Universitätsklinikum Ulm
Institut für Pathologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Experimentelle Untersuchungen zur Expression von SOCS1 an humanen Zelllinien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Pauline Kürten
aus Köln

2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Marienfeld
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Brunner
Tag der Promotion: 17.11.2023

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1 EINLEITUNG 1

1.1 Maligne Lymphome 1

1.2 Der JAK-STAT-Signalweg 12

1.3 Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) 14

1.4 Antikörper 22

1.5 Zielsetzung 24

2 MATERIAL UND METHODEN 25

Material 25

2.1 Zelllinien 25

2.2 Nährmedien und Zusätze für Zellkulturarbeiten 29

2.3 Reagenzien für die cDNA-Synthese 29

2.4 Primer für die semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion 30

2.5 Transfektionsvektoren 30

2.6 Antikörper 31

2.7 Gebrauchsfertige Kits 31

2.8 Angesetzte Puffer 32

2.9 Weitere Chemikalien und Reagenzien 35

2.10 Geräte und Verbrauchsmaterial 37

2.11 Software 42

Methoden 43

2.12 Zellkulturarbeiten 43

2.13 Transfektion von HEK 293T Zellen mit einem Wildtyp-*SOCS1*-codierenden Expressionsplasmid 48

2.14 Extraktionsarbeiten 52

2.15 RNA-Nachweis und -Quantifizierung durch semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion 54

2.16 Proteinnachweis und -quantifizierung im Western Blot 63

2.17 Immunpräzipitation 72

2.18 Durchführung von STR-Analysen zur Authentifizierung humaner Zelllinien 75

2.19 Erstellen von Zytospins und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin 77

2.20 Statistische Analyse 78

3 ERGEBNISSE 79

3.1 Wildtyp-SOCS1-Expression in transient transfizierten HEK 293T Zellen 79

3.2 Endogene SOCS1-Expression in weiteren Zelllinien 86

3.3 Spezifität institutseigener und kommerziell erhältlicher monoklonaler anti-SOCS1-Antikörper 94

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 97

4 DISKUSSION 98

4.1 Die hemmende Wirkung von SOCS1 auf die Zellproliferation 98

4.2 Die Regulierung der SOCS1-Expression auf mRNA-Ebene 99

4.3 Die *SOCS1*-mRNA- und SOCS1-Proteinexpression in B-Zell-Lymphomzelllinien 101

4.4 Biallelische *SOCS1*-Mutationen der Zelllinie L428 107

4.5 Die Charakterisierung des SOCS1-Proteinstatus und Schlussfolgerungen hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen Mutationsarten im Western Blot 109

4.6 Die Spezifität der untersuchten anti-SOCS1-Antikörper und mögliche Konsequenzen hinsichtlich einer Verwendung in der Immunhistochemie 112

4.7 Bestrebungen zur Proteinidentifizierung 114

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick 117

5 ZUSAMMENFASSUNG 119

6 LITERATURVERZEICHNIS 121

DANKSAGUNG 174

LEBENSLAUF 175

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid, Aminosäure
ABC-DLBCL	activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom aktivierten B-Zell- ähnlichen Subtyp
ABVD	Chemotherapieschema: Adramycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, erworbenes Immunschwächesyndrom
AMEL	Amelogenin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCL2	B-cell lymphoma 2, *BCL2*-Gen, BCL2-Protein
BCL6	B-cell lymphoma 6, *BCL6*-Gen, BCL6-Protein
BEACOPP	Chemotherapieschema: Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin (Vincristin), Procarbazin, Prednison
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHL	classic Hodgkin lymphoma, klassisches Hodgkin-Lymphom
CHOP	Chemotherapieschema: Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin (Vincristin), Prednison
CIS	Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein
CLL	chronische lymphatische Leukämie
COO	cell-of-origin, Ursprungszelle
C_T	cycle threshold

DA-EPOCH-R	Chemotherapieschema: dosisadapitiert Etoposid, Prednison, Oncovin (Vincristin), Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Rituximab
ddH2O	demineralisiertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	double-stranded, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBV^+	durch das Epstein-Barr-Virus infiziert, positiv für das Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESS	Extended SH2 Subdomain, Erweiterte-SH2-Subdomäne
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
fs	Frameshift-Mutation
fw	forward, forward Primer
G/C	Guanin/Cytosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, *GAPDH*-Gen
GCB-DLBCL	germinal-center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom keimzentrumsartigen Subtyp
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	grünes fluoreszierendes Protein

GHSG	German Hodgkin Study Group, Deutsche Hodgkin Studiengruppe
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HeBS	HEPES-buffered saline, HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK 293T	human embryonic kidney 293T cells, humane embryonale Nierenzelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	menschliches Leukozytenantigen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HRS-Zellen	Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, Version 10
if	In-frame-Deletion
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G-Subklasse
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IMDM	Iscove‘s Modified Dulbecco‘s Medium
IPI	Internationaler Prognostischer Index
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
ISS	Internationales Staging System
JAB	JAK-Binding Protein

JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KIR	Kinase Inhibitory Region, Kinasen-Inhibitorische Region
KIT	Tyrosinkinase KIT
LCL	lymphoblastoid cell line, lymphoblastoide Zelllinie
LDCHL	lymphocyte-depleted classic Hodgkin lymphoma, lympozytenarmes klassisches Hodgkin-Lymphom
LDH	Lactatdehydrogenase
LIF	leukemia inhibitory factor, leukämiehemmender Faktor
LP-Zellen	Lymphozyten-prädominante Zellen
LRCHL	lymphocyte-rich classic Hodgkin lymphoma, lymphozytenreiches klassisches Hodgkin-Lymphom
MCCHL	mixed cellularity classic Hodgkin lymphoma, gemischtzelliges klassisches Hodgkin-Lymphom
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
miR	microRNA
MLV	Murin Leukemia Virus, murines Leukämievirus
MM	multiples Myelom
M-MLV-RT	Moloney Murin Leukemia Virus Transcriptase
MUM1	Multiple Myeloma 1
mut	Mutation, mutiert
MYC	Homolog zum aviären viralen Myelocytomatose-Onkogen, Protoonkogen, *MYC*-Gen, MYC-Protein
n.a.	not applicable, Angabe nicht verfügbar
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCCN-IPI	Internationaler Prognostischer Index des National Comprehensive Cancer Network

NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLPHL	nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma, nodulär Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
NLS	nuclear localization signal, Kernlokalisierungssignal
n.s.	nicht signifikant
NSCHL	nodular sclerosis classic Hodgkin lymphoma, nodulär sklerosierendes klassisches Hodgkin-Lymphom
OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAX5	Paired Box 5
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PEST	Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S), Threonin (T)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PET-CT	kombinierte Positronen-Emissions-Tomografie und Computertomografie
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PMBL	primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma, primär mediastinales (thymisches) großzelliges B-Zell-Lymphom
POL	Polymerase
PTP1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1 B
pY	phosphorylierter Tyrosinrest
p53	p53-Protein
p65	NF-κB p65-Untereinheit, auch: RelA
QIF	quantitative Immunfluoreszenz
qPCR	semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Rbx1	RING-Box-Protein 1
Rbx2	RING-Box-Protein 2
R-CHOP	Chemotherapieschema: Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin (Vincristin), Prednison, Rituximab
RelA	REL-assoziiertes Protein, auch: NF-κB p65-Untereinheit
R-ISS	revised International Staging System, überarbeitetes Internationales Staging System
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing Phosphatase-1
SHP-2	Src homology region 2 domain-containing Phosphatase-2
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling, *SOCS*-Gene, SOCS-Proteine
SOCS1	Suppressor of Cytokine Signaling 1, *SOCS1*-Gen, SOCS1-Protein
$SOCS1^{-/-}$	*SOCS1*-defizient
SSI-1	STAT-induced STAT Inhibitor 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STR	Short Tandem Repeats
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20-Zusatz
TC-PTP	T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor

Tm	melting temperature, Schmelztemperatur
TNT	Tris-NaCl-Tween
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TYK2	Tyrosinkinase 2
UKU	Universitätsklinikum Ulm
well	Vertiefung einer Probenplatte
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp, wildtypisch

1 Einleitung

1.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome werden nach dem Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in eine Vielzahl von Entitäten eingeteilt, übergeordnet können Hodgkin-Lymphome und die heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome unterschieden werden [336]. Die Zuordnung zu einer bestimmten Lymphomentität erfolgt durch Begutachtung eines Lymphknotens oder auffälligen Gewebes in einem spezialisierten Zentrum für Hämatopathologie. In Zusammenschau klinischer, histopathologischer und molekulargenetischer Befunde kann so in der Regel eine Diagnose gesichert und nach Staging und interdisziplinärer Fallbesprechung eine Therapieempfehlung ausgesprochen werden [41, 42, 72, 91, 128, 176, 177, 181, 336].

1.1.1 Hodgkin-Lymphome

1.1.1.1 Epidemiologie

Hodgkin-Lymphome kommen mit einem Anteil von 0,5 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland insgesamt selten vor [118, 287]. In der Altersklasse der 15- bis 29-Jährigen zählen sie mit etwas über 10 % aller Krebsneuerkrankungen jedoch zu den fünf häufigsten Krebsarten [118]. Betrachtet man die Altersverteilung, fällt ein doppelgipfliger Verlauf mit einem ersten Häufigkeitsgipfel zwischen 15 und 29 Jahren und einem zweiten Erkrankungsgipfel zwischen 75 und 84 Jahren auf [118, 389]. Frauen erkranken im Alter von 15 bis 25 Jahren häufiger an Hodgkin-Lymphomen, während in allen weiteren Alterskategorien Männer öfter betroffen sind [118, 389]. Das Lebenszeitrisiko, an einem Hodgkin-Lymphom zu erkranken, liegt in Deutschland für Frauen bei 0,2 % und für Männer bei 0,3 % [287]. Seit Mitte der 2000er Jahre ist die Prävalenz von Hodgkin-Lymphomen leicht angestiegen, während die Mortalität unter anderem durch verbesserte Therapiemöglichkeiten zurückgegangen ist [287]. 2017 lag die Prävalenz in Deutschland in der weiblichen Bevölkerung bei 2,3 und in der männlichen Bevölkerung bei 3,3 pro 100.000 Einwohner [389].

1.1.1.2 Klassifikation

Die WHO unterscheidet das nodulär Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL, ca. 10 % aller Hodgkin-Lymphome) vom klassischen Hodgkin-Lymphom (CHL, ca. 90 % aller Hodgkin-Lymphome). Für Letzteres sind wiederum vier Subtypen bekannt: nodulär sklerosierend (NSCHL), gemischtzellig (MCCHL), lymphozytenreich (LRCHL) und lympozytenarm (LDCHL). Die einzelnen Subtypen variieren hinsichtlich des Begleitinfiltrats, der Eigenschaften der neoplastischen Zellen, des klinischen Erscheinungsbilds sowie der Risikofaktoren und EBV-Assoziation [330]. Der nodulär sklerosierende Subtyp kommt in Deutschland am häufigsten vor, gefolgt vom gemischtzelligen klassischen Hodgkin-Lymphom [118].

1.1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ursachen, die für die Entstehung eines Hodgkin-Lymphoms von Bedeutung sind, sind nicht abschließend geklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass EBV-Infektionen eine Rolle bei der Entstehung klassischer Hodgkin-Lymphome spielen könnten [15, 330]. Auch durch eine Immundefizienz, beispielsweise im Rahmen einer HIV-Infektion, scheint die Entwicklung von Hodgkin-Lymphome begünstigt zu werden [330]. Seit Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) konnte für Patient(inn)en mit einer HIV-Infektion beziehungsweise einer AIDS-Erkrankung eine Inzidenzzunahme von Hodgkin-Lymphomen beobachtet werden [36, 86, 266]. Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines Hodgkin-Lymphoms werden Rauchen, Umweltfaktoren und genetische Faktoren in Betracht gezogen [101, 150, 155, 321].

1.1.1.4 Klinisches Erscheinungsbild und Lokalisation

Hodgkin-Lymphome werden klinisch in aller Regel durch indolente Lymphknotenschwellungen auffällig. Je nach Subtyp treten diese bevorzugt in zervikalen, mediastinalen, axillären oder paraaortalen Lymphknotenstationen auf. Beim nodulär sklerosierenden Subtyp ist typischerweise das Mediastinum betroffen, in 20 % der Fälle kommt es zudem zur Milzbeteiligung. Eine Beteiligung des Knochenmarks ist beim nodulär sklerosierenden klassischen Hodgkin-Lymphom selten (ca. 5 %), sofern diese auftritt jedoch prognostisch ungünstig. Gemischtzellige

klassische Hodgkin-Lymphome manifestieren sich hingegen häufiger in abdominellen Lymphknotenregionen, eine Milzbeteiligung ist häufig. Bei ca. 40 % der an einem klassischen Hodgkin-Lymphom Erkrankten tritt eine B-Symptomatik auf. Nodulär Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphome gehen selten mit einer B-Symptomatik einher und bleiben klinisch lange asymptomatisch. Sie finden sich überwiegend in peripheren Lymphknoten [330].

1.1.1.5 Diagnostik und Staging

Die Diagnosesicherung erfolgt nach klinischem Verdacht durch referenzpathologische Begutachtung eines exstirpierten Lymphknotens oder eines ausreichend großen Biopsats [47, 114, 250, 293, 330]. Durch Statinguntersuchungen kann die Zuordnung zu einem Stadium der modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation erfolgen [47, 53, 187, 293]. Zur Therapieplanung finden in aller Regel zusätzlich die von der Deutschen Hodgkin Studiengruppe (GHSG) ermittelten Risikofaktoren (Befall von drei oder mehr Lymphknotenarealen, hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit, großer Mediastinaltumor, extranodaler Befall) Beachtung [91].

1.1.1.6 Histopathologie und Immunphänotyp

Typischerweise kommen bei klassischen Hodgkin-Lymphomen einkernige Hodgkin- und mehrkernige Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) vor. Diese werden von einem entzündlichen Infiltrat begleitet, welches je nach Subtyp variiert [330]. Der Anteil neoplastischer Zellen ist mit 0,1 bis 10 % gering [330]. Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen exprimieren mehrheitlich CD30 und CD15 [131, 307, 311, 312, 331, 398] sowie PAX5 und IRF4/MUM1 [46, 85], CD19-, CD20- und CD79a-positive neoplastische Zellen kommen hingegen seltener vor [164, 307, 330, 360, 398]. Den HRS-Zellen fehlen typischerweise eine Immunglobulinexpression und die Ausprägung eines funktionstüchtigen B-Zell-Rezeptors [143, 153, 197, 352]. Insgesamt ist die deutlich reduzierte respektive fehlende Expression B-Zell-spezifischer Marker Ausdruck eines B-Zell-Identitätsverlusts der HRS-Zellen [120, 143, 153, 197, 352, 360]. Beim nodulär sklerosierenden Subtyp kommen Lakunarzellen als Variante der Reed-Sternberg-Zellen vor [195, 330]. Das nodulär Lymphozyten-prädominante Hodgkin-Lymphom unterscheidet sich von klassischen Hodgkin-Lymphomen durch das Fehlen CD30- und

CD15-positiver HRS-Zellen. Charakteristisch sind Lymphozyten-prädominante (LP-) Zellen, welche CD20 und CD79a exprimieren [9, 195, 263, 264, 330]. Das Begleitinfiltrat besteht überwiegend aus knotenbildenden Lymphozyten sowie Epitheloidzellen [330].

1.1.1.7 Therapie

Die Therapie eines Hodgkin-Lymphoms erfolgt streng stadienadaptiert und überwiegend mit kurativer Intention. Je nach Stadium der Ann-Arbor-Klassifikation, Risikofaktoren und Allgemeinzustand wird zwischen verschiedenen Therapiekonstellationen unterschieden. Diese setzen sich aus einer Chemotherapie nach dem ABVD- und/oder BEACOPP-Schema sowie einer involved-site Radiotherapie teils nur PET-CT-positiver Restareale zusammen [81, 82, 91, 177, 267].

1.1.1.8 Prognose

Die Prognose der Hodgkin-Lymphome ist insgesamt gut. Die Fünfjahresüberlebensrate liegt in Deutschland zwischen 84 und 86 %. Das mittlere Alter der in Deutschland an einem Hodgkin-Lymphom Verstorbenen lag 2017 für Frauen bei 76 Jahren und für Männer bei 73 Jahren [287]. Hervorzuheben sind jedoch ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms und eine weitere Zunahme dieses Risikos bei einem Erkrankungszeitpunkt vor dem 30. Lebensjahr [25]. Für Kinder, die vor dem 10. Lebensjahr eine Hodgkin-Lymphom-Therapie erhalten haben, konnte unter anderem ein 14-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms ermittelt werden [206]. Signifikante Zunahmen des relativen Risikos wurden insbesondere für Non-Hodgkin-Lymphome, Leukämien, Schilddrüsen-, Bronchial-, Mamma- und Nierenzellkarzinome sowie Karzinome des Gastrointestinaltrakts als Sekundärmalignome beobachtet [25, 71, 334]. Eine Assoziation zwischen der Entstehung von Sekundärmalignomen und dem gewählten Therapieregime ist wahrscheinlich [39, 117]. Bei beiden Geschlechtern kann es als Therapiefolge zu Infertilität kommen [30, 31, 63, 209, 249, 322, 339]. Zudem wurden Schilddrüsenfunktionsstörungen, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Einschränkungen der Lungenfunktion als Langzeitfolgen nach Hodgkin-Lymphom-Therapie beobachtet [35, 196, 335, 354].

1.1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

1.1.2.1 Epidemiologie

Die heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome stellt weltweit den Hauptteil der Neoplasien des hämatopoetischen und lymphatischen Systems dar [333]. In Deutschland waren Non-Hodgkin-Lymphome im Jahr 2016 für fast 4 % aller Krebsneuerkrankungen und 3 % aller Krebssterbefälle verantwortlich [285]. Insgesamt ist die Inzidenz der Non-Hodgkin-Lymphome in Deutschland seit Ende der 1970er Jahre kontinuierlich gestiegen, während die Sterblichkeit seit Ende der 1990er Jahre leicht rückläufig ist [388]. Mehrheitlich treten Non-Hodgkin-Lymphome im höheren Lebensalter (mittleres Erkrankungsalter 70 bis 72 Jahre) und in der männlichen Bevölkerung auf [289, 390]. Eine Zunahme der Erkrankungsfälle ist überwiegend ab dem 50. Lebensjahr zu verzeichnen [289]. Separat erfasst werden die epidemiologischen Daten der multiplen Myelome und chronischen lymphatischen Leukämien. Sie machen jeweils zwischen 1 und 2 % der jährlichen Krebsneuerkrankungen aus und unterscheiden sich hinsichtlich Häufigkeitsgipfel und Geschlechterverteilung nicht wesentlich von den oben genannten Beobachtungen [285, 286, 288]. Zu den häufigsten Non-Hodgkin-Lymphomen zählen in Deutschland Plasmazell-Neoplasien, chronische lymphatische Leukämien (CLL) und diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) [388]. Für einige in Deutschland seltener vorkommende Non-Hodgkin-Lymphome konnte ein früheres mittleres Erkrankungsalter beziehungsweise häufigeres Auftreten beim weiblichen Geschlecht beobachtet werden [388].

1.1.2.2 Klassifikation

Non-Hodgkin-Lymphome werden durch das Klassifikationssystem der WHO in eine Vielzahl von Entitäten untergliedert. Berücksichtigung finden hierbei die Linienzugehörigkeit (B- oder T/NK-Zellreihe) und der Reifegrad (Vorläuferzell-Neoplasien, reifzellige lymphatische Neoplasien) der neoplastischen Zellen. Zudem sind zur Klassifizierung der Neoplasie die Morphologie und der Immunphänotyp sowie genetische, molekulare und klinische Faktoren wie beispielsweise chromosomale Aberrationen oder Genmutationen, das klinische Erscheinungsbild sowie die Tumorlokalisation und -ausbreitung von Bedeutung [336].

1.1.2.3 Therapie

Der Großteil der Non-Hodgkin-Lymphome lässt sich durch eine Polychemotherapie nach dem CHOP-Schema in kurativer oder palliativer Intention behandeln [41, 42, 72, 128, 176, 181]. Sofern die neoplastischen Zellen CD20 exprimieren, kann der chimäre anti-CD20-Antikörper Rituximab als zielgerichtetes Therapeutikum eingesetzt werden (R-CHOP), wodurch in vielen Fällen eine Prognoseverbesserung beobachtet werden konnte [55, 259, 265]. In einigen Fällen wird eine alleinige oder ergänzende Strahlentherapie durchgeführt [134, 375]. Von diesem Grundschema abweichende Therapiekonzepte werden unter anderen zur Behandlung chronischer lymphatischer Leukämien, multipler Myelome und primär zerebraler Non-Hodgkin-Lymphome gewählt [175, 178, 179, 366, 373]. Ein etabliertes Mittel zur Risikostratifizierung der an Non-Hodgkin-Lymphomen Erkrankten stellt der Internationale Prognostische Index (IPI) dar. Dieser berücksichtigt verschiedene patienten- und erkrankungsbezogene Faktoren (Alter, Ann-Arbor-Stadium, Allgemeinzustand, Anzahl extranodaler Herde, Lactatdehydrogenase-Wert) und kann durch eine Prognoseeinschätzung bei der Therapieplanung bedeutsam sein [137].

1.1.2.4 Prognose

Die Prognose von Non-Hodgkin-Lymphomen in Deutschland ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate von 70 % bei Frauen und 68 % bei Männern insgesamt betrachtet gut, das mittlere Sterbealter lag im Jahr 2017 für Frauen bei 80 Jahren und für Männer bei 77 Jahren [289]. Aufgeschlüsselt nach ICD-10-Diagnosen hat insbesondere das multiple Myelom eine deutlich ungünstigere Prognose: Die Fünfjahresüberlebensrate liegt hier bei 49 %, im Schnitt versterben erkrankte Frauen mit 78 Jahren und erkrankte Männer mit 76 Jahren [288]. Ähnlich den Hodgkin-Lymphomen besteht nach überstandener Non-Hodgkin-Lymphom-Erkrankung ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Sekundärmalignoms [25] insbesondere vor Erreichen des 45. Lebensjahres [222]. Eine Assoziation mit dem gewählten Therapieregime ist wahrscheinlich [226, 349]. Signifikante Zunahmen des relativen Risikos wurden unter anderem für die Entwicklung von Hodgkin-Lymphomen, myeloischen Leukämien, malignen Hodentumoren, Schilddrüsen-, Nierenzell- und Lungenkarzinomen als Sekundärmalignome beobachtet [25, 226]. Als therapiebedingte Langzeitfolgen konnten zudem Risikozunahmen für kardiovaskuläre

Erkrankungen und zerebrovaskuläre Ereignisse festgestellt werden [223].

1.1.2.5 Vorstellung relevanter Non-Hodgkin-Lymphomentitäten

1.1.2.5.1 Primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom

Das primär mediastinale (thymische) großzellige B-Zell-Lymphom (PMBL) gehört zu den reifzelligen hochmalignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen und geht mutmaßlich von B-Zellen des Thymusmarks aus [2, 62, 97, 138, 214, 215]. Es betrifft vor allem Frauen in der dritten bis vierten Lebensdekade, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 35 Jahren [2, 49, 171, 213, 257, 292, 342, 347].

Seinen Hauptmanifestationsort hat das PMBL im vorderen Mediastinum häufig mit Bezug zum Thymus [256], hierbei neigt es zu infiltrativem Wachstum in umliegende Strukturen wie Perikard, Pleura oder Lunge [49, 174, 256, 396]. Das Auftreten eines PMBL außerhalb des Mediastinums ist unüblich, eine hämatogene Ausbreitung der neoplastischen Zellen in Niere, Nebenniere, Gastrointestinaltrakt und das zentrale Nervensystem wurde jedoch beschrieben und geht in der Regel mit einer schlechten Prognose einher [37, 49, 97, 347]. Ein Knochenmarkbefall und eine Ausbreitung in extrathorakale Lymphknoten kommen beim PMBL ebenfalls selten vor und sprechen differentialdiagnostisch eher für ein diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL) mit Mediastinalbefall [49, 96, 97, 347].

Ein PMBL kann klinisch lange Zeit unauffällig bleiben. B-Symptome, Dysphagie, Heiserkeit und unproduktiver Husten, Dyspnoe in Folge von Atemwegskompression, Thoraxschmerzen, Halsvenenstauung durch lokal invasives Wachstum oder ein Perikard- oder Pleuraerguss können unspezifische klinische Hinweise auf ein PMBL sein [97, 174, 181, 347].

Histologisch zeigt das PMBL ein heterogenes Bild. Es zeichnet sich durch diffuses Wachstum und eine teils ausgeprägte Sklerosierung des Bindegewebes aus. Eine starke interindividuelle Variabilität der neoplastischen Zellen hinsichtlich Größe und Morphologie ist typisch, während die neoplastischen Zellen innerhalb einer Läsion nur wenig variieren [97, 185, 256]. Charakteristischerweise werden unter anderem die B-Zell-Antigene CD19, CD20, CD22 und CD79a exprimiert, wohingegen Immunglobuline, HLA I, HLA II, CD3, CD5, CD10 und CD21 nicht exprimiert werden [97, 121, 126, 212, 214, 216, 262]. CD30 lässt sich größtenteils nachweisen, wobei sich das Färbemuster

von jenem in klassischen Hodgkin-Lymphomen unterscheidet, CD15 wird nur selten exprimiert [97, 121, 262].

Das PMBL wird anhand der modifizierten Ann-Arbor-Kriterien klassifiziert [53]. Bei 60 bis 70 % der Erkrankten hat das PMBL bei Diagnosestellung bereits einen Durchmesser von über 10 cm erreicht, nichtsdestotrotz werden 80 % der PMBL-Erkrankungen im Frühstadium (I oder II nach Ann-Arbor-Klassifikation) erkannt [396]. In der Regel werden PMBL-Patient(inn)en mit einer Chemotherapie nach dem R-CHOP- oder DA-EPOCH-R-Schema behandelt, gegebenenfalls mit konsolidierender Bestrahlung des Resttumors [74, 181, 282]. Prognostisch ungünstig wirken sich ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium nach Ann-Arbor-Klassifikation sowie ein reduzierter Allgemeinzustand, hohe Lactatdehydrogenase-Werte und das Vorliegen eines Perikardergusses aus [174]. In Studien konnten hohe Heilungsraten und eine Fünfjahresüberlebensrate von bis zu 97 % beobachtet werden [74, 282].

1.1.2.5.2 Multiples Myelom

Beim multiplen Myelom (MM) handelt es sich um eine von Plasmazellen ausgehende Neoplasie, die zur Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome zählt [200]. Häufig geht einem multiplen Myelom eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) voraus [172, 363]. Infektionen, chronische Erkrankungen, toxische Substanzen und Strahlung könnten ätiologisch eine Rolle spielen [92, 182, 186, 200].

In der Regel zeigt sich beim multiplen Myelom eine generalisierte oder multifokale Infiltration des Knochenmarks durch die neoplastischen Zellen, welche Ähnlichkeit zu reifen Plasmazellen aufweisen und ein abnormes monoklonales Immunglobulin (M-Protein) produzieren können. Die neoplastischen Zellen exprimieren analog zu physiologisch vorkommenden Plasmazellen CD38 und CD138. CD45 wird hingegen nicht, CD19 selten exprimiert. Als aberrante Antigene können CD56, CD200, CD28, CD20, CD52, CD10, KIT (CD117), myeloische und monozytäre Antigene und seltener für Stammzellen typische Antigene vorkommen [200].

Durch die zunehmende Verdrängung des physiologischen blutbildenden Marks kann es im peripheren Blut zur Panzytopenie kommen [169, 281]. Ein leukämischer Verlauf mit Ausschwemmung der Myelomzellen ins periphere Blut wird insgesamt selten beobachtet [38, 345]. Eine extramedulläre Beteiligung deutet oft auf ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium hin [50, 60, 353, 355].

Klinisch äußert sich das multiple Myelom durch Anämiesymptome wie Blässe und Schwäche, durch Blutungsneigung und Infektanfälligkeit. Letztere beruht unter anderem auf einem Mangel an funktionstüchtigen Immunglobulinen. Eine B-Symptomatik kann ebenfalls auftreten [105, 169, 281]. Knocheninfiltrationen durch die neoplastischen Plasmazellen können zu Osteolysen führen. Diese können klinisch als Knochenschmerzen oder laborchemisch als Hyperkalzämie in Erscheinung treten und mittels Bildgebung nachgewiesen werden. In einigen Fällen manifestiert sich das multiple Myelom durch pathologische Frakturen unter anderem der Wirbelkörper, Rippen oder des Schädels [136, 169]. Seltener können neurologische Ausfälle infolge Rückenmarkskompression oder eine periphere Polyneuropathie auftreten [50, 169, 200, 281].

Das von den neoplastischen Plasmazellen produzierte abnorme Immunglobulin kann sowohl im Serum als auch im Urin nachweisbar sein [136, 169]. In Folge der abnormen Immunglobulinproduktion kann es zur Amyloidose [136, 168, 200, 268, 364] mit Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen [229, 247, 273, 277], Malabsorptionssyndrom [279, 337] oder Niereninsuffizienz und zu weiteren Erkrankungen der Nieren (Myelom-Niere, Leichtkettenerkrankung, etc.) kommen [3, 70, 119, 139, 162, 200, 236, 237]. Laborchemisch können neben einer Hyperkalzämie eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, ein verminderter Anteil polyklonaler Immunglobuline, eine Hyperurikämie, eine Hypalbuminämie und erhöhte Werte für Kreatinin, Lactatdehydrogenase und β2-Mikroglobulin im Serum auffallen [105, 136, 169, 200, 248]. Die Diagnosestellung erfolgt anhand der Kriterien der International Myeloma Working Group (klonale Plasmazellen im Knochenmark ≥ 10 % und monoklonales Protein im Serum und/oder im Urin nachweisbar und/oder Vorliegen von Endorganschäden: Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie, osteolytische oder diffuse Knochendestruktion) [136, 270]. Zur klinischen Stadieneinteilung wird das überarbeitete Internationale Staging System (R-ISS) der International Myeloma Working Group verwendet, da dieses eine Abschätzung der Prognose hinsichtlich Überlebenszeit und (progressionsfreier) Fünfjahresüberlebensrate ermöglicht. Berücksichtigt werden Laborparameter (β2-Mikroglobulin, Albumin, Lactatdehydrogenase im Serum) und zytogenetische Aberrationen [105, 248].

Die Therapie des multiplen Myeloms setzt sich im Wesentlichen aus Induktion, autologer Transplantation, Konsolidierung und Erhaltung zusammen. Allgemein wird die Behandlung in Studien empfohlen. Bei Knochenbeteiligung wird zusätzlich eine

osteoprotektive Therapie durchgeführt, je nach Indikation erfolgt ergänzend eine Strahlentherapie [178, 373]

1.1.2.5.3 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Das diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) umfasst eine heterogene Gruppe reifzelliger B-Zell-Lymphome, die morphologisch durch diffus wachsende mittelgroße bis große B-Zellen auffallen und aufgrund ihres aggressiven Wachstumsverhaltens zu den hochmalignen Lymphomen gezählt werden [96]. Sowohl in Deutschland als auch weltweit betrachtet ist das DLBCL eines der häufigsten Non-Hodgkin-Lymphome. Es tritt vor allem im höheren Lebensalter auf, kann jedoch auch bei Kindern oder im jungen Erwachsenenalter vorkommen [10, 96, 220, 342, 388]. Das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland lag für den Zeitraum von 2011 bis 2013 bei 71 Jahren, Männer sind häufiger betroffen als Frauen [289, 388].
Die Ätiopathogenese des DLBCL ist weitestgehend ungeklärt [96]. Ein DLBCL kann sowohl de novo als primäres DLBCL entstehen als auch als sekundäres DLBCL aus indolenten Lymphomentitäten wie beispielsweise einem follikulären Lymphom, einem Marginalzonenlymphom, einem nodulär Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom oder einer chronischen lymphatischen Leukämie hervorgehen. Sekundäre DLBCLs treten seltener auf als primäre DLBCLs und gehen mit einer schlechteren Prognose einher [8, 28, 57, 96, 296, 348]. Immundefizienz stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung eines DLBCL dar [96]. Betroffene mit vorbestehender Immundefizienz infolge HIV-Infektion zeigen gegenüber einer nichtinfizierten Referenzgruppe im Schnitt ein jüngeres Erkrankungsalter, ein häufigeres Auftreten EBV-positiver Lymphome, eine häufigere extranodale Manifestation bei Erstdiagnosestellung sowie geringere Überlebensraten [221]. Unter immunkompetenten Erkrankten kommen EBV-positive Fälle selten vor, diese werden durch die WHO als separate Entität (EBV$^+$ DLBCL) klassifiziert [32, 96, 99, 125].
Eine weiterführende Einteilung des DLBCL in Subtypen kann anhand verschiedener Gesichtspunkte erfolgen. Hinsichtlich der Ähnlichkeit zur mutmaßlichen Ursprungszelle (cell-of-origin, COO) und entsprechender Genexpression unterscheidet man das keimzentrumsartige (germinal center B-cell (GCB)-like DLBCL) vom aktivierten B-Zellen ähnlichen DLBCL (activated B-cell (ABC)-like DLBCL) [7, 96, 181]. Möglich ist zudem eine morphologische Subklassifizierung in zentroblastische,

immunoblastische, anaplastische und seltenere DLBCL-Subtypen. Weitere Einteilungskriterien können darüber hinaus der Immunphänotyp oder das Vorliegen genetischer Aberrationen sein. Bei Letzterem sind insbesondere Translokationen von *MYC* und *BCL2* und/oder *BCL6* von Bedeutung [26, 56, 96, 110, 129, 161, 181].

Typisch für das DLBCL ist eine rasch progrediente Lymphknotenvergrößerung. B-Symptome und extranodale Manifestationen können ebenfalls auftreten. Letztere finden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei bis zu 40 % der Erkrankten. Extranodale Manifestationen treten am häufigsten im Gastrointestinaltrakt auf, können aber auch Knochen, Hoden, Waldeyer-Rachenring, Milz, Speicheldrüse, Leber, Niere, Schilddrüse oder Nebennieren und seltener das zentrale Nervensystem betreffen [48, 96, 211]. Eine Knochenmarkbeteiligung tritt in 10 bis 25 % der Fälle auf. Eine resultierende Panzytopenie kann zur Anämie, Blutungsneigung und Infektanfälligkeit führen. Das Auftreten neoplastischer Zellen im peripheren Blut wird selten beobachtet [12, 14, 96].

