer, H.D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C. & Dorken, B. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* **100**, 2961-2969 (1997).

9. Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C. & Kuppers, R. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood* **106**, 4345-4350 (2005).

10. Bjorkholm, M., Axdorph, U., Grimfors, G., Merk, K., Johansson, B., Landgren, O., Svedmyr, E., Mellstedt, H. & Holm, G. Fixed versus response-adapted MOPP/ABVD chemotherapy in Hodgkin's disease. A prospective randomized trial. *Ann Oncol* **6**, 895-899 (1995).

11. Braeuninger, A., Kuppers, R., Strickler, J.G., Wacker, H.H., Rajewsky, K. & Hansmann, M.L. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9337-9342 (1997).

12. Bullock, A.N., Debreczeni, J.E., Edwards, A.M., Sundstrom, M. & Knapp, S. Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7637-7642 (2006).

13. Butterbach, K., Beckmann, L., de Sanjosé, S., Benavente, Y., Becker, N., Foretova, L., Maynadie, M., Cocco, P., Staines, A., Boffetta, P., Brennan, P. & Nieters, A. Association of JAK-STAT pathway related genes with lymphoma risk: results of a European case-control study (EpiLymph). *British Journal of Haematology* **153**, 318-333 (2011).

14. Calabrese, V., Mallette, F.A., Deschenes-Simard, X., Ramanathan, S., Gagnon, J., Moores, A., Ilangumaran, S. & Ferbeyre, G. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* **36**, 754-767 (2009).

15. Campo, E., Swerdlow, S.H., Harris, N.L., Pileri, S., Stein, H. & Jaffe, E.S. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019-5032 (2011).

16. Carbone, A., Gloghini, A., Gruss, H.J. & Pinto, A. CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **147**, 912-922 (1995).

17. Carbone, P.P., Kaplan, H.S., Musshoff, K., Smithers, D.W. & Tubiana, M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res* **31**, 1860-1861 (1971).

18. Chong, M.M., Cornish, A.L., Darwiche, R., Stanley, E.G., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Hilton, D.J., Starr, R., Alexander, W.S. & Kay, T.W. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity* **18**, 475-487 (2003).

19. Daegelmann, C., Herberth, G., Roder, S., Herbarth, O., Giese, T., Kramer, U., Behrendt, H., Borte, M., Heinrich, J., Emmrich, F. & Lehmann, I. Association between suppressors of cytokine signalling, T-helper type 1/T-helper type 2 balance and allergic sensitization in children. *Clin Exp Allergy* **38**, 438-448 (2008).

20. De Sepulveda, P., 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 J* **18**, 904-915 (1999).

21. Dickensheets, H., Vazquez, N., Sheikh, F., Gingras, S., Murray, P.J., Ryan, J.J. & Donnelly, R.P. Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes Immun* **8**, 21-27 (2007).

22. Diehl, V., Klimm, B. & Re, D. Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next? *Eur J Haematol Suppl*, 6-13 (2005).

23. Drexler, H.G. Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. II. Continuous cell lines. *Leuk Lymphoma* **9**, 1-25 (1993).

24. Drexler, H.G., Gignac, S.M., Hoffbrand, A.V. & Minowada, J. Formation of multinucleated cells in a Hodgkin's-disease-derived cell line. *Int J Cancer* **43**, 1083-1090 (1989).

25. Egwuagu, C.E., Yu, C.R., Zhang, M., Mahdi, R.M., Kim, S.J. & Gery, I. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* **168**, 3181-3187 (2002).

26. 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).

27. Forbes, S.A., Bhamra, G., Bamford, S., Dawson, E., Kok, C., Clements, J., Menzies, A., Teague, J.W., Futreal, P.A. & Stratton, M.R. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet.* **Chapter**, Unit 10.11. (2008).

28. Forbes, S.A., Tang, G., Bindal, N., Bamford, S., Dawson, E., Cole, C., Kok, C.Y., Jia, M., Ewing, R., Menzies, A., Teague, J.W., Stratton, M.R. & Futreal, P.A. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **38**, D652-657. Epub 2009 Nov 2011. (2010).

29. Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R. & Herman, J.G. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* **101**, 2784-2788 (2003).

30. Goda, J.S., Massey, C., Kuruvilla, J., Gospodarowicz, M.K., Wells, W., Hodgson, D.C., Sun, A., Keating, A., Crump, M. & Tsang, R.W. Role of Salvage Radiation Therapy for Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma Who Failed Autologous Stem Cell Transplant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5**, 5 (2012).

31. Gregorieff, A., Pyronnet, S., Sonenberg, N. & Veillette, A. Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *J Biol Chem* **275**, 21596-21604 (2000).

32. Harada, M., Nakashima, K., Hirota, T., Shimizu, M., Doi, S., Fujita, K., Shirakawa, T., Enomoto, T., Yoshikawa, M., Moriyama, H., Matsumoto, K., Saito, H., Suzuki, Y., Nakamura, Y. & Tamari, M. Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**, 491-496 (2007).

33. Harrington, L.E., Mangan, P.R. & Weaver, C.T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* **18**, 349-356 (2006).

34. Harris, N.L. Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* **12**, 159-175 (1999).

35. Harris, N.L. Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol* **36**, 220-232 (1999).

36. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., Gatter, K.C. & et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361-1392 (1994).

37. Hasenclever, D. & Diehl, V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* **339**, 1506-1514 (1998).

38. Hashimoto, M., Ayada, T., Kinjyo, I., Hiwatashi, K., Yoshida, H., Okada, Y., Kobayashi, T. & Yoshimura, A. Silencing of SOCS1 in macrophages suppresses tumor development by enhancing antitumor inflammation. *Cancer Sci* **100**, 730-736 (2009).

39. He, B., You, L., Uematsu, K., Zang, K., Xu, Z., Lee, A.Y., Costello, J.F., McCormick, F. & Jablons, D.M. SOCS-3 is frequently silenced by

hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14133-14138 (2003).

40. Hertel, C.B., Zhou, X.G., Hamilton-Dutoit, S.J. & Junker, S. Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene* **21**, 4908-4920 (2002).

41. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 114-119 (1998).

42. Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H. & Scheidereit, C. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* **196**, 605-617 (2002).

43. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans* **17**, 68-114 (1832).

44. Huang, F.J., Steeg, P.S., Price, J.E., Chiu, W.T., Chou, P.C., Xie, K., Sawaya, R. & Huang, S. Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis. *Cancer Res* **68**, 9634-9642 (2008).

45. Hwang, M.N., Min, C.H., Kim, H.S., Lee, H., Yoon, K.A., Park, S.Y., Lee, E.S. & Yoon, S. The nuclear localization of SOCS6 requires the N-terminal region and negatively regulates Stat3 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun* **360**, 333-338 (2007).

46. Irsch, J., Nitsch, S., Hansmann, M.L., Rajewsky, K., Tesch, H., Diehl, V., Jox, A., Kuppers, R. & Radbruch, A. Isolation of viable Hodgkin and Reed-Sternberg cells from Hodgkin disease tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 10117-10122. (1998).

47. Jones, R.J., Gocke, C.D., Kasamon, Y.L., Miller, C.B., Perkins, B., Barber, J.P., Vala, M.S., Gerber, J.M., Gellert, L.L., Siedner, M., Lemas, M.V., Brennan, S., Ambinder, R.F. & Matsui, W. Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **113**, 5920-5926 (2009).

48. Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W.G., Jr., 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 Dev* **12**, 3872-3881 (1998).

49. Kanzler, H., Kuppers, 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. *J Exp Med* **184**, 1495-1505 (1996).

50. Kapp, U., Wolf, J., Hummel, M., Pawlita, M., von Kalle, C., Dallenbach, F., Schwonzen, M., Krueger, G.R., Muller-Lantzsch, N., Fonatsch, C. & et al. Hodgkin's lymphoma-derived tissue serially transplanted into severe combined immunodeficient mice. *Blood* **82**, 1247-1256 (1993).

51. 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).

52. Koelsche, C., Strebovsky, J., Baetz, A. & Dalpke, A.H. Structural and functional analysis of a nuclear localization signal in SOCS1. *Mol Immunol* **46**, 2474-2480 (2009).

53. Komazaki, T., Nagai, H., Emi, M., Terada, Y., Yabe, A., Jin, E., Kawanami, O., Konishi, N., Moriyama, Y., Naka, T. & Kishimoto, T. Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human pancreatic cancers. *Jpn J Clin Oncol* **34**, 191-194 (2004).

54. Krebs, D.L. & Hilton, D.J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**, 378-387 (2001).

55. Krebs, D.L., Uren, R.T., Metcalf, D., Rakar, S., Zhang, J.G., Starr, R., De Souza, D.P., Hanzinikolas, K., Eyles, J., Connolly, L.M., Simpson, R.J., Nicola, N.A., Nicholson, S.E., Baca, M., Hilton, D.J. & Alexander, W.S. SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation. *Mol Cell Biol* **22**, 4567-4578 (2002).

56. Kubo, M., Hanada, T. & Yoshimura, A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* **4**, 1169-1176 (2003).

57. Kuppers, R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* **9**, 15-27 (2009).

58. Kuppers, R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 491-496 (2009).

59. Kuppers, R., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* **9 Suppl 5**, S17-20 (1998).

60. Kuppers, R., Kanzler, H., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. Single cell analysis of Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Ann Oncol* **7 Suppl 4**, 27-30 (1996).

61. Kuppers, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10962-10966 (1994).

62. Kuppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L. & Rajewsky, K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* **12**, 4955-4967 (1993).

63. Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V.D., Poirel, H., Quang, C.T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J. & Bernard, O.A. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* **278**, 1309-1312 (1997).

64. Lee, K.H., Moon, K.J., Kim, H.S., Yoo, B.C., Park, S., Lee, H., Kwon, S., Lee, E.S. & Yoon, S. Increased cytoplasmic levels of CIS, SOCS1, SOCS2, or SOCS3 are required for nuclear translocation. *FEBS Lett* **582**, 2319-2324 (2008).

65. Lesinski, G.B., Zimmerer, J.M., Kreiner, M., Trefry, J., Bill, M.A., Young, G.S., Becknell, B. & Carson, W.E., 3rd. Modulation of SOCS protein expression influences the interferon responsiveness of human melanoma cells. *BMC Cancer* **10**, 142 (2010).

66. Li, S., Chen, S., Xu, X., Sundstedt, A., Paulsson, K.M., Anderson, P., Karlsson, S., Sjogren, H.O. & Wang, P. Cytokine-induced Src homology 2 protein (CIS) promotes T cell receptor-mediated proliferation and prolongs survival of activated T cells. *J Exp Med* **191**, 985-994 (2000).

67. Lonergan, K.M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W. & Kaelin, W.G., Jr. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* **18**, 732-741 (1998).

68. Lukes, R.J. & Butler, J.J. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* **26**, 1063-1083 (1966).

69. Mader, A., Bruderlein, S., Wegener, S., Melzner, I., Popov, S., Muller-Hermelink, H.K., Barth, T.F., Viardot, A. & Moller, P. U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res* **119**, 204-210 (2007).

70. Mader, A., Bruderlein, S., Wegener, S., Melzner, I., Popov, S., Muller-Hermelink, H.K., Barth, T.F., Viardot, A. & Moller, P. U-HO1, a new cell line derived from a primary refractory classical Hodgkin lymphoma. *Cytogenet Genome Res.* **119**, 204-210. Epub 2008 Feb 2001. (2007).

71. Mallette, F.A., Calabrese, V., Ilangumaran, S. & Ferbeyre, G. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging (Albany NY)* **2**, 445-452 (2010).

72. Mancao, C. & Hammerschmidt, W. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* **110**, 3715-3721 (2007).

73. Mani, H. & Jaffe, E.S. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma* **9**, 206-216 (2009).

74. Mansell, A., Smith, R., Doyle, S.L., Gray, P., Fenner, J.E., Crack, P.J., Nicholson, S.E., Hilton, D.J., O'Neill, L.A. & Hertzog, P.J. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* **7**, 148-155 (2006).

75. Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H.D., Falini, B., Delsol, G., Isaacson, P.G., Pileri, S. & Stein, H. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* **337**, 453-458 (1997).

76. Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. & Stein, H. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* **95**, 1443-1450 (2000).

77. Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H.D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. & Stein, H. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* **95**, 1443-1450. (2000).

78. Melnikov, A.A., Scholtens, D., Talamonti, M.S., Bentrem, D.J. & Levenson, V.V. Methylation profile of circulating plasma DNA in patients with pancreatic cancer. *J Surg Oncol* **99**, 119-122 (2009).

79. 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).

80. 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. *Int J Cancer* **118**, 1941-1944 (2006).

81. Metcalf, D., Greenhalgh, C.J., Viney, E., Willson, T.A., Starr, R., Nicola, N.A., Hilton, D.J. & Alexander, W.S. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* **405**, 1069-1073 (2000).

82. Molin, D., Fischer, M., Xiang, Z., Larsson, U., Harvima, I., Venge, P., Nilsson, K., Sundstrom, C., Enblad, G. & Nilsson, G. Mast cells express functional CD30 ligand and are the predominant CD30L-positive cells in Hodgkin's disease. *Br J Haematol* **114**, 616-623 (2001).

83. Moller, P., Bruderlein, S., Strater, J., Leithauser, F., Hasel, C., Bataille, F., Moldenhauer, G., Pawlita, M. & Barth, T.F. MedB-1, a human tumor cell line derived from a primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Int J Cancer* **92**, 348-353 (2001).

84. Mooney, R.A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L.M., Shang, Y. & Furlanetto, R.W. Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* **276**, 25889-25893 (2001).

85. Mottok, A., Renne, C., Seifert, M., Oppermann, E., Bechstein, W., Hansmann, M.L., Kuppers, R. & Brauninger, A. Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood* **114**, 4503-4506 (2009).

86. Mottok, A., Renne, C., Willenbrock, K., Hansmann, M.L. & Brauninger, A. Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood.* **110**, 3387-3390. Epub 2007 Jul 3325. (2007).

87. Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., Gattinoni, L., Wrzesinski, C., Hinrichs, C.S., Kerstann, K.W., Feigenbaum, L., Chan, C.C. & Restifo, N.P. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362-373 (2008).

88. Muschen, M., Rajewsky, K., Brauninger, A., Baur, A.S., Oudejans, J.J., Roers, A., Hansmann, M.L. & Kuppers, R. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* **191**, 387-394 (2000).

89. Nagai, H., Kim, Y.S., Konishi, N., Baba, M., Kubota, T., Yoshimura, A. & Emi, M. Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* **186**, 59-65 (2002).

90. 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).

91. Narazaki, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T., Yoshizaki, K., Naka, T. & Kishimoto, T. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13130-13134 (1998).

92. Neuwirt, H., Puhr, M., Santer, F.R., Susani, M., Doppler, W., Marcias, G., Rauch, V., Brugger, M., Hobisch, A., Kenner, L. & Culig, Z. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 is expressed in human prostate cancer and exerts growth-inhibitory function through down-regulation of cyclins and cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol* **174**, 1921-1930 (2009).

93. 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 J* **18**, 375-385 (1999).

94. Nosho, K., Irahara, N., Shima, K., Kure, S., Kirkner, G.J., Schernhammer, E.S., Hazra, A., Hunter, D.J., Quackenbush, J., Spiegelman, D., Giovannucci, E.L., Fuchs, C.S. & Ogino, S. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One* **3**, e3698 (2008).

95. Ohno, T., Stribley, J.A., Wu, G., Hinrichs, S.H., Weisenburger, D.D. & Chan, W.C. Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **337**, 459-465 (1997).

96. Okochi, O., Hibi, K., Sakai, M., Inoue, S., Takeda, S., Kaneko, T. & Nakao, A. Methylation-mediated silencing of SOCS-1 gene in hepatocellular carcinoma derived from cirrhosis. *Clin Cancer Res* **9**, 5295-5298 (2003).

97. Palmer, D.C. & Restifo, N.P. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* **30**, 592-602 (2009).

98. Peeters, P., Raynaud, S.D., Cools, J., Wlodarska, I., Grosgeorge, J., Philip, P., Monpoux, F., Van Rompaey, L., Baens, M., Van den Berghe, H. & Marynen, P. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* **90**, 2535-2540 (1997).

99. Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., Peelman, F. & Tavernier, J. Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *J Biol Chem* **281**, 32953-32966 (2006).

100. Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F. & Tavernier, J. The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 371-381 (2008).