Histomorphologisch zeigen sich beim DLBCL charakteristischerweise mittelgroße bis große Zellen, die einen ebenfalls großen Zellkern besitzen. Weitere Merkmale variieren zwischen den einzelnen Subtypen [96]. Die neoplastischen Zellen exprimieren in der Regel Marker der B-Zell-Reihe (CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX5) [56, 66, 96] und können CD5 [56, 374, 376], CD30 [132, 326], BCL2, BCL6, CD10 und MUM1/IRF4 exprimieren [34, 56, 96].

Die Diagnosesicherung erfolgt durch die histopathologische Untersuchung eines im Idealfall vollständig entnommenen Lymphknotens. Ist die sich darstellende Morphologie mit der Diagnose eines DLBCL vereinbar, wird das Vorliegen einer *MYC*-Translokation mittels FISH untersucht. Ist diese nachweisbar, wird zur Abgrenzung von high-grade B-Zell-Lymphomen auf Vorliegen einer *BCL2*- und/oder *BCL6*-Translokation getestet. Zudem sollte eine COO-Subtypisierung durchgeführt werden, wozu die immunhistochemische Bestimmung nach der Hans-Klassifikation empfohlen wird. Über Färbungen für CD10, BCL6 und MUM1/IRF4 kann so eine Unterscheidung zwischen Keimzentrumstyp (GCB-Typ; CD10+ oder CD10-, BCL6+, MUM1/IRF4-) und Nicht-Keimzentrumstyp (Non-GCB-Typ; CD10-, BCL6- oder CD10-, BCL6+, MUM1/IRF4+) erfolgen [110, 158, 181].

Das Erkrankungsstadium wird nach der modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation angegeben [53]. Häufig wird ein DLBCL erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Bei etwa einem Drittel der DLBCL-Patient(inn)en liegt zum

Diagnosezeitpunkt bereits ein Stadium IV vor [14, 48, 211]. Eine Einschätzung der Prognose kann durch den Internationalen Prognostischen Index (IPI) beziehungsweise den NCCN-IPI (National Comprehensive Cancer Network-IPI) erfolgen. Der NCCN-IPI wurde nach Etablierung von Rituximab in der DLBCL-Therapie aus dem IPI entwickelt, um weiterhin eine trennscharfe Risikostratifizierung von DLBCL-Patient(inn)en zu ermöglichen [137, 395]. Vom (NCCN-)IPI unabhängige Risikofaktoren stellen eine Knochenmarkbeteiligung, eine große initiale Tumormasse (Durchmesser ≥ 7,5 cm) und Komorbiditäten dar [16, 116, 260, 314]. Von prognostischer Bedeutung ist zudem die COO-Subklassifizierung [7, 110, 294].

Therapeutisch wird in der Regel ein kurativer Ansatz herangezogen. Ohne Therapie zeigt das DLBCL einen rasch progredienten, tödlich endenden Verlauf. Die Therapie erfolgt nach dem R-CHOP-Schema gegebenenfalls in Kombination mit einer Strahlentherapie PET-positiver Restbefunde. Bei großer initialer Tumormasse kann eine Strahlentherapie das Gesamtüberleben verbessern [116, 181]. Insgesamt liegt die Heilungsrate eines DLBCL in Deutschland zwischen 60 und 70 %. In Studien konnte für den GCB-like DLBCL-Subtyp eine Fünfjahresüberlebensrate von 60 bis 76 % beobachtet werden, für den ABC-like Subtyp zwischen 16 und 34 % [7, 110, 181, 289, 294].

1.2 Der JAK-STAT-Signalweg

Der JAK-STAT-Signalweg nimmt eine wichtige Rolle bei der Regulierung grundlegender Zellvorgänge ein. Durch Rezeptoraktvierung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die unter anderem Zellproliferation, -differenzierung und -überleben beeinflussen und zur Apoptose und Immunaktivierung führen kann. Es gibt zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren Signaltransduktion über den JAK-STAT-Signalweg abläuft, hierzu zählen Interferone [228, 324, 356, 361], Interleukine [21, 108, 142, 157, 340, 371, 382, 387], Erythropoietin [370], Somatotropin [13], Prolaktin [45, 76] und Leptin [98]. Die durch den JAK-STAT-Signalweg physiologisch vermittelten Wirkungen sind entsprechend vielfältig. Neben der Hämatopoese, Entwicklung sowie Regulierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems [75, 135, 154, 205, 219, 234, 241, 245, 251, 252, 254, 290, 343, 361, 371] sind unter anderem Wachstum [341, 350], Fertilität [341], Differenzierung der Brustdrüse und

Laktation [43, 261, 341, 350, 358] sowie Adipogenese [350] mit einer Signalübertragung durch JAKs und STATs verbunden.

Für die Signaltransduktionskaskade von wesentlicher Bedeutung sind rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen, die man als Januskinasen (JAKs) bezeichnet, sowie die zu den Transkriptionsfaktoren zählenden Signal Transducer and Activator of Transcription-Proteine (STATs) (vgl. Abbildung 1). Aktuell sind vier Januskinasen (JAK1 [368, 369], JAK2 [112, 368, 369], JAK3 [142, 272, 338, 372] und TYK2 [84, 167]) und sieben STAT-Proteine (STAT1 [89, 305, 317, 318], STAT2 [89, 305, 317, 318], STAT3 [4, 393, 394], STAT4 [377, 394], STAT5a [227, 359], STAT5b [192, 227, 359], STAT6 [130]) bekannt, wobei bestimmte Liganden, Rezeptoren, JAKs und STATs miteinander interagieren und so eine spezifische Wirkung hervorrufen können [21, 115, 319, 324, 356, 370]. STATs liegen in inaktiviertem Zustand im Zytoplasma vor und verfügen an ihrem Carboxyterminus über eine Src homology 2-Domäne (SH2), die mit phosphorylierten Tyrosinresten interagieren kann [90, 320].

Durch Bindung eines Liganden an den zugehörigen Rezeptor kommt es zur Rezeptoraktivierung mit Konformationsänderung der zytoplasmatischen Rezeptordomäne und Transphosphorylierung der rezeptorassoziierten JAKs [21, 319, 324, 357, 370]. Die JAKs phosphorylieren nachfolgend Tyrosinreste der zytoplasmatischen Rezeptordomäne, wodurch Bindungsstellen für Proteine mit einer SH2-Domäne entstehen [210, 370, 384]. STATs können nun über ihre SH2-Domäne an die phosphorylierten Rezeptortyrosinreste binden, anschließend werden sie durch die JAKs ebenfalls an einem carboxyterminal gelegenen Tyrosinrest phosphoryliert [90, 318, 324, 393]. Die hierdurch aktivierten STATs dissoziieren vom Rezeptor und dimerisieren durch Wechselwirkung zwischen SH2-Domänen und phosphorylierten Tyrosinresten [320, 393]. Als Dimere gelangen sie in den Zellkern, wo sie über Bindung an spezifische DNA-Sequenzen der Promotorregion die Expression ihrer Zielgene beeinflussen können (vgl. Abbildung 1) [107, 318, 320, 393].

Es gibt verschiedene Mechanismen, die eine hemmende Wirkung auf die Signalübertragung ausüben können und hierdurch eine wichtige Funktion bei der Regulierung von Zellproliferation und -überleben übernehmen. Hierzu zählen SHP-1 [61, 208], SHP-2 [386], PTP1B [194, 230], TC-PTP [325], PIAS [54, 188] und Vertreter der SOCS-Familie [199, 243, 300, 381, 385]. SOCS1 kann beispielsweise direkt mit Januskinasen interagieren und durch Hemmung der Kinaseaktivität die Signalweiterleitung unterbinden (vgl. Abbildung 1) [80, 184, 232, 235, 243, 381].

Durch Dysregulation der Signaltransduktionskaskade können Genese und Progression einer Vielzahl von Erkrankungen begünstigt werden. Eine vermehrte Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges kann zum Beispiel bei vielen hämatologischen Neoplasien [29, 140, 165, 170, 278], soliden Tumorerkrankungen [51, 95, 102, 362] und Autoimmunerkrankungen beobachtet werden [77, 87, 280, 323].

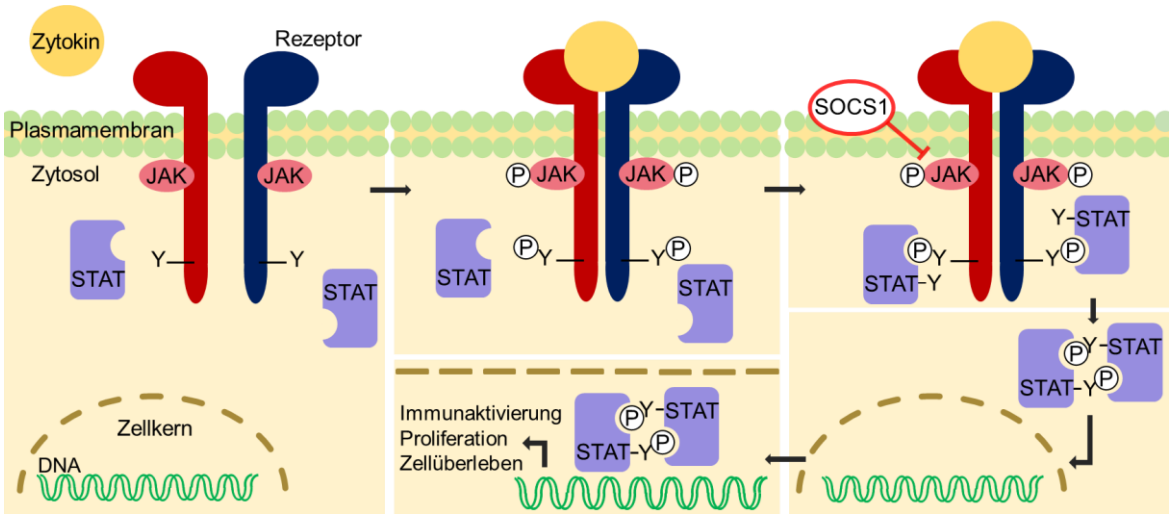


Abbildung 1: Der JAK-STAT-Signalweg nach Alexander [6]**.** Die Bindung des Zytokins an den zugehörigen Rezeptor führt zur Rezeptoraktivierung und Transphosphorylierung der JAKs. Aktivierte JAKs phosphorylieren Rezeptortyrosinreste und ermöglichen hierdurch die Bindung von STAT-Proteinen an die intrazellulären Rezeptordomänen. Phosphorylierte STATs dissoziieren vom Rezeptor, als Dimere gelangen sie in den Zellkern und aktivieren durch Bindung spezifischer DNA-Sequenzen die Transkription ihrer Zielgene. SOCS1 kann direkt mit JAKs interagieren und die Signaltransduktion hemmen. JAK: Januskinasen, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription, Y: Tyrosinrest, P: Phosphorylierung, SOCS1: Suppressor of Cytokine Signaling 1.

1.3 Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1)

1.3.1 SOCS1 und die Familie der SOCS-Proteine

Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) sind Negativregulatoren der JAK-STAT-vermittelten Signaltransduktion. Die zytokininduzierte Aktivierung des Signalweges stimuliert als Nebeneffekt die Transkription von *SOCS*-Genen. Die entsprechenden SOCS-Proteine können nachfolgend über verschiedene Wirkmechanismen und Angriffspunkte die Signaltransduktion hemmen [64, 80, 111, 149, 151, 152, 184, 232, 235, 243, 258, 300, 381, 391]. Im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus

können sie somit eine übermäßige Aktivierung des Signalweges verhindern und Einfluss auf wichtige Zellvorgänge wie Proliferation und Zellüberleben oder die Immunantwort ausüben. Die SOCS-Familie umfasst acht Proteine: SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 und CIS (Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein) [122]. Allen Mitgliedern der SOCS-Familie sind bestimmte strukturelle und funktionell bedeutsame Merkmale gemein. Hierzu zählen eine zentral gelegene SH2-Domäne und ein konserviertes Motiv am Carboxyterminus des Proteins, welches man als SOCS Box bezeichnet (vgl. Abbildung 2) [122, 328].

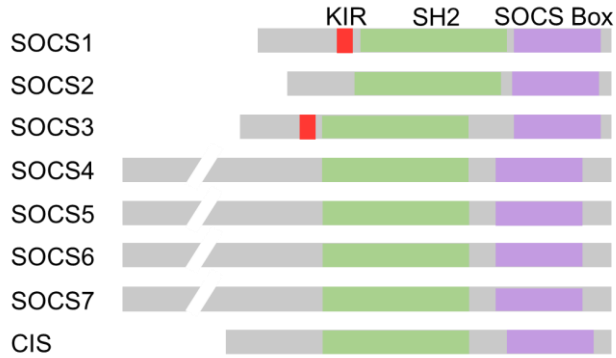


Abbildung 2: Schematische Darstellung der SOCS-Proteinfamilie nach Krebs/Hilton [166]. Alle acht Mitglieder der SOCS-Familie weisen eine SOCS Box am Carboxyterminus des Proteins und eine zentral gelegene SH2-Domäne auf. SOCS1 und SOCS3 verfügen zudem über eine aminoterminal gelegene KIR-Domäne. SOCS Box: violett, SH2-Domäne: grün, KIR-Domäne: rot. SOCS: Suppressor of Cytokine Signaling, CIS: Cytokine-Inducible SH2-Containing Protein, KIR: Kinasen-Inhibitorische Region, SH2: Src homology 2.

SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling 1) ist ein wichtiger und intensiv untersuchter Vertreter der SOCS-Familie. SOCS1 wurde erstmals 1997 durch drei verschiedene Forschungsgruppen beschrieben nachdem diesen unabhängig voneinander die Klonierung des *SOCS1*-Gens gelungen war [80, 232, 328]. Sie wählten für SOCS1 die Bezeichnungen Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) [328], STAT-induced STAT Inhibitor 1 (SSI-1) [232] und JAK-Binding Protein (JAB) [80]. Wie diese Bezeichnungen bereits andeuten, ist SOCS1 in der Lage, die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren stimulierte Signaltransduktion im Zytoplasma auf unterschiedlichen Wegen wirkungsvoll zu hemmen [64, 80, 151, 152, 184, 232, 235, 243, 381, 391].

Die physiologische Funktion von SOCS1 wurde an *SOCS1*-Knockout-Mäusen (*SOCS1*$^{-/-}$) untersucht. Diese starben jeweils innerhalb von drei Wochen nach der Geburt [5, 198, 207, 329]. Bei den *SOCS1*$^{-/-}$ Mäusen fielen eine Wachstumsretardierung, eine

Leberschädigung mit fettiger Degeneration und Nekrosen und eine Infiltration zahlreicher Organe durch Makrophagen und Granulozyten auf, der Thymus der *SOCS1*$^{-/-}$ Mäuse stellte sich größengemindert dar, in Knochenmark, Milz und im peripheren Blut konnte ein zunehmender Mangel an reifen B-Zellen festgestellt werden [207, 329]. Aus den Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass SOCS1 für die In-vivo Regulierung zahlreicher Zelltypen inklusive B- und T-Zellen essenziell ist [198, 329]. Nach weiteren Untersuchungen konnten die Veränderungen der *SOCS1*$^{-/-}$Mäuse durch eine vermehrte Wirkung von IFNγ [5, 198] und eine Schlüsselrolle von SOCS1 bei der Regulierung IFNγ-induzierter Prozesse erklärt werden [5].

SOCS1 kann die Signaltransduktion zahlreicher Zytokine und Wachstumsfaktoren über den JAK-STAT-Signalweg beeinflussen. Hierzu zählen IFNγ [5, 328], IFNα/β [327], IGF-1 [397], IL-2 [80], IL-3 [80], IL-4 [67, 193, 232], IL-6 [232, 328], OSM [328], LIF [232, 328], Prolaktin [258], Somatotropin [111, 271], Erythropoietin [80], Thrombopoietin [328], TSH [253] und G-CSF [232].

Insgesamt scheinen die Funktionen von SOCS1 deutlich komplexer und umfangreicher zu sein als bisher erforscht. Neben der inhibitorischen Wirkung auf den JAK-STAT-Signalweg im Zytoplasma sind mittlerweile zahlreiche weitere Funktionen bekannt. Beispielsweise ist SOCS1 in die Regulierung des Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalweges involviert [22, 156, 233]. Hierdurch greift SOCS1 über einen weiteren Mechanismus in das Überleben, die Reifung und Differenzierung diverser Zelltypen sowie die Entwicklung und Aktivierung des Immunsystems ein. Auf antigenpräsentierende Zellen hat SOCS1 eine hemmende Wirkung, was für die Immunosurveillance und weitere immunologische Prozesse von Bedeutung ist [109, 113, 156, 315]. Im Zellkern kann SOCS1 eine Hemmung des NF-κB-Signalweges bewirken. Hierbei induziert SOCS1 über Ubiquitinierung die proteasomale Degradation der p65/RelA-Untereinheit von NF-κB und beeinträchtigt die NF-κB-Aktivität [298, 332]. Zudem kann SOCS1 mit dem Tumorsuppressor p53 interagieren und über dessen Aktivierung zur Förderung antiproliferativer und anti-inflammatorischer Prozesse sowie zur Onkogen-induzierten Seneszenz beitragen [44]. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass *SOCS1* einerseits die Funktion eines Tumorsuppressorgens ausübt [148, 189, 242, 246, 297, 316, 383], andererseits jedoch auch als Onkogen [183, 269, 346] agieren kann.

1.3.2 Die Struktur von SOCS1 und die inhibitorische Wirkung auf den JAK-STAT-Signalweg

Das *SOCS1*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (16p13) [379]. Es unterteilt sich in zwei Exonbereiche, wobei der codierende Bereich auf dem zweiten Exon zu finden ist [306] und 636 Basenpaare umfasst [238]. Das SOCS1-Protein hat eine Länge von 211 Aminosäuren [239].

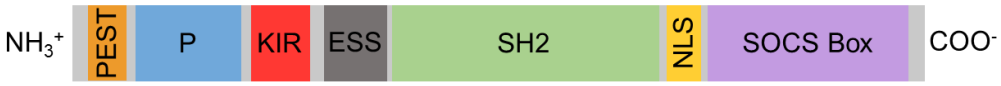


Abbildung 3: Schematische Darstellung der SOCS1-Proteindomänen nach Baetz et al. [23]. Wie alle Mitglieder der SOCS-Proteinfamilie besitzt das SOCS1-Protein eine zentral gelegene SH2-Domäne und eine SOCS Box am Carboxyterminus des Proteins. Im Bereich des Aminoterminus weist das SOCS1-Protein zwei prolinreiche Domänen, eine KIR-Domäne und mutmaßlich ein PEST-Motiv auf. Zentral findet sich angrenzend an die SH2- eine ESS-Domäne. Am Carboxyterminus besitzt SOCS1 ein Kernlokalisierungssignal. Erläuterungen zu den Funktionen der einzelnen Proteindomänen finden sich im Text. PEST: mutmaßliches PEST-Motiv, P: prolinreiche Domänen, KIR: Kinasen-Inhibitorische Region, ESS: Erweiterte-SH2-Subdomäne, SH2: SH2-Domäne, NLS: Kernlokalisierungssignal.

PEST-Motiv (aa 22-39 [17]): PEST-Motive sind Aminosäuresequenzen, die reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) und in der Regel mit einer geringen Halbwertszeit des Proteins verbunden sind [18, 291]. SOCS1 besitzt ein mutmaßliches PEST-Motiv im Bereich des Aminoterminus [17].

Prolinreiche Domänen (aa 34-39, aa 41-47 [64]): SOCS1 verfügt am Aminoterminus über zwei prolinreiche Domänen (Diprolin-Motiv Typ I und II). Über diese kann SOCS1 mit Proteinen interagieren, die eine SH3-Domäne (Src homology 3, SH3) besitzen. Hierzu zählen Proteine wie Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), die wichtige Zellprozesse und intrazelluläre Signalvorgänge beeinflussen können [64]. Aminoterminal der prolinreichen Domänen findet sich darüber hinaus ein Polyserin-Motiv [64] mit sieben aufeinanderfolgenden Serinresten [239].

KIR (aa 55-66 [23]): Die Kinasen-Inhibitorische Region (Kinase Inhibitory Region, KIR) findet sich am Aminoterminus von SOCS1 und SOCS3 [243, 300, 381]. Sie verstärkt die Bindungsaffinität zwischen JAKs und SOCS1 respektive SOCS3 [184, 381]. Mutationen der KIR-Domäne führen zu einer deutlich herabgesetzten Affinität [184]. Durch

Ähnlichkeit zum Activation Loop fungiert sie zudem als Pseudosubstrat der JAKs und kann hierüber die Kinaseaktivität hemmen [184, 300, 381].

ESS (aa 67-78 [23, 184]): Die Erweiterte-SH2-Subdomäne (Extended SH2 Subdomain, ESS) liegt aminoterminal der SH2-Domäne [300, 381]. Sie ist für die SH2-Phosphotyrosin-Interaktion, Ausrichtung der Zielmoleküle und Bindungsaffinität von Bedeutung [18, 235, 300, 381].

SH2 (aa 79-158 [23, 184]): Über ihre zentral gelegene SH2-Domäne (Src homology 2, SH2) können SOCS-Proteine an phosphorylierte Tyrosinreste binden. Befinden sich diese an Rezeptoren, kann durch SH2-vermittelte Bindung der phosphorylierten Tyrosinreste die Rekrutierung von STATs verhindert oder die Aktivität der JAKs beeinträchtigt werden [103, 111, 173, 199, 271, 301, 378, 385]. Eine direkte Hemmung der Kinaseaktivität durch Bindung an JAKs ist ebenfalls möglich [235, 243, 381]. SOCS1 kann bestimmte phosphorylierte Tyrosinreste im Activation Loop der JAKs binden (bei JAK2 pY1007) und hierdurch sterisch den Zugang zum aktiven Zentrum blockieren [100, 184, 381]. Die SH2-Domäne bestimmt, welche Zielmoleküle gebunden werden können, sie ist ein gemeinsames Merkmal aller SOCS-Proteine [80, 122, 184, 232, 328].

NLS (aa 159-172 [23]): Zwischen SH2-Domäne und SOCS Box besitzt SOCS1 ein Kernlokalisierungssignal (NLS), welches die Translokation von SOCS1 in den Zellkern vermittelt [23]. Mutationen in diesem Bereich führen zu einer Umkehr des Expressionsmusters mit einem vermehrten Vorkommen von SOCS1 im Zytoplasma [23, 163]. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der SOCS-Familie, die kein NLS besitzen und physiologischerweise nicht im Zellkern vorkommen (zum Beispiel CIS), nach Fusion mit der SOCS1-NLS in den Zellkern translozieren können [23].

SOCS Box (aa 173-211 [23]): Die SOCS Box am Carboxyterminus des Proteins ist allen Mitgliedern der SOCS-Familie gemein [122, 328, 381]. Sie kann über Interaktion mit Elongin B, Elongin C [151, 391], Cullin-2/Rbx1 oder Cullin-5/Rbx2 und E2-Ligase [20, 152] die Bildung des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes vermitteln [20, 152, 391]. Hierüber können die für die Signalweiterleitung erforderlichen Proteine durch Ubiquitinierung für den Abbau im Proteasom gekennzeichnet werden, was insgesamt die Signalweiterleitung hemmt [64, 88, 149, 218, 351, 391]. Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass die SOCS Box SOCS-Proteine vor der proteasomalen Degradation

schützen [235] und die Interaktion zwischen SOCS Box und dem Elongin BC-Komplex insgesamt die Proteinstabilität erhöhen kann [19, 151].

Zusammenfassend lassen sich drei Mechanismen benennen, über die SOCS-Proteine im Zytoplasma inhibierend auf die JAK-STAT-vermittelte Signaltransduktion einwirken können: 1. Die direkte Interaktion zwischen SOCS und JAKs über SH2- und ESS-Domäne mit Hemmung der Kinaseaktivität über die KIR-Domäne [111, 184, 235, 243, 258, 271, 300, 381]. 2. Die Markierung von JAKs und Rezeptoren für den proteasomalen Abbau durch ein Zusammenwirken der SOCS Box und weiterer Faktoren zur Bildung des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes [20, 64, 88, 149, 151, 152, 218, 351, 391]. 3. Die Blockierung von STAT-Bindungsstellen und Hemmung der Kinaseaktivität durch Bindung an zytoplasmatischen Rezeptordomänen über SH2-Phosphotyrosin-Interaktion [111, 184, 199, 258, 271, 301, 378]. SOCS1 bewirkt über die beiden erstgenannten Mechanismen eine Hemmung des JAK-STAT-Signalweges [20, 88, 149, 151, 184, 218, 235, 243, 351, 381].

1.3.3 Die Bedeutung von SOCS1 in B-Zell-Lymphomen

Führt man sich die physiologischen Funktionen von SOCS1 vor Augen, wird klar, dass Veränderungen des *SOCS1*-Gens mit Beeinträchtigung der Funktionalität des SOCS1-Proteins deutliche Auswirkungen auf essenzielle regulatorische Prozesse innerhalb der Zelle haben können. Eine konstitutive Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges wurde für eine Vielzahl maligner Erkrankungen beschrieben. Hierzu zählen auch diverse B-Zell-Lymphomentitäten wie beispielsweise Hodgkin-Lymphome [367], primär mediastinale großzellige B-Zell-Lymphome (PMBL) [203], multiple Myelome [93] und diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) [304]. In einigen dieser Lymphomentitäten ist der *SOCS1*-Mutationsstatus von prognostischer Relevanz [146, 180, 202, 304].

In der Pathogenese der Hodgkin-Lymphome sind Veränderung der NF-κB- [78, 79, 123, 124, 144, 147, 276] und JAK-STAT- [127, 147, 180, 201, 224, 310, 344, 367] vermittelten Signaltransduktion von zentraler Bedeutung. In klassischen Hodgkin-Lymphomen zählt *SOCS1* zu den am häufigsten mutierten Genen [147, 180, 344, 367]. 2006 konnten Weniger et al. sowohl in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien als auch in 42 % (8/19) der untersuchten klassischen Hodgkin-Lymphome *SOCS1*-Mutationen in den

HRS-Zellen nachweisen [367]. Neuere Studien von Lennerz/Hoffmann et al., Juskevicius et al. und Tiacci et al. zeigen *SOCS1*-Mutationsraten von 61 % (64/105) [180], 90 % (9/10) [147] und 59 % (16/27) [344] in den jeweils untersuchten Kohorten. Das Häufigkeitsverhältnis von trunkierenden zu nichttrunkierenden Mutationen variiert zwischen den genannten Studien [147, 180, 344]. In klassischen Hodgkin-Lymphomen kommt dem *SOCS1*-Mutationssubtyp durch Zuteilung zu den Gruppen „trunkierend (Major)", „nichttrunkierend (Minor)" und „Wildtyp" die Bedeutung eines tumorspezifischen prognostischen Biomarkers zu [180]. Demnach gehen trunkierende *SOCS1*-Mutationen mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf, höheren Rezidivrisiko und geringeren Gesamtüberleben einher [180]. Für die Subtypen „Wildtyp" und „nichttrunkierend" konnten Lennerz/Hoffmann et al. hingegen vergleichbare Gesamtüberlebensraten ermitteln [180].

Auch beim PMBL spielt die konstitutive Aktivierung des NF-κB- [73, 83, 97, 308] und des JAK-STAT-Signalweges [27, 73, 97, 203, 204, 225, 283, 284] pathogenetisch eine wesentliche Rolle. Bereits 2005 wurde gezeigt, dass sowohl in PMBL-Zelllinien als auch in PMBL-Tumorgewebe *SOCS1*-Mutationen gehäuft vorkommen und infolge eines defekten SOCS1-Proteins eine Dysregulation des JAK-STAT-Signalweges bewirken [27, 203]. Melzner et al. begründeten durch ihre Untersuchungen die Rolle von SOCS1 als Tumorsuppressor im PMBL [203, 204]. In der 2005 von Melzner et al. untersuchten PMBL-Kohorte konnten *SOCS1*-Mutationen in 45 % der Fälle (9/20) festgestellt werden [203]. Neuere Studien konnten diese Ergebnisse mittels Next Generation Sequencing bestätigen. So fanden Dubois et al. 2016 in 55,5 % (10/18) aller untersuchten PMBL-Gewebeproben *SOCS1*-Mutationen [73], häufiger traten in dieser Kohorte lediglich *STAT6*-Mutationen (72,2 %) auf [73]. In der 2019 von Mottok et al. untersuchten PMBL-Kohorte kamen *SOCS1*-Mutationen mit 64 % (60/94) insgesamt am häufigsten vor [225]. Den Großteil machten hierbei Missense-Mutationen (35/60) aus, häufig konnten auch multiple *SOCS1*-Mutationen pro Fall (18/60) beobachtet werden [225]. Molekulargenetisch weist das PMBL eine Ähnlichkeit mit dem klassischen Hodgkin-Lymphom auf [225, 295, 302, 367]. Ob *SOCS1*-Mutationen im PMBL eine prognostische Bedeutung zukommt, ist bisher jedoch nicht geklärt.

Für multiple Myelome konnte gezeigt werden, dass *SOCS1* in Myelomzellen durch Hypermethylierung inaktiviert vorliegen kann [65, 93, 94, 275]. Die hierdurch beeinträchtigte Regulierung des JAK-STAT-Signalweges bedingt eine stärkere Wirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und kann hierüber Überleben und Expansion

der Myelomzellen fördern [93]. Insbesondere IL-6 scheint hierbei eine wichtige Bedeutung zuzukommen [11, 93, 159, 160, 392]. Untersuchungen zur Häufigkeit von *SOCS1*-Hypermethylierung in verschiedenen Myelom-Kohorten kamen auf Werte zwischen 35,7 % (20/56)[94] und 74,5 % (38/51)[65]. Reddy et al. konnten in der von ihnen untersuchten Kohorte ähnliche Methylierungsraten in Fällen mit multiplem Myelom (40 %) und MGUS (45 %) beobachten [275], sodass sie die Vermutung aufstellten, dass es sich bei der *SOCS1*-Hypermethylierung um ein frühes Ereignis im Entstehungsprozess eines multiplen Myeloms handeln könne [275]. Eine prognostische Bedeutung des *SOCS1*-Methylierungsstatus hinsichtlich der Gesamtüberlebensdauer [65] oder eine Korrelation zwischen *SOCS1*-Methylierungsstatus und klinischen Parametern [94] konnte bislang nicht festgestellt werden.

Im DLBCL zählt *SOCS1* zu den 15 Genen, die am häufigsten von Mutationen betroffen sind [274]. Untersuchungen an DLBCL-Kohorten zeigen Mutationsraten zwischen 16 % (24/154) [304] und 28 % (21/76) [146]. Mehrere Studien gehen davon aus, dass *SOCS1*-Mutationen im DLBCL durch somatische Hypermutation bedingt sind [202, 224, 304]. Welche prognostische Bedeutung *SOCS1*-Mutationen im DLBCL zukommt, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Schif/Lennerz et al. konnten 2015 einen Zusammenhang zwischen dem Mutationssubtyp („trunkierend (Major)“, „nichttrunkierend (Minor)“, „Wildtyp“) und dem Gesamtüberleben erkennen [304]. In der von ihnen untersuchten Kohorte waren trunkierende *SOCS1*-Mutationen im Vergleich zur Wildtyp-Subgruppe mit einem längeren Gesamtüberleben, nichttrunkierende Mutationen mit einem deutlich kürzeren Gesamtüberleben assoziiert [304]. Juskevicius et al. konnten dieses Ergebnis nur teilweise bestätigen. In der von ihnen untersuchten Kohorte waren *SOCS1*-Mutationen mit einem längeren progressionsfreien Überleben verbunden, prognostische Unterschiede zwischen trunkierenden und nichttrunkierenden Mutationen zeigten sich jedoch nicht [146]. In einer weiteren Studie von Juskevicius et al. waren *SOCS1*-Mutationen in DLBCL-Patient(inn)en mit günstigeren, nichtrezidivierenden Krankheitsverläufen assoziiert [145]. Neuere Untersuchungen von Mellert/Martin et al. konnten die Beobachtungen von Schif/Lennerz et al. und Juskevicius et al. nicht bestätigen. Sie stellten in ihren Untersuchungen fest, dass Mutationen, die mutmaßlich eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion bewirken, den positiven Effekt einer Rituximab-Zugabe zum DLBCL-

Therapieregime aufheben können und hinsichtlich des Gesamtüberlebens älterer, mit R-CHOP behandelter DLBCL-Patient(inn)en prognostisch ungünstig sind [202].

1.4 Antikörper

Antikörper sind wesentliche Hilfsmittel in der Forschung und im klinischen Alltag. Durch den gezielten Nachweis eines Proteins oder anderer zellulärer Bestandteile können Aussagen über die Expression dieser Zielstruktur in einzelnen Zellen oder ganzen Zellverbänden getroffen werden. Insbesondere bei Proteinen, die sich klinisch als Biomarker neoplastischer Erkrankungen etabliert haben, kann die Charakterisierung der Proteinexpression eine wichtige Grundlage hinsichtlich Prognose und Therapieplanung bilden. Ein hierzu etabliertes Verfahren ist die von Albert H. Coons beschriebene und sich seither stetig weiterentwickelnde Methode der Immunhistochemie, bei der über Antigen-Antikörper-Interaktion und nachfolgende Detektionsreaktionen Expressionsmuster dargestellt werden können [58, 59].