101. Pinto, A., Aldinucci, D., Gloghini, A., Zagonel, V., Degan, M., Improta, S., Juzbasic, S., Todesco, M., Perin, V., Gattei, V., Herrmann, F., Gruss, H.J. & Carbone, A. Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. *Blood* **88**, 3299-3305 (1996).

102. Poppema, S. Immunology of Hodgkin's disease. *Baillieres Clin Haematol* **9**, 447-457 (1996).

103. Poppema, S., Potters, M., Emmens, R., Visser, L. & van den Berg, A. Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol* **36**, 253-259 (1999).

104. Raccurt, M., Tam, S.P., Lau, P., Mertani, H.C., Lambert, A., Garcia-Caballero, T., Li, H., Brown, R.J., McGuckin, M.A., Morel, G. & Waters, M.J. Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma. *Br J Cancer* **89**, 524-532 (2003).

105. Rottapel, R., Ilangumaran, S., Neale, C., La Rose, J., Ho, J.M., Nguyen, M.H., Barber, D., Dubreuil, P. & de Sepulveda, P. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene* **21**, 4351-4362 (2002).

106. Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S. & Mak, T.W. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell.* **104**, 33-42. (2001).

107. 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. *Mol Cell* **12**, 1413-1426 (2003).

108. Sakamoto, H., Yasukawa, H., Masuhara, M., Tanimura, S., Sasaki, A., Yuge, K., Ohtsubo, M., Ohtsuka, A., Fujita, T., Ohta, T., Furukawa, Y., Iwase, S., Yamada, H. & Yoshimura, A. A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood* **92**, 1668-1676 (1998).

109. Sakamoto, L.H., B, D.E.C., Cajaiba, M., Soares, F.A. & Vettore, A.L. MT1G hypermethylation: a potential prognostic marker for hepatoblastoma. *Pediatr Res* **67**, 387-393 (2010).

110. Sambade, C., Berglund, M., Lagercrantz, S., Sallstrom, J., Reis, R.M., Enblad, G., Glimelius, B. & Sundstrom, C. U-2940, a human B-cell line derived from a diffuse large cell lymphoma sequential to Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* **118**, 555-563. (2006).

111. Sasaki, A., Inagaki-Ohara, K., Yoshida, T., Yamanaka, A., Sasaki, M., Yasukawa, H., Koromilas, A.E. & Yoshimura, A. The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6. *J Biol Chem* **278**, 2432-2436 (2003).

112. Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A. & Yoshimura, A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* **4**, 339-351 (1999).

113. Sasi, W., Jiang, W.G., Sharma, A. & Mokbel, K. Higher expression levels of SOCS 1,3,4,7 are associated with earlier tumour stage and better clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer* **10**, 178 (2010).

114. Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M.L. & Kuppers, R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol* **4**, 151-174 (2009).

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

116. Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C. & Stein, H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood* **95**, 3020-3024 (2000).

117. Seki, Y., Hayashi, K., Matsumoto, A., Seki, N., Tsukada, J., Ransom, J., Naka, T., Kishimoto, T., Yoshimura, A. & Kubo, M. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-

dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13003-13008 (2002).

118. Seki, Y., Inoue, H., Nagata, N., Hayashi, K., Fukuyama, S., Matsumoto, K., Komine, O., Hamano, S., Himeno, K., Inagaki-Ohara, K., Cacalano, N., O'Garra, A., Oshida, T., Saito, H., Johnston, J.A., Yoshimura, A. & Kubo, M. SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat Med* **9**, 1047-1054 (2003).

119. Skinnider, B.F. & Mak, T.W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**, 4283-4297 (2002).

120. Sporri, B., Kovanen, P.E., Sasaki, A., Yoshimura, A. & Leonard, W.J. JAB/SOCS1/SSI-1 is an interleukin-2-induced inhibitor of IL-2 signaling. *Blood* **97**, 221-226 (2001).

121. 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).

122. Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H. & et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* **66**, 848-858 (1985).

123. 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 J* **25**, 863-874 (2011).

124. Sutherland, K.D., Lindeman, G.J., Choong, D.Y., Wittlin, S., Brentzell, L., Phillips, W., Campbell, I.G. & Visvader, J.E. Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene* **23**, 7726-7733 (2004).

125. Turnley, A.M., Faux, C.H., Rietze, R.L., Coonan, J.R. & Bartlett, P.F. Suppressor of cytokine signaling 2 regulates neuronal differentiation by inhibiting growth hormone signaling. *Nat Neurosci* **5**, 1155-1162 (2002).

126. Tzankov, A., Bourgau, C., Kaiser, A., Zimpfer, A., Maurer, R., Pileri, S.A., Went, P. & Dirnhofer, S. Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod Pathol* **18**, 1542-1549 (2005).

127. Tzankov, A. & Dirnhofer, S. Pathobiology of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology.* **73**, 107-125. (2006).

128. Verdier, F., Chretien, S., Muller, O., Varlet, P., Yoshimura, A., Gisselbrecht, S., Lacombe, C. & Mayeux, P. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* **273**, 28185-28190 (1998).

129. Weber, A., Hengge, U.R., Bardenheuer, W., Tischoff, I., Sommerer, F., Markwarth, A., Dietz, A., Wittekind, C. & Tannapfel, A. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* **24**, 6699-6708 (2005).

130. 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. *Oncogene* **25**, 2679-2684 (2006).

131. Willenbrock, K., Ichinohasama, R., Kadin, M.E., Miura, I., Terui, T., Meguro, K., Fukuhara, O., DeCoteau, J.F. & Hansmann, M.L. T-cell variant of classical Hodgkin's lymphoma with nodal and cutaneous manifestations demonstrated by single-cell polymerase chain reaction. *Lab Invest* **82**, 1103-1109 (2002).

132. Wood, K.M., Roff, M. & Hay, R.T. Defective IkappaBalpha in Hodgkin cell lines with constitutively active NF-kappaB. *Oncogene* **16**, 2131-2139 (1998).

133. Wu, L.M., Zhang, F., Zhou, L., Yang, Z., Xie, H.Y. & Zheng, S.S. Predictive value of CpG island methylator phenotype for tumor recurrence in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *BMC Cancer* **10**, 399 (2010).

134. Wu, T.C., Mann, R.B., Charache, P., Hayward, S.D., Staal, S., Lambe, B.C. & Ambinder, R.F. Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **46**, 801-804 (1990).

135. 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).

136. 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 J* **18**, 1309-1320 (1999).

137. Ye, H., Liu, H., Raderer, M., Chott, A., Ruskone-Fourmestraux, A., Wotherspoon, A., Dyer, M.J., Chuang, S.S., Dogan, A., Isaacson, P.G. & Du, M.Q. High incidence of t(11;18)(q21;q21) in Helicobacter pylori-negative gastric MALT lymphoma. *Blood.* **101**, 2547-2550. Epub 2002 Nov 2527. (2003).

138. Yoshida, T., Ogata, H., Kamio, M., Joo, A., Shiraishi, H., Tokunaga, Y., Sata, M., Nagai, H. & Yoshimura, A. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* **199**, 1701-1707 (2004).

139. Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C. & Herman, J.G. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* **28**, 29-35 (2001).