1.4.1 Die Bedeutsamkeit der Antikörpervalidierung und Validierungsalgorithmen

Zur Erforschung potenzieller Biomarker an Zelllinien und Gewebeproben sollte grundlegenderweise sichergestellt werden, dass die verwendeten Antikörper ihr Zielprotein zuverlässig und spezifisch nachweisen und sich entsprechende Ergebnisse unter gleichen Bedingungen reproduzieren lassen [40]. Vor der regelhaften Verwendung eines Antikörpers für immunhistochemische Verfahren empfiehlt es sich daher, einen Antikörper zu validieren. Ein standardisiertes Vorgehen zur Antikörpervalidierung ist beispielsweise als „Rimm Lab Algorithm for antibody validation of IHC/QIF“ publiziert worden [40]. Zur Antikörpervalidierung kann hierbei ein zweistufiges Vorgehen gewählt werden. In einem ersten Schritt sollte ein Antikörper hinsichtlich seiner Fähigkeit, sein Zielprotein spezifisch nachzuweisen, untersucht werden. Eine geeignete Methode ist die Verwendung des Antikörpers für Western Blots mit Lysaten aus Zelllinien, die das Zielprotein sicher exprimieren (Positivkontrolle) und sicher nicht exprimieren (Negativkontrolle) [40]. Gelingt ein spezifischer Nachweis des Zielproteins im Western Blot, kann in einem zweiten Schritt eine Antikörpervalidierung für die Immunhistochemie erfolgen. Diese umfasst unter

anderem die Untersuchung des Expressionsmusters und der Ergebnis-reproduzierbarkeit an Gewebeschnitten beispielsweise in Form eines Tissue Microarrays sowie die Austestung des Antikörpers in Hinblick auf Verdünnung und Gewebevorbehandlung [40].

1.4.2 Die Eigenschaften kommerziell verfügbarer und institutseigener monoklonaler anti-SOCS1-Antikörper und damit verbundene diagnostische Möglichkeiten

Zum Nachweis von SOCS1 stehen zahlreiche kommerzielle monoklonale Antikörper zur Verfügung. Diese erkennen ein aminoterminal gelegenes Epitop, welches durch die jeweiligen Hersteller nicht näher spezifiziert wird. Aus den Datenblättern der verschiedenen Antikörper können Informationen zur Immunisierungssequenz gewonnen werden (vgl. Abbildung 4), Angaben hinsichtlich einer möglichen Kreuzreaktivität der kommerziellen Antikörper werden vom Hersteller nicht getroffen. Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm hat gemeinsam mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg institutseigene monoklonale Antikörperklone generiert, die gegen den Carboxyterminus des SOCS1-Proteins gerichtet sind. Hierzu gehört der publizierte Antikörper 424C [365], der ein klar definiertes Epitop von acht Aminosäuren bindet. Eine mögliche Kreuzreaktivität dieses Antikörpers wurde während des Herstellungsprozesses ausgeschlossen [365]. Im Rahmen dieser Arbeit wird jeweils auf die beiden institutseigenen Antikörperklone #424/44/8/13 und #424/44/8 Bezug genommen, die hinsichtlich Herstellungsprozess, Kreuzreaktivitätstestung sowie wesentlicher Eigenschaften wie des Epitops mit dem publizierten Antikörper 424C übereinstimmen.

Mehrere Studien haben sich mit der prognostischen Bedeutung des *SOCS1*-Mutationssubtyps in B-Zell-Lymphomen beschäftigt [145, 146, 180, 202, 304]. Auch wenn in diesem Bereich noch weitere Erkenntnisse erforderlich sind, scheint die Differenzierung zwischen trunkierenden und nichttrunkierenden *SOCS1*-Mutationen und Wildtyp-*SOCS1* prognostisch und therapeutisch relevant zu sein. Zur Erfassung des *SOCS1*-Mutationsstatus sind zumeist aufwendige und zeitintensive Verfahren erforderlich [180]. Durch die Verfügbarkeit von Antikörpern, die den Aminoterminus respektive den Carboxyterminus des SOCS1-Proteins spezifisch nachweisen können, könnte eine Charakterisierung des SOCS1-Status gegebenenfalls mit Unterscheidung zwischen trunkiertem und nichttrunkiertem SOCS1 auf Proteinebene über Methoden

wie Western Blot und Immunhistochemie gelingen. Je nach Epitop der verfügbaren Antikörper könnte hierdurch zudem eine Aussage über das strukturell intakte Vorliegen funktionell bedeutsamer Proteindomänen getroffen werden.



Abbildung 4: Aminosäuresequenz des SOCS1-Proteins mit Darstellung der Immunisierungssequenzen und Epitope verschiedener monoklonaler anti-SOCS1-Antikörper sowie farblicher Hervorhebung einiger SOCS1-Proteindomänen. Die Immunisierungssequenz der kommerziellen Antikörper #LS-C191491, #4H1, #S1040-01K und #S1040-01C befindet sich am Aminoterminus des SOCS1-Proteins (vgl. dunkelblau unterstrichener Bereich, aa 2-78), das Epitop ist nicht bekannt. Die Immunisierungssequenz der institutseigenen Antikörper #424/44/8/13 und #424/44/8 liegt carboxyterminal (vgl. rot unterstrichener Bereich, aa 104-211), das Epitop ist klar definiert und umfasst acht Aminosäuren (aa 196-203, LNPVLRDY, vgl. rot gefensterter Bereich). KIR: rot, ESS: dunkelgrau, SH2: grün, NLS: gelb, SOCS Box: violett, weitere Aminosäuren: hellgrau. Details zu den Proteindomänen finden sich im Abschnitt 1.3.2.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist insbesondere, sich von B-Zell-Lymphomen ableitende Zelllinien hinsichtlich ihrer *SOCS1*-mRNA-Expression sowie ihres SOCS1-Proteinstatus zu untersuchen und dadurch Aussagen über auftretende Diskrepanzen zwischen Gen- und Proteinexpression treffen zu können. Als wesentlicher Nebenaspekt sollen hierbei institutseigene wie kommerziell erhältliche monoklonale anti-SOCS1-Antikörper bezogen auf ihre Fähigkeit, SOCS1 im Western Blot verlässlich und spezifisch nachzuweisen, verglichen werden. Im Hinblick auf die verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper sollen die Ergebnisse im Zusammenhang mit den jeweiligen Immunisierungssequenzen respektive Epitopen beurteilt werden. Zudem soll diskutiert werden, ob eine weiterführende Aussage über den SOCS1-Status (trunkiertes SOCS1 vs. nichttrunkiertes SOCS1) durch die verfügbaren monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper getroffen werden kann. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Antikörperspezifität soll darüber hinaus eine mögliche Verwendung der untersuchten Antikörper in der Immunhistochemie diskutiert werden.

2 Material und Methoden

Material

2.1 Zelllinien

Es wurden die folgenden Zelllinien aus dem Institut verwendet: HEK 293T, Karpas 1106, LCL, U-MM1b, HBL-1, L540, L428 und MedB-1. Eine Zelllinien-Authentifizierung erfolgte über STR-Analyse und Abgleich mit publizierten STR-Profilen (vgl. Abschnitt 2.18). Die zum Abgleich genutzten Daten stammten von ExPASy – Bioinformatics Resource Portal – Cellosaurus, Schweizer Institut für Bioinformatik SIB, Lausanne, Schweiz [313].

2.1.1.1 HEK 293T

Bei HEK 293T Zellen (human embryonic kidney) handelt es sich um Zellen einer menschlichen embryonalen Nierenzelllinie, welche als Variante der HEK 293 Zelllinie zusätzlich das SV40 large T-Antigen exprimieren.

2.1.1.2 Karpas 1106

Die 1994 von Nacheva et al. beschriebene Zelllinie Karpas 1106 (vgl. Abbildung 5a) entstammt dem Pleuraerguss einer 29-jährigen Frau mit mediastinalem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom [231]. Melzner et al. fanden 2006 heraus, dass in dieser Zelllinie biallelisch das *SOCS1*-Gen vollständig deletiert ist (vgl. Tabelle 1) [204]. Aufgrund ihrer biallelischen *SOCS1*-Defizienz wurden Karpas 1106-Zellen im Rahmen der nachfolgend dargestellten Experimente als Negativkontrolle eingesetzt.

2.1.1.3 LCL

Lymphoblastoide Zelllinien können durch In-vitro-Infektion von peripheren B-Lymphozyten mit dem Ebstein-Barr-Virus (EBV) generiert werden [240]. Die in dieser Arbeit verwendete lymphoblastoide Zelllinie (LCL) (vgl. Abbildung 5b) exprimiert wildtypisches *SOCS1* und leitet sich nicht von einem B-Zell-Lymphom, sondern von EBV^+ B-Zellen ab.

2.1.1.4 U-MM1b

Bei der Zelllinie U-MM1b (vgl. Abbildung 5c) handelt es sich um die Zelllinie eines multiplen Myeloms. Sie exprimiert Wildtyp-*SOCS1*.

2.1.1.5 HBL-1

Die 1997 von Abe et al. isolierte HBL-1-Zelllinie (vgl. Abbildung 5d) hat ihren Ursprung im Pleuraerguss eines 65-jährigen Mannes mit diffusem großzelligem B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom [1]. HBL-1-Zellen besitzen die Eigenschaften eines DLBCL vom ABC-Subtyp und exprimieren Wildtyp-*SOCS1*.

2.1.1.6 L540

Die Zelllinie L540 (vgl. Abbildung 5e) wurde 1981 von Diehl et al. beschrieben. Als Ursprungsmaterial für die Etablierung dieser Zelllinie diente das Knochenmark einer 20-jährigen Frau mit nodulär sklerosierendem klassischem Hodgkin-Lymphom im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (klinisches Stadium IVB) [68]. In L540-Zellen liegt *SOCS1* in wildtypischer Form vor.

2.1.1.7 L428

Die L428-Zelllinie (vgl. Abbildung 5f) wurde 1980 von Schaadt et al. publiziert. Sie entstammt dem Pleuraerguss einer 37-jährigen Frau mit nodulär sklerosierendem klassischem Hodgkin-Lymphom im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (klinisches Stadium IVB) [303]. Von Weniger et al. wurden 2006 auf DNA-Ebene biallelisch *SOCS1*-Mutationen im für die SH2-Domäne codierenden Bereich beschrieben: c.349_359del11 (fs); c.393_407del15 (if) (vgl. Tabelle 1) [367].

2.1.1.8 MedB-1

Bei der 2001 von Möller et al. beschriebenen Zelllinie MedB-1 (vgl. Abbildung 5g) handelt es sich um eine PBML-Zelllinie. Als Ursprungsmaterial für die Etablierung dieser Zelllinie diente Tumorgewebe eines 27-jährigen Mannes mit primär mediastinalem großzelligen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (klinisches Stadium IIB)

[217]. Für die MedB-1-Zellline sind 2005 von Melzner et al. biallelisch *SOCS1*-Mutationen im für die SOCS Box codierenden Bereich beschrieben worden: c.526_533del8 (fs); c.552_575del24 (if) (vgl. Tabelle 1) [203].

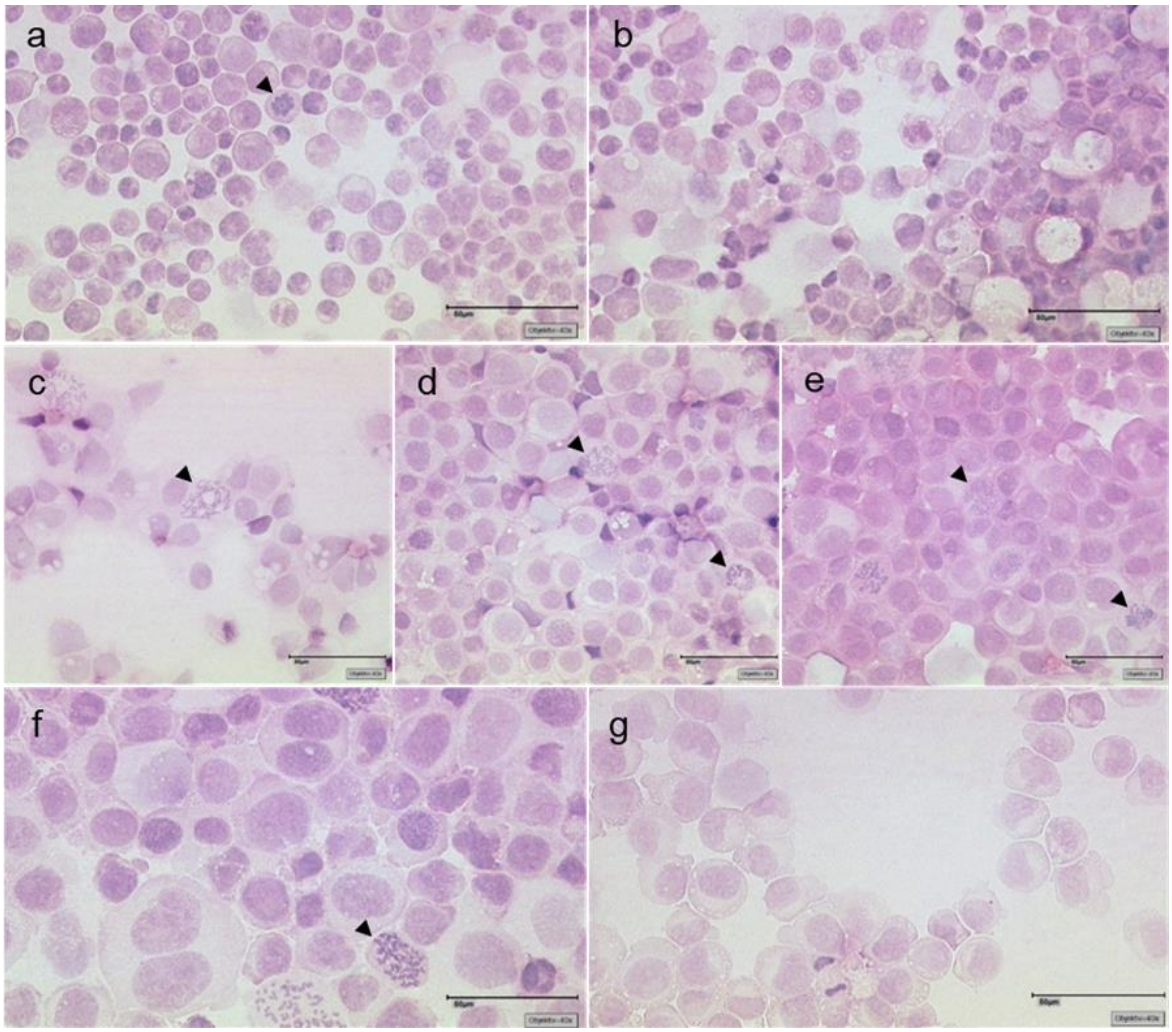


Abbildung 5: Morphologie der verwendeten B-Zell-Lymphomzelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie. H.E.-gefärbte Zytospinpräparate. a: Karpas 1106, b: LCL, c: U-MM1b, d: HBL-1, e: L540, f: L428, g: MedB-1. Mitosefiguren sind exemplarisch mit Pfeilspitzen (►) markiert. Abgebildete Messleiste: 50 µm, Objektiv: 40x.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten B-Zell-Lymphomzelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie. PMBL: Primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom (Primary Mediastinal B-cell Lymphoma), LCL: Lymphoblastoide Zelllinie (Lymphoblastoid Cell Line), MM: Multiples Myelom, ABC-DLBCL: Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom vom aktivierten B-Zell-ähnlichen Subtyp (activated B-cell-like), NSCHL: Hodgkin-Lymphom vom nodulär sklerosierenden Subtyp, EBV: Epstein-Barr-Virus, mut: Mutation, wt: Wildtyp, fs: Frameshift-Mutation, if: In-frame-Deletion.

Zelllinie	Entität	*SOCS1*-Ausprägung	Art der Mutation	Bereich	Auswirkung
Karpas 1106	PMBL	mut	Deletion, chromosomale Translokation (16p13.13)	gesamtes *SOCS1*-Gen	SOCS1-Verlust
LCL	durch Infektion mit EBV immortalisierte B-Zelllinie	wt			
U-MM1b	MM	wt			
HBL-1	ABC-DLBCL	wt			
L540	NSCHL	wt			
L428	NSCHL	mut	Deletion (c.349_359del11 (fs); c.393_407del15(if))	SH2-Domäne	Verkürzung
MedB-1	PMBL	mut	Deletion (c.526_533del8 (fs); c.552_575del24 (if))	SOCS Box	Verkürzung

2.2 Nährmedien und Zusätze für Zellkulturarbeiten

Nährmedien			
	IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	400 ml	Gibco IMDM, HEPES, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
	RPMI	100 ml	Lonza BioWhittaker RPMI 1640 without L-Glutamine, Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Zusätze			
	FCS (Fetales Kälberserum)	50 ml	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	Penicillin/Strepto-mycin	6 ml	Lonza BioWhittaker Antibiotics: Penicillin-Streptomycin Mixture (10.000 U Penicillin, 10.000 U Streptomycin), Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	Glutamin	6 ml	Lonza BioWhittaker L-Glutamine, 29,3 mg/ml in 0,85 % NaCl-Lösung, 200 mmol/l Lonza Group AG, Basel, Schweiz

2.3 Reagenzien für die cDNA-Synthese

Nucleosidtriphosphate	Promega Corporation, Madison, USA
Oligo-dT-Primer	Promega Corporation, Madison, USA
Rekombinanter Ribonuclease-Inhibitor (RNasin)	Promega Corporation, Madison, USA
Reverse Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV-RT)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen AG), Waltham, USA

2.4 Primer für die semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

β-Actin - Haushaltsgen	
Biomers.net GmbH, Ulm	
Forward Primer	5‘-TGTGGCATCCACGAAACTAC-3‘
Reverse Primer	5‘-GGAGCAATGATCTTGATCTTCA-3‘
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) - Haushaltsgen	
Real Time Primers, LLC, Elkins Park, USA	
Forward Primer	5‘-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3‘
Reverse Primer	5‘-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3‘
SOCS1- Wildtyp	
Real Time Primers, LLC, Elkins Park, USA	
Forward Primer	5‘-GCCCCTTCTGTAGGATGGTA-3‘
Reverse Primer	5‘-GGAGGAAGAGGAAGGTT-3‘
SOCS1 - mutationsspezifisch für die Zelllinie L428	
Biomers.net GmbH, Ulm	
Forward Primer (L428 fw)	5‘-ACATTCCGTTCGCACGCCGAT-3‘
Reverse Primer 1 (L428/1 mut)	5‘-TCGTGGGTCCCGAGGCTA -3‘
Reverse Primer 2 (L428/1 wt)	5‘-CCCGAGGCCATCTTCACG -3‘
Reverse Primer 3 (L428/2 mut)	5‘-GGCTGCCATCCAGGTGAA-3‘
Reverse Primer 4 (L428/2 wt)	5‘-GGTGAAAGCGGCCGGCCT -3‘

2.5 Transfektionsvektoren

Leervektor (pFLAG-CMV2)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
GFP-codierender Vektor (maxGFP)	Lonza AG, Basel, Schweiz
Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor (pFLAG-SOCS1(wt))	Der pFLAG-SOCS1(wt)-Expressionsvektor wurde institutsintern durch Integration der humanen *SOCS1*-cDNA in die *Eco*RI- und *Bam*HI-Schnittstellen des Parentalvektors pFLAG-CMV2 generiert.

2.6 Antikörper

anti-Maus-Antikörper (Sekundärantikörper; IgG (H+L), HRP; QD216575)	polyklonal, Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen AG), Waltham, USA
anti-SOCS1-Antikörper (#424/44/8)	monoklonal, Maus	institutseigen (Pathologie UKU/DKFZ Heidelberg)
anti-SOCS1-Antikörper (#424/44/8/13)	monoklonal, Maus	institutseigen (Pathologie UKU/DKFZ Heidelberg)
anti-SOCS1-Antikörper (#LS-C191491, TS106)	monoklonal, Maus	LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA
anti-SOCS1-Antikörper (#S1040-01K, 11n174)	monoklonal, Maus	United States Biological Corporation, Salem, USA
anti-β-Tubulin-Antikörper (TUB 2.1)	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Weitere Informationen zu den verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörpern finden sich in Tabelle 10 im Abschnitt 2.16.9.

2.7 Gebrauchsfertige Kits

GenomeLab Human STR Primer Set Kit	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN AG, Hilden
Qiagen Qiashredder	QIAGEN AG, Hilden
Qiagen RNase-free DNase Set	QIAGEN AG, Hilden
Qiagen RNeasy Mini Kit	QIAGEN AG, Hilden
Qubit dsDNA HS Assay Kit (Fluorometer-Lösung)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen), Waltham, USA

2.8 Angesetzte Puffer

HeBS (HEPES-gepufferte Salzlösung, 2x)		
	HEPES NaCl KCl Na_2HPO_4	0,12 g 0,16 g 0,0075 g 0,002 g
	mit destilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen; pH-Wert auf 7,06 einstellen	
PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung, 10x)		
	NaCl KCl Na_2HPO_4 NaH_2PO_4	8,77 g 0,2 g 11,7 g 2,4 g
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen; pH-Wert auf 7,22 einstellen	
PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung, 1x)		
	PBS-Puffer (10x)	100 ml
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
SDS-Laufpuffer (10x)		
	Tris Glycin SDS (1 %)	60 g 300 g 20 g
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
SDS-Laufpuffer (1x)		
	SDS-Laufpuffer (10x)	100 ml
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
SDS-Proteinladepuffer (4x)		
	Tris-HCl SDS (8 %) Bromphenolblau Glycerol (40 %)	20 ml 8 ml 0,4 g 40 ml
	mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen	

	Gebrauchslösung: 1 ml SDS-Proteinladepuffer (4x) + 50 µl DTT (1 mol/l)	
Stripping-Buffer		
	NaOH SDS (10 %)	1,6 g 20 ml
	mit destilliertem Wasser auf 200 ml auffüllen	
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA, 10x)		
	Tris Eisessig EDTA	48,5 g 11,4 ml 20 ml
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA, 1x)		
	TAE (10x)	100 ml
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, 20x)		
	Tris NaCl	48,46 g 105,2 g
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen; pH-Wert mit HCl auf 7,6 einstellen	
TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, 1x)		
	TBS (20x)	25 ml
	mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen	
TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20-Zusatz, 1x)		
	TBS (20x)	50 ml
	Tween-20	500 µl
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
TNT-Puffer (Tris-NaCl-Tween, 1x)		
	Tris-HCl-Stammlösung (0,75 mol/l, pH 7,4) NaCl Triton-X-100	2,5 ml 2,5 ml 500 µl

	mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen	
TNT^{++} (Tris-NaCl-Tween^{++}, 1x)		
	DTT (1 mol/l)	20 µl
	Phosphatase-Inhibitoren	eine Tablette
	Protease-Inhibitoren	eine Tablette
	TNT-Puffer	20 ml
Transferpuffer (10x)		
	Tris	58 g
	Glycin	29 g
	SDS (20 %)	18,5 ml
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen	
Transferpuffer-Gebrauchslösung		
	Transferpuffer (10x)	100 ml
	Methanol	100 ml
	destilliertes Wasser	800 ml
Tris-HCl-Stammlösung für Polyacrylamid-Gele (0,75 mol/l, pH 8,8)		
	Tris	90,86 g
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen; pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen	
Tris-HCl-Stammlösung für TNT-Puffer (0,75 mol/l, pH 7,4)		
	Tris	90,86 g
	SDS (10 %)	0,4 ml
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen; pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen	
Tris-HCl-Stammlösung für Polyacrylamid-Gele (0,25 mol/l, pH 6,8)		
	Tris	30,29 g
	mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen; pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen	
Western Blot-Blocklösung (Magermilch 5 %)		
	Magermilchpulver	2,5 g
	TBS-T	50 ml

2.9 Weitere Chemikalien und Reagenzien

Aceton (C_3H_6O)	VWR International, LLC, Radnor, USA
Acrylamid (C_3H_5NO; 40 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose High Resolution (Spezialagarose für PCR-Gele und kleine DNA-Fragmente (50 bp-1 kb))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$; APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bradfordreagenz-Lösung (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bromphenolblau ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)	United States Biological Corporation, Salem, USA
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie-Färbelösung (QC Colloidal Coomassie Stain)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Deionisiertes Formamid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Demineralisiertes Wasser (ddH_2O)	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg
Dimethylsulfoxid (C_2H_6OS; DMSO)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$; DTT; 0,1 mol/l)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen AG), Waltham, USA
Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$; DTT; 1 mol/l)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
DNA-Polymerase (AmplitaqGold)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eindeckmedium wässrig (Aquatex)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Eosin G-Lösung (1 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (C_2H_5OH)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Ethidiumbromid ($C_{21}H_{20}BrN_3$)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Glycin ($C_2H_5NO_2$)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Hämatoxylin-Färbelösung	Abcam Inc., Cambridge, Vereinigtes Königreich
HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol (C_3H_8O)	VWR International, LLC, Radnor, USA
Längenstandard für Kapillarelektrophorese (DNA Size Standard 600)	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Laufpuffer für Kapillarelektrophorese	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Magermilchpulver (Skim Milk Powder for Microbiology)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Methanol (CH_3OH)	VWR International, LLC, Radnor, USA
Mineralöl	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) ohne Calcium und Magnesium	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
PCR-Ladepuffer (Gel Loading Dye, Purple, 6x, no SDS)	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA
Phosphatase-Inhibitoren (PhosSTOP)	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Protease-Inhibitoren, EDTA-frei (cOmplete, Mini)	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Protein G-Sepharose (Streptavidin Sepharose High Performance; 20 % Ethanol)	General Electric Company (GE Healthcare), Boston, USA
Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin), gereinigt (100x)	New England Biolabs GmbH, Ipswich, USA

RNase-freies Wasser	QIAGEN AG, Hilden
SYBR Green I (FastStart Universal SYBR Green Master (Rox))	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Tween-20	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Western Blot-Detektierlösung (WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate)	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Western Blot-Proteinladder (WesternSure Pre-stained Chemiluminescent Protein Ladder)	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
β-Mercaptoethanol (C_2H_6OS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen AG), Waltham, USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem GmbH, Darmstadt
5x first-strand buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen AG), Waltham, USA

2.10 Geräte und Verbrauchsmaterial

Absaugvorrichtung (Chemiefeste Membran-Vakuumpumpe)	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Aluminiumständer zum Kühlen von Proben (Rotilabo-Alu.Racks)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Antikörperinkubationsboxen	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

Bechergläser	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
Biologische Gefrierbehälter (zur Lagerung von Zellen und Geweben bei -196 °C)	Cryosarctic GmbH, Schöllkrippen
Deckgläser	VWR International, LLC, Radnor, USA
Einfrierblock (Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Nalgene), Waltham, USA
Elektrophorese-Netzgerät (Consort EV243 Electrophoresis Power Supply)	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Elektrophorese-Netzgerät (Electrophoresis Power Supply EPS 301)	General Electric Company (GE Healthcare), Boston, USA
Filterpapier (Whatman)	General Electric Company (GE Healthcare), Boston, USA
Flockeneisbereiter mit Speicher	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Fluorometer (Qubit 3 Fluorometer)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Flüssigkeitsstickstoff-Behälter (170 l)	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
Gefrierschränke (-80 °C)	Eppendorf AG (New Brunswick Scientific), Hamburg Heraeus GmbH, Hanau
Geldokumentationssystem (AlphaImager)	Alpha Innotech (Cell Biosciences), San Leandro/Palo Alto, USA
Gestelle für Reaktionsgefäße	VWR International, LLC, Radnor, USA
Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, Österreich
Handzähler	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen
Horizontale Elektrophoresekammer (Easy Cast Electroporesis System)	Owl Scientific Inc., Woburn, USA
Inkubator (Nunc Cell Factory Inkubator mit CO_2-Regelung)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Inverses Lichtmikroskop (Axiovert) und Zubehör	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kämme und Schlitten für horizontale Elektrophoresekammern	VWR International, LLC (PEQLAB Biotechnologie GmbH), Radnor, USA
Kapillararray für Kapillarelektrophorese (8 Kapillaren)	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Kapillarelektrophorese-System (CEQ GeXP)	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Kryo-Schraubdeckelgefäß (1,8 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Kühlgefrierautomaten	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Laborschüttler (RS-DS5)	Phoenix Instruments GmbH, Garbsen
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Lichtmikroskop (Axio Lab) und Zubehör	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mehrkanalpipetten (1 – 10 µl, 50 – 300 µl)	Abimed GmbH, Langenfeld
Messpipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Mikroliterpipetten (0,5 – 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterplatten F-Form, Abdeckung	Anicirin S.R.L., Scorzè, Italien
Mikrotiterplatten F-Form flach	Anicirin S.R.L., Scorzè, Italien
Mikrowelle	Samsung AG, Seoul, Südkorea
Mikrozentrifuge (MiniStar Silverline)	VWR International, LLC, Radnor, USA
Minitischzentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer mit zugehörigen Hämacytometer-Deckgläsern (Tiefe 0,1 mm)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Nitrilhandschuhe, Peha-soft nitrile guard	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz
Objektträger	VWR International, LLC, Radnor, USA

Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Pasteurpipetten (Kunststoff)	VWR International, LLC, Radnor, USA
PCR-Einzelgefäß (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
PCR-Gerät (peqSTAR Thermocycler)	VWR International, LLC (PEQLAB Biotechnologie GmbH), Radnor, USA
PCR-Gerät (SensoQuest Labcycler 48)	SensoQuest GmbH, Göttingen
PCR-Platten (96 wells)	Corning Inc., Corning, USA
PCR-8er-Kette (10 µl – 0,2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pinzetten	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg
Pipettenspitzen (20 – 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe)
Pipettierhelfer	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Platten (96 wells) für Spektralphotometrie	Corning Inc., Corning, USA
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Corporation, Irving, USA
qPCR-Gerät (real-time PCR-Cycler, Rotor-Gene Q)	QIAGEN AG, Hilden
qPCR-Mikrogefäße (0,1 ml; Strip Tubes and Caps)	QIAGEN AG, Hilden
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (15 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (50 ml)	nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe)
Rotor zum Überkopfmischen von Proberöhrchen (test-tube rotator)	Snijders Labs, Tilburg, Niederlande
Semidry-Blotter	H. Hölzel Laborgeräte GmbH, Wörth
Sicherheitswerkbank (SterilCARD Class II Type A/B3)	The Baker Company, Stanford, Maine, USA
Spektralphotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer)	Bio Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Spektralphotometer-Mikro-Volumen-Platte (Take 3)	Bio Tek Instruments Inc., Winooski, USA

Spritzen (5 ml, 10 ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Spritzenfilter (0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Verschlussmatten aus Silikon für PCR-Platten (96 wells)	VWR International, LLC, Radnor, USA
Vertikale Elektrophoresekammern	C.B.S. Scientific Company Inc., San Diego, USA
Vortex-Mixer	LMS Laboratory and Medical Supplies, Brigachtal
Western Blot-Detektionsgerät (C-Digit Blot Scanner)	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Western Blot-Membran (Amersham Protran)	General Electric Company (GE Healthcare), Boston, USA
Western Blot-Zubehör (Glasplatten, Klemmen, Gummiabdichtungen, Trennstäbe, Kämme)	C.B.S. Scientific Company Inc., San Diego, USA
Wiegeschälchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm^2, für adhärente und Suspensionszelllinien)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturplatten (6 wells für adhärente Zellen)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zentrifuge, gekühlt	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugen	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen Eppendorf AG, Hamburg
Zubehör für Zytospin-Zentrifuge (Objektträger, Filterpapiere, Deckgläser, Trichter und Kammern)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zytospin-Zentrifuge (Cytospin 3 Centrifuge)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Shandon), Waltham, USA

2.11 Software

AlphaEaseFC - Geldokumentationssoftware für AlphaImager	Alpha Innotech (Cell Biosciences), San Leandro/Palo Alto, USA
GeneMarker 2.2.0 – Genotyp-Analyse-Software	SoftGenetics, LLC., State College, USA
Gen5 2.09 – Detektionssoftware für Spektralphotometermessungen	Bio Tek Instruments Inc., Winooski, USA
Image Studio Digits 5.2 – Western Blot-Detektionssoftware	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Rotor-Gene Q Series Software – Software für Rotor-Gene Q real-time PCR-Cycler	QIAGEN AG, Hilden
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Methoden

2.12 Zellkulturarbeiten

2.12.1 Vorbemerkung

Alle Arbeiten an Zelllinien haben im Laborbereich der biologischen Sicherheitsstufe 2 innerhalb einer Sicherheitswerkbank stattgefunden.

2.12.2 Auftauen von kryokonservierten Zelllinien

Durch Kryokonservierung ist es möglich, Zellen langfristig zu lagern. Die Stoffwechselvorgänge der Zellen werden hierbei durch Kälte minimiert und erst bei für die jeweilige Zellart idealen Temperaturbedingungen wieder vollständig aufgenommen. So können unter anderem die Proliferation und Differenzierung von Zellen während großer Zeitspannen unterbunden werden, ohne den Phänotyp der Zellen zu verändern. Der Zusatz eines Kryoprotektivums wie Dimethylsulfoxid (DMSO) ist essenziell, da die Zellen ansonsten durch das Ausbilden von Eiskristallen in den Zellzwischenräumen und die damit einhergehenden steigenden Druckverhältnisse zerstört würden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei -196 °C in Stickstofftanks gelagert. Um einen Zellschaden infolge osmotischen Schocks zu verhindern, ist die tiefgefrorene Zell-DMSO-Suspension jeweils langsam auf Raumtemperatur gebracht und hierzu schrittweise anhand des untenstehenden Schemas (vgl. Tabelle 2) mit Nährmedium verdünnt worden. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für vier Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das durch das Zentrifugieren am Boden des Reaktionsgefäßes entstandene Zellpellet wurde nach Absaugen des DMSO-haltigen Überstands in 5 bis 6 ml Medium resuspendiert.

Die adhärent wachsenden HEK 293T Zellen wurden im Anschluss in drei Zellkulturflaschen ausgesät. Hierzu wurden die Zellkulturflaschen mit je 6 ml frischem Nährmedium sowie je 2 ml der HEK 293T Zellsuspension befüllt und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Die aufgetauten und resuspendierten Suspensionszelllinien Karpas 1106, LCL, U-MM1b, HBL-1, L540, L428 und MedB-1 wurden vollständig in je eine Zellkulturflasche überführt und ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Tabelle 2: Pipettierschema zum Auftauen kryokonservierter Zelllinien.