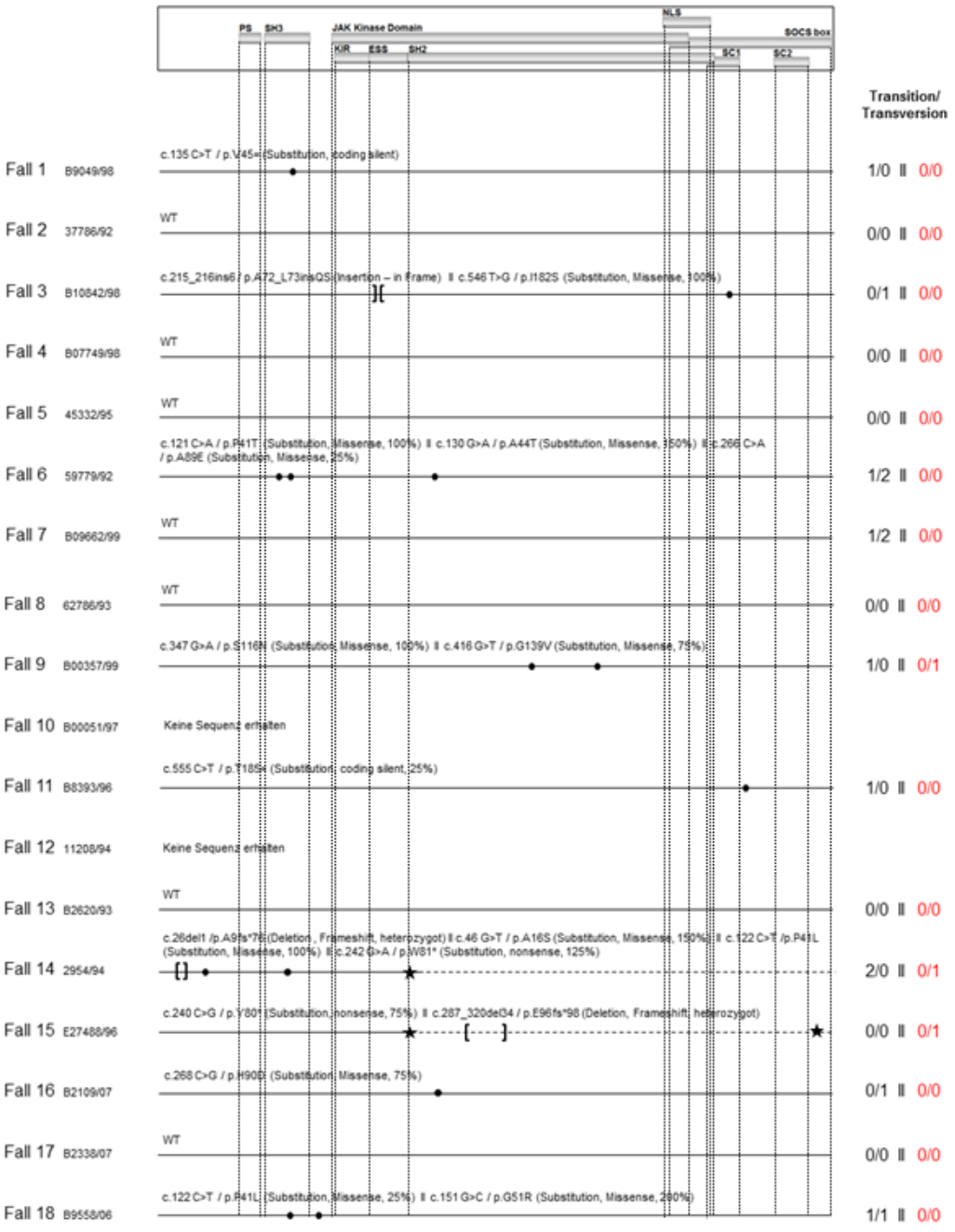
140. Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Hara, T. & Miyajima, A. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* **14**, 2816-2826 (1995).

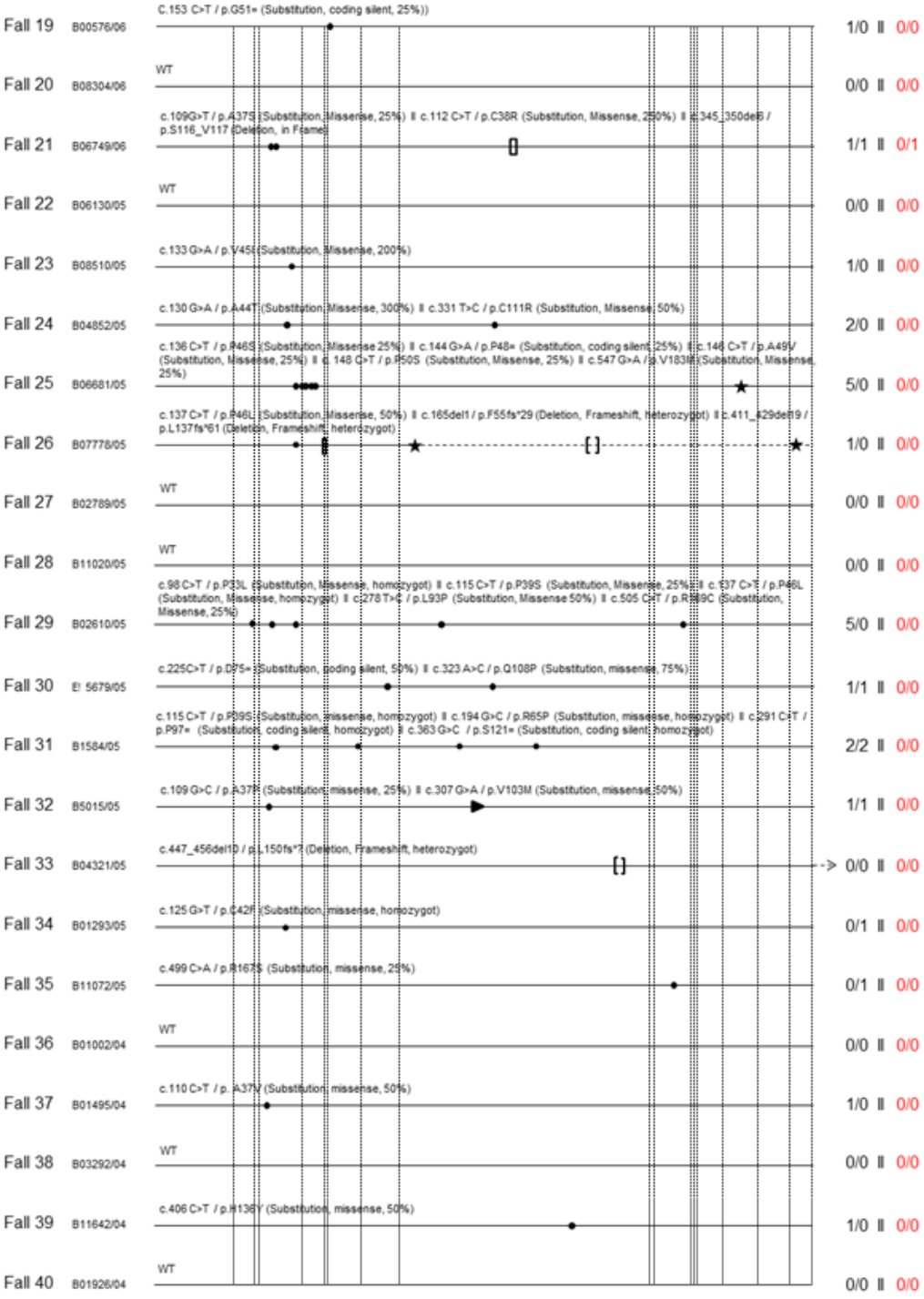
141. Zhang, J., Li, H., Yu, J.P., Wang, S.E. & Ren, X.B. Role of SOCS1 in tumor progression and therapeutic application. *Int J Cancer* **130**, 1971-1980 (2012).