Zeitpunkt (Minuten)	Zugabe Nährmedium (ml)
0	0,1
1	0,12
2	0,15
3	0,19
4	0,26
5	0,36
6	0,5
7	0,56
8	1,69
9	4,75
	Gesamtvolumen Nährmedium: 9 ml

2.12.3 Kultivieren von Zelllinien

Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2-Atmosphäre in 25 cm^2 Zellkulturflaschen. Als Nährmedien dienten IMDM und RPMI, die mit Glutamin, fetalem Kälberserum (FCS) und Streptomycin/Penicillin versetzt wurden.

Bei den adhärent wachsenden HEK 293T Zellen wurde isotonische Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) verwendet, um die Zellen zu waschen und insbesondere im Rahmen des Splittens von Nährmediumresten zu reinigen. Das Passagieren der HEK 293T Zellen erfolgte mittels Trypsin/EDTA-Lösung. Trypsin ist als Protease in der Lage, die für die Adhäsion der Zellen verantwortlichen Proteine und Peptide zu spalten und dadurch die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Der EDTA-Zusatz führt zur Ansäuerung des Milieus und dadurch zu einer Beschleunigung des Ablösevorgangs. Fetales Kälberserum ist als Bestandteil des Mediums fähig, die Trypsinwirkung zu beenden. Auch das Beklopfen der Zellkulturflasche kann als mechanisches Verfahren dem Ablösen der Zellen dienen.

Das Kultivieren der Zelllinien Karpas 1106, LCL, U-MM1b, HBL-1, L540, L428 und MedB-1 erforderte aufgrund des Suspensionscharakters dieser Zellen keine Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung.

2.12.4 Passagieren von Zelllinien

Die HEK 293T Zellen wurden in der Regel dreimal wöchentlich gesplittet, um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen. Da es sich um adhärent wachsende Zellen handelt, wurden diese nach Entfernung des Mediums und bereits abgestorbener, suspendierter Zellen jeweils mit 3 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und nach Absaugen der PBS mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für zwei Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach leichtem Beklopfen der Flaschen zum Ablösen der restlichen Zellen wurden je 3 ml frisches Medium hinzugegeben. Jeweils 2 bis 3 ml der Suspension wurden abgesaugt und durch 6 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt. Nachfolgend wurden die HEK 293T Zellen wieder inkubiert.

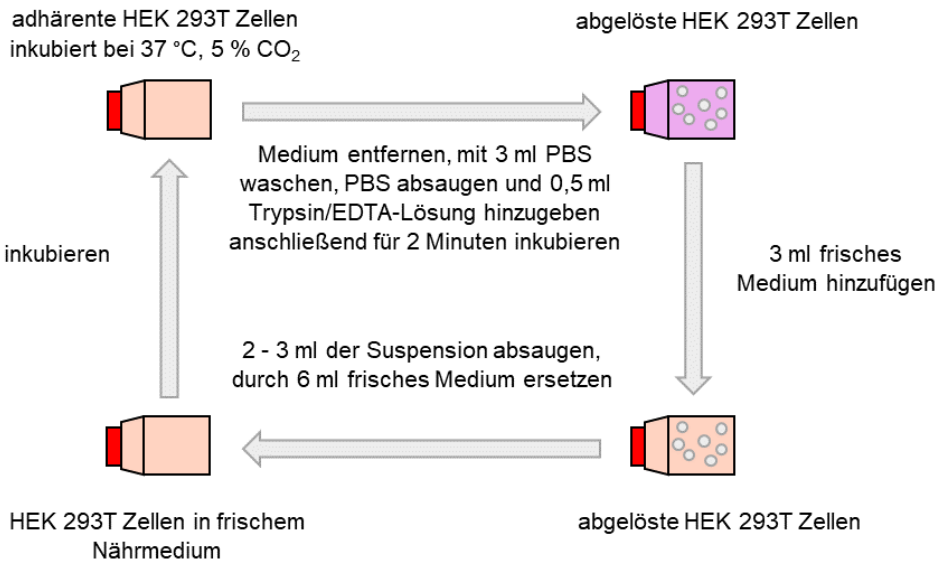


Abbildung 6: Passagieren von HEK 293T Zellen mittels Trypsinierung.

Die Zellen der Linien Karpas 1106, LCL, U-MM1b, HBL-1, L540, L428 und MedB-1 wurden in unregelmäßigeren Zeitabständen als die HEK 293T Zellen passagiert, wobei die Färbung des Kulturmediums ausschlaggebender Faktor war. Beim Passagieren wurde jeweils ein Teil der Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen entfernt und

durch einen entsprechenden Anteil an frischem Nährmedium ersetzt. Anschließend wurden diese reinkubiert.

2.12.5 Wechseln von Zellkulturflaschen

Ein Wechsel der Zellkulturflasche ist alle zwei bis drei Wochen in Kombination mit dem regulären Splitten der kultivierten Zellen durchgeführt worden. Bei den HEK 293T Zellen erfolgte das Vorgehen zunächst analog zum Passagieren. Nach der zweiminütigen Inkubation wurde der Inhalt der Zellkulturflaschen jedoch jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt und für vier Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert.
Bei den verwendeten Suspensionszellen erfolgten das Überführen und nachfolgende Zentrifugieren dagegen ohne Vorbehandlung.
Bei allen verwendeten Zelllinien wurde der Überstand im Anschluss abgesaugt. Die entstandenen Zellpellets wurden je in 1 ml Nährmedium resuspendiert. Danach wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt, sodass die Zellkulturen an dieser Stelle passagiert wurden. Abschließend wurden die Zellkulturflaschen mit Medium aufgefüllt, bis jeweils ein Gesamtvolumen von 8 ml erreicht war, und wieder inkubiert.

2.12.6 Kryokonservieren von Zelllinien

Durch häufiges Splitten ist es möglich, dass grundlegende Zelleigenschaften wie Teilungsrate oder Genexpressionsmuster verändert werden. Um sicherzustellen, dass für spätere Versuchsansätze ebenfalls entsprechende Zellen mit geringer Passagezahl zur Verfügung stehen, wurde ein Teil der verwendeten Zelllinien frühzeitig kryokonserviert.
Bei den HEK 293T Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt. Anschließend folgten das Waschen der Zellen mit PBS und das Lösen vitaler Zellen vom Boden der Zellkulturflasche durch Trypsinierung. Nach Inkubation für zwei Minuten und Zugabe von 3 ml Nährmedium wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 0,5 ml Nährmedium resuspendiert.
Bei den Suspensionszelllinien wurden jeweils 3 bis 4 ml in entsprechende Reaktionsgefäße überführt und ebenfalls fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Analog zum Vorgehen bei adhärenten Zellen wurden die entstandenen Zellpellets

resuspendiert. Alle weiteren Schritte wurden bei adhärent und in Suspension wachsenden Zelllinien identisch durchgeführt.

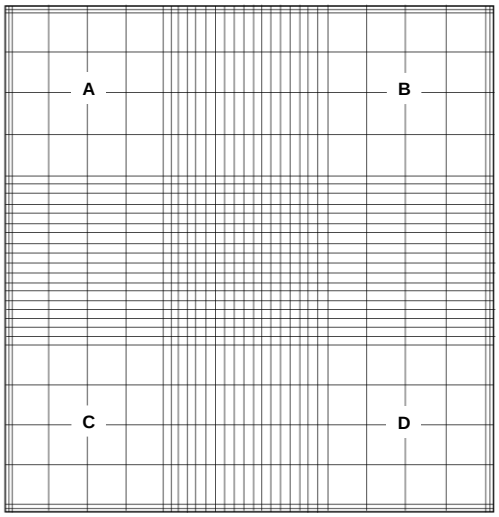
Nach dem Ansetzen des Einfriermediums wurde dieses steril filtriert und aufgrund der starken Wärmeentwicklung auf Eis gelagert. Nachfolgend wurden 0,5 ml Einfriermedium zu den 0,5 ml Zellsuspension gegeben und gründlich gemischt. Die Suspension wurde dann in ein Kryogefäß gegeben und mit Hilfe eines Einfrierblocks über Nacht bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Überführung des Kryogefäßes in den Stickstofftank und somit die langfristige Lagerung bei -196 °C. Die Zusammensetzung des Einfriermediums gibt Tabelle 3 wieder.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Einfriermediums zum Kryokonservieren von Zelllinien.

Zellsuspension	Einfriermedium
0,5 ml	0,2 ml Nährmedium (4 Volumenanteile) 0,2 ml FCS (4 Volumenanteile) 0,1 ml DMSO (2 Volumenanteile)
Gesamtvolumen: 1 ml mit 10 % DMSO-Anteil	

2.12.7 Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer

Für einige Versuche war es erforderlich, vorab eine vergleichbare Zellanzahl in den verschiedenen Versuchsansätzen sicherzustellen. Aus diesem Grund erfolgte die Ermittlung der mittleren Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierbei wurden jeweils zwei Tropfen Zellsuspension zwischen Grundplatte der Zählkammer und zugehörigem Deckglas eingebracht. Am inversen Lichtmikroskop wurden dann die einzelnen Zellen in den vordefinierten Zählkammer-Quadraten ausgezählt. Aus diesen Angaben konnte im Anschluss die mittlere Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension berechnet werden (vgl. Abbildung 7).



a.

Quadrat A: Anzahl Zellen =: a Quadrat B: Anzahl Zellen =: b Quadrat C: Anzahl Zellen =: c Quadrat D: Anzahl Zellen =: d
$a + b + c + d =: x$ $\frac{x}{4} =: y$ y entspricht der mittleren Zellzahl eines großen Quadrates A - D
Die Zellsuspension enthält im Mittel $y \cdot 10^4$ Zellen/ml.

b.

Abbildung 7: Neubauer-Zählkammer. a. Schematische Darstellung der Zählfelder einer Neubauer-Zählkammer mit Markierung der großen Zählkammer-Quadrate A – D; b. Berechnung der mittleren Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension aus den ermittelten Zellzahlen.

2.13 Transfektion von HEK 293T Zellen mit einem Wildtyp-*SOCS1*-codierenden Expressionsplasmid

Unter dem Begriff Transfektion versteht man das Einbringen fremder Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet die stabile von der transienten Transfektion, wobei es bei letzterer nicht zur Integration der Fremd-DNA beziehungsweise -RNA in das Genom der Zellen kommt. Die transfizierten Zellen produzieren anschließend RNA und Proteine entsprechend den in die Zellen eingebrachten Nukleinsäuren.

Ziel der nachfolgend beschriebenen Transfektionsarbeiten war es, eine zeitweise unterschiedlich starke Expression von wildtypischem *SOCS1* in HEK 293T zu erreichen (transiente Transfektion) und dadurch anschließende Untersuchungen des SOCS1-Protein- und *SOCS1*-mRNA-Gehaltes der transfizierten Zellen zu ermöglichen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsarbeiten umfassten jeweils die folgenden Schritte:

- Tag 1: Aussäen einer gewünschten Anzahl an HEK 293T Zellen in Vertiefungen der Zellkulturplatten

- Tag 2: Transiente Transfektion der HEK 293T Zellen mit absteigenden Mengen des Wildtyp-*SOCS1*-codierenden Expressionsplasmids pFLAG-SOCS1(wt) mittels Calciumphosphat-Methode
- Tag 3: Mediumwechsel mit anschließender Fluoreszenzkontrolle
- Tag 4: Vorbereitung der Zellen für Protein (TNT^{++})- und RNA-Extraktionen

Insgesamt sind die Transfektionsarbeiten dreimal durchgeführt worden. Sie umfassten jeweils sechs Transfektionsansätze, welche für jede Transfektion doppelt geführt wurden.

2.13.1 Zellaussaat

Je Transfektion wurden pro Ansatz ca. 10^4 HEK 293T Zellen ausgesät. Hierzu wurde vorab die mittlere Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension durch Zellzählung unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Das erforderliche Volumen Zellsuspension für $12 \cdot 10^4$ Zellen wurde aus diesen Angaben berechnet und mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 24,5 ml aufgefüllt. Entsprechend enthielt jeder Ansatz nach der Zellaussaat ca.10^4 HEK 293T Zellen in ca. 2 ml Nährmedium. Beim Aussäen der Zellen wurde zunächst analog zum Passagieren vorgegangen. Die HEK 293T Zellen wurden in PBS gewaschen, durch Trypsinierung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in 3 ml Medium resuspendiert. Nach erfolgter Zellzählung und Bestimmung des erforderlichen Zellsuspensionsvolumens wurde dieses Volumen in mit Nährmedium auf ein Gesamtvolumen von 24,5 ml ($12 \cdot 2$ ml + 0,5 ml Pipettierverlust) aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde gründlich resuspendiert und nachfolgend auf zwölf Ansätze à 2 ml aufgeteilt. Bis zu den weiteren Transfektionsarbeiten am folgenden Tag wurden die Zellkulturplatten bei 37 °C und 5 % CO_2-Atmosphäre inkubiert.

2.13.2 Transfizieren von HEK 293T Zellen

Für die transiente Transfektion der HEK 293T Zellen wurde das Wildtyp-*SOCS1*-codierende Expressionsplasmid pFLAG-SOCS1(wt) verwendet. Um vergleichbare Bedingungen für die verschiedenen Transfektionsansätze herzustellen und in alle Ansätze die gleiche Plasmidgesamtmenge einzubringen, wurde zudem ein Leervektor (pFLAG-CMV2) eingesetzt. Das Hinzugeben eines GFP-codierenden Vektors (grünes

fluoreszierendes Protein, pmaxGFP) zu den einzelnen Transfektionsansätzen sollte darüber hinaus eine frühzeitige Kontrolle des Transfektionserfolges ermöglichen.
Die Transfektion erfolgte mittels Calciumphosphat-Methode. Aufgrund der Reaktion von Calcium und Phosphat kommt es zur Bildung von Calciumphosphatkristallen, an welche die DNA der Transfektionsvektoren bindet. Durch den von den gebildeten Calciumphosphatpräzipitaten auf die HEK 293T Zellen ausgeübten Stress erfolgt eine endozytotische Aufnahme der an die Präzipitate gebundenen Nukleinsäuren. Die endozytierte Plasmid-DNA wird anschließend im Rahmen der physiologischen Zellvorgänge transkribiert (mRNA) und translatiert (Proteinbiosynthese).

Tabelle 4: Zusammensetzung der Transfektionsansätze.

Reagenz	Volumen
ddH_2O	90 µl
$CaCl_2$	10 µl
HeBS (2x)	100 µl
pmaxGFP	0,5 µl
pFLAG-SOCS1(wt), pFLAG-CMV2	entsprechend angestrebter Transfektionsmenge (vgl. Tabelle 5)

Zunächst wurden alle Reagenzien bis auf die HEPES-gepufferte Salzlösung in Mikroreaktionsgefäße gegeben, gründlich gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde jeweils HEPES-gepufferte Salzlösung (2x HeBS) hinzugefügt und alles erneut zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Transfektionsansätze in die einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatten pipettiert (ca. 200 µl Transfektionsansatz pro Vertiefung). Um die Aufnahme der DNA in die Zellen zu fördern, wurden die Zellkulturplatten leicht per Hand geschwenkt. Abschließend erfolgte die Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2. Eine Übersicht der im Einzelnen erforderlichen Plasmidmengen findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Übersicht der erforderlichen Plasmidmengen.

Ansatz	Menge Wildtyp-*SOCS1*-Expressions-vektor/Ansatz	Volumen pFLAG-SOCS1(wt)		Volumen pFLAG-CMV2
		c_1 = 1,2 µg/µl	c_2 = 50 ng/µl	c = 1,2367 µg/µl
1	4 µg	3,33 µl	-	0 µl
2	2 µg	1,67 µl	-	1,67 µl
3	1 µg	0,83 µl	-	2,5 µl
4	0,4 µg	-	8 µl	3 µl
5	0,1 µg	-	2 µl	3,25 µl
6	0 µg	-	-	3,33 µl
transfizierte Plasmidgesamtmenge/Ansatz: 4 µg				

2.13.3 Mediumwechsel und Fluoreszenzkontrolle

Am dritten Tag der Transfektionsarbeiten ist jeweils ein Mediumwechsel durchgeführt worden. Haben sich beim Mikroskopieren der am Vortag transfizierten HEK 293T Zellen starke Calciumablagerungen dargestellt, sind die Zellen zusätzlich mit PBS gewaschen worden. 30 bis 60 Minuten nach dem Mediumwechsel fand jeweils eine Untersuchung der transfizierten Zellen auf Fluoreszenz statt (Fluoreszenzmikroskopie). Bei nachweisbarer Fluoreszenz kann hierbei die Transfektion frühzeitig als erfolgreich bestätigt werden. Bei dem Fehlen einer Fluoreszenz kann eine Aufnahme der Nukleinsäuren in die Zellen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

2.13.4 Zellgewinnung für nachfolgende Extraktionsarbeiten

Zum Schluss der Transfektionsarbeiten (Tag 4) sind die Zellen für die nachfolgenden geplanten Extraktionen von RNA und Proteinen (TNT^{++}) vorbereitet worden. Hierzu ist zunächst in allen Ansätzen das Medium entfernt worden. Es erfolgte das Waschen der transfizierten HEK 293T Zellen mit PBS. Die PBS-Zellsuspension ist anschließend nach Ansätzen getrennt in Reaktionsgefäße überführt worden. Die doppelt geführten Ansätze wurden im gleichen Gefäß gesammelt. Die verschiedenen Ansätze wurden bei

1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde jeweils der Überstand entfernt und das jeweilige Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Zur Vorbereitung der Extraktionsarbeiten (RNA und TNT^{++}-Extrakte) wurden die PBS-Zellsuspensionen an dieser Stelle jeweils auf zwei Mikroreaktionsgefäße à 1 ml aufgeteilt.

2.14 Extraktionsarbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit sind für alle Zelllinien wiederholt RNA- und Proteinextraktionen durchgeführt worden. Die Extraktion von DNA war bei den unterschiedlichen Suspensionszelllinien erforderlich, um mittels STR-Analyse (Short Tandem Repeat) eine Authentifizierung der Zelllinien zu ermöglichen.

2.14.1 Gewinnung von Suspensionszellen für nachfolgende Extraktionsarbeiten

Zur Vorbereitung der einzelnen Extraktionen sind pro Zelllinie 4 bis 8 ml Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt worden. Nach anschließendem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 1000 rpm wurde jeweils der Überstand entfernt und die entstandenen Zellpellets wurden in 1 bis 2 ml PBS resuspendiert.
Die Vorbereitung adhärenter Zelllinien für die verschiedenen Extraktionsarbeiten wurde in Abschnitt 2.13.4 beschrieben.

2.14.2 Extraktion von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem RNA-Extraktions-Kit RNeasy Mini Kit von QIAGEN unter Zuhilfenahme des QIAshredder-Systems zur Homogenisierung der Zelllysate. Die PBS-Zellsuspension wurde zunächst für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets wurden in je 350 µl RTL-Puffer (+ 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml) resuspendiert. Anschließend wurden die Suspensionen jeweils in einen Schredder des QIAshredder-Systems pipettiert und zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Durchfluss wurden je 350 µl siebzigprozentiges Ethanol gegeben und dann jeweils auf die Säulen des Kits pipettiert. Nach Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 10.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen. 350 µl RW1-Puffer wurden jeweils auf die Säulen gegeben. Es wurde erneut

zentrifugiert (30 Sekunden bei 10.000 rpm) und der Durchfluss verworfen. Pro Probe wurden danach 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer auf die Säule pipettiert. Nach Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden je 350 µl RW1-Puffer hinzugefügt. Nach Zentrifugieren für 20 Sekunden bei 10.000 rpm wurde der Durchfluss abermals verworfen. Danach folgte zweimal die Zugabe von 500 µl RPE-Puffer, wobei zwischen den beiden Zugaben die Proben jeweils zentrifugiert (30 Sekunden bei 10.000 rpm) wurden und der Durchfluss entfernt wurde. Es folgten ein erneutes Zentrifugieren (zwei Minuten bei 10.000 rpm) und Verwerfen des Durchflusses. Zum Trocknen wurden die Säulen noch einmal zentrifugiert (eine Minute bei 10.000 rpm). Abschließend wurden die Säulen in ein neues Mikroreaktionsgefäß gestellt und jeweils 30 µl RNase-freies Wasser hinzupipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugieren für eine Minute bei 10.000 rpm wurden die gewonnenen RNA-Extrakte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung in qPCR-Experimenten tiefgefroren.

2.14.3 Extraktion von Proteinen (TNT^{++}-Extrakte)

Zur Gewinnung von TNT^{++}-Extrakten wurden die in PBS suspendiert vorliegenden Zellen zunächst durch Zentrifugieren für zwei Minuten bei 4000 rpm pelletiert. Danach wurden die Zellpellets je nach Größe in 100 bis 150 µl TNT^{++}-Lösung resuspendiert, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und ca. alle fünf Minuten durch Vortexen durchmischt. Das regelmäßige Vortexen diente hierbei durch den ausgeübten mechanischen Stress dem Zellaufschluss. Im Anschluss erfolgte ein erneutes Zentrifugieren, allerdings für zehn Minuten bei 14.000 rpm und bei 4 °C. Der proteinhaltige Überstand wurde jeweils in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung im Rahmen von Western Blot-Experimenten oder Immunpräzipitationsansätzen bei -80 °C tiefgefroren. Die entstandenen Pellets wurden verworfen.

2.14.4 Extraktion von DNA

Zur DNA-Isolierung aus Zellen wurde das QIAmp DNA Mini Kit von QIAGEN verwendet. Die PBS-Zellsuspension wurde zunächst für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die entstandenen Zellpellets wurden jeweils in 200 µl PBS resuspendiert. Pro Probe wurden 20 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer

hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen durch 15 Sekunden Vortexen wurden die Proben für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurden je 200 µl Ethanol hinzugegeben und die Proben erneut für 15 Sekunden gevortext. Die Proben wurden anschließend auf DNeasy Säulen pipettiert und für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Es wurden pro Probe 500 µl AW1-Puffer hinzugegeben und nach erneutem Zentrifugieren (eine Minute bei 10.000 rpm) und Verwerfen des Durchflusses 500 µl AW2-Puffer hinzupipettiert. Nach Zentrifugieren für eine Minute bei 10.000 rpm und Trocknen der Membran durch Zentrifugieren für vier Minuten bei maximaler Geschwindigkeit wurden die Säulen jeweils in ein neues Mikroreaktionsgefäß gestellt. Abschließend wurden 100 µl AE-Puffer zu jeder Probe hinzugegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert.

Die Messung des DNA-Gehaltes erfolgte mit Hilfe des Qubit dsDNA HS Assay Kit von Invitrogen im Qubit Fluorometer. Hierzu wurden jeweils 199 µl Qubit dsDNA HS-Puffer und 1 µl Probe in Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Für die Standardlösungen 1 und 2 wurden jeweils 190 µl Qubit dsDNA HS-Puffer mit 10 µl Qubit dsDNA HS-Standard 1 beziehungsweise -Standard 2 versetzt. Nach gründlichem Mischen durch Vortexen und Inkubieren für zwei Minuten bei Raumtemperatur wurde zunächst der DNA-Gehalt der Standardlösungen und nachfolgend der der verschiedenen Proben im Fluorometer gemessen.

Ein Teil der extrahierten DNA wurden im Anschluss einer STR-Analyse zugeführt. Details finden sich im Abschnitt 2.18.

2.15 RNA-Nachweis und -Quantifizierung durch semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) dient der gezielten Untersuchung der Genexpression. Sie ermöglicht es, bestimmte DNA-Abschnitte nachzuweisen und durch den Vergleich mit Haushaltsgenen (zum Beispiel *GAPDH*, *β-Actin*) zu quantifizieren. Die Zunahme an DNA-Molekülen wird nach jedem qPCR-Zyklus bestimmt und kann somit in Echtzeit verfolgt werden. Wird ein Fluoreszenzfarbstoff wie SYBR Green I zum Nachweis der während der qPCR gebildeten DNA-Moleküle verwendet, korreliert das gemessene Fluoreszenzsignal mit

der in der Probe enthaltenen Menge doppelsträngiger DNA. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte, die für die Durchführung einer qPCR erforderlich sind, beschrieben.

2.15.1 RNA-Konzentrationsmessung

Die aus den unterschiedlichen Zelllinien extrahierte RNA wurde zunächst jeweils durch reverse Transkription in entsprechende komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als erster Schritt wurde dazu die RNA-Konzentration gemessen. Dies erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers. Zunächst wurden 2 µl RNase-freies Wasser als Dublette auf die Mikrovolumenplatte des Spektralphotometers pipettiert und gemessen (blank). Danach wurden die RNA-Extraktproben gut durchmischt und ebenfalls je 2 µl als Dubletten auf die Mikrovolumenplatte gegeben. Aus den gemessenen Konzentrationen (ng/µl) wurden im Anschluss die erforderlichen Probenvolumina für 1 µg RNA errechnet.

2.15.2 cDNA-Synthese mittels M-MLV-RT

Das Enzym reverse Transkriptase ist durch seine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität in der Lage, RNA in DNA umzuschreiben. Ausgehend von einem Primer, der mit einem der RNA-Stränge hybridisiert, synthetisiert die reverse Transkriptase einen zum RNA-Strang komplementären DNA-Strang. Nach Abbau der RNA durch den RNase-H-Anteil der reversen Transkriptase wird der DNA-Einzelstrang zu einem doppelsträngigen DNA-Molekül vervollständigt. Hierbei kommt die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptase zum Einsatz. Als Primer für die cDNA-Synthese werden zumeist Oligo-dT-Primer verwendet, da diese aus mehreren Thymidinen bestehen und dadurch den Poly-A-Schwanz der RNA binden können. Um einen vorzeitigen RNA-Abbau durch physiologisch vorkommende eukaryotische RNasen zu unterbinden, wird zumeist ein Ribonuclease-Inhibitor hinzugegeben. Die verwendete M-MLV-RT (Moloney Murin Leukemia Virus Reverse Transcriptase) wird als reverse Transkriptase durch das *POL*-Gen des murinen Leukämievirus (MLV) codiert.

In den durchgeführten Experimenten wurde jeweils 1 µg RNA pro Probe für die cDNA-Synthese eingesetzt. Das jeweilige erforderliche Volumen wurde entsprechend mit

RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Zu den einzelnen RNA-Proben wurden anschließend jeweils 1 µl Oligo-dT-Primer und 1 µl Nucleosidtriphosphate gegeben. Im ersten Inkubationsschritt wurden die Proben fünf Minuten bei 65 °C im PCR-Gerät inkubiert und danach sofort auf Eis gelagert. Pro Probe wurden 7 µl cDNA-Synthese-Mastermix (vgl. Tabelle 6) hinzugegeben. Nach einer zweiten Inkubation von zwei Minuten bei 37 °C und nachfolgender erneuter Lagerung der Proben auf Eis wurde je 1 µl reverse Transkriptase (M-MLV-RT) zu den Proben gegeben. Die Proben wurden dann zunächst für 50 Minuten bei 37 °C und anschließend für 15 Minuten bei 70 °C in PCR-Gerät inkubiert. Nach Herunterkühlen der Proben auf 8 °C konnten diese bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung für die qPCR gelagert werden.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mastermix (1x) für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Volumen
5x first-strand buffer	4 µl
DTT (0,1 mol/l)	2 µl
Rekombinanter Ribonuclease-Inhibitor	1 µl
	Gesamtvolumen: 7 µl

2.15.3 Designen von Primern zum Nachweis von *SOCS1*-Mutationen

Für die Zelllinie L428 wurden mutationsspezifische qPCR-Primer erstellt. Die reverse Primer zum Nachweis der für die Zelllinie L428 auf DNA-Ebene beschriebenen Mutationen wurden jeweils so gewählt, dass sie mit den komplementären DNA-Bereichen hybridisieren können, sofern die beschriebenen Mutationen vorliegen. Hierbei handelt es sich um die Primer L428/1 mut (in Abbildung 8 gelb hervorgehoben) zum Nachweis der Frameshift-Mutation (c.349_359del11, monoallelisch) und L428/2 mut (in Abbildung 8 grün hervorgehoben) zum Nachweis der In-frame-Deletion (c.393_407del15, monoallelisch). Darüber hinaus wurden die Wildtyp-*SOCS1*-Primer L428/1 wt und L428/2 wt erstellt (in Abbildung 8 mit Fenstern markiert), die so designt wurden, dass sie hybridisieren können, falls *SOCS1* im Bereich der bekannten Frameshift-Mutation (L428/1 wt) beziehungsweise im Bereich der bekannten In-frame-Deletion (L428/2 wt) wildtypisch exprimiert wird.

ATG GTA GCA CAC AAC CAG GTG GCA GCC GAC AAT GCA GTC TCC ACA GCA
GCA GAG CCC CGA CGG CGG CCA GAA CCT TCC TCC TCT TCC TCC TCC TCG
CCC GCG GCC CCC GCG CGC CCG CGG CCG TGC CCC GCG GTC CCG GCC
CCG GCC CCC GGC GAC ACG CAC TTC CGC ACA TTC CGT TCG CAC GCC GAT
TAC CGG CGC ATC ACG CGC GCC AGC GCG CTC CTG GAC GCC TGC GGA TTC
TAC TGG GGG CCC CTG AGC GTG CAC GGG GCG CAC GAG CGG CTG CGC
GCC GAG CCC GTG GGC ACC TTC CTG GTG CGC GAC AGC CGC CAG CGG
AAC TGC TTT TTC GCC CTT AGC GTG AAG ATG GC[1] C TCG GGA CCC ACG AGC
ATC CGC GTG CAC TTT C AG GCC GGC CGC TTT CA[2]CC TG GAT GGC AGC CGC
G AG AGC TTC GAC TGC CTC TTC GAG CTG CTG GAG CAC TAC GTG GCG GCG
CCG CGC CGC ATG CTG GGG GCC CCG CTG CGC CAG CGC CGC GTG CGG
CCG CTG CAG GAG CTG TGC CGC CAG CGC ATC GTG GCC ACC GTG GGC CGC
GAG AAC CTG GCT CGC ATC CCC CTC AAC CCC GTC CTC CGC GAC TAC CTG
AGC TCC TTC CCC TTC CAG ATT TGA

Primer-Sequenzen:

Forward Primer (L428 fw):	5‘- ACATTCCGTTCGCACGCCGAT -3‘
Reverse Primer 1 (L428/1 mut):	5‘- TCGTGGGTCCCGAGGCTA -3‘
Reverse Primer 2 (L428/1 wt):	5‘- CCCGAGGCCATCTTCACG -3‘
Reverse Primer 3 (L428/2 mut):	5‘- GGCTGCCATCCAGGTGAA -3‘
Reverse Primer 4 (L428/2 wt):	5‘- GGTGAAAGCGGCCGGCCT -3‘

Produktlängen:

L428/1 mut: 194 bp, L428/1 wt: 197 bp, L428/2 mut: 238 bp, L428/2 wt: 241 bp

Abbildung 8: *SOCS1*-Nucleotidsequenz (codierende Sequenz) mit Hervorhebung der designten Primer zum Nachweis der für die Zelllinie L428 auf DNA-Ebene beschriebenen *SOCS1*-Mutationen. Die auf DNA-Ebene beschriebenen Mutationen sind in der Nucleotidsequenz unterstrichen dargestellt und nummeriert. 1: Frameshift-Mutation c.349_359del11, 2: In-frame-Deletion c.393_407del15, L428/1 mut: Primer zum Nachweis der Frameshift-Mutation, L428/2 mut: Primer zum Nachweis der In-frame-Deletion, L428/1 wt, L428/2 wt: Primer zum Nachweis von Wildtyp-*SOCS1*; sie hybridisieren, falls die jeweils nachzuweisende Mutation nicht exprimiert wird und *SOCS1* in diesem Sequenzabschnitt wildtypisch vorliegt. Die betreffenden Mutationen wurden 2006 von Weniger et al. auf unterschiedlichen Allelen beschrieben, in obiger Abbildung sind sie vereinfacht aufeinanderfolgend in derselben Nucleotidsequenz dargestellt.

2.15.4 Ansetzen von Primern für nachfolgende qPCR-Experimente

Für alle durchgeführten qPCR-Experimente wurden Wildtyp-*SOCS1*-, *GAPDH*- und *β-Actin*-Primermischungen verwendet. Für die Zelllinie L428 wurden zudem die entsprechenden mutationsspezifischen Primer genutzt. Jede Primermischung setzte sich hierbei aus einem Primerpaar bestehend aus einem forward Primer und einem zugehörigen reverse Primer zusammen, die mit Nuclease-freiem Wasser hinreichend

verdünnt wurden. Die Wildtyp-*SOCS1*-, *GAPDH*- und mutationsspezifischen Primermischungen wurden jeweils 1 : 10 verdünnt. Der *β-Actin*-Primermix hingegen wurde in einer stärkeren Verdünnung (6 : 100) verwendet.

2.15.5 Semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Ein qPCR-Zyklus untergliedert sich klassischerweise in drei Teilschritte: Denaturierung – Hybridisierung – Elongation.
Bei der Denaturierung kommt es durch hohe Temperaturen von ca. 95 °C zur Auftrennung der vorliegenden doppelsträngigen cDNA-Moleküle. Anschließend können sich die jeweiligen Primer an komplementäre Bereiche der DNA-Einzelstränge anlagern (Hybridisierung). Jeweils von den 3'-Ende der Primer ausgehend werden komplementäre Stränge durch Verlängerung der Primer mit Nucleotiden gebildet (Elongation). Die hierfür zuständigen Enzyme, die Taq-Polymerasen, sind thermostabil und überstehen den Denaturierungsschritt auch bei einer hohen Anzahl an qPCR-Zyklen. Ihre optimale Arbeitstemperatur liegt bei 72 °C.
Die Temperatur des Hybridisierungsschrittes ist in aller Regel von den gewählten Primern abhängig und kann aus den jeweiligen Schmelztemperaturen (Tm-Wert) entsprechend der Formel *Tm-Wert - 2 °C* berechnet werden. Bei unterschiedlichen Tm-Werten für die verwendeten Primer wurde der jeweils niedrigste Tm-Wert berücksichtigt. Im Falle der verwendeten Wildtyp-*SOCS1*-Primermischung waren dies beispielsweise 56 °C, für die mutationsspezifischen Primer der Zelllinie L428 52 °C. Einen Überblick über Dauer und Temperatur der einzelnen Teilschritte eines qPCR-Zyklus, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, liefert Abbildung 9.



Abbildung 9: qPCR-Zyklusprofil für Wildtyp-*SOCS1*. Exemplarische Darstellung des Zyklusprofils für die semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR). In der Regel wurden jeweils 40 Zyklen durchgeführt.

Zum Nachweis der während eines Zyklus gebildeten doppelsträngigen DNA-Moleküle kommen mehrere Methoden in Betracht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Durch Anlagerung des SYBR Green I-

Farbstoffs an doppelsträngige DNA entsteht ein Komplex, der blaues Licht (ca. 494 nm) absorbieren und grünes Licht (ca. 521 nm) emittieren kann. Übersteigt das gemessene Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert (C_T-Wert; C_T: cycle threshold) und hebt sich dadurch deutlich vom Hintergrund ab, spricht man von einem positiven Ergebnis, das für weiterführende Berechnungen genutzt werden kann.

Zur praktischen Durchführung der qPCR-Experimente wurden die cDNA-Proben zunächst jeweils 1 : 10 verdünnt. Pro erforderlicher Primermischung wurde jeweils ein Mastermix angesetzt. Für alle durchgeführten qPCR-Experimente wurden Wildtyp-*SOCS1*-, *GAPDH*- und *β-Actin*-Primermischungen verwendet. Für die Extrakte aus der Zelllinie L428 wurden zusätzlich die jeweiligen mutationsspezifischen Primermischungen eingesetzt. Für die durchzuführende qPCR wurden pro Primermischung alle cDNA-Extraktproben sowie ein zusätzlicher Ansatz mit Nuclease-freiem Wasser statt cDNA-Extrakt als Negativkontrolle berücksichtigt. Das SYBR Green I (Rox) wurde erst kurz vor dem Pipettieren des jeweiligen Mastermix hinzugegeben. Die Zusammensatzung des qPCR-Mastermix (1x) gibt Tabelle 7 wieder. Entsprechend einem vorher festgelegten Schema wurden die unterschiedlichen qPCR-Reaktionsansätze pipettiert. Pro Reaktionsgefäß wurde jeweils 1 µl cDNA vorgelegt und im Anschluss wurden 9 µl Mastermix zugegeben. Idealerweise wurde der Mastermix hierbei so pipettiert, dass er den Tropfen cDNA vollständig umgab. Pro biologischem Replikat wurden drei technische Replikate geführt. Alle Proben wurden während der Vorbereitungen auf Eis gelagert. Nach dem Pipettieren der Proben wurden diese in die qPCR-Maschine gestellt und das entsprechende Programm gestartet. In der Regel wurden 40 Zyklen durchlaufen.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix (1x) für die semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR).

Reagenz	Volumen
Nuclease-freies Wasser	3,6 µl
Primermix (forward/reverse Primer)	0,4 µl
SYBR Green I (Rox) (enthält unter anderem SYBR Green I-Fluoreszenzfarbstoff, Taq-Polymerase und Nucleotide)	5 µl

2.15.6 Nachweis von qPCR-Produkten durch Agarosegel-Elektrophorese

Im Idealfall handelt es sich bei der mittels Fluoreszenz nachgewiesenen doppelsträngigen DNA um Moleküle, die sich aus Primer und komplementärer Proben-DNA zusammensetzen. Da der für die qPCR verwendete Fluoreszenzfarbstoff jedoch jegliche Form doppelsträngiger DNA binden kann und folglich nicht zwischen interessierendem Produkt und Artefakten (zum Beispiel durch Aneinanderlagern von Primern als Primerdimere) unterscheidet, ist diese Methode sensitiv, aber wenig spezifisch. Aus diesem Grund wurden alle qPCR-Produkte im Anschluss an die qPCR auf Agarosegele aufgetragen und durch Gelelektrophorese der Größe der DNA-Stränge nach aufgetrennt. Zum Anfärben der Produkte wurde Ethidiumbromid eingesetzt. Die verwendeten Agarosegele wurden vorab selbst gegossen. Für ein einprozentiges Agarosegel wurden zunächst 1,5 g Agarosepulver in ca. 150 ml TAE-Puffer (1x) in einem Becherglas für zwei Minuten bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt und gelöst. Danach wurden 2 Tropfen Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (0,5 µg/ml) hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend in die Elektrophoreseschlitten gegossen. Durch das Einlegen von Kämmen wurden Aussparungen zum Laden der Proben im Gel geschaffen. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde es in die mit TAE-Puffer (1x) gefüllte horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt und gut mit Puffer benetzt. Die Kämme wurden entfernt. Zunächst wurden je 10 µl 100 bp-Ladder in die erste Tasche pipettiert. Nachfolgend wurden alle zuvor mit 2 µl PCR-Ladepuffer versehenen qPCR-Proben geladen (Gesamtvolumen 12 µl). Das Gel wurde bei 110 V und 150 A 40 Minuten laufen gelassen. Die Detektion der Banden im Agarosegel erfolgte über ein Geldokumentationssystem (AlphaImager) mittels UV-Licht. Die Lage der Banden wurde dokumentiert und hinsichtlich der Ergebnisse der durchgeführten qPCR interpretiert.

2.15.7 Schmelzkurven

Am Schluss einer qPCR erhält man neben einer Übersicht der einzelnen Proben-C_T-Werte und der Verlaufsentwicklung des Fluoreszenzsignals auch die zugehörigen Schmelzkurven. Letztere entstehen durch Denaturierung der Proben am Ende der qPCR. Während einer Temperatursteigerung erfolgt eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung, die sich als Anstieg der Schmelzkurve zeigt. Ist die Temperatur

hoch genug, um die Proben zu denaturieren, lösen sich die gebildeten doppelsträngigen DNA-Moleküle und die DNA liegt wieder einzelsträngig vor. Da der Fluoreszenzfarbstoff nun keine doppelsträngige DNA mehr binden kann, resultiert dies in einen abrupten Abfall des Fluoreszenzsignals. Die Schmelzkurven geben folglich einen Hinweis darauf, ob pro Probe ein einzelnes spezifisches Produkt entstanden ist (eine Spitze pro Schmelzkurve) oder ob mehrere Produkte zu erwarten sind (zwei bis mehrere Spitzen pro Schmelzkurve). Da es vor allem in G/C-reichen Regionen vorkommen kann, dass einige Bindungen des doppelsträngigen DNA-Moleküls stärker sind als andere, können in solchen Fällen mehrere Schmelzkurvenspitzen auftreten, obwohl lediglich ein spezifisches Produkt entstanden ist. Daher ist es sinnvoll, die Proben auf Agarosegele aufzutragen und gelelektrophoretisch aufzutrennen. Dies wurde für alle Proben durchgeführt. Das Vorgehen wurde in Abschnitt 2.15.6 beschrieben.

2.15.8 Primereffizienztestung

Da es bei der abschließenden Beurteilung der *SOCS1*-mRNA-Expression von Vorteil sein kann, die Effizienz der verwendeten Primer einschätzen und vergleichen zu können, wurden entsprechende Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Zur Testung der Primereffizienz wurden cDNA-Verdünnungsreihen angesetzt (bis 1 : 10000 jeweils mit dem Verdünnungsfaktor 1 : 10). Die Proben der Verdünnungsreihen wurden anschließend als PCR-Proben verwendet. Das Vorgehen inklusive Ansetzen des qPCR-Mastermix für die unterschiedlichen Primermischungen erfolgte analog zum im Abschnitt 2.15.5 beschriebenen Verfahren. Zur Auswertung der Primereffizienztestung wurden die Mittelwerte der erhaltenen C_T-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der verwendeten Probenverdünnungen in einem Koordinatensystem aufgetragen. Durch die einzelnen Punkte wurde nachfolgend eine Ausgleichsgerade gelegt, deren Steigung bestimmt wurde (vgl. Abbildung 10). Die Primereffizienz ließ sich im Anschluss anhand der folgenden Gleichung berechnen: $Primereffizienz\ (\%) = (-1+10^{-1/Steigung})\cdot 100$. Primereffizienzen zwischen 90 % und 110 % gelten allgemeinhin als gut, der Idealwert liegt bei 100 %. Zudem wurden für alle untersuchten Primer die Amplifikations- und Schmelzkurven betrachtet und die Lage der qPCR-Produkte nach Agarosegel-Elektrophorese hinsichtlich der zu erwartenden Produktgröße beurteilt.

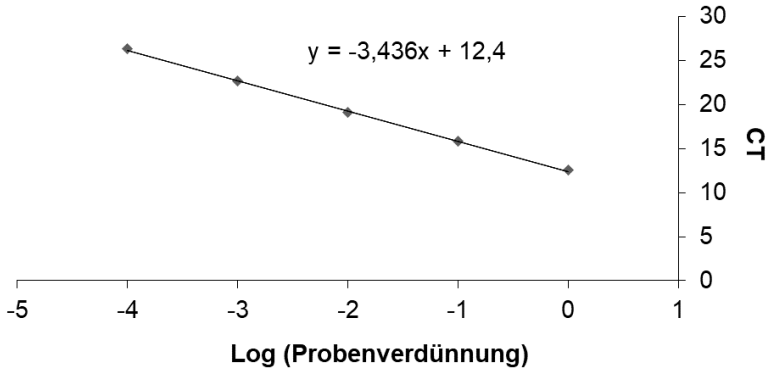


Abbildung 10: Auswertungsgrafik zur Bestimmung der *GAPDH*-Primereffizienz. Die angegebene Steigung der Ausgleichsgeraden bestimmt entsprechend der Formel $(-1+10^{-1/Steigung})\cdot 100$ die Primereffizienz in Prozent. Primereffizienzen zwischen 90 % und 110 % gelten allgemeinhin als gut, der Idealwert liegt bei 100 %. Im Beispiel liegt eine Primereffizienz von 95,45 % vor.

Es soll bereits an dieser Stelle erwähnt werden, dass sich für die im Rahmen der semiquantitativen Echtzeit-PCR-Experimente eingesetzten Primer überwiegend Primereffizienzen zwischen 90 % und 110 % ergaben. Zwei für die Zelllinie L428 designte Primer (L428/2 wt, L428/2 mut) wiesen geringere Effizienzen auf. Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte: L428/2 mut 72,53 %, L428/2 wt 87,31 %, L428/1 wt 92,84 %, *GAPDH* 95,45 %, *β-Actin* 98,62 %, L428/1 mut 103,69 %, *SOCS1* – Wildtyp 105,68 %.

2.15.9 Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse

Zur Auswertung der qPCR-Daten und anschließenden Beurteilung der Genexpression sind die gemessenen C_T-Werte sowie die daraus zu berechnenden ΔC_T- und $\Delta\Delta C_T$-Werte von Bedeutung. Der C_T-Wert als Schwellenwert, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal deutlich ansteigt, ist hierbei proportional zum Kehrwert der Proben-DNA-Menge: Ein C_T-Wert ≤ 29 spricht für eine große Menge doppelsträngiger DNA in der Ausgangsprobe. Ein C_T-Wert ≥ 38 weist hingegen auf eine äußerst geringe Menge Ausgangsproben-DNA beziehungsweise auf Artefaktbildung gegen Ende der qPCR hin. Die ΔC_T-Werte können als Differenz zwischen dem C_T-Wert des Gens von Interesse und C_T-Wert eines Haushaltsgens berechnet werden, beispielsweise als $\Delta C_T = C_T(SOCS1wt) - C_T(\beta\text{-}Actin)$. Der ΔC_T-Wert erlaubt durch eine Normalisierung der gemessenen Ergebnisse den Vergleich unterschiedlicher Proben. Der $\Delta\Delta C_T$-Wert setzt die errechneten ΔC_T-Werte zusätzlich in Relation zu einer gewählten Referenz

entsprechend der Formel $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(Probe) - \Delta C_T(Referenz)$. Die relative Genexpression kann als $2^{-\Delta\Delta CT\text{-Wert}}$ berechnet werden.

Im konkreten Fall wurden sowohl für die Transfektionsexperimente als auch für die Untersuchungen weiterer Zelllinien ΔC_T-, $\Delta\Delta C_T$-Werte und die relative Expression als $2^{-\Delta\Delta CT\text{-Wert}}$ bestimmt. Als Grundlage wurden aus den zu einer cDNA-Probe (biologisches Replikat) gehörenden technischen Replikaten jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. In den transfizierten HEK 293T Zellen wurde die relative *SOCS1*-mRNA-Expression als Vielfaches der endogenen *SOCS1*-Expression von HEK 293T Zellen ausgewertet. Hinsichtlich der weiteren untersuchten Zelllinien diente die verwendete lymphoblastoide Zelllinie als Beispiel einer Zelllinie, die sich im Gegensatz zu den weiteren Suspensionszelllinien nicht von einem B-Zell-Lymphom, sondern von EBV^+ B-Lymphozyten ableitet, als Referenz für die relative endogene Wildtyp-*SOCS1*-Expression. *β-Actin* wurde in allen Quantifizierungsschritten als Haushaltsgen verwendet.

2.16 Proteinnachweis und -quantifizierung im Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung und Übertragung auf eine Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Neben einem bestimmten nachzuweisenden Protein wird in der Regel zusätzlich der Nachweis eines ubiquitär in Zellen vorkommenden Proteins wie β-Tubulin oder α-Actin angestrebt, welches als Ladekontrolle fungiert und darüber hinaus der anschließenden Quantifizierung der detektierten Banden dient. Der Ablauf eines Western Blot-Experiments gliedert sich in viele einzelne Schritte, die im Folgenden dargelegt werden sollen.

2.16.1 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele erstellt. Die Zusammensetzung der Gele gibt Tabelle 8 wieder. Zum Herstellen des Trenngels wurden demineralisiertes Wasser, Tris-HCl-Puffer, Acrylamid, APS und SDS durch Invertieren gemischt. Nach Hinzugeben von TEMED und erneutem Invertieren wurde das Gemisch in die vorbereiteten Gelkammern gegossen und mit Ethanol

überschichtet, um das Ausbilden von Luftblasen an der Gel-Luft-Grenze zu verhindern. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde zunächst das Ethanol möglichst vollständig entfernt. Danach wurde das Sammelgel analog zum Trenngel gegossen. Das Gemisch wurde in die Gelkammern gefüllt und mit einem Kamm versehen. Die Zinken des Kamms lieferten hierbei Aussparungen, die später als Taschen dem Laden der Proteinproben dienten. Die Gele konnten nach Polymerisation des Sammelgels sofort verwendet oder über Nacht bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 8: Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels für den Western Blot.

Trenngel (12 % Acrylamid)		Sammelgel (4,5 % Acrylamid)	
Reagenz	Volumen	Reagenz	Volumen
ddH_2O	1729 µl	ddH_2O	1761 µl
Tris-HCl (0,75 mol/l, pH 8,8)	5640 µl	Tris-HCl (0,25 mol/l, pH 6,8)	2500 µl
Acrylamid (40 %)	3403 µl	Acrylamid (40 %)	564 µl
APS (10 mg/ml)	280 µl	APS (10 mg/ml)	125 µl
SDS (10 %)	224 µl	SDS (10 %)	50 µl
TEMED	20 µl	TEMED	10 µl

2.16.2 Bestimmung der Proteinkonzentration durch Bradford Protein Assay

Um die Proteinkonzentration der verschiedenen Proben zu ermitteln, wurde die Methode des Bradford Protein Assays verwendet. Hierzu wurden je 0,5 ml Bradford Reagenz mit 1 µl Proteinextrakt versetzt. Zum Erstellen einer Standardreihe sind verschiedene BSA-Standardproben mit den aufsteigenden Konzentrationen von 1 µg/µl, 2,5 µg/µl, 5 µg/µl und 10 µg/µl zur Bradford Reagenz pipettiert worden. Als Nullstandard diente eine Probe Bradford Reagenz ohne jeglichen Zusatz. Nach Ansetzen der Standardreihe und Proteinproben sind diese durch Invertieren gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die Proben der Standardreihe und Proteinproben sind jeweils als Dubletten à 200 µl in die entsprechenden Platten pipettiert und mit Hilfe des Spektralphotometers bei 595 nm gemessen worden (Programm Gen5 2.09). Aus den bestimmten Absorptionen für die angesetzte Standardreihe konnte jeweils eine Standardkurve erstellt werden. Anhand dieser war ein Abgleich zwischen gemessenen und errechneten

Proteinkonzentrationen möglich. Mit Hilfe der gemessenen Proteinkonzentrationen wurden die erforderlichen Probenvolumina für eine Proteinmenge von 10 µg pro Probe berechnet.

2.16.3 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichts. Durch das verwendete Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst sowie die Ladung der unterschiedlichen im Gemisch enthaltenen Proteine vereinheitlicht. Da es sich bei SDS um ein anionisches Tensid handelt, werden die Proteine durch die Verwendung von SDS negativ geladen und laufen dementsprechend in der Gelelektrophorese zur Anode.
Die unter Zuhilfenahme des Bradford Protein Assays ermittelten Probenvolumina wurden jeweils mit 5 µl SDS-Ladepuffer (4x SDS) versetzt und zur weiteren Proteindenaturierung für fünf Minuten bei 95 °C im Thermomixer aufgekocht. Nach dem Abkühlen und Zentrifugieren der Proben konnten sie in die Geltaschen des Polyacrylamid-Gels geladen werden. Für die in dieser Arbeit erstellten Western Blots sind maximal 18 µl Proteinextrakt verwendet worden, um sicherzustellen, dass die geladenen Proben nicht in benachbarte Geltaschen fließen und dadurch gegebenenfalls das Ergebnis beeinträchtigen. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die Gele in die Laufkammern gespannt. Letztere wurden mit SDS-Laufpuffer (1x SDS) befüllt, sodass die Gele gut benetzt waren. Der Kamm zwischen den Gelplatten wurde entfernt und die entstandenen Geltaschen wurden gründlich mit SDS-Laufpuffer gespült. Vor dem Laden der Proben wurden alle Luftblasen unterhalb des Gels entfernt. In die erste Geltasche wurden jeweils 7 µl Proteinstandard pipettiert. Nachfolgend wurden alle Proteinproben der Reihe nach vollständig in die unterschiedlichen Geltaschen geladen. Im Anschluss wurden die Elektrophoresekammern angeschlossen und für 90 Minuten bei 130 V laufen gelassen. Da die aus den unterschiedlichen Zelllinien gewonnenen Proteinextrakte im Rahmen der Western Blot-Experimente mit vier unterschiedlichen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörpern untersucht werden sollten, wurden für jede TNT^{++}-Extraktion alle zu untersuchenden Proteinproben vierfach angesetzt und für vier getrennte Blots jeweils mit zugehörigem Proteinstandard aufgetragen.

2.16.4 Transfer von Proteinen mittels Semidry-Blot

Beim Blotten werden die im Polyacrylamid-Gel nach Molekulargewicht getrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine laufen auch hier nach dem Anlegen von Spannung im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Der Semidry-Blot erfolgt in horizontaler Anordnung, sodass beim Blotten ein für diese Methode typisches Blot-Sandwich entsteht (vgl. Abbildung 11). Die Filterpapiere sind hierbei puffergetränkt (semidry).

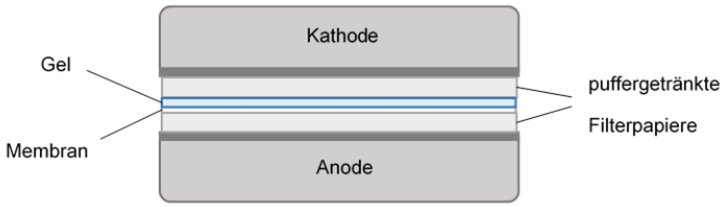


Abbildung 11: Schematische Darstellung des typischen „Blot-Sandwich“ beim Semidry-Western Blot.

Für den Semidry-Blot verwendete Filterpapiere wurden vor dem Blotten in Transferpuffer (1x) inkubiert, die Blot-Membran wurde ca. zwei Minuten in demineralisiertem Wasser aktiviert. Vom Polyacrylamid-Gel wurden die Glasplatten und Trennstäbe entfernt, das Trenngel wurde vom Sammelgel abgetrennt. Danach wurde die aktivierte Blot-Membran mit Transferpuffer benetzt und auf dem Gel platziert. Vier puffergetränkte Filterpapiere wurden auf die Anode des Blotters gelegt. Darauf folgten die Blot-Membran samt Gel und vier weitere puffergetränkte Filterpapiere. Um restliche Luftblasen zu entfernen, wurde mit einer Rolle mit leichtem Druck über die Filterpapiere gefahren. Es wurde etwas Transferpuffer oben auf das Papier gegeben und die Kathode des Blotters darüber platziert. Auf den Blotter wurde zum Schluss ein Gewicht gesetzt, um einen guten Kontakt zwischen Gel und Membran während des Blotvorgangs zu gewährleisten. Der Blotter wurde für ein Blot-Sandwich auf 60 mA, für zwei auf 120 mA eingestellt und 80 Minuten laufen gelassen.

2.16.5 Blocken von Western Blot-Membranen

Um im weiteren Verlauf unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper an freie Bindungsstellen auf der Blot-Membran zu verhindern, ist es sinnvoll, diese

Bindungsstellen vor der Antikörperinkubation zu blockieren. Hierfür eignen sich unter anderem fünfprozentige BSA- oder Magermilchpulver-Lösungen.
Das Blocken der Membranen erfolgte jeweils in 50 ml fünfprozentiger Magermilch. Die Membranen wurde vor dem Blocken jeweils aus dem Blotter genommen. Das Gel und allfällige Gelreste wurden vorsichtig von den Blot-Membranen entfernt. Anschließend wurden die Membranen für mindestens eine Stunde in der angesetzten Magermilch geschwenkt. Nach dem Blocken wurden die Membranen kurz in TBS-T gewaschen.

2.16.6 Antikörperinkubationen

Die Inkubation mit verschiedenen Primär- sowie Sekundärantikörpern ermöglicht ein Protein von Interesse spezifisch mittels Western Blot nachzuweisen. Die Antigen-Bindungsstellen der Primärantikörper binden hierbei die Epitope der nachzuweisenden Proteine. Durch Inkubation mit einem für den Primärantikörper geeigneten Sekundärantikörper und nachfolgender Markierung des Sekundärantikörpers gelingt es, das gesuchte Protein zu detektieren (vgl. Abbildung 12). Die zwischen den Antikörperinkubationen regelmäßig stattfindenden Waschschritte dienen der Entfernung ungebundener Antikörper.

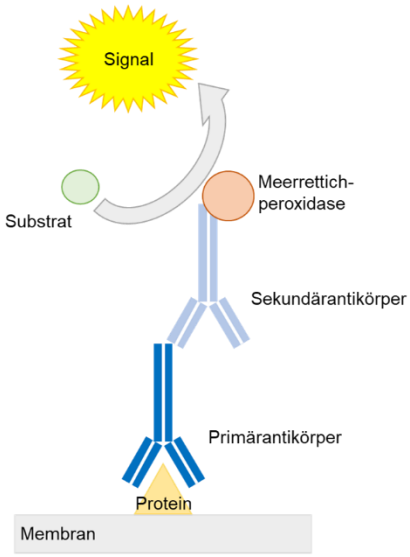


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Proteindetektion im Western Blot unter Verwendung von spezifischen Primärantikörpern und Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern zur Erzeugung detektierbarer Bandensignale.

2.16.6.1 Primärantikörperinkubation

Insgesamt wurden vier verschiedene monoklonale anti-SOCS1-Antikörper verwendet, um SOCS1 im Western Blot nachzuweisen (vgl. Tabelle 10 im Abschnitt 2.16.9). Darüber hinaus wurde ein monoklonaler anti-β-Tubulin-Antikörper nach erfolgter SOCS1-Detektion als weiterer Primärantikörper zum Nachweis der Ladekontrolle β-Tubulin verwendet, um später eine Quantifizierung der jeweiligen SOCS1-Banden zu ermöglichen. Im Western Blot lässt sich SOCS1 bei einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa nachweisen, β-Tubulin typischerweise bei ca. 55 kDa.
Die Primärantikörperinkubation fand jeweils über Nacht bei 4 °C statt. Die Membranen wurden 16 bis 18 Stunden in der jeweiligen Antikörperlösung geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten in TBS-T schloss sich die Sekundärantikörperinkubation an.

2.16.6.2 Sekundärantikörperinkubation

Als Sekundärantikörper wurde in allen Western Blot-Experimenten ein anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Membranen wurden jeweils zwei Stunden bei Raumtemperatur in der Sekundärantikörperlösung geschwenkt und anschließend dreimal für je zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Die untenstehende Tabelle liefert eine Zusammenschau aller verwendeten Antikörper inklusive Verdünnung.

Tabelle 9: Übersicht aller verwendeten Antikörper inklusive der Verdünnungen und BSA-Anteile.

Antikörper	Zielprotein	Verdünnung (in TBS-T)	BSA-Anteil
Primärantikörper			
#424/44/8/13	SOCS1	1 : 1000	0,5 %
#424/44/8	SOCS1	1 : 1000	0,5 %
#LS-C191491	SOCS1	1 : 1000	0,5 %
#S1040-01K	SOCS1	1 : 1000	0,5 %
#T4026	β-Tubulin	1 : 1000	-
Sekundärantikörper			
anti-Maus	Maus-Antikörper	1 : 10000	0,5 %

2.16.7 Western Blot-Bandendetektion

Bei der Detektion von Western Blot-Banden können sich die Eigenschaften der Meerrettichperoxidase zu Nutze gemacht werden. Diese ist unter anderem in der Lage, eine Chemilumineszenz-Reaktion zu katalysieren. Das Enzym Meerrettichperoxidase kann an Sekundärantikörper gekoppelt vorliegen und bei Zugabe entsprechender Substratlösungen (in der Regel gleiche Anteile Luminol-Wasserstoffperoxid-Lösung und Chemilumineszenz-Verstärker-Lösung) Luminol oxidieren. Bei diesem Vorgang wird Licht emittiert, das wiederum einen Film belichten oder von einem dafür vorgesehenen Scanner detektiert werden kann. Die Intensität des emittierten Lichts korreliert mit der Anzahl gebundener Antikörper und folglich mit der Proteinmenge auf der Blot-Membran.
Von beiden Detektierlösungen (Luminol-Wasserstoffperoxid- und Chemilumineszenz-Verstärker-Lösung) wurden jeweils 500 µl zur zu detektierenden Membran gegeben. Die Membran wurde im Anschluss durch Schwenken für vier Minuten gleichmäßig benetzt. Nachfolgend wurde die Membran im Scanner platziert und die Detektion gestartet (high sensitivity-Programm, zwölf Minuten). Nach erfolgter Detektion wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Im Anschluss war es möglich, die Membran mit einem weiteren Primärantikörper zu inkubieren.

2.16.8 Western Blot-Bandenquantifizierung

Die Quantifizierung der detektierten Banden erfolgte mit der dafür vorgesehenen Software Image Studio Digits 5.2. Es wurden jeweils die Signalstärken für die unterschiedlichen durch SOCS1 (bei ca. 24 kDa) und β-Tubulin hervorgerufenen Banden (bei ca. 55 kDa) gemessen. Sortiert nach Proteinextraktionen sowie verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörpern wurden in Microsoft Excel die jeweiligen SOCS1-Bandenintensitäten mit den Signalen der zugehörigen β-Tubulin-Banden normalisiert. So konnten die Ergebnisse insbesondere für die durchgeführten Transfektionen auch zwischen den verschiedenen Extraktionen und verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörpern verglichen werden. Im Falle der Transfektionen erfolgte die Darstellung zudem relativ zur Negativkontrolle, in die ausschließlich ein Leervektor eingebracht wurde.

2.16.9 Generierung institutseigener monoklonaler anti-SOCS1-Antikörperklone

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten institutseigenen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper #424/44/8 und #424/44/8/13 wurden in einer Zusammenarbeit des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg in Hybridom-Technik generiert. Auch wenn ich in den Gewinnungsprozess der betreffenden Antikörper nicht direkt involviert war, soll der Prozess an dieser Stelle kurz dargestellt werden, da die genannten institutseigenen anti-SOCS1-Antikörperklone wesentliche Bestandteile der von mir durchgeführten Experimente sind.

Zur Generierung der institutseigenen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper wurden BALB/c Mäuse mit einem synthetisch hergestellten Protein immunisiert, welches vom C-Terminus aus betrachtet die letzten 108 Aminosäuren des Wildtyp-SOCS1-Proteins umfasst. Die Immunisierung wurde viermal durch Boosterinjektion wiederholt, um den Antikörpertiter zu erhöhen. Nach Gewinnung von Plasmazellen der immunisierten Mäuse erfolgte die Hybridisierung der Plasmazellen mit Maus-Myelomzellen. Die entstandenen Hybridome wurden anschließend selektioniert und mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay-Test (ELISA) bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, Antikörper gegen das zur Immunisierung verwendete trunkierte Wildtyp-SOCS1-Protein zu produzieren. In einem weiteren Selektionsschritt wurden Zytospins angefertigt und mit Antikörpern inkubiert, die aus dem Nährmedium der jeweiligen ELISA-positiven Klone gewonnenen wurden. Für die Zytospins wurden mit einem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor transfizierte HEK 293T Zellen als Positivkontrolle und mit einem Leervektor transfizierte HEK 293T Zellen sowie Karpas 1106-Zellen als Negativkontrollen eingesetzt. Zur Aufreinigung der so ausgewählten Klone wurde eine Protein G-Sepharose-Affinitätschromatographie durchgeführt. Im Anschluss erfolgten eine Epitop-Kartierung über Peptid-Microarray-Verfahren und eine Kreuzreaktivitäts-testung durch Epitope Substitution Scan. Die so gewonnenen institutseigenen monoklonalen IgG1-Antikörperklone zeigten in den durchgeführten Tests eine hohe Affinität zu einem klar definierten carboxyterminal gelegenen Epitop von acht Aminosäuren sowie keine Kreuzreaktivität.

Ein Überblick über die wesentlichen Eigenschaften der verwendeten institutseigenen und kommerziellen Antikörperklone findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper. Bei allen verwendeten anti-SOCS1-Antikörpern handelt es sich um murine monoklonale Antikörper, die eine bestimmte Aminosäureabfolge im SOCS1-Protein erkennen. Die Immunisierungssequenz der institutseigenen Antikörper liegt am Carboxyterminus des SOCS1-Proteins, die der kommerziellen Antikörper befindet sich hingegen aminoterminal. Für die institutseigenen Antikörperklone (#424/44/8/13, #424/44/8) ist in der Spalte „Epitop" in Klammern das klar definierte Epitop dieser Antikörper als Aminosäuresequenz angegeben. Eine Kreuzreaktivität der institutseigenen Klone wurde per Kreuzreaktivitätsanalyse mittels Epitope substitution scan ausgeschlossen. Für die kommerziell erhältlichen anti-SOCS1-Antikörper (#LS-C191491, #S1040-01K) sind Informationen bezüglich Epitop und Kreuzreaktivität nicht verfügbar. Immun.-sequenz: Immunisierungssequenz; Pathologie UKU/DKFZ Heidelberg: Zusammenarbeit des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg; aa: Aminosäure; n.a.: not applicable, Angabe nicht verfügbar.

Antikörper	Klon	Wirt	Klonalität	Hersteller	Subklasse	Immun.-sequenz	Epitop	Kreuzreaktivität
#424/44/8/13	424/44/8/13	Maus	monoklonal	Pathologie UKU/DKFZ Heidelberg	IgG1	aa 104 - 211	aa 196 – 203 (LNPVLRDY)	keine
#424/44/8	424/44/8	Maus	monoklonal	Pathologie UKU/DKFZ Heidelberg	IgG1	aa 104 - 211	aa 196 – 203 (LNPVLRDY)	keine
#LS-C191491	TS106	Maus	monoklonal	LifeSpan BioSciences Inc.	IgG1	aa 2 - 78	n.a.	n.a.
#S1040-01K	11n174	Maus	monoklonal	United States Biological Corp.	IgG1	aa 2 - 78	n.a.	n.a.

2.17 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der gezielten Anreicherung eines bestimmten Proteins aus einem komplexeren Gemisch. Das zu präzipitierende Protein wird durch einen entsprechenden, vorab an eine Matrix gekoppelten Antikörper gebunden. Als Matrix kommen hierbei zum Beispiel Protein G-Sepharose-Partikel infrage. Bei Sepharose handelt es sich um quervernetzte Agarose (Separation-Pharmacia-Agarose). Protein G kommt hingegen physiologisch in der Zellwand von Streptokokken vor und kann durch carboxyterminal gelegene Bindungsdomänen mit hoher Affinität die konstante Region von Immunglobulinen (F_C) vom Typ G binden. Durch die Bildung von Protein G-Sepharose-Antikörper-Protein-Komplexen (vgl. Abbildung 13) können diese Interaktionspartner durch Zentrifugieren sowie verschiedene Waschschritte von weiteren im Gemisch befindlichen Proteinen getrennt werden. Durch Aufkochen mit Ladepuffer (4x SDS) und Zentrifugieren werden die entstandenen Komplexe zum Schluss wieder gelöst und in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Antikörper und gesuchtes Protein befinden sich letztendlich in denaturierter Form im Überstand und können mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert werden. Eine anschließende Coomassie-Färbung ermöglicht die Visualisierung der aufgetrennten Proteine in Bandenform. In der Regel werden hier zusätzlich zu den gesuchten Proteinen zwei Antikörper-Banden (leichte Ketten bei ca. 25 kDa, schwere Ketten bei ca. 50 kDa) sichtbar.

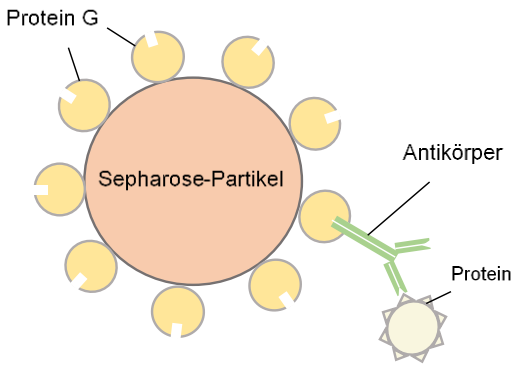


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Protein G-Sepharose-Partikel, Antikörper und anzureicherndem Protein.