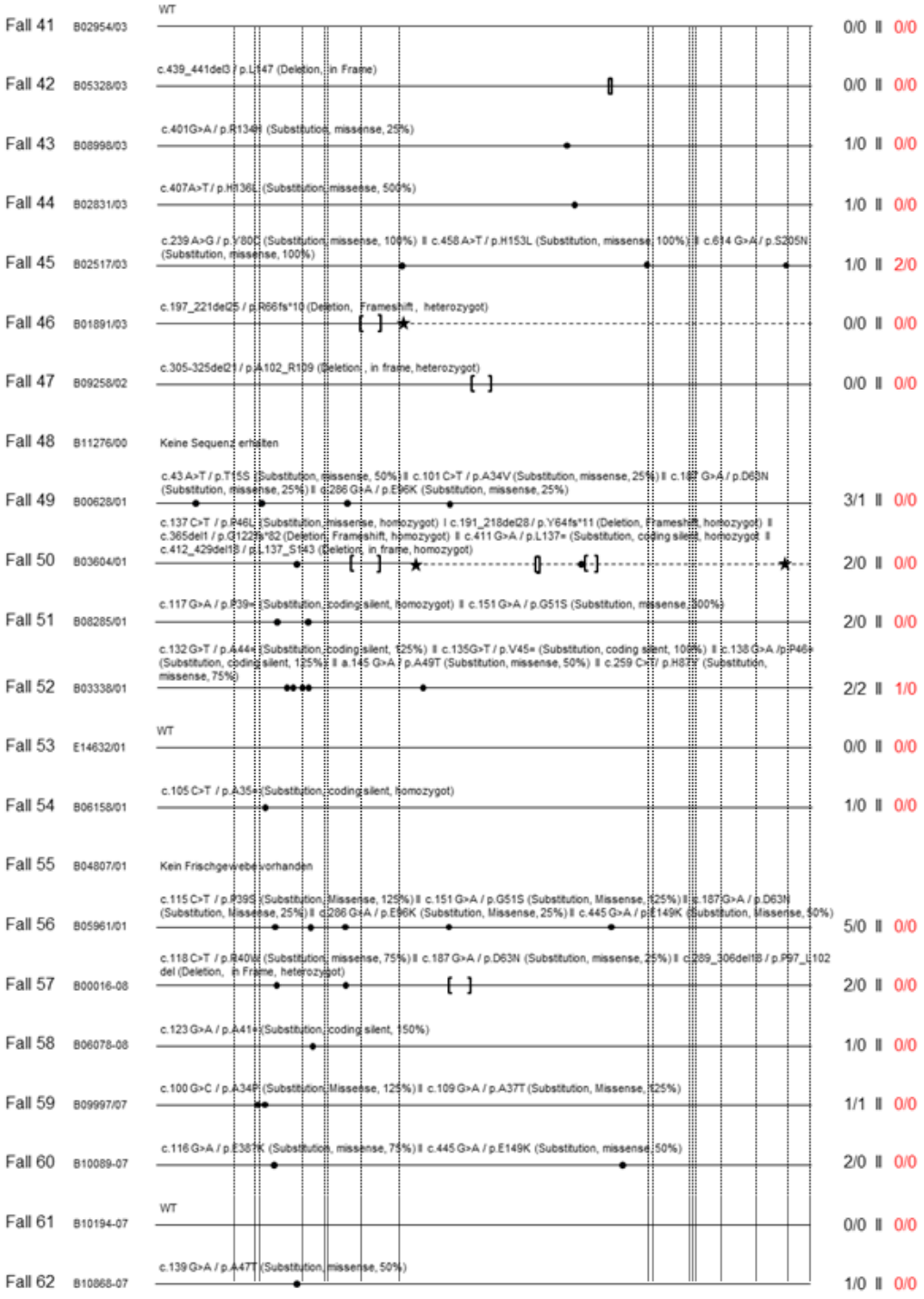
142. Zhang, J.G., Metcalf, D., Rakar, S., Asimakis, M., Greenhalgh, C.J., Willson, T.A., Starr, R., Nicholson, S.E., Carter, W., Alexander, W.S., Hilton, D.J. & Nicola, N.A. The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13261-13265 (2001).

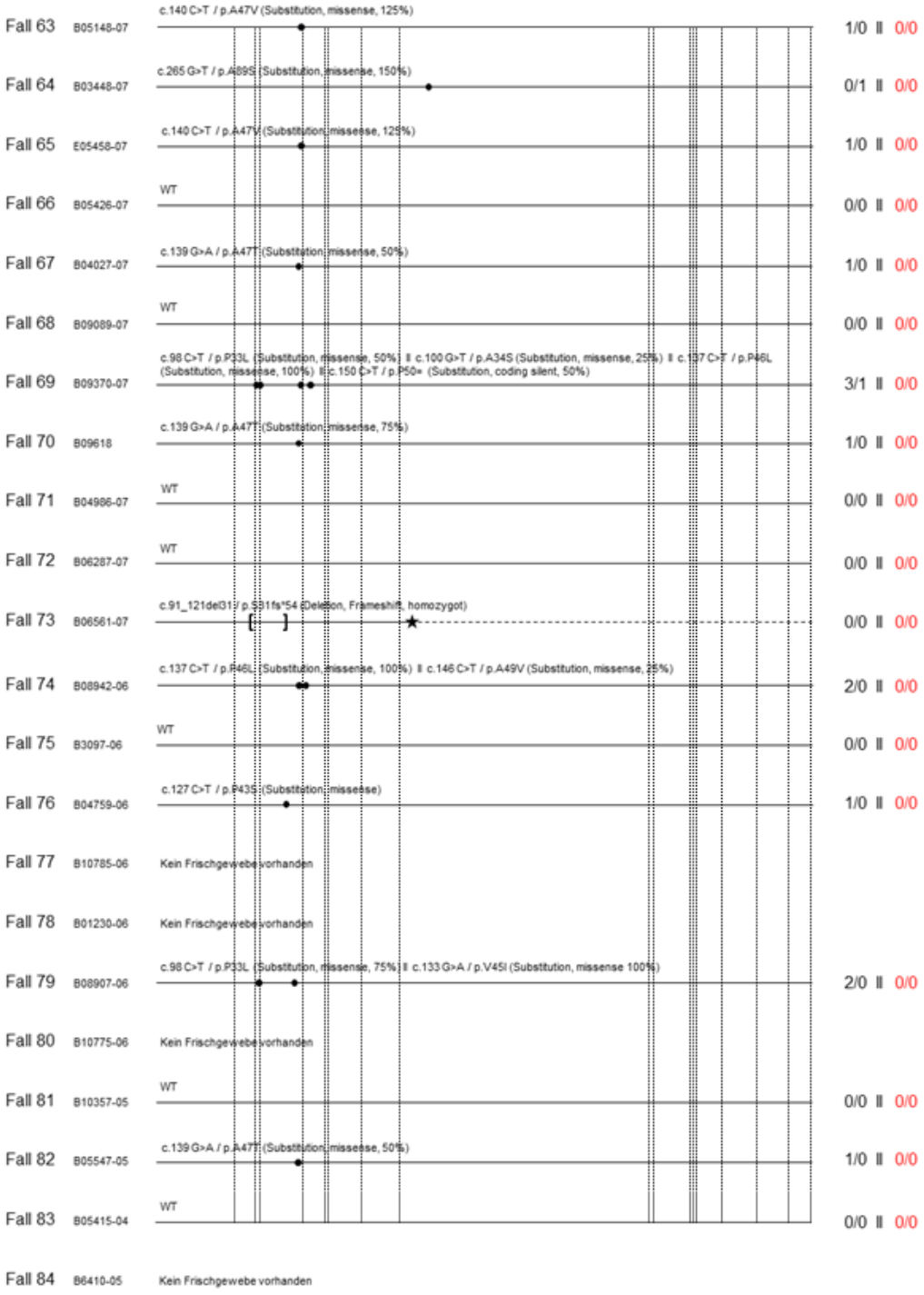
143. Zitzmann, K., Brand, S., De Toni, E.N., Baehs, S., Goke, B., Meinecke, J., Spottl, G., Meyer, H.H. & Auernhammer, C.J. SOCS1 silencing enhances antitumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* **67**, 5025-5032 (2007).

ANHANG


PS
SH3
JAK Kinase Domain
NLS
SOCS box
KIR
ESS
SH2
SC1
SC2
Transition/
Transversion
Fall 1 B9049/98
c.135 C>T / p.V45= (Substitution, coding silent)
1/0 II 0/0
Fall 2 37786/92
WT
0/0 II 0/0
Fall 3 B10842/98
c.215_216ins6 / p.A72_L73insQS (Insertion – in frame) II c.546 T>G / p.I182S (Substitution, Missense, 100%)
0/1 II 0/0
Fall 4 B07749/98
WT
0/0 II 0/0
Fall 5 45332/95
WT
0/0 II 0/0
Fall 6 59779/92
c.121 C>A / p.P41T (Substitution, Missense, 100%) II c.130 G>A / p.A44T (Substitution, Missense, 50%) II c.266 C>A / p.A89E (Substitution, Missense, 25%)
1/2 II 0/0
Fall 7 B09662/99
WT
1/2 II 0/0
Fall 8 62786/93
WT
0/0 II 0/0
Fall 9 B00357/99
c.347 G>A / p.S116N (Substitution, Missense, 100%) II c.416 G>T / p.G139V (Substitution, Missense, 75%)
1/0 II 0/1
Fall 10 B00051/97
Keine Sequenz erhalten
Fall 11 B8393/96
c.555 C>T / p.T185= (Substitution, coding silent, 25%)
1/0 II 0/0
Fall 12 11208/94
Keine Sequenz erhalten
Fall 13 B2620/93
WT
0/0 II 0/0
Fall 14 2954/94
c.26del1 /p.A9fs*76 (Deletion , Frameshift, heterozygot) II c.46 G>T / p.A16S (Substitution, Missense, 150%) II c.122 C>T /p.P41L (Substitution, Missense, 100%) II c.242 G>A / p.W81* (Substitution, nonsense, 125%)
2/0 II 0/1
Fall 15 E27488/96
c.240 C>G / p.Y80* (Substitution, nonsense, 75%) II c.287_320del34 / p.E96fs*98 (Deletion, Frameshift, heterozygot)
0/0 II 0/1
Fall 16 B2109/07
c.268 C>G / p.H90D (Substitution, Missense, 75%)
0/1 II 0/0
Fall 17 B2338/07
WT
0/0 II 0/0
Fall 18 B9558/06
c.122 C>T / p.P41L (Substitution, Missense, 25%) II c.151 G>C / p.G51R (Substitution, Missense, 200%)
1/1 II 0/0


Fall 19 B00576/06
C.153 C>T / p.G51= (Substitution, coding silent, 25%))
1/0 || 0/0
Fall 20 B08304/06
WT
0/0 || 0/0
Fall 21 B06749/06
c.109G>T / p.A37S (Substitution, Missense, 25%) || c.112 C>T / p.C38R (Substitution, Missense, 250%) || c.345_350del6 / p.S116_V117 (Deletion, in Frame)
1/1 || 0/1
Fall 22 B06130/05
WT
0/0 || 0/0
Fall 23 B08510/05
c.133 G>A / p.V45I (Substitution, Missense, 200%)
1/0 || 0/0
Fall 24 B04852/05
c.130 G>A / p.A44T (Substitution, Missense, 300%) || c.331 T>C / p.C111R (Substitution, Missense, 50%)
2/0 || 0/0
Fall 25 B06681/05
c.136 C>T / p.P46S (Substitution, Missense 25%) || c.144 G>A / p.P48= (Substitution, coding silent, 25%) || c.146 C>T / p.A49V (Substitution, Missense, 25%) || c.148 C>T / p.P50S (Substitution, Missense, 25%) || c.547 G>A / p.V183M (Substitution, Missense, 25%)
5/0 || 0/0
Fall 26 B07778/05
c.137 C>T / p.P46L (Substitution, Missense, 50%) || c.165del1 / p.F55fs*29 (Deletion, Frameshift, heterozygot) || c.411_429del19 / p.L137fs*61 (Deletion, Frameshift, heterozygot)
1/0 || 0/0
Fall 27 B02789/05
WT
0/0 || 0/0
Fall 28 B11020/05
WT
0/0 || 0/0
Fall 29 B02610/05
c.98 C>T / p.P33L (Substitution, Missense, homozygot) || c.115 C>T / p.P39S (Substitution, Missense, 25%) || c.137 C>T / p.P46L (Substitution, Missense, homozygot) || c.278 T>C / p.L93P (Substitution, Missense 50%) || c.505 C>T / p.R169C (Substitution, Missense, 25%)
5/0 || 0/0
Fall 30 B05679/05
c.225C>T / p.D75= (Substitution, coding silent, 50%) || c.323 A>C / p.Q108P (Substitution, missense, 75%)
1/1 || 0/0
Fall 31 B1584/05
c.115 C>T / p.P39S (Substitution, missense, homozygot) || c.194 G>C / p.R65P (Substitution, missense, homozygot) || c.291 C>T / p.P97= (Substitution, coding silent, homozygot) || c.363 G>C / p.S121= (Substitution, coding silent, homozygot)
2/2 || 0/0
Fall 32 B5015/05
c.109 G>C / p.A37P (Substitution, missense, 25%) || c.307 G>A / p.V103M (Substitution, missense, 50%)
1/1 || 0/0
Fall 33 B04321/05
c.447_456del10 / p.L150fs*? (Deletion, Frameshift, heterozygot)
0/0 || 0/0
Fall 34 B01293/05
c.125 G>T / p.C42F (Substitution, missense, homozygot)
0/1 || 0/0
Fall 35 B11072/05
c.499 C>A / p.R167S (Substitution, missense, 25%)
0/1 || 0/0
Fall 36 B01002/04
WT
0/0 || 0/0
Fall 37 B01495/04
c.110 C>T / p.A37V (Substitution, missense, 50%)
1/0 || 0/0
Fall 38 B03292/04
WT
0/0 || 0/0
Fall 39 B11642/04
c.406 C>T / p.H136Y (Substitution, missense, 50%)
1/0 || 0/0
Fall 40 B01926/04
WT
0/0 || 0/0


Fall 41 B02954/03
WT
0/0 || 0/0
Fall 42 B05328/03
c.439_441del3 / p.L147 (Deletion, in Frame)
0/0 || 0/0
Fall 43 B08998/03
c.401G>A / p.R134H (Substitution, missense, 25%)
1/0 || 0/0
Fall 44 B02831/03
c.407A>T / p.H136L (Substitution, missense, 50%)
1/0 || 0/0
Fall 45 B02517/03
c.239A>G / p.Y80C (Substitution, missense, 100%) || c.458A>T / p.H153L (Substitution, missense, 100%) || c.614G>A / p.S205N (Substitution, missense, 100%)
1/0 || 2/0
Fall 46 B01891/03
c.197_221del25 / p.R66fs*10 (Deletion, Frameshift, heterozygot)
0/0 || 0/0
Fall 47 B09258/02
c.305-325del21 / p.A102_R109 (Deletion, in frame, heterozygot)
0/0 || 0/0
Fall 48 B11276/00
Keine Sequenz erhalten
Fall 49 B00628/01
c.43A>T / p.T15S (Substitution, missense, 50%) || c.101C>T / p.A34V (Substitution, missense, 25%) || c.187G>A / p.D63N (Substitution, missense, 25%) || c.286G>A / p.E96K (Substitution, missense, 25%)
3/1 || 0/0
Fall 50 B03604/01
c.137C>T / p.R46L (Substitution, missense, homozygot) I c.191_218del28 / p.Y64fs*11 (Deletion, Frameshift, homozygot) || c.365del1 / p.G122fs*82 (Deletion, Frameshift, homozygot) || c.411G>A / p.L137= (Substitution, coding silent, homozygot) || c.412_429del18 / p.L137_S143 (Deletion, in frame, homozygot)
2/0 || 0/0
Fall 51 B08285/01
c.117G>A / p.P39= (Substitution, coding silent, homozygot) || c.151G>A / p.G51S (Substitution, missense, 100%)
2/0 || 0/0
Fall 52 B03338/01
c.132G>T / p.A44= (Substitution, coding silent, 125%) || c.135G>T / p.V45= (Substitution, coding silent, 100%) || c.138G>A / p.P46= (Substitution, coding silent, 125%) || a.145G>A / p.A49T (Substitution, missense, 50%) || c.259C>T / p.H87Y (Substitution, missense, 75%)
2/2 || 1/0
Fall 53 E14632/01
WT
0/0 || 0/0
Fall 54 B06158/01
c.105C>T / p.A35= (Substitution, coding silent, homozygot)
1/0 || 0/0
Fall 55 B04807/01
Kein Frischgewebe vorhanden
Fall 56 B05961/01
c.115C>T / p.P39S (Substitution, Missense, 125%) || c.151G>A / p.G51S (Substitution, Missense, 125%) || c.187G>A / p.D63N (Substitution, Missense, 25%) || c.286G>A / p.E96K (Substitution, Missense, 25%) || c.445G>A / p.E149K (Substitution, Missense, 50%)
5/0 || 0/0
Fall 57 B00016-08
c.118C>T / p.R40W (Substitution, missense, 75%) || c.187G>A / p.D63N (Substitution, missense, 25%) || c.289_306del18 / p.P97_L102 del (Deletion, in Frame, heterozygot)
2/0 || 0/0
Fall 58 B06078-08
c.123G>A / p.A41= (Substitution, coding silent, 150%)
1/0 || 0/0
Fall 59 B09997/07
c.100G>C / p.A34P (Substitution, Missense, 125%) || c.109G>A / p.A37T (Substitution, Missense, 125%)
1/1 || 0/0
Fall 60 B10089-07
c.116G>A / p.E387K (Substitution, missense, 75%) || c.445G>A / p.E149K (Substitution, missense, 50%)
2/0 || 0/0
Fall 61 B10194-07
WT
0/0 || 0/0
Fall 62 B10868-07
c.139G>A / p.A47T (Substitution, missense, 50%)
1/0 || 0/0