2.17.1 Probenvorbereitung für die Immunpräzipitation

Für die Präzipitationsexperimente wurden die kommerziell erworbenen Antikörper (#LS-C191491, #S1040-01K) als spezifische Antikörper sowie der für alle

durchgeführten Western Blots verwendete anti-β-Tubulin-Antikörper unspezifischer Kontrollantikörper eingesetzt. Die verwendeten Proteinextrakte stammten aus den Zelllinien Karpas 1106 und HBL-1. Die Zelllinie Karpas 1106 sollte hierbei als *SOCS1*-defiziente Zelllinie die Unterscheidung der zu erwartenden Banden im Coomassie-gefärbten Gel erleichtern. Für jede Probe mit Proteinextrakt wurden 600 µg Protein eingesetzt. Die Proteinkonzentration der TNT^{++}-Extrakte wurde vorab mittels Bradford Protein Assay (siehe Abschnitt 2.16.2) bestimmt und entsprechend das benötigte Extraktvolumen berechnet. Einen Überblick über die eingesetzten Proben liefert Abbildung 14.

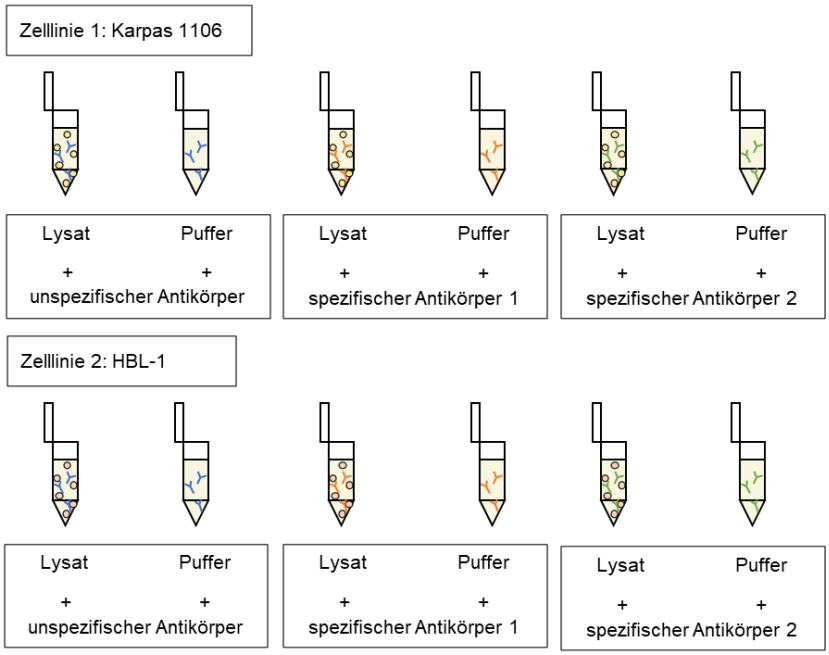


Abbildung 14: Übersicht der verschiedenen Immunpräzipitationsproben.

2.17.2 Protein G-Sepharose-Vorbehandlung

Im Rahmen der Sepharose-Vorbehandlung wurden die eingesetzten Protein G-Sepharose-Partikel zunächst durch Zentrifugieren für zehn Sekunden bei 14000 rpm und 4 °C von Resten der Aufbewahrungslösung gereinigt. Für die nachfolgenden Schritte wurde das Protein G-Sepharose-Pellet danach in 1,2 ml kaltem TNT^{++}-Puffer durch gründliches Resuspendieren gelöst. Zur Vorreinigung (preclear step) wurde anschließend jede Probe mit 20 µl Protein G-Sepharose-Mischung versetzt und für eine Stunde bei 4 °C auf einem Rotor inkubiert. Nach Zentrifugieren für zehn Sekunden bei 14000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein frisches Mikroreaktionsgefäß pipettiert und für die eigentliche Immunpräzipitation verwendet.

2.17.3 Proteinanreicherung durch Immunpräzipitation

Zu jeder Probe wurde entsprechend der Planung einer der Antikörper gegeben und alles über Nacht bei 4 °C auf einem Rotor inkubiert. Pro Probe wurden 0,2 µg Antikörper verwendet. Am nächsten Tag wurden zu jeder Probe 100 µl Protein G-Sepharose-Mischung hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben erneut für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Rotor inkubiert. Danach folgten vier Waschschritte. Die Proben wurden zwei Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl TNT^{++}-Puffer zu jeder Probe und Resuspendieren des Pellets schloss sich ein erneutes Inkubierten auf einem Rotor für 15 Minuten bei 4 °C an. Dieser Waschschritt wurde wiederholt. Die darauffolgenden zwei Waschschritte erfolgten analog, jedoch wurden statt des TNT^{++}-Puffers 500 µl TBS je Probe verwendet. Nach Verwerfen des Überstands wurde jedes Pellet mit 10 µl Ladepuffer (4x SDS) versetzt. Die Proben wurden zur Proteindenaturierung fünf Minuten bei 95 °C im Thermomixer gekocht und nach dem Abkühlen zentrifugiert.

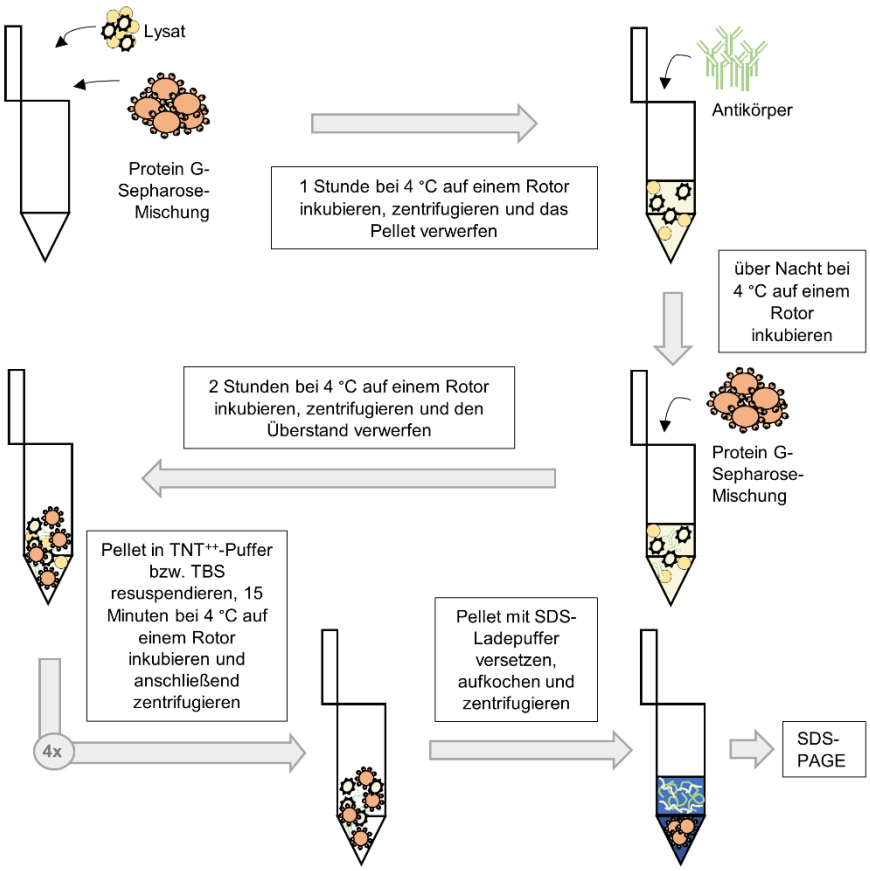


Abbildung 15: Anreicherung von Proteinen mittels Immunpräzipitation und Vorbereitung für die nachfolgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

2.17.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Gradientengel

Nach Trennung der Protein G-Sepharose-Partikel vom Proteingemisch durch Zentrifugieren wurden jeweils die Überstände der Proben in die Taschen eines Gradientengels geladen. Es wurde analog zum im Abschnitt 2.16.3 beschriebenen Vorgehen einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiterverfahren.

2.17.5 Coomassie-Proteinfärbung

Nachfolgend wurden die im Gel enthaltenen Proteine angefärbt (Coomassie-Färbung). Hierzu wurde das Gel in destilliertem Wasser gewaschen, eine Stunde in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend zum Entfärben mehrere Stunden in destilliertem Wasser geschüttelt. Um eine kontinuierliche Entfärbung des Gelhintergrundes zu ermöglichen, wurde während des Entfärbeprozesses mehrfach das Wasser gewechselt. Auf eine Fixierung vor dem Färbeprozess wurde verzichtet. Ergebnis war ein Gel mit blau angefärbten Proteinbanden. Die Lage der Proteinbanden wurde diskutiert und mittels AlphaImager dokumentiert.

2.18 Durchführung von STR-Analysen zur Authentifizierung humaner Zelllinien

Short Tandem Repeats (STR) sind kurze Wiederholungssequenzen im nichtcodierenden DNA-Bereich. Sie variieren hinsichtlich ihrer Anzahl und ihres Verteilungsmusters zwischen Individuen einer Spezies und machen ca. 0,5 % des Genoms aus. Durch die Analyse mehrerer hoch variabler STR-Loci ergeben sich individuelle STR-Profile, die sich einem Individuum spezifisch zuordnen lassen. STR-Analysen werden daher häufig in der Forensik und zur Abstammungsdiagnostik eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden STR-Analysen zur Zelllinien-Authentifizierung verwendet. Hierbei wurden zunächst Polymerasekettenreaktionen (PCR) zur gezielten Vervielfältigung ausgewählter STR-Loci der aus den verwendeten Zelllinien extrahierten DNA (vgl. Abschnitt 2.14.4) durchgeführt. Im Anschluss folgten die Auftrennung und der Nachweis der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte mittels Kapillarelektrophorese. Unter Verwendung des GenomeLab Human STR Primer Set Kit

von Beckman Coulter wurden für jede Zelllinie ein geschlechtsspezifischer Locus (Amelogenin, AMEL) und elf STR-Loci (D3S1358, TH01, D13S317, D8S1179, D7S820, TPOX, D16S539, D18S51, CSF1PO, Penta D, Penta E) untersucht.

Zur Vorbereitung der PCR wurden die DNA-Proben zunächst jeweils mit Nuclease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Danach wurden die PCR-Ansätze entsprechend dem untenstehenden Schema pipettiert (vgl. Tabelle 11) und auf Eis gelagert.

Tabelle 11: PCR-Ansatz für die STR-Analyse. Verwendet wurde das GenomeLab Human STR Primer Set Kit von Beckman Coulter. Die forward Primer sind hierbei zur späteren Detektion mittels Kapillarelektrophorese kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden.

Reagenz	Volumen
Nuclease-freies Wasser	3,7 µl
Primermix (forward/reverse Primer)	5 µl
Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold)	0,3 µl
DNA (c = 10 ng/µl)	1 µl

Die Proben wurden nachfolgend elf Minuten bei 95 °C und zwei Minuten bei 96 °C im PCR-Gerät inkubiert. Im Anschluss durchliefen die Proben 27 Zyklen des folgenden Programmes: eine Minute 94 °C (Denaturierung), eine Minute 60 °C (Hybridisierung), eine Minute 70 °C (Elongation). Nach dreißigminütiger Inkubation bei 60 °C wurden die Proben auf 10 °C heruntergekühlt.

Die Auftrennung und Detektion der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte erfolgten anschließend mit Hilfe des CEQ GeXP Kapillarelektrophorese-Systems. Hierzu wurden zunächst für jede PCR-Probe 20 µl deionisiertes Formamid mit 0,3 µl Längenstandard (DNA Size Standard 600) vorbereitet. Das Formamid-Standard-Gemisch wurde in die Vertiefungen einer Probenplatte pipettiert (Gesamtvolumen 20,3 µl/Ansatz). Zum vorgelegten Formamid-Standard-Gemisch wurde 1 µl PCR-Produkt gegeben und mit einem Tropfen Mineral-Öl überschichtet, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstehen. Analog wurde für alle weiteren Proben verfahren. Danach wurde eine Pufferplatte mit 250 µl Laufpuffer pro Ansatz vorbereitet. Die Proben- und Pufferplatte wurden anschließend in das Kapillarelektrophorese-System eingestellt und die Elektrophorese wurde entsprechend Herstellerempfehlungen gestartet. Die

Auswertung erfolgte mit der Software GeneMarker 2.2.0. Die generierten STR-Profile wurden mit den von ExPASy – Bioinformatics Resource Portal – Cellosaurus, Schweizer Institut für Bioinformatik SIB, Lausanne, Schweiz [313] bereitgestellten Daten abgeglichen (vgl. Abschnitt 2.1).

2.19 Erstellen von Zytospins und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Das Erstellen eines Zytospins ermöglicht, ähnlich wie ein Zellausstrich, die Morphologie einzelner Zellen zu beurteilen. Die in Suspension befindlichen Zellen werden hierbei auf Objektträger zentrifugiert und durch Aceton fixiert. Anschließend können die verschiedenen Zellen histologisch oder immunhistochemisch gefärbt werden. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) stellt eine histologische Standardfärbung dar. Basophile Strukturen wie Zellkerne werden durch Hämatoxylin blau angefärbt, acidophile Strukturen wie beispielsweise das Zytoplasma oder Proteine färben sich durch das Eosin in unterschiedlicher Intensität rötlich.

Für die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Zytospins wurden je Zelllinie ca. 500 µl Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für fünf Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Je 50 µl der PBS-Zellsuspension wurden dann in die trichterförmigen Zytospin-Blotter pipettiert. Bei Betätigung der Zytospin-Zentrifuge werden die einzelnen Zellen durch Wirkung der Zentrifugalkraft aus dem Blotter auf einen daran angrenzend angebrachten Objektträger bewegt. Anzahl und Dichte der Zellen auf dem Objektträger hängen hierbei neben der Anzahl an Zellen in Suspension auch von den Einstellungen der Zytospin-Zentrifuge ab. Für alle erstellten Zytospins wurde die Zentrifuge drei Minuten mit 800 rpm betätigt. Um die Zellen zu fixieren, wurden die Objektträger im Anschluss an das Zentrifugieren zehn Minuten in Aceton gestellt. Danach wurden die Zytospins mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt.

Die Zytospins wurden hierzu zunächst in destilliertem Wasser gewaschen. Es folgten die Färbung in Hämatoxylin-Lösung (drei Minuten), das Bläuen der Zytospins in fließendem Leitungswasser (drei Minuten) und die Färbung mit Eosin (15 Sekunden). Anschließend wurden die Zytospins erneut mit Leitungswasser gespült. Nach kurzem Trocknen an der Luft schloss sich das Eindecken der Zytospins an.

2.20 Statistische Analyse

Als Grundlage der im Ergebnisteil dargelegten Auswertungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich Fehlerbalken in Diagrammen auf den mittleren Standardfehler. Zur Einschätzung der statistischen Signifikanz wurde jeweils der t-Test bei unabhängigen Stichproben (unpaired t-test) durchgeführt. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt ausgedrückt: n.s.: $p > 0{,}05$; *: $p \leq 0{,}05$; **: $p \leq 0{,}01$; ***: $p \leq 0{,}001$. Die jeweilig bestimmte Signifikanz bezieht sich hierbei auf eine festgelegte Referenzgruppe. Im Rahmen der Transfektionsexperimente stellen die ausschließlich mit einem Leervektor transfizierten HEK 293T Zellen diese Referenzgruppe dar, im Falle der Untersuchung weiterer Zelllinien wurde die lymphoblastoide Zelllinie (LCL) als Beispiel einer Zelllinie, die sich im Gegensatz zu den weiteren Suspensionszelllinien nicht von einem B-Zell-Lymphom, sondern von EBV^+ B-Lymphozyten ableitet, als Referenzgruppe festgelegt. In allen nachfolgenden Diagrammen sind die zueinander in Bezug gesetzten Gruppen über eine Klammer kenntlich gemacht. Das zugehörige Signifikanzniveau befindet sich oberhalb der jeweiligen Klammer.

Detailliertere Informationen zur Auswertung von qPCR-Daten unter Zuhilfenahme von ΔC_T-, $\Delta\Delta C_T$-Werten sind in Abschnitt 2.15.9 dargestellt. Angaben zur Western Blot-Quantifizierung finden sich in Abschnitt 2.16.8.

3 Ergebnisse

3.1 Wildtyp-SOCS1-Expression in transient transfizierten HEK 293T Zellen

3.1.1 Bestimmung der Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression

Die Auswertungen der semiquantitativen Echtzeit-PCR-Experimente zeigen, dass die Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression mit abnehmender Menge des transfizierten Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors ebenfalls abnimmt (vgl. Abbildung 16). Insgesamt fällt jedoch auf, dass sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsansätzen verglichen mit der endogenen Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in HEK 293T Zellen trotz deutlicher Unterschiede der eingebrachten Menge an Wildtyp-*SOCS1*-codierendem Expressionsvektor überwiegend gering darstellen.

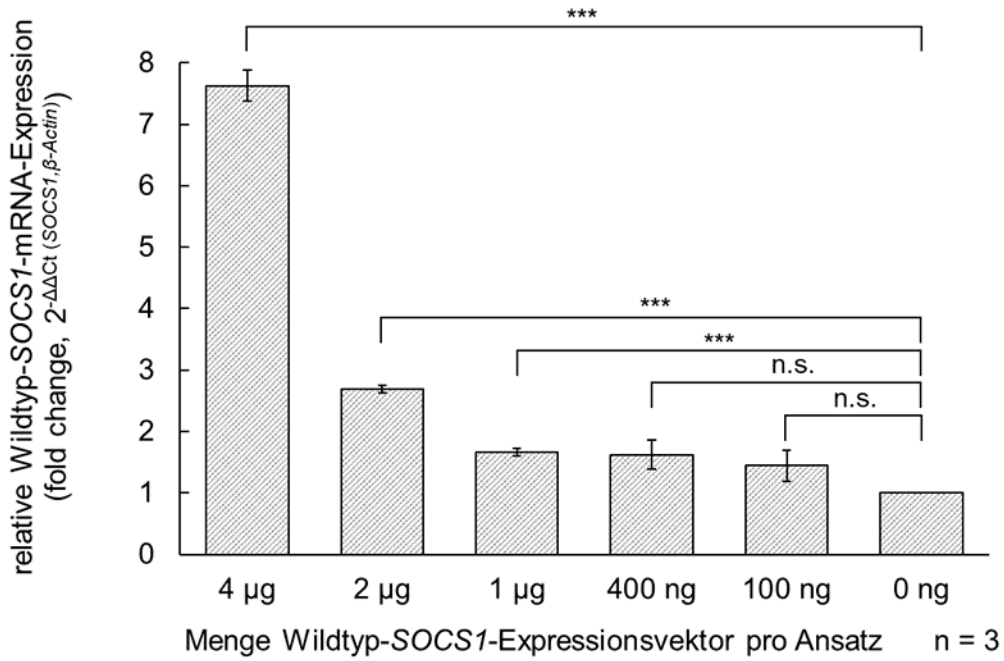


Abbildung 16: Relative Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in transient transfizierten HEK 293T Zellen als Vielfaches der endogenen Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression dieser Zelllinie. Die verwendeten HEK 293T Zellen wurden mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors transfiziert: 4 µg – 2 µg – 1 µg – 400 ng – 100 ng – 0 ng pro Ansatz. Zur Sicherstellung vergleichbarer Versuchsbedingungen wurde in jeden Ansatz eine Plasmidgesamtmenge von 4 µg eingebracht. Diese setzte sich jeweils aus einer vorgegebenen Menge an Wildtyp-*SOCS1*-codierendem Expressionsvektor sowie einer entsprechenden Menge eines Leervektors zusammen. Der Ansatz, in dem die entsprechenden Zellen ausschließlich mit einem Leervektor transfiziert wurden, repräsentiert den physiologischen *SOCS1*-Status in HEK 293T Zellen. Zur Berechnung der mRNA-Expression wurde *β-Actin* als Referenzgen verwendet. Die Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler wieder. n.s.: $p > 0{,}05$; *: $p \leq 0{,}05$; **: $p \leq 0{,}01$; ***: $p \leq 0{,}001$.

Der Ansatz mit der höchsten Transfektionsmenge (4 µg pro Ansatz) weist mit dem etwa 7,6-Fachen der endogenen Wildtyp-*SOCS1*-Expression mit Abstand den höchsten *SOCS1*-mRNA-Gehalt auf. Deutlich hebt sich auch die Probe mit der zweithöchsten Transfektionsmenge (2 µg pro Ansatz) ab, in der sich das rund 2,7-Fache der endogenen Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression bestimmen lässt. Die restlichen Proben weisen mit dem 1,67- (1 µg), 1,62- (400 ng) sowie 1,44-Fachen (100 ng) im Vergleich zur endogenen Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in HEK 293T Zellen nur geringe Unterschiede auf.

Im Anschluss an jede qPCR wurden sowohl eine Schmelzkurvenanalyse (vgl. Abbildung 17) als auch eine gelelektrophoretische Auftrennung der bei der qPCR entstandenen Produkte (vgl. Abbildung 18) durchgeführt.

Die in Abbildung 17 dargestellten Schmelzkurven zeigen für alle verwendeten Primer jeweils eine eindeutige Schmelzkurvenspitze. Dies legt nahe, dass pro eingesetzter cDNA-Probe ein spezifisches Produkt entstanden ist. Bei unspezifischen Produkten wie Primerdimeren wären mehrere Spitzen zu erwarten.

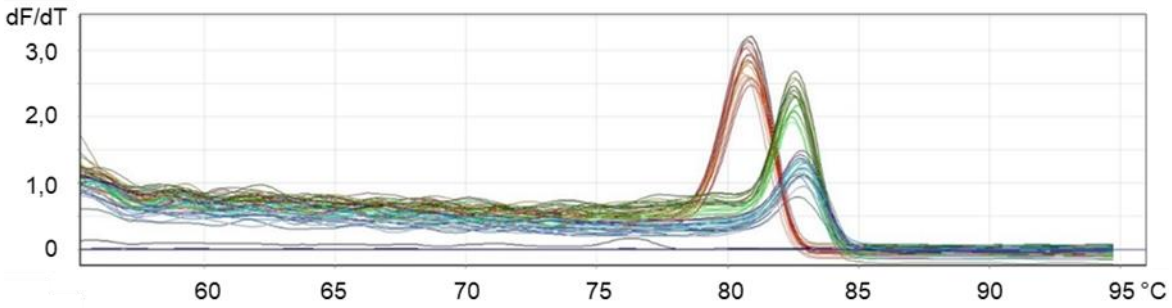


Abbildung 17: Schmelzkurven für Amplifikate aus Transfektionsexperimenten. Exemplarische Darstellung der Schmelzkurven, die im Anschluss an die qPCR mit Extrakten der ersten Transfektion angefertigt wurden. Rot: *GAPDH*-Amplifikate, grün: *β-Actin*-Amplifikate, blau: Wildtyp-*SOCS1*-Amplifikate.

Abbildung 18 zeigt den Nachweis von qPCR-Produkten nach Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Pro Probe lässt sich jeweils eine spezifische Bande entsprechend der zu erwartenden Produktlänge erkennen. Die *β-Actin*-Amplifikate finden sich bei ca. 182 bp (vgl. Abbildung 18a), die Amplifikate der Wildtyp-*SOCS1*-Primer lassen sich bei ca. 104 bp nachweisen (vgl. Abbildung 18b). Für die Proben, in die ausschließlich ein Leervektor eingebracht wurde, lassen sich bei ca. 104 bp ebenfalls Banden darstellen, was am ehesten auf die endogene Wildtyp-*SOCS1*-Expression in HEK 293T Zellen zurückzuführen ist. Dass sich die Banden der einzelnen

Proben ähnlich intensiv darstellen, ist darauf zurückzuführen, dass die qPCR-Amplifikate aus dem saturierten Plateaubereich am Ende der qPCR stammen. Für die Negativkontrollen sind keine Banden zu detektieren. Insgesamt ist davon auszugehen, dass für alle verwendeten Proben spezifische qPCR-Produkte entstanden sind. Für alle weiteren Transfektionen zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.

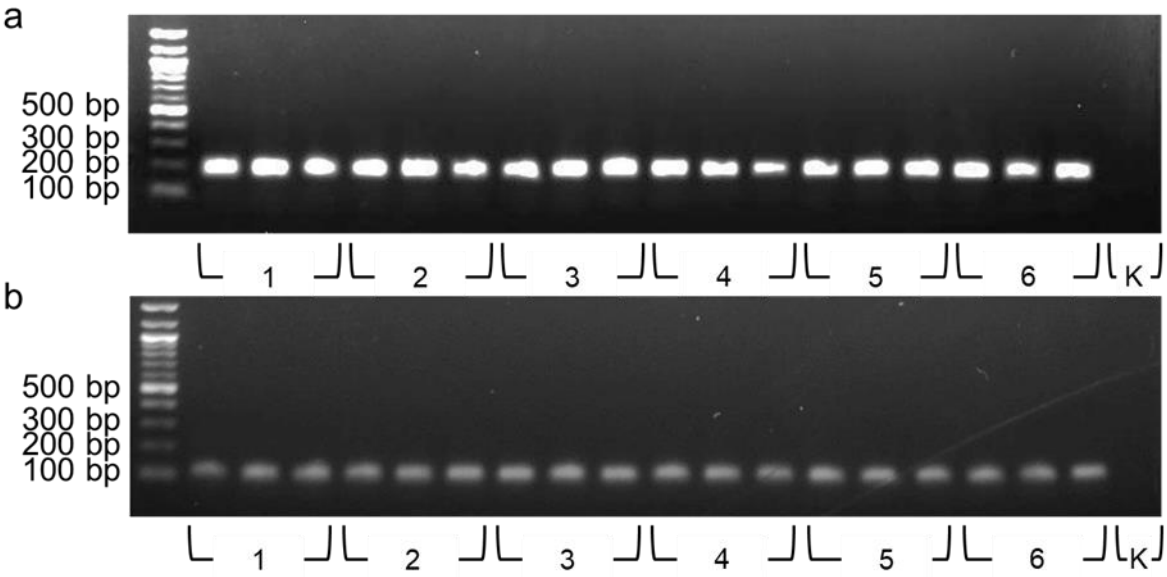


Abbildung 18: Nachweis der qPCR-Produkte der ersten Transfektion nach Auftrennung mittels Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Exemplarisch sind die qPCR-Produkte der ersten Transfektion dargestellt. Für alle drei technischen Replikate der Proben 1 bis 6 (ursprüngliche Transfektionsmengen in 1 : 4 µg, 2 : 2 µg, 3 : 1 µg, 4 : 400 ng, 5 : 100 ng und 6 : 0 ng pro Ansatz) ist jeweils eine spezifische Bande detektierbar. Für die Negativkontrollen (K) sind keine Banden nachweisbar. a: *β-Actin*-Amplifikate bei ca. 182 bp; b: Wildtyp-*SOCS1*-Amplifikate bei ca. 104 bp.

3.1.2 Nachweis von SOCS1-Protein unter Verwendung kommerziell erhältlicher und institutseigener monoklonaler anti-SOCS1-Antikörper

Die angefertigten Western Blots zeigen, dass alle verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper ihr Zielprotein zuverlässig bei einem Molekulargewicht von ca. 24 kDa nachweisen können. Mit absteigender Menge an transfiziertem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor nimmt die Bandenintensität entsprechend ab (vgl. Abbildung 19).

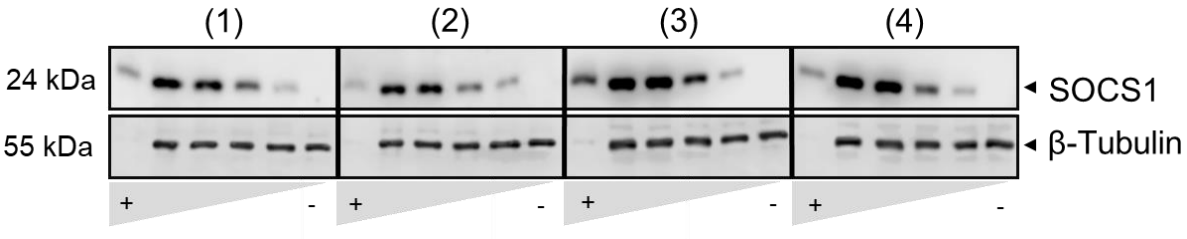


Abbildung 19: SOCS1-Proteinstatus der transient mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*- Expressionsvektors transfizierten HEK 293T Zellen. Die transiente Transfektion der HEK 293T Zellen erfolgte mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-codierenden Expressionsvektors: 4 µg – 2 µg – 1 µg – 400 ng – 100 ng – 0 ng pro Ansatz. Zum SOCS1-Proteinnachweis wurden die folgenden vier monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper verwendet: (1) #424/44/8/13, (2) #424/44/8, (3) #LS-C191491, (4) #S1040-01K. Als Ladekontrolle wurde β Tubulin bei ca. 55 kDa nachgewiesen. Exemplarisch sind die Western Blots der dritten Transfektion dargestellt.

Als Sonderfall ist jeweils die erste Spur der dargestellten Western Blots zu betrachten. Die dort aufgetragenen Proteinextrakte stammen aus den Versuchsansätzen mit der höchsten transfizierten Menge an Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor von 4 µg pro Ansatz. Entgegen der Erwartung fallen die SOCS1-Bandenintensitäten hier ausgesprochen schwach aus. Auch β-Tubulin als Ladekontrolle ist äußerst schwach bis kaum detektierbar, sodass die für diese Proben gemessenen Bandenintensitäten nicht für die nachfolgend dargestellten Quantifizierungen berücksichtigt wurden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass SOCS1 in größeren Mengen auf HEK 293T Zellen stark proliferationshemmend wirkt. Betrachtet man Spur 6 der Western Blots, fällt auf, dass in den aufgetragenen Proben keine Bande für SOCS1 sichtbar ist. In die zugrundeliegenden Transfektionsansätze wurde ausschließlich ein Leervektor eingebracht. Spur 6 spiegelt folglich den physiologischen Zustand von HEK 293T Zellen wider und legt nahe, dass die endogene SOCS1-Proteinexpression stark reguliert vorliegt und nicht ausreicht, um ein sich wesentlich vom Hintergrund abhebendes Bandensignal im Western Blot zu erzeugen. Die für die Spuren 2 bis 6 mit bloßem Auge erkennbare stufenweise Abnahme der SOCS1-Bandenintensitäten lässt sich jeweils objektiv durch Quantifizierung der Bandensignale für die einzelnen verwendeten Antikörper bestätigen. In allen durchgeführten Western Blots verringert sich die nachweisbare Menge an SOCS1-Protein entsprechend der abnehmenden in die Zellen eingebrachten Menge an Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor (vgl. Abbildung 20 und Abbildung 21).

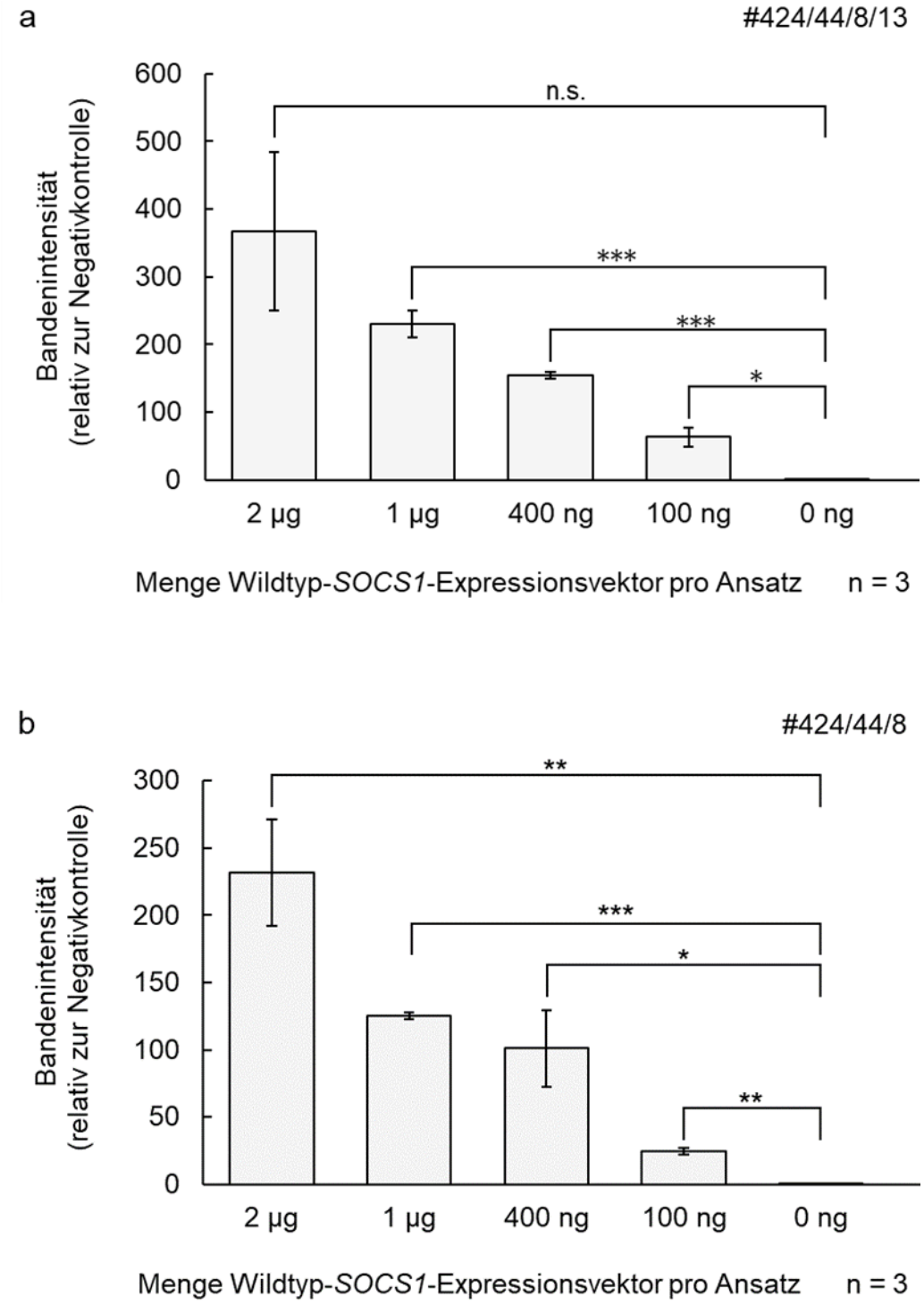


Abbildung 20: Quantifizierung der gemessenen Bandenintensitäten für die transiente Transfektion von HEK 293T Zellen mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors untergliedert nach den verwendeten institutseigenen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörperklonen. a: #424/44/8/13, b: #424/44/8. Die Darstellung der Bandenintensitäten erfolgt relativ zur Negativkontrolle, in die ausschließlich ein Leervektor eingebracht wurde. Die Fehlerbalken geben jeweils den mittleren Standardfehler wieder. n.s.: $p > 0{,}05$; *: $p \leq 0{,}05$; **: $p \leq 0{,}01$; ***: $p \leq 0{,}001$.

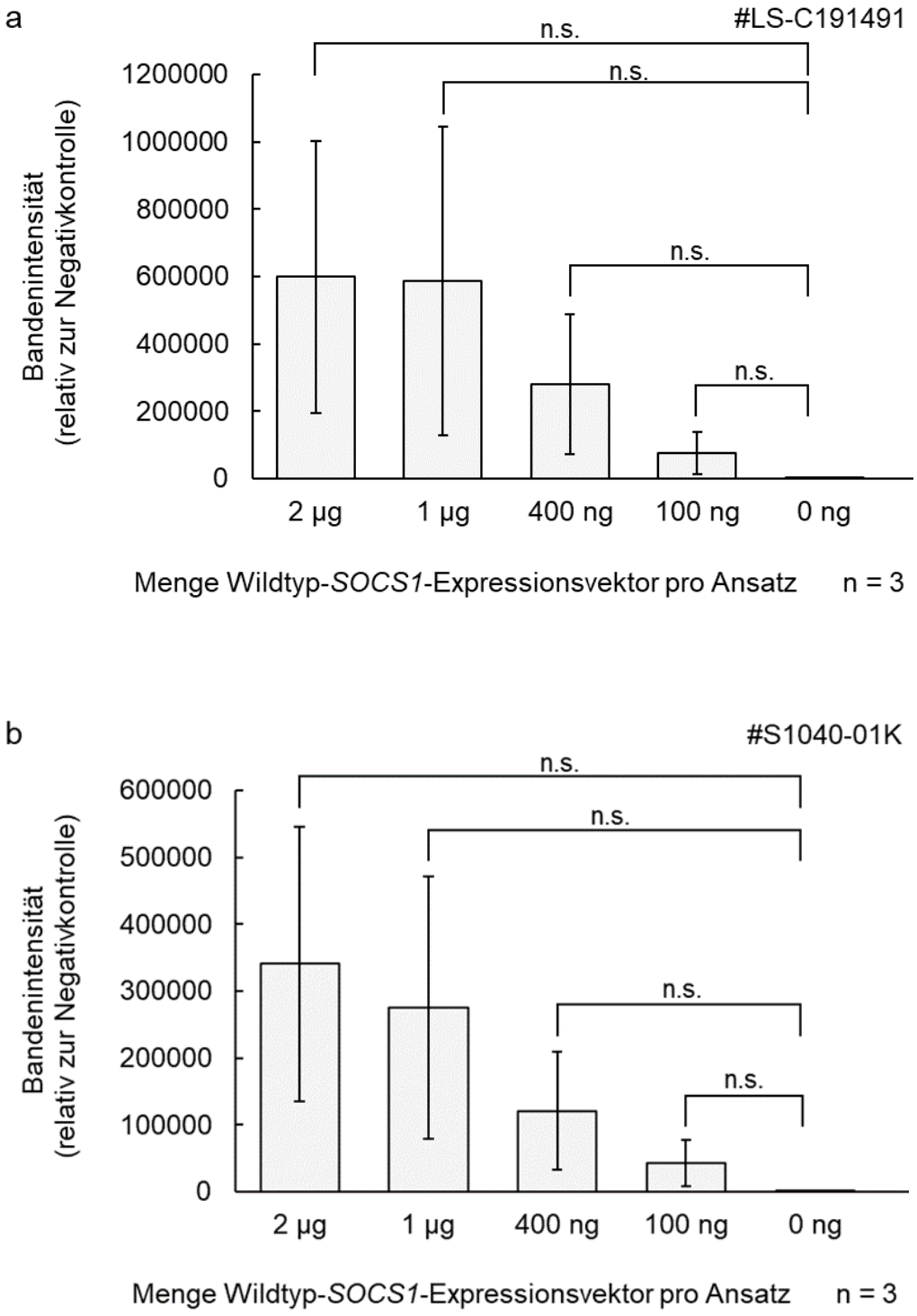


Abbildung 21: Quantifizierung der gemessenen Bandenintensitäten für die transiente Transfektion von HEK 293T Zellen mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors untergliedertnach den verwendeten kommerziellen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörperklonen. a: #LS-C191491, b: #S1040-01K. Die Darstellung der Bandenintensitäten erfolgt relativ zur Negativkontrolle, in die ausschließlich ein Leervektor eingebracht wurde. Die Fehlerbalken geben jeweils den mittleren Standardfehler wieder. n.s.: $p > 0{,}05$; *: $p \leq 0{,}05$; **: $p \leq 0{,}01$; ***: $p \leq 0{,}001$.

Vergleicht man die Ergebnisse der Quantifizierung für die verschiedenen Antikörper (vgl. Abbildung 20 und Abbildung 21) fällt auf, dass es erhebliche Unterschiede in der Größenordnung der relativen Bandenintensitäten gibt, obwohl die gemessenen Werte mit Hilfe der Signalstärken für β-Tubulin normalisiert wurden. So legen die Quantifizierungen nahe, dass die kommerziell erhältlichen anti-SOCS1-Antikörper im Rahmen der Transfektionsexperimente für vergleichbare Mengen SOCS1-Protein deutlich stärkere Bandensignale (ca. $2 \cdot 10^3$-fach) erzeugen als die institutseigenen Klone. Dem gegenüber stehen jedoch ebenfalls deutlich stärkere Schwankungen der Bandensignale und dementsprechend höhere mittlere Standardfehler, die sich bei der Quantifizierung der mittels kommerziell erhältlichen Antikörperklonen durchgeführten Western Blots ergeben (vgl. Abbildung 21a, b). Die institutseigenen Antikörperklone liefern für alle Transfektionsmengen deutlich geringere Standardabweichungen und dadurch insgesamt signifikantere Ergebnisse (vgl. Abbildung 20a, b).

Insgesamt zeigen die Untersuchungen der *SOCS1*-mRNA-Expression und des SOCS1-Proteinstatus in mit einem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor transfizierten HEK 293T Zellen übereinstimmende Ergebnisse: Mit absteigenden Transfektionsmengen nehmen sowohl die Wildtyp-*SOCS1*-mRNA- als auch die Wildtyp-SOCS1-Proteinexpression in den transfizierten Zellen ab. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Transfektionsansätzen fallen auf mRNA-Ebene überwiegend gering aus, wohingegen sie auf Proteinebene deutlicher hervortreten.

In einem nächsten Schritt wurden entsprechende Untersuchungen an weiteren, insbesondere sich von B-Zell-Lymphomen ableitenden Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt 3.2 dargestellt.

3.2 Endogene SOCS1-Expression in weiteren Zelllinien

3.2.1 Analyse der Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in B-Zell-Lymphomzelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie

Die durchgeführten semiquantitativen Echtzeit-PCR-Experimente zeigen ein heterogenes Bild bezüglich der endogenen Wiltyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in den weiteren verwendeten Zelllinien (vgl. Abbildung 22).

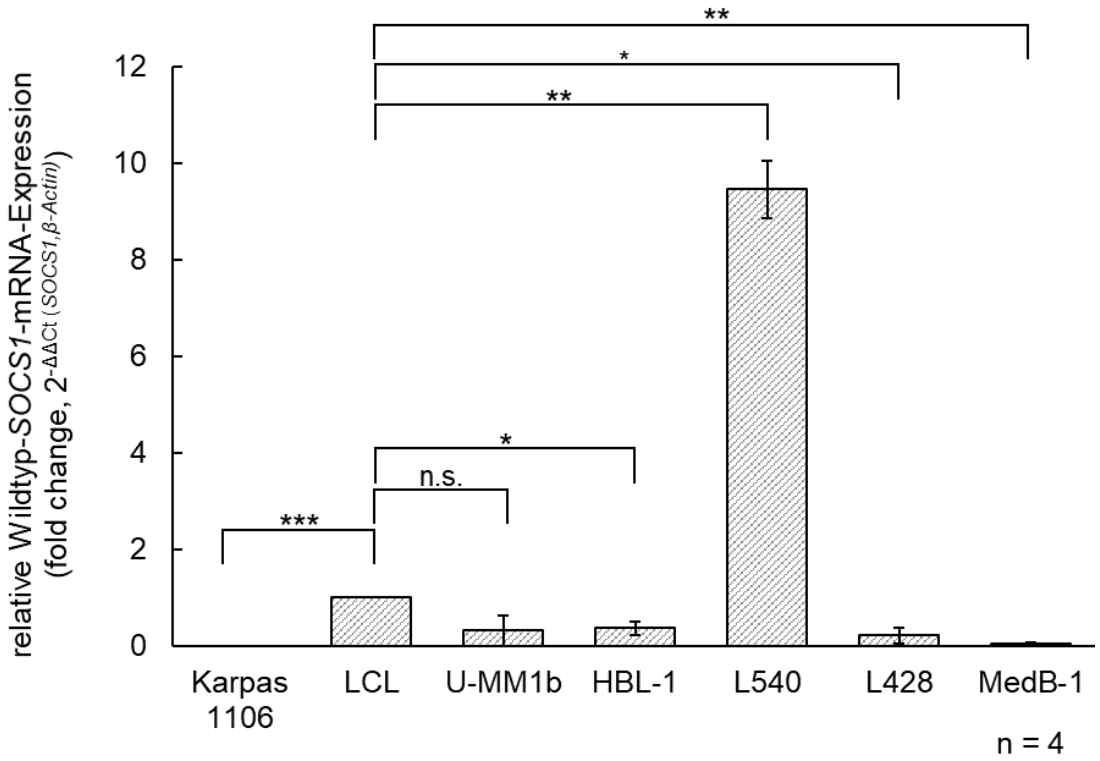


Abbildung 22: Endogene Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in B-Zell-Lymphomzelllinien relativ zur Expression von Wildtyp-*SOCS1*-mRNA einer lymphoblastoiden Zellenlinie (LCL). Die für jede Zelllinie angegebene relative Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression ist als Vielfaches der Expression von Wildtyp-*SOCS1*-mRNA in lymphoblastoiden Zellen dargestellt. Zur Berechnung der ΔΔCt-Werte wurde *β-Actin* als Referenzgen verwendet. Der Nachweis von Wildtyp-*SOCS1* erfolgte über den Primer *SOCS1*-Wildtyp. Die Fehlerbalken entsprechen dem mittleren Standardfehler. n.s.: $p > 0{,}05$; *: $p \leq 0{,}05$; **: $p \leq 0{,}01$; ***: $p \leq 0{,}001$.

Verglichen mit der eingesetzten lymphoblastoiden Zelllinie (LCL) zeigt die L540-Zelllinie mit dem ca. 9,45-Fachen der für die LCL-Zellen gemessenen Werte als einzige Zelllinie eine deutlich höhere relative Wiltyp-*SOCS1*-mRNA-Expression. Alle weiteren verwendeten B-Zell-Lymphomzelllinien weisen im Vergleich zu LCL-Zellen deutlich geringere Wiltyp-*SOCS1*-mRNA-Mengen auf. In Zellen der Linien U-MM1b und HBL-1

lässt sich eine relative Wiltyp-*SOCS1*-mRNA-Expression von 0,32 (U-MM1b) beziehungsweise 0,37 (HBL-1) im Vergleich zu lymphoblastoiden Zellen (LCL mit Referenzwert 1) ermitteln. Die für die Zelllinien L428 und MedB-1 gemessenen Werte fallen mit dem 0,21-Fachen (L428) und 0,05-Fachen (MedB-1) der *SOCS1*-mRNA-Expression in lymphoblastoiden Zellen noch geringer aus. Hervorzuheben ist die Zelllinie Karpas 1106, da diese aufgrund ihrer biallelischen *SOCS1*-Defizienz keinerlei Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression zeigt.

Analog zu den Transfektionsexperimenten lässt sich auch für die weiteren verwendeten Zelllinien über Schmelzkurvenanalysen sowie die gelelektrophoretische Auftrennung der jeweils gebildeten Amplifikate die Spezifität der qPCR-Produkte bestätigen.

Die in Abbildung 23 exemplarisch für die Amplifikate der Zelllinie L540 dargestellten Schmelzkurven zeigen für alle verwendeten Primer sowie eingesetzten cDNA-Proben eindeutige Schmelzkurvenspitzen.

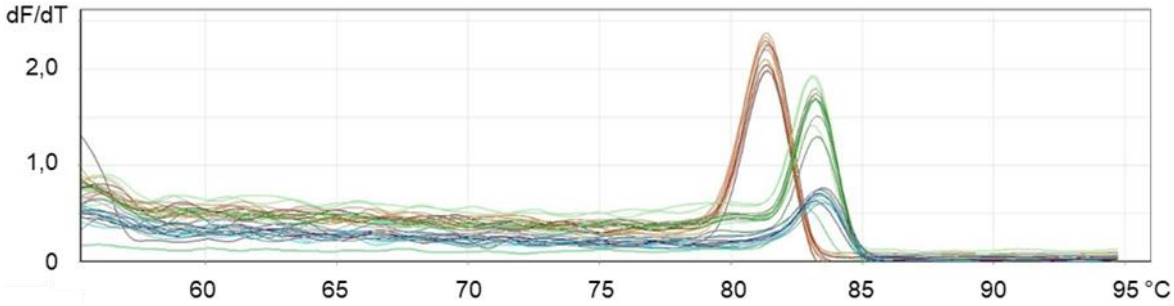


Abbildung 23: Schmelzkurven für Amplifikate der L540-Zelllinie. Exemplarische Darstellung der Schmelzkurven, die nach der qPCR mit Extrakten der Zelllinie L540 erstellt wurden. Rot: *GAPDH*-Amplifikate, grün: *β-Actin*-Amplifikate, blau: Wildtyp-*SOCS1*-Amplifikate.

Auch der in Abbildung 24 exemplarisch für die Zelllinie L540 dargestellte Nachweis der qPCR-Produkte über Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid-Lösung weist auf spezifische qPCR-Produkte hin. Jede aufgetragene Probe mit Ausnahme der Negativkontrollen (K) erzeugt eine spezifische Bande bei der zu erwartenden Produktlänge (*β-Actin*-Amplifikate bei ca. 182 bp, vgl. Abbildung 24a; Wildtyp-*SOCS1*-Amplifikate bei ca. 104 bp, vgl. Abbildung 24b). Die Banden der Wildtyp-*SOCS1*-Amplifikate für das zweite technische Replikat der Probe 1 und das dritte technische Replikat der Probe 4 fallen schwächer aus als in den anderen Proben. Die Negativkontrollen zeigen jeweils keine Banden.

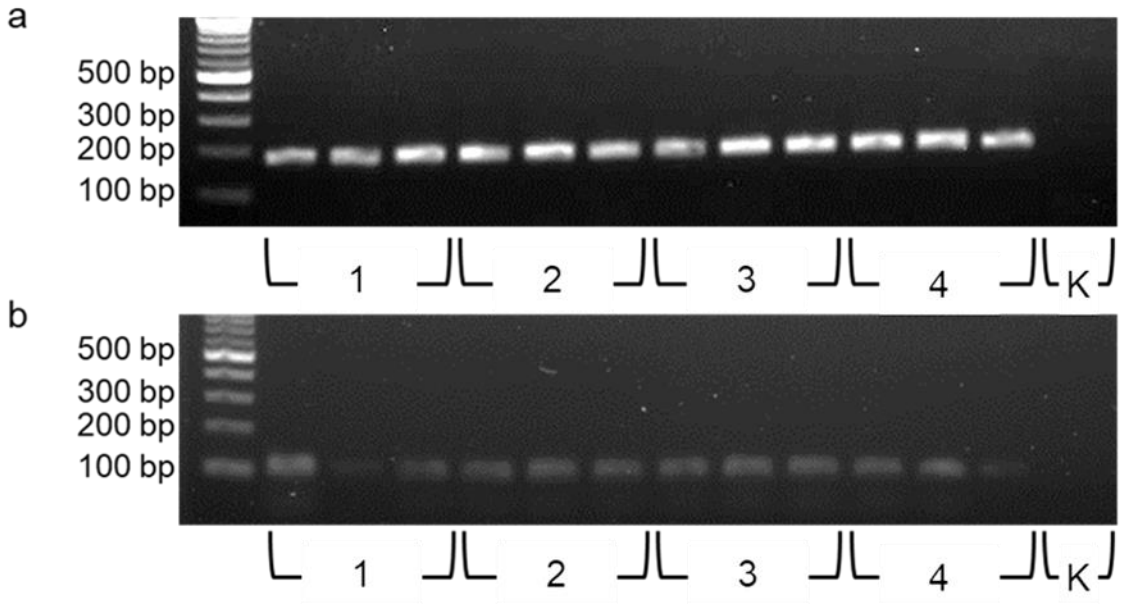


Abbildung 24: Nachweis der qPCR-Produkte für die L540-Zelllinie nach Auftrennung mittels Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Exemplarisch sind die Produkte dargestellt, die bei der qPCR mit Extrakten der Zelllinie L540 gebildet wurden. Pro Extraktion wurden drei technische Replikate eingesetzt. Für alle Replikate der eingesetzten Proben 1 – 4 lassen sich spezifische Banden erkennen. Für die Negativkontrollen (K) sind keine Banden detektierbar. a: *β-Actin*-Amplifikate bei ca. 182 bp, b: Wildtyp-*SOCS1*-Amplifikate bei ca. 104 bp. 1 – 4: Probe 1 – 4.

Eine Beurteilung der Spezifität der qPCR-Produkte wurde analog für alle weiteren verwendeten Zelllinien durchgeführt und es zeigten sich mit den hier dargestellten Schmelzkurven und Agarosegelen übereinstimmende Ergebnisse. Eine Ausnahme stellt die Zelllinie Karpas 1106 dar, für die sich entsprechend der nicht feststellbaren Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression keine *SOCS1*-Amplifikate nachweisen ließen.

3.2.2 Bestimmung des SOCS1-Proteinstatus in B-Zell-Lymphomzelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie

Betrachtet man nun die SOCS1-Proteinexpression in den untersuchten Zelllinien, zeigen sich wider Erwarten lediglich für die Extrakte der HBL-1-Zelllinie Banden im Western Blot. Für alle weiteren Zelllinien lässt sich mit Hilfe der verwendeten kommerziell erhältlichen (#LS-C191491, #S1040-01K) wie institutseigenen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper (#424/44/8/13, #424/44/8) kein SOCS1-Protein nachweisen (vgl. Abbildung 25).

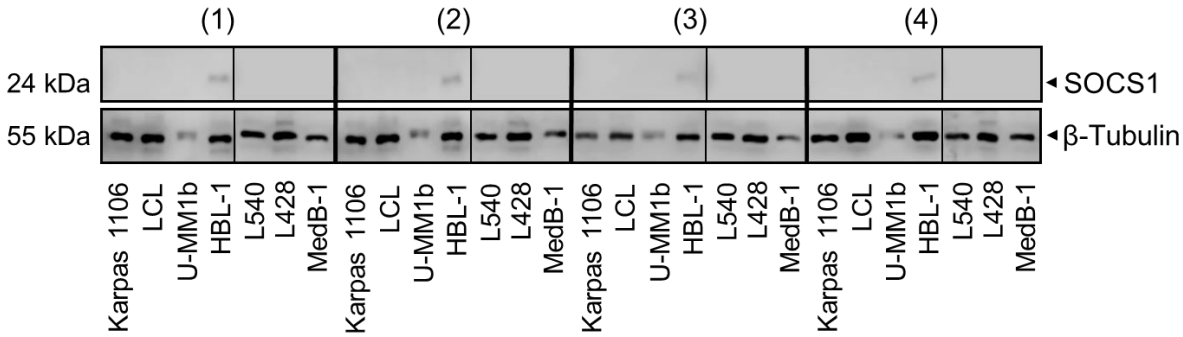


Abbildung 25: SOCS1-Proteinexpression in B-Zell-Lymphomzelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie. Der SOCS1-Proteinnachweis erfolgte durch die folgenden vier monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper: (1) #424/44/8/13, (2) #424/44/8, (3) #LS-C191491, (4) #S1040-01K. Als Ladekontrolle wurde β-Tubulin (ca. 55 kDa) verwendet.

Die Quantifizierung der angefertigten Western Blots führt für alle verwendeten anti-SOCS1-Antikörper somit zu folgendem Bild: Für die durch Extrakte der Zelllinie HBL-1 erzeugten Bandensignale ergeben sich nach Normalisierung mit der Ladekontrolle β-Tubulin jeweils geringe Bandenintensitäten (0,54 bis 0,84). Für alle weiteren Zelllinien-Extrakte sind keine quantifizierbaren SOCS1-Proteinbanden detektierbar (vgl. Abbildung 26). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die verschiedenen anti-SOCS1-Antikörper vergleichbare Ergebnisse liefern. Die normalisierten Bandenintensitäten fallen für die institutseigenen Antikörper (vgl. Abbildung 26a, b) etwas schwächer aus als für die kommerziellen Antikörperklone (vgl. Abbildung 26c, d). Die mittleren Standardfehler liegen im Bereich von 0,08 bis 0,15 und unterscheiden sich für die verwendeten anti-SOCS1-Antikörper in diesem Fall nur geringfügig.

Vergleicht man den in den untersuchten Zelllinien ermittelten SOCS1-Proteinstatus mit der zugehörigen *SOCS1*-mRNA-Expression, fällt auf, dass insbesondere zwei Zelllinien erhebliche Diskrepanzen aufweisen: HBL-1-Zellen exprimieren vergleichsweise große Mengen an SOCS1-Protein und verhältnismäßig wenig wildtypische *SOCS1*-mRNA, während die L540-Zelllinie eine starke Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression zeigt, jedoch im Western Blot für diese Zelllinie kein SOCS1-Protein nachzuweisen ist.

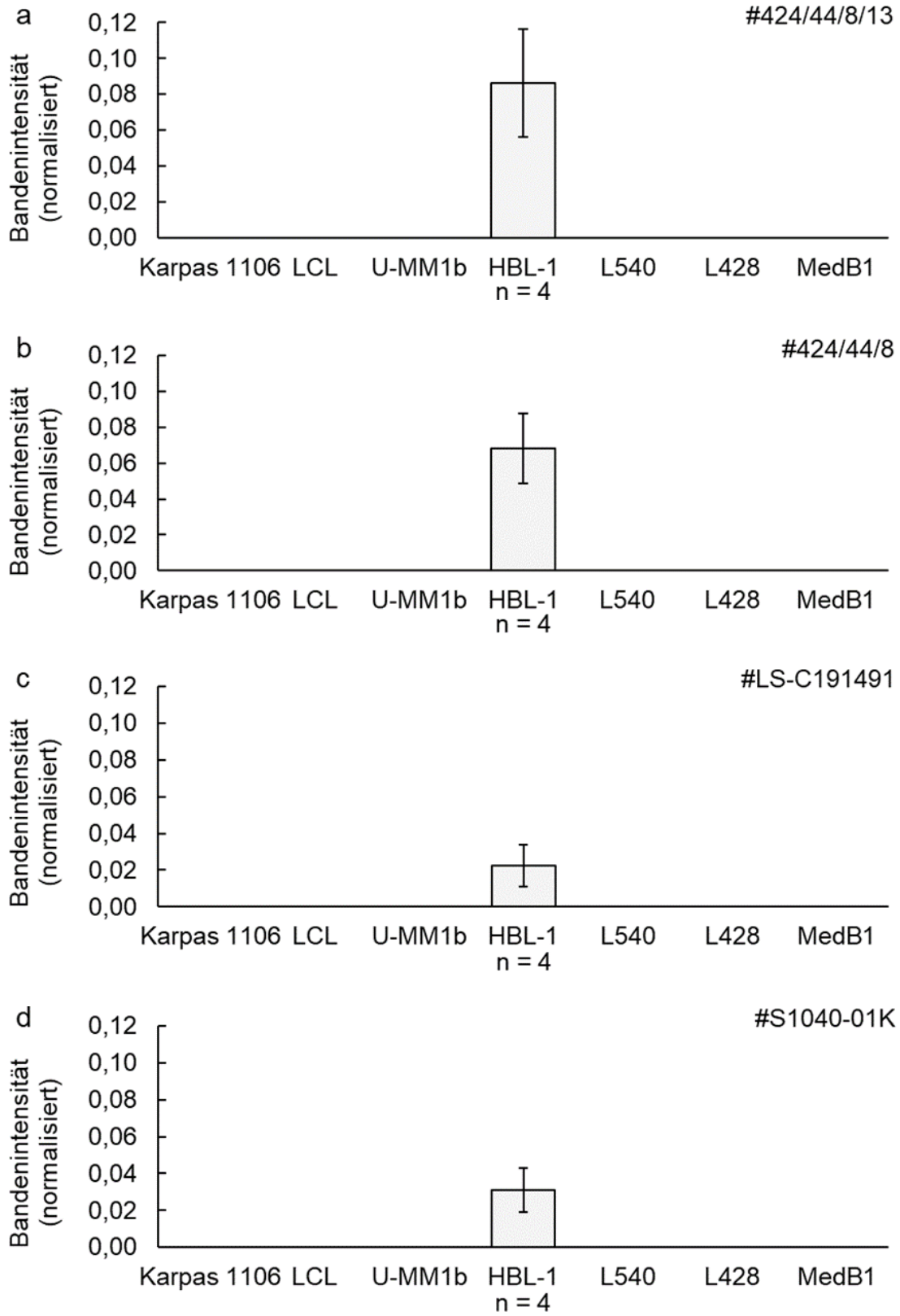


Abbildung 26: Quantifizierung der detektierbaren Bandenintensitäten für die verschiedenen B-Zell-Lymphomzelllinien und eine lymphoblastoide Zelllinie untergliedert nach verwendeten anti-SOCS1-Antikörperklonen. a: #424/44/8/13, b: #424/44/8, c: #LS-C191491, d: #S1040-01K. Die Intensitäten der SOCS1-Proteinbanden wurden mit Hilfe der jeweiligen Ladekontrollen normalisiert. Die Fehlerbalken stellen den mittleren Standardfehler dar.

3.2.3 Nachweis der für die Zelllinie L428 beschriebenen *SOCS1*-Mutationen auf mRNA-Ebene durch mutationsspezifische semiquantitative Echtzeit-PCR

Wie im Methodenteil beschrieben (vgl. Abschnitt 2.15.3) wurden für die Zelllinie L428 mutationsspezifische qPCR-Experimente unter Verwendung hierzu designter mutationsspezifischer Primer durchgeführt. Hierdurch war es möglich zu untersuchen, inwiefern die auf DNA-Ebene für die Zelllinie L428 beschriebenen *SOCS1*-Mutationen auf mRNA-Ebene exprimiert werden.

Die Auswertungen kommen zu dem Ergebnis, dass sowohl die für diese Zelllinie beschriebene Frameshift-Mutation (c.349_359del11) als auch die In-frame-Deletion (c.393_407del15) auf mRNA-Ebene exprimiert werden und durch die designten Primer nachgewiesen werden können (vgl. Abbildung 27 L428/1 mut zum Nachweis der Frameshift-Mutation, L428/2 mut zum Nachweis der In-frame-Deletion). Mit einem ΔCt-Wert von 8,66 wird die Frameshift-Mutation in den untersuchten Proben etwas stärker exprimiert als die beschriebene In-frame-Deletion (ΔCt-Wert 9,08).

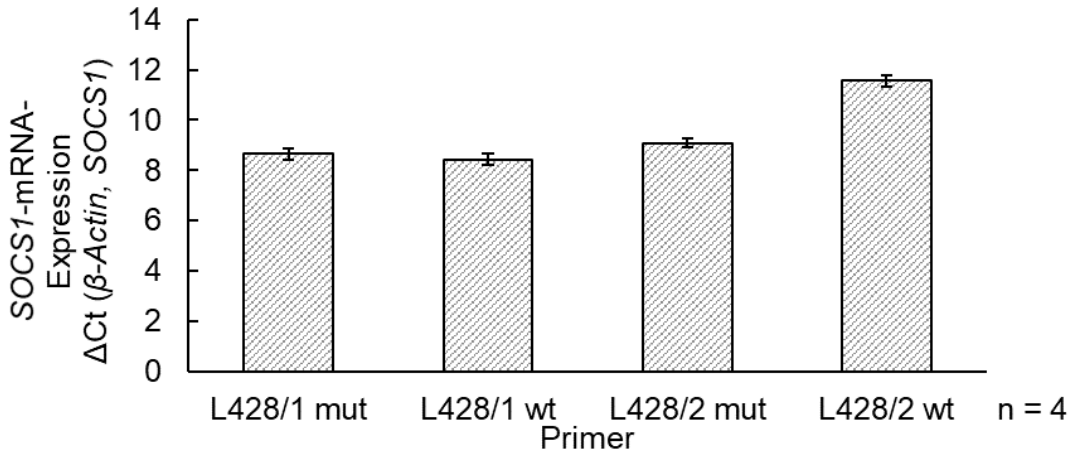


Abbildung 27: Quantifizierung der *SOCS1*-mRNA-Expression in L428-Zellen mittels zum Nachweis der jeweiligen Mutation respektive Wildtyp designten Primer. Dargestellt sind ΔCt-Werte, die aus den Ct-Werten für *β-Actin* und die unterschiedlichen *SOCS1*-Primer berechnet wurden. L428/1 mut: Nachweis der publizierten Frameshift-Mutation (c.349_359del11) auf mRNA-Ebene, L428/2 mut: Nachweis der publizierten In-frame-Deletion (c.393_407del15) auf mRNA-Ebene, L428/1 wt: Nachweis von *SOCS1*-Wildtyp; der entsprechende Primer wurde so designt, dass er hybridisieren kann, sofern *SOCS1* im Bereich der bekannten Frameshift-Mutation wildtypisch exprimiert wird, L428/2 wt: Nachweis von *SOCS1*-Wildtyp; der entsprechende Primer wurde so designt, dass er hybridisieren kann, sofern *SOCS1* im Bereich der bekannten In-frame-Deletion wildtypisch exprimiert wird. Die Fehlerbalken geben den mittleren Standardfehler wieder. Details zum Primer-Design finden sich im Abschnitt 2.15.3.

Die mittels mutationsspezifischen Primerkombinationen erhaltenen Ergebnisse zeigen zudem, dass die untersuchten Sequenzabschnitte nicht ausschließlich in mutierter Form vorliegen. So lässt sich durch den Primer L428/1 wt im untersuchten Sequenzabschnitt der beschriebenen Frameshift-Mutation eine wildtypische *SOCS1*-mRNA-Expression nachweisen, Gleiches gilt für den Primer L428/2 wt im Fall der bekannten In-frame-Deletion (vgl. Abbildung 27 L428/1 wt und L428/2 wt).
Die in Abbildung 28 dargestellten Schmelzkurven für Amplifikate der Zelllinie L428 zeigen für alle eingesetzten Proben eine eindeutige Schmelzkurvenspitze.

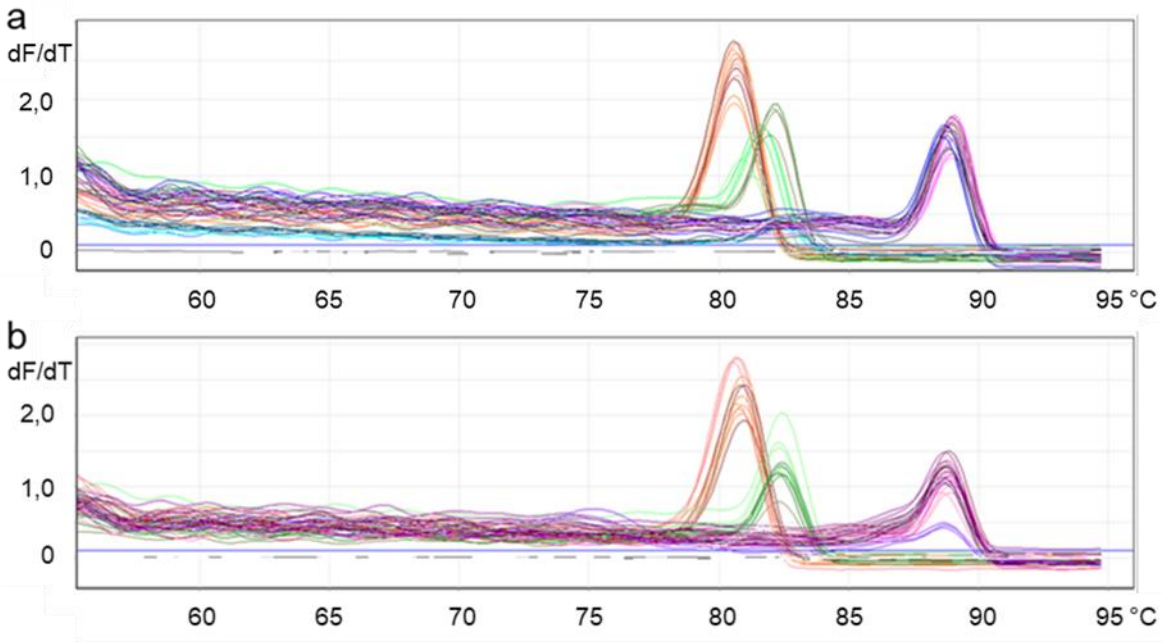


Abbildung 28: Schmelzkurven für Amplifikate der Zelllinie L428 unter Verwendung mutationsspezifischer Primer. a: Rot: *GAPDH*-Amplifikate, grün: *β-Actin*-Amplifikate, magenta: *SOCS1*-Amplifikate (L428/1 mut), dunkelviolett: *SOCS1*-Amplifikate (L428/1 wt). b: Rot: *GAPDH*-Amplifikate, grün: *β-Actin*-Amplifikate, magenta: *SOCS1*-Amplifikate (L428/2 mut), violett: *SOCS1*-Amplifikate (L428/2 wt).