Fall 63 B05148-07 c.140 C>T / p.A47V (Substitution, missense, 125%) 1/0 || 0/0
Fall 64 B03448-07 c.265 G>T / p.A89S (Substitution, missense, 150%) 0/1 || 0/0
Fall 65 E05458-07 c.140 C>T / p.A47V (Substitution, missense, 125%) 1/0 || 0/0
Fall 66 B05426-07 WT 0/0 || 0/0
Fall 67 B04027-07 c.139 G>A / p.A47T (Substitution, missense, 50%) 1/0 || 0/0
Fall 68 B09089-07 WT 0/0 || 0/0
Fall 69 B09370-07 c.98 C>T / p.P33L (Substitution, missense, 50%) || c.100 G>T / p.A34S (Substitution, missense, 25%) || c.137 C>T / p.P46L (Substitution, missense, 100%) || c.150 C>T / p.P50= (Substitution, coding silent, 50%) 3/1 || 0/0
Fall 70 B09618 c.139 G>A / p.A47T (Substitution, missense, 75%) 1/0 || 0/0
Fall 71 B04986-07 WT 0/0 || 0/0
Fall 72 B06287-07 WT 0/0 || 0/0
Fall 73 B06561-07 c.91_121del31 / p.S31fs*54 (Deletion, Frameshift, homozygot) 0/0 || 0/0
Fall 74 B08942-06 c.137 C>T / p.P46L (Substitution, missense, 100%) || c.146 C>T / p.A49V (Substitution, missense, 25%) 2/0 || 0/0
Fall 75 B3097-06 WT 0/0 || 0/0
Fall 76 B04759-06 c.127 C>T / p.P43S (Substitution, missense) 1/0 || 0/0
Fall 77 B10785-06 Kein Frischgewebe vorhanden
Fall 78 B01230-06 Kein Frischgewebe vorhanden
Fall 79 B08907-06 c.98 C>T / p.P33L (Substitution, missense, 75%) || c.133 G>A / p.V45I (Substitution, missense 100%) 2/0 || 0/0
Fall 80 B10775-06 Kein Frischgewebe vorhanden
Fall 81 B10357-05 WT 0/0 || 0/0
Fall 82 B05547-05 c.139 G>A / p.A47T (Substitution, missense, 50%) 1/0 || 0/0
Fall 83 B05415-04 WT 0/0 || 0/0
Fall 84 B6410-05 Kein Frischgewebe vorhanden

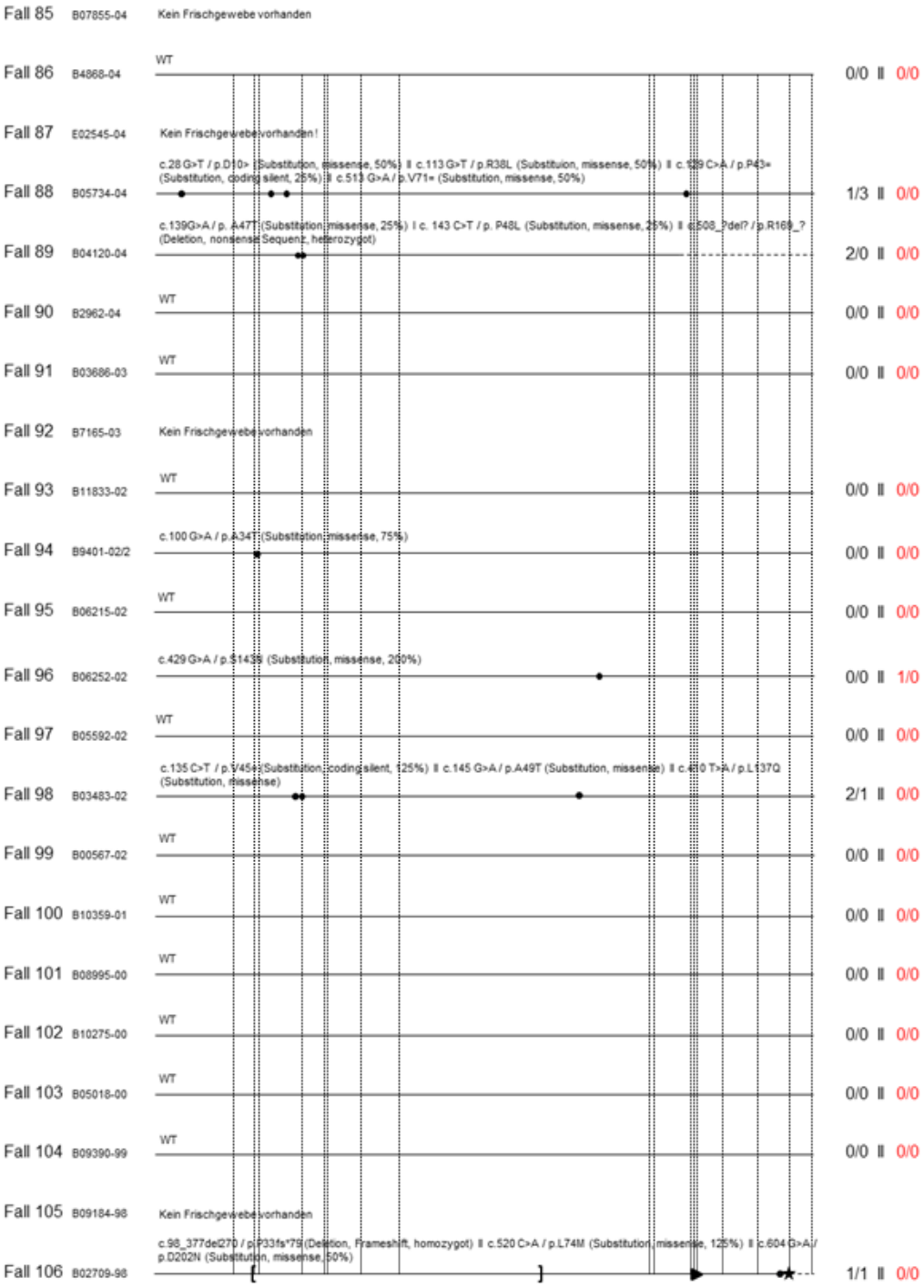


Abbildung 19 *SOCS-1*-Mutationsanalyse im Patientenkollektiv Insgesamt umfasst das Hodgkin-Patientenkollektiv 116 Patienten. Der Mutationsstatus konnte in 96 Fällen erhoben werden (in 17 Fällen war zu wenig Frischgewebe vorhanden (z. B. Fall 107-116 – nicht gezeigt), in 3 Fällen konnte aus dem Material keine DNA extrahiert werden). Jedem Patienten wurde zusätzlich zur Fallnummer ein nebenstehender B-Code zugeordnet. Dieser Code dient der Pathologie Ulm zur Zuordnung der Gewebeproben zum jeweiligen Patienten. Zuoberst befindet sich eine schematische Abbildung des *SOCS-1*-Gens, in dem funktionelle Domänen und deren Subdomänen vermerkt sind. Das *SOCS-1*-Gen ist neben jedem Fall als schwarze Linie dargestellt. Mutationen wurden je nach Typ und Lokalisation im Genbereich vermerkt und charakterisiert. Die bei jeder monoallelischen Punktmutation angegebene Prozentzahl bezieht sich auf die bei der Sanger-Sequenzierung erreichte Signalhöhe verglichen mit der des Wildtyps. Der Buchstabenschlüssel für die bei den Aminosäuren verwendeten Abkürzungen findet sich in Tabelle 11. Bei einer Punktmutation wurde nebenstehend vermerkt, ob es sich um eine Transition oder Transversion handelt. Punktmutationen, die im Konsensusbereich aberranter somatischer Hypermutation auftraten (vgl. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) sind rot dargestellt. **Symbole:** Geschlossene Klammern, Deletion; offene Klammern, Insertion; Punkte, Punktmutationen; Sterne, Stoppcodon; Dreieck, Startcodon; gestrichelte Linie, Nonsense-Sequenz.

Tabelle 10 Häufigkeitsverteilung der den kodierenden *SOCS-1*-Genbereich betreffenden Mutationen in Bezug auf funktionelle Konsequenz und Domänenlokalisation: Die Häufigkeitsverteilung von *SOCS-1*-Mutationen wurde in 4 verschiedenen Patientenkohorten untersucht (Cosmic, Minor, Major, Minor + Major). Die Mutationslokalisation wurde der jeweiligen Domäne zugeordnet. Die Patienten der Cosmic-Kohorte entstammen der COSMIC-Datenbank (http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/) **Symbole:** % (n/N) prozentualer Anteil aller den jeweiligen Domänenbereich direkt betreffenden Mutationen; [Range] Anzahl an Mutationen, für die eine N-terminale Verkürzung der Proteinlänge prädiziert wird. Der Zahlenbereich entspricht der konservativen Mutationswichtung (linker Wert) und der aggressiven Mutationswichtung (rechter Wert) (vgl. Abbildung 15). Für Patienten der Minor-Kohorte ist der Range per Definition = 0. **Abkürzungen:** AA, Aminosäuren; n, Fallanzahl in der Kohorte; N, Anzahl an Mutationen in der jeweiligen Domäne; PRR, prolinreiche Repeats mit Diprolinen Motiven PxxPxR (Typ I) und RPxPXXP (Typ II) als Funktionselemente der SH3-Domäne; SH2 (Src Homology 2 Domain); SH3, (Src Homology Domain 3 (XPpXP)); CH, Cis Homology Domain (CIS, cytokine-inducible SH2-containing protein); SC-Motiv, SSI COOH-terminal motif (SSI, STAT-induced STAT Inhibitor).

			***SOCS-1* Major + Minor (COSMIC-Kohorte)**			***SOCS-1* Major + Minor (Hodgkin-Kollektiv)**		
SOCS-1								
Domäne	**AA**	**Funktion**	**N = 31**	**%**	**[Range %]**	**N = 58**	**%**	**[Range %]**
SH3-Domäne	34-47	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	3	9,7	[9,7]	34	58,62	[60,34-60,34]
Poly-Serine	26-32	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	1	3,2	[3,2]	1	1,72	[3,45-3,45]
PRR (Typ I)	34-39	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	2	6,5	[6,5]	15	25,86	[27,59-27,59]
PRR (Typ II)	41-47	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	3	9,7	[9,7]	24	41,38	[43,10-43,10]
JAK-Domäne	56-166	Inhibierung der Kinaseaktivität von JAKs[123]	22	71	[77,4]	30	51,72	[55,17-55,17]
KIR	55-66	Erhöht die Affinität der JAK-Bindung[123]	8	25,8	[29,0]	7	12,07	[15,52-15,52]
ESS	67-78	Bindung an pY1007 im Activation Loop von JAKs[123]	6	19,4	[32,3]	7	12,07	[17,24-17,24]
SH2	79-174	Bindung an pY1007 im Activation Loop von JAKs[123]	17	54,8	[77,4]	29	50	[55,17-56,90]
TEC-Kinase	82	Inhibierung der Kinaseaktivität von TEC[87]	3	9,7	[35,5]	1	1,72	[12,07-13,79]
Arginin	104	Phosphotyrosine Bindungsstelle[30]	2	6,5	[35,5]	3	5,17	[13,79-17,24]
NLS	159-173	Ermöglicht die nukleäre Lokalisation von *SOCS-1*6	4	12,9	[54,8-67,7]	2	3,45	[17,24-25,86]
SOCS-Box	161-210	Assoziation mit den Elongationsfaktoren BC zwecks Degradation von Zielmolekülen wie z. B.: JAK2, TEL-JAK2, IRS-1, IRS-2[41]	9	29	[71,0-83,9]	5	8,62	[22,41-31,03]
SC-Motiv 1	174-182	Bindungsstelle der Elongin BC-Box[77]	4	12,9	[61,3-77,4]	1	1,72	[15,52-24,14]
SC-Motiv 2	194-204	Schützt *SOCS-1* vor proteolytischer Degradation77	0	0	[58,1-74,2]	1	1,72	[15,52-24,14]

			***SOCS-1* Major (Hodgkin-Kollektiv)**			***SOCS-1* Minor (Hodgkin-Kollektiv)**		
SOCS-1								
Domäne	**AA**	**Funktion**	**N = 14**	**%**	**[Range %]**	**N = 44**	**%**	**[Range %]**
SH3-Domäne	34-47	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	2	14,29	[21,43-21,43]	32	72,73	[0,00]
Poly-Serine	26-32	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	1	7,14	[14,29-14,29]	0	0	[0,00]
PRR (Typ I)	34-39	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	2	14,29	[21,43-21,43]	13	29,55	[0,00]
PRR (Typ II)	41-47	Bindungsstelle für SH3-Domäne von z. B. Grb2[23]	2	14,29	[21,43-21,43]	22	50	[0,00]
JAK-Domäne	56-166	Inhibierung der Kinaseaktivität von JAKs[123]	11	78,57	[92,86-92,86]	19	43,18	[0,00]
KIR	55-66	Erhöht die Affinität der JAK-Bindung[123]	4	28,57	[42,86-42,86]	3	6,82	[0,00]
ESS	67-78	Bindung an pY1007 im Activation Loop von JAKs[123]	4	28,57	[50,00-50,00]	3	6,82	[0,00]
SH2	79-174	Bindung an pY1007 im Activation Loop von JAKs[123]	10	71,43	[92,86-100,00]	19	43,18	[0,00]
TEC-Kinase	82	Inhibierung der Kinaseaktivität von TEC[87]	1	7,14	[50,00-57,14]	0	0	[0,00]
Arginin	104	Phosphotyrosine Bindungsstelle[30]	3	21,43	[57,14-71,43]	0	0	[0,00]
NLS	159-173	Ermöglicht die nukleäre Lokalisation von *SOCS-1*6	1	7,14	[64,29-100,00]	1	2,27	[0,00]
SOCS-Box	161-210	Assoziation mit den Elongationsfaktoren BC zwecks Degradation von Zielmolekülen wie z. B. JAK2, TEL-Jak2, IRS-1, IRS-2[41]	1	7,14	[64,29-100,00]	4	0	[0,00]
SC-Motiv 1	174-182	Bindungsstelle der Elongin BC-Box[77]	1	7,14	[64,29-100,00]	0	0	[0,00]
SC-Motiv 2	194-204	Schützt *SOCS-1* vor proteolytischer Degradation[77]	1	7,14	[64,29-100,00]	0	0	[0,00]

Tabelle 11 Kodierung der Aminosäuren

A	**Alanin**
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin

L	**Leucin**
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

LEBENSLAUF

Name	Karl Hoffmann	
Geburtsdatum	13.01.1985	
Geburtsort	Marburg/Lahn	
Familienstand	ledig	
Staatsangehörigkeit	deutsch	
Schulische Ausbildung	1991–1995	Wichern-Grundschule Bad Oeynhausen
	1995–2004	Gymnasium Kolleg St. Thomas Vechta
	22.06.2004	Abitur
Wehrdienst	2004–2005	Fallschirmjäger Btl. 313 Varel
Studium	2005–2006	College International Budapest
	2006–2008	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest
	Seit 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
	2009–2010	Promotionsprogramm experimentelle Medizin
	2013	voraussichtliche Approbation

DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Möller, dem Leiter des Instituts für Pathologie der Universität Ulm bedanken, der mir die Möglichkeit gab, eine derart interessante Fragestellung in seiner Abteilung bearbeiten zu dürfen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. J. Lennerz, der mit qualifizierter Betreuung, unermüdlicher Geduld und konstruktiver Kritik maßgeblichen Anteil am Zustandekommen dieser Dissertation hatte.

Auch bei Frau Dr. O. Ritz, Frau Karola Dorsch und Herrn Dr. I. Melzner, die den experimentellen Teil meiner Arbeit mit ihrem Fachwissen in richtige Bahnen gelenkt haben, möchte ich mich ausdrücklich bedanken. Birgit Schif, Elena Kelsch, Elena Moser, Julia Melzner, Iwona Nerbas, Nele Rüther, Anna-Maria Bubolz, Lucia Flossbach, Michaela Buck, Dr. S. Brüderlein und Prof. Dr. R. Marienfeld danke ich für ihre Hilfe bei experimentellen Fragestellungen. Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie der Universität Ulm.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. A. Viardot, dessen zeitnahe Aufbereitung wichtiger Daten in hohem Maße zum guten Gelingen der Arbeit beitrug. Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Comprehensive Cancer Centers Ulm, dort vor allem Herrn P. Kuhn und Frau C. Welke.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Freundin Natalie Maiterth und bei meinen Eltern Heike und Kornelius Hoffmann.