Auch die auf Agarosegele aufgetragenen und anschließend aufgetrennten Proben sprechen dafür, dass für alle Primer spezifische qPCR-Produkte gebildet wurden. Pro Probe ist jeweils eine Bande bei der zu erwartenden Produktlänge erkennbar (vgl. Abbildung 29). Die *SOCS1*-Amplifikate mit für die L428-Zelllinie beschriebener Frameshift-Mutation finden sich bei ca. 194 bp (vgl. Abbildung 29b), jene mit der für diese Zelllinie beschriebene In-frame-Deletion bei ca. 238 bp (vgl. Abbildung 29d). Die *SOCS1*-Amplifikate der Primer L428/1 wt und L428/2 wt lassen sich bei ca. 197 bp beziehungsweise bei ca. 241 bp nachweisen (vgl. Abbildung 29c, e).

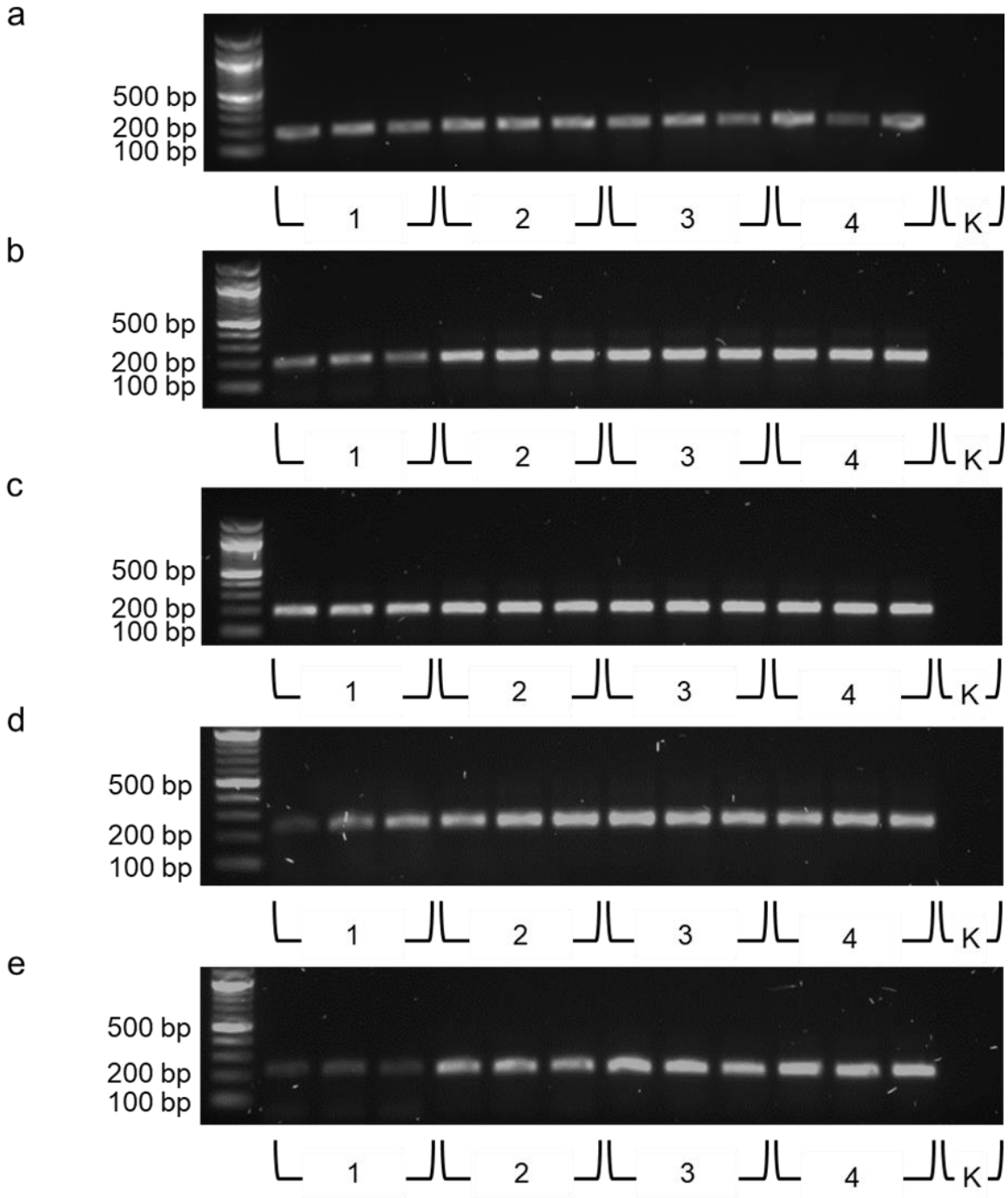


Abbildung 29: Nachweis der qPCR-Produkte für die L428-Zelllinie nach Auftrennung mittels Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Für alle aufgetragenen Proben 1 – 4 lassen sich spezifische Banden erkennen. Für die Negativkontrollen (K) sind keine Banden detektierbar a: *β-Actin*-Amplifikate bei ca. 182 bp, b: *SOCS1*-Amplifikate mit Frameshift-Mutation (L428/1 mut) bei ca. 194 bp, c: *SOCS1*-Amplifikate (L428/1 wt) bei ca. 197 bp, d: *SOCS1*-Amplifikate mit In-frame-Deletion (L428/2 mut) bei ca. 238 bp, e: *SOCS1*-Amplifikate (L428/2 wt) bei ca. 241 bp.

3.3 Spezifität institutseigener und kommerziell erhältlicher monoklonaler anti-SOCS1-Antikörper

3.3.1 Nachweis unspezifischer Proteinbanden mittels kommerzieller anti-SOCS1-Antikörper

Betrachtet man die zur Untersuchung der SOCS1-Proteinexpression angefertigten Western Blots unter dem Gesichtspunkt der Antikörperspezifität, fällt auf, dass sich mit den verwendeten kommerziellen anti-SOCS1-Antikörpern #LS-C191491 und #S1040-01K zusätzlich zur SOCS1-Bande regelmäßig eine weitere Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa detektieren lässt. Dies ist sowohl bei Western Blots der Fall, die mit Proteinextrakten aus transfizierten HEK 293T Zellen durchgeführt wurden (vgl. Abbildung 30 (3), (4)), als auch bei Blots, bei denen Proteinextrakte aus den weiteren untersuchten Zelllinien eingesetzt wurden (vgl. Abbildung 31 (3), (4)). Western Blots, die mit den institutseigenen Antikörperklonen inkubiert wurden, weisen hingegen in keinem Fall eine zusätzliche unspezifische Bande auf (vgl. Abbildung 30, Abbildung 31 jeweils (1), (2)).

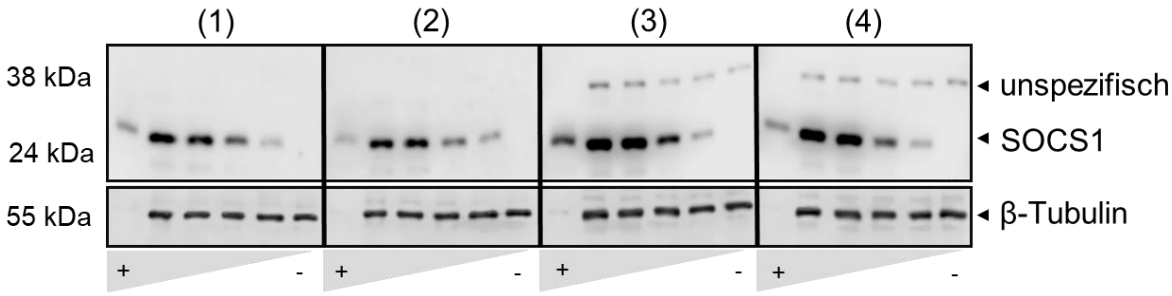


Abbildung 30: Nachweis einer unspezifischen Bande im Western Blot bei Verwendung kommerzieller anti-SOCS1-Antikörper (Proteinextrakte aus transient transfizierten HEK 293T Zellen). Zusätzlich zum SOCS1-Protein binden die verwendeten kommerziellen anti-SOCS1-Antikörper an ein unbekanntes Protein, das bei einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa im Western Blot detektiert wird (3), (4). Eine entsprechende unspezifische Bande ist in Western Blots, die mit den institutseigenen Klonen inkubiert wurden, nicht vorhanden (1), (2). β-Tubulin wurde bei ca. 55 kDa als Ladekontrolle nachgewiesen. Exemplarisch sind die Western Blots der dritten Transfektion von HEK 293T Zellen dargestellt. Menge an transfiziertem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor: 4 µg – 2 µg – 1 µg – 400 ng – 100 ng – 0 ng pro Ansatz. (1) #424/44/8/13, (2) #424/44/8, (3) #LS-C191491, (4) #S1040-01K.

Bei Betrachtung der Western Blots, die mit Proteinextrakten aus transient mit einem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor transfizierten HEK 293T Zellen angefertigt wurden, fällt auf, dass die 38 kDa-Banden mit abnehmender Menge des transfizierten Wildtyp-

SOCS1-Expressionsvektors im Gegensatz zu den durch SOCS1 hervorgerufenen Banden keine deutlich abnehmende Dynamik der Bandenintensität zeigen. Vielmehr erscheinen die Banden bei 38 kDa in Spur 2 bis 6 der entsprechenden Blots überwiegend gleichmäßig intensiv, was insgesamt an die Ladekontrolle erinnert (vgl. Abbildung 30 (3), (4)).

Betrachtet man die Western Blots, die mit Proteinextrakten aus sich von B-Zell-Lymphomen ableitenden Zelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie durchgeführt wurden, fällt auf, dass nicht in allen Spuren eine unspezifische Bande zu finden ist (vgl. Abbildung 31 (3), (4)). Für die Zelllinien U-MM1b und MedB-1 scheint keine unspezifische Bande nachweisbar zu sein, was sich mit weiteren angefertigten und hier nicht dargestellten Western Blots deckt. Hervorzuheben ist auch, dass sich für Extrakte der biallelisch *SOCS1*-defizienten Zelllinie Karpas 1106 analog zu Abbildung 31 (3), (4) auf allen mit den kommerziellen Antikörperklonen inkubierten Western Blots eine unspezifische Bande detektieren ließ.

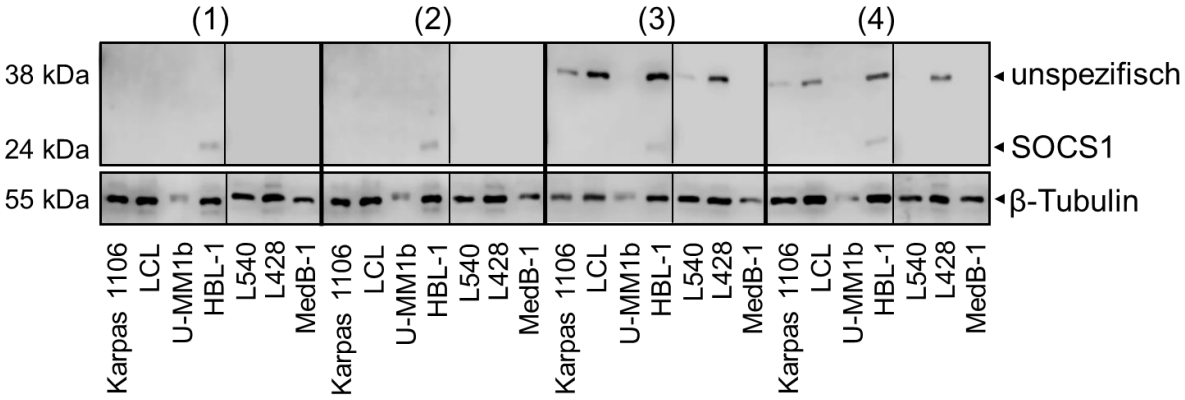


Abbildung 31: Nachweis einer unspezifischen Bande im Western Blot bei Verwendung kommerzieller anti-SOCS1-Antikörper (Proteinextrakte aus B-Zell-Lymphomzelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie). Auch hier lässt sich für die kommerziellen Antikörper eine unspezifische Bande bei ca. 38 kDa detektieren (3), (4). Die institutseigenen Klone erkennen hingegen ausschließlich SOCS1-Protein. Als Ladekontrolle wurde β-Tubulin nachgewiesen. (1) #424/44/8/13, (2) #424/44/8, (3) #LS-C191491, (4) #S1040-01K.

3.3.2 Versuch der Proteinanreicherung mittels Immunpräzipitation

Um zu untersuchen, welches Protein durch die kommerziellen Antikörperklone bei ca. 38 kDa zusätzlich erkannt wird, wurde versucht das entsprechende Protein durch Immunpräzipitation anzureichern. Die Versuchsplanung und Probenverteilung sind Abschnitt 2.17 zu entnehmen.

Im Rahmen der durchgeführten Immunpräzipitationsexperimente unter Verwendung von Protein G-Sepharose-Partikeln ist es nicht gelungen, das mittels kommerzieller Antikörper im Western Blot detektierbare 38 kDa-Protein nachzuweisen (vgl. Abbildung 32). Im dargestellten Coomassie-gefärbten Gel lassen sich nach Proteinseparierung durch SDS-PAGE mehrere Banden erkennen. Diese repräsentieren die zu erwartenden Antikörper-Banden durch leichte Ketten bei ca. 25 kDa und schwere Ketten bei ca. 50 kDa sowie zahlreiche weitere unspezifische Banden. Die zu untersuchende 38 kDa-Bande stellt sich nach Immunpräzipitation nicht dar, sodass weiterführende Schritte zur Proteinidentifizierung auf diese Weise nicht möglich erscheinen.

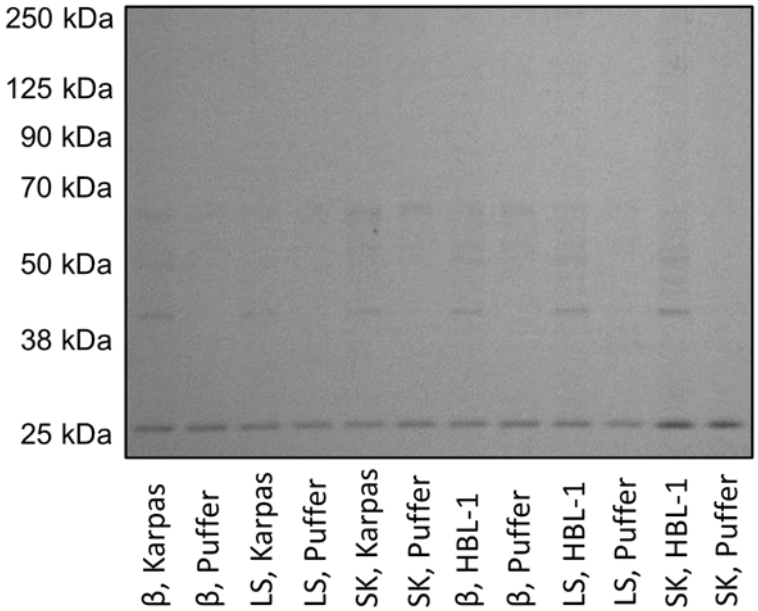


Abbildung 32: Exemplarische Ergebnisdarstellung der Immunpräzipitationsexperimente unter Verwendung kommerzieller Antikörperklone. Coomassie-gefärbtes Gel nach Proteinseparierung mittels SDS-PAGE. Für die Präzipitationsexperimente wurden die kommerziellen Antikörperklone #LS-C191491 und #S1040-01K als spezifische Antikörper sowie ein anti-β-Tubulin-Antikörper als unspezifischer Kontrollantikörper verwendet. Die eingesetzten Proteinextrakte stammten aus den Zelllinien Karpas 1106 und HBL-1. Als Kontrolle wurden Ansätze mit TNT^{++}-Puffer statt Proteinextrakt für alle Antikörper mitgeführt. Für jede Probe mit Proteinextrakt wurden 600 µg Protein eingesetzt. Karpas: Proteinextrakte der Zelllinie Karpas 1106, HBL-1: Proteinextrakte der Zelllinie HBL-1, Puffer: Kontrollansatz mit TNT^{++}-Puffer, β: anti-β-Tubulin-Antikörper, LS: #LS-C191491, S: # S1040-01K. Darstellung in Grautönen.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der Transfektionsexperimente an HEK 293T Zellen konnte mit abnehmender Menge des eingebrachten Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors sowohl eine abnehmende *SOCS1*-mRNA-Expression als auch eine stufenweise Abnahme der SOCS1-Proteinexpression beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Transfektionsansätzen stellten sich auf Proteinebene deutlich dar, während diese auf mRNA-Ebene überwiegend schwach hervortraten.

Weitere Untersuchungen an sich von B-Zell-Lymphomen ableitenden Zelllinien und einer lymphoblastoiden Zelllinie konnten Diskrepanzen zwischen der *SOCS1*-mRNA-Expression und dem SOCS1-Proteinstatus in zwei Zelllinien aufzeigen. Hierbei handelt es sich um die DLBCL-Zelllinie HBL-1 und die NSCHL-Zelllinie L540.

Als weiteres wesentliches Ergebnis bestätigen die durchgeführten Versuche, dass mit allen verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörpern ein vergleichbar zuverlässiger SOCS1-Nachweis im Western Blot gelingt. Western Blots, die mit kommerziellen anti-SOCS1-Antikörpern inkubiert wurden, zeigten regelmäßig eine zusätzliche Bande bei 38 kDa. Unter der Annahme, dass die 38 kDa-Bande nicht durch eine modifizierte Form von SOCS1 hervorgerufen wurde, stellten sich die kommerziellen Antikörperklone in den durchgeführten Western Blot-Experimenten insgesamt als unspezifisch heraus. Die institutseigenen Antikörperklone konnten hingegen in allen durchgeführten Experimenten zuverlässig und spezifisch ihr Zielprotein SOCS1 nachweisen.

Die beiden wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit können somit anhand der vorliegenden Ergebnisse beantwortet werden. Alle noch unbeantworteten Fragen der eingangs formulierten Zielsetzung werden nachfolgend in der Diskussion thematisiert werden.

4 Diskussion

4.1 Die hemmende Wirkung von SOCS1 auf die Zellproliferation

SOCS1 nimmt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der JAK-STAT-Signaltransduktion ein und kann somit grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellüberleben, Differenzierung und die Immunantwort beeinflussen. Eine überschießende Signaltransduktion ist entsprechend mit einer gesteigerten Proliferation verbunden und kann die Genese sowie Progression neoplastischer Erkrankungen bedingen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass *SOCS1* einerseits die Funktion eines Tumorsuppressorgens ausübt [148, 190, 242, 246, 297, 316, 383], andererseits jedoch auch eine onkogene Wirkung [183, 269, 346] besitzt. Melzner et al. konnten nach ektopischer Expression von Wildtyp-*SOCS1* in MedB-1-Zellen eine deutliche Wachstumshemmung der transfizierten Zellen beobachten [203]. Während die untersuchten MedB-1-Zellen eine physiologische Verdopplungszeit von 24 Stunden aufwiesen, zeigte sich nach Transfektion mit einem Wildtyp-*SOCS1*-Vektor in Proliferationsassays eine Wachstumshemmung mit Verlängerung der Verdopplungszeit auf rund vier Tage [203]. Unter anderem sahen Melzner et al. hierdurch die Bedeutung von SOCS1 als Tumorsuppressor im PMBL begründet [203].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK 293T Zellen transient mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors transfiziert. Hierbei fiel als Nebenaspekt unter dem Gesichtspunkt der Zellproliferation auf, dass sich in Ansätzen mit der höchsten transfizierten Menge des Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors von 4 µg pro Ansatz eine vergleichsweise geringe Anzahl vitaler transfizierter HEK 293T Zellen befand. Dieser Sachverhalt spiegelte sich unter anderem in den dargestellten Western Blots mit schwachen Bandenintensitäten für SOCS1 und β-Tubulin infolge geringer Proteinkonzentration in den betreffenden Extrakten wider. Wie im Material- und Methodenteil beschrieben, wurde für die einzelnen Transfektionsansätze initial eine vergleichbare Anzahl von ca. 10^4 HEK 293T Zellen pro Ansatz ausgesät. Um vergleichbare Bedingungen herzustellen, wurde zudem für jeden Ansatz eine Plasmidgesamtmenge von 4 µg (Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor pFLAG-SOCS1(wt), Leervektor pFLAG-CMV2) verwendet und mit den entsprechenden Proben wurde jeweils gleichartig weiterverfahren. Das standardisierte Vorgehen, die Reproduzierbarkeit des Effekts und das selektive Auftreten in Proben mit hoher

transfizierter Menge des Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors (4 µg) deuten insgesamt darauf hin, dass eine starke ektopische Wildtyp-*SOCS1*-Expression das Überleben und die Proliferation der HEK 293T Zellen beeinträchtigen und auf diese zytotoxisch wirken können. Dieser Erklärungsansatz steht im Einklang mit dem durch Melzner et al. 2005 beschriebenen wachstumshemmenden Effekt der ektopischen Wildtyp-*SOCS1*-Expression auf MedB-1-Zellen [203] und den bekannten physiologischen Funktionen von SOCS1 bei der Regulierung von Signaltransduktion und Zellzyklus [44, 242, 383]. Eine detailliertere Untersuchung des hemmenden Effekts hoher transfizierter Mengen des Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors auf HEK 293T Zellen erfolgte im Rahmen meiner Arbeit nicht, prinzipiell wäre hierzu analog zum Vorgehen von Melzner et al. [203] die Durchführung eines Proliferationsassays denkbar.

4.2 Die Regulierung der SOCS1-Expression auf mRNA-Ebene

Um die physiologische Zellfunktion aufrechtzuerhalten, ist SOCS1 innerhalb der Zelle in einem engen Bereich reguliert. Hierbei stellen Translation, Transkription und die Proteinstabilität wichtige Regulierungspunkte dar [104, 151, 306]. Gegenstand zahlreicher Publikationen ist die Beeinflussung der SOCS1-Expression durch microRNAs (miR) in malignen Tumoren [133, 141] sowie in entzündlichen und allergischen Erkrankungen [244, 255]. MicroRNAs sind kurze, nichtcodierende RNA-Moleküle, die durch Interaktion mit spezifischen Bindestellen in der 3‘-nichttranslatierten Region der Zielgen-mRNA die Genexpression regulieren können. Wesentliche Mechanismen umfassen die Destabilisierung der mRNA und die Hemmung der Translation durch eine verminderte Initiation oder eine vorzeitige Termination [106]. Die SOCS1-Expression kann beispielsweise über Bindung der microRNAs miR-155 und miR-122 an definierte Bereiche der 3‘-nichttranslatierten Region der *SOCS1*-mRNA gehemmt werden [133, 141, 244, 255, 380].

In den durchgeführten Arbeiten wurde neben dem SOCS1-Proteinstatus die Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression in den transfizierten HEK 293T Zellen gemessen. Dies erfolgte über semiquantitative Echtzeit-PCR. Hierbei fiel auf, dass sich Unterschiede der Expression in den transfizierten HEK 293T Zellen auf mRNA-Ebene – auch im Vergleich zur gemessenen endogenen Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression der HEK

293T Zellen – überwiegend gering darstellten. Auf Proteinebene traten die Unterschiede deutlicher hervor.

Die geringen Unterschiede der Wildyp-*SOCS1*-mRNA-Expression könnten darauf hindeuten, dass SOCS1 auf mRNA-Ebene in einem engen Bereich reguliert wird. Dies erscheint in Anbetracht der Konsequenzen, die eine Dysregulation der JAK-STAT-vermittelten Signaltransduktion zur Folge haben kann, plausibel und wird durch bisherige Erkenntnisse hinsichtlich der Regulierung der SOCS1-Expression gestützt. Da sowohl die *SOCS1*-mRNA-Expression als auch die SOCS1-Proteinexpression in den transfizierten HEK 293T Zellen mit absteigender Menge des Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors stufenweise abnahmen, sind diese Ergebnisse durchaus miteinander vereinbar, auch wenn sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen auf Proteinebene deutlicher darstellten. Dass sich als Ausnahme der oben genannten Beobachtung in Ansätzen der höchsten transfizierten Menge des Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors von 4 µg pro Ansatz jeweils eine starke Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression messen ließ, könnte mit der hohen Menge an eingebrachtem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsplasmid sowie mit den mRNA-Abbaumechanismen und -kapazitäten der transfizierten HEK 293T Zellen zusammenhängen. Eine Identifizierung der Ursachen und Bestimmung der relevanten Regulationsmechanismen sind durch die vorliegenden Ergebnisse und durchgeführten Experimente nicht möglich.

Als Ursache der überwiegend geringen Unterschiede auf mRNA-Ebene käme aus methodischer Sicht auch ein unspezifischer Nachweis des Zielgens durch die verwendeten Primer in Betracht. Vor dem Hintergrund, dass die zugehörigen Schmelzkurven eindeutige Spitzen zeigten und sich auch nach Auftrennung der qPCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese pro Probe jeweils eine einzelne Bande bei der erwarteten Produktlänge nachweisen ließ, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Die Tatsache, dass sich die Banden im Agarosegel unabhängig von der verwendeten Menge des Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors ähnlich intensiv darstellten, ist am ehesten dadurch zu erklären, dass die aufgetragenen Proben aus dem saturierten Plateaubereich am Ende der qPCR stammten. Insgesamt ist davon auszugehen, dass in den durchgeführten qPCR-Experimenten die Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression akkurat erfasst wurde, eine zusätzliche Sequenzierung der qPCR-Produkte hätte dies jedoch eindeutig belegen können.

4.3 Die *SOCS1*-mRNA- und SOCS1-Proteinexpression in B-Zell-Lymphomzelllinien

SOCS1 ist ein wichtiger Vertreter der SOCS-Familie, der über unterschiedliche Mechanismen die durch Zytokine induzierte und über den JAK-STAT-Signalweg vermittelte Signaltransduktion hemmen kann. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die direkte Interaktion zwischen SOCS1 und JAKs über die SH2- und ESS-Domäne mit Hemmung der Kinaseaktivität durch die KIR-Domäne [184, 235, 243, 381] sowie die Vermittlung der proteasomalen Degradation von Proteinen, die für die Signalweiterleitung essenziell sind, unter anderem über die SOCS Box [20, 64, 88, 149, 151, 152, 218, 351, 391]. Um diesen Aufgaben nachzukommen, ist die regelhafte Expression des *SOCS1*-Gens und eines strukturell und funktionell intakten SOCS1-Proteins entscheidend.

Zahlreiche Studien haben sich mit der Rolle von SOCS1 in soliden Tumorerkrankungen und malignen hämatologischen Neoplasien beschäftigt. Unter anderem konnte in Melanomen [190], multiplen Myelomen [94], myeloischen Leukämien [52, 191], hepatozellulären Karzinomen [383] und Magenkarzinomen [246] eine Herunterregulierung der SOCS1-Expression über eine Veränderung des Methylierungsmusters innerhalb von *SOCS1*-CpG-Inseln beobachtet werden. In der PMBL-Zelllinie Karpas 1106 konnten Melzner et al. biallelisch einen Verlust des gesamten *SOCS1*-Gens feststellen und zeigten, dass es infolge des SOCS1-Verlustes zur andauernden Phosphorylierung von JAK2 mit nachfolgend konstitutiver Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges kommt [204]. Eine Dysregulation der JAK-STAT-Signalgebung kann jedoch bereits durch einzelne Mutationen des *SOCS1*-Gens verursacht werden, sofern diese zu Veränderungen der Aminosäuresequenz des SOCS1-Proteins führen. Studien konnten durch Sequenzierung *SOCS1*-Mutationen beispielsweise in Gewebeproben von Patient(inn)en mit klassischem Hodgkin-Lymphom [147, 180, 344, 367], PMBL [73, 203, 225] und DLBCL [145, 146, 202, 274, 304] nachweisen und – teils unter Zuhilfenahme spezialisierter Software – Aussagen über die mutmaßliche Auswirkung der jeweiligen Mutation auf Proteinebene treffen. Lennerz/Hoffmann et al. gelang es, durch Korrelation des Mutationsstatus mit klinischen Daten den *SOCS1*-Mutationssubtyp als tumorspezifischen prognostischen Biomarker im klassische Hodgkin-Lymphom zu identifizieren [180].

Im Allgemeinen können zahlreiche weitere Faktoren und Vorgänge Einfluss auf die mRNA- und Proteinexpression nehmen, hierzu zählen unter anderem Regulierungsmechanismen im Rahmen von Transkription und Translation, posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen sowie Veränderungen der mRNA- und Proteinstabilität und des mRNA- und Proteinabbaus. Diese spielen bei der physiologischen Regulierung von Gen- und Proteinexpression eine Rolle; Störungen können ebenfalls zur Genese und Progression einer Vielzahl von Erkrankungen beitragen.

Im Hinblick auf die SOCS1-Expression sind unter anderem Regulierungsvorgänge durch microRNAs beschrieben worden [133, 141, 244, 255, 380]. Gregorieff et al. und Schlüter et al. konnten zeigen, dass SOCS1 zudem über eine Unterdrückung der Translation durch die 5‘-nichttranslatierte Region der *SOCS1*-mRNA reguliert wird [104, 306]. Hierbei wird die Initiation der Translation durch das Vorhandensein von zwei zusätzlichen Startkodons in der 5‘-nichttranslatierten Region gehemmt, was mit einer verminderten endogenen SOCS1-Proteinexpression in ruhenden Zellen einhergehen kann [104]. Ausgangspunkt der Untersuchungen von Gregorieff et al. war die Beobachtung, dass sich in Lysaten aus T-Lymphozyten der Maus *SOCS1*-mRNA-Transkripte problemlos nachweisen ließen, während SOCS1-Proteine in Immunpräzipitationsversuchen erst nach Verwendung großer Mengen Proteinextrakt (9 mg) detektierbar waren [104]. Darüber hinaus kann die SOCS1-Expression durch Inhibition und Induktion der Proteolyse reguliert werden. Das mutmaßliche aminoterminal gelegene PEST-Motiv könnte analog zum PEST-Motiv des SOCS3-Proteins eine kürzere Halbwertszeit des SOCS1-Proteins bedingen [17, 18, 69]. Die Interaktion von SOCS1 mit dem Elongin BC-Komplex über die SOCS Box kann hingegen den Proteinabbau hemmen und folglich eine Steigerung der SOCS1- Proteinexpression bewirken [151].

Bislang gibt es wenige Studien, in denen die *SOCS1*-Genexpression und der SOCS1-Proteinstatus in unterschiedlichen B-Zell-Lymphomentitäten systematisch erfasst und diese einander gegenübergestellt wurden.

In der vorliegenden Arbeit habe ich daher ausgewählte, sich von B-Zell-Lymphomen ableitende Zelllinien (Karpas 1106, MedB-1: PMBL, HBL-1: DLBCL, U-MM1b: MM, L540, L428: NSCHL) und eine lymphoblastoide Zelllinie (LCL) hinsichtlich ihrer *SOCS1*-mRNA-Expression und ihres SOCS1-Proteinstatus untersucht. Die biallelisch *SOCS1*-

defiziente Zelllinie Karpas 1106 diente hierbei als Negativkontrolle. Die lymphoblastoide Zelllinie wurde ausgewählt, da sie sich nicht von einem B-Zell-Lymphom ableitet und als Zelllinie EBV-transformierter B-Lymphozyten am ehesten mit aktivierten, physiologisch vorkommenden B-Lymphozyten vergleichbar ist. Um eine ausreichende Reproduzierbarkeit sicherzustellen, wurden alle Extraktionsarbeiten (RNA, TNT^{++}) und nachfolgenden Versuche für jede Zelllinie viermal durchgeführt.

Die extrahierte RNA wurde jeweils mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Letztere wurde anschließend für semiquantitative Echtzeit-PCR-Experimente unter Verwendung von SYBR Green I eingesetzt. Aus methodischer Sicht handelt es sich hierbei um ein weit verbreitetes und äußerst sensitives Verfahren zum Nachweis doppelsträngiger DNA-Moleküle, welches jedoch nicht allzu spezifisch ist. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I kann jegliche doppelsträngige DNA nachweisen, hierzu zählen auch unspezifische Produkte oder Primerdimere. Um die Spezifität der qPCR-Produkte zu überprüfen, wurden im Anschluss an die qPCR-Experimente jeweils die Schmelzkurven ausgewertet und es erfolgten eine Auftrennung der qPCR-Produkte entsprechend ihrer Größe mittels Agarosegel-Elektrophorese sowie eine Visualisierung der entsprechenden Banden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid. Bei jeweils eindeutigen Schmelzkurvenspitzen und dem Nachweis einer einzelnen Bande bei der zu erwartenden Produktlänge war davon auszugehen, dass es sich um spezifische Produkte der jeweiligen Zielgene handelte. Um fehlerhafte Ergebnisse auszuschließen, wäre es an dieser Stelle denkbar gewesen, die jeweiligen Produkte zu sequenzieren. Da die Primereffizienz als weiterer Faktor die Messung der Expression mittels qPCR beeinträchtigen kann, wurde eingangs eine Primereffizienztestung durchgeführt. Die in diesem Versuchsteil verwendeten Primer hatten hierbei alle eine Effizienz zwischen 95,45 und 105,68 % gezeigt, was insgesamt einer guten Primereffizienz entspricht. Zur Ermittlung des Proteinstatus wurden Western Blot-Experimente durchgeführt. Es wurden kommerziell verfügbare monoklone anti-SOCS1-Antikörper, die ein aminoterminal gelegenes Epitop erkennen, und institutseigene monoklonale Antikörper, die ein Epitop im Bereich der SOCS Box am Carboxyterminus des SOCS1-Proteins binden, verwendet. Dass die eingesetzten Antikörper in der Lage sind, ihr Zielprotein SOCS1 nachzuweisen, wurde im Rahmen der Transfektionsexperimente vorab sichergestellt.

Die Zelllinie Karpas 1106 zeigte in den durchgeführten Experimenten sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene keinerlei SOCS1-Expression, was im Einklang mit der von Melzner et al. beschriebenen biallelischen *SOCS1*-Defizienz dieser PMBL-Zelllinie steht [204].

Für die Zelllinien U-MM1b, L428 und MedB-1 konnte eine im Vergleich zu lymphoblastoiden Zellen geringere Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression gemessen werden, im Western Blot war für keine dieser Zelllinien SOCS1-Protein nachweisbar. Diese Ergebnisse könnten Ausdruck einer engen Regulierung der *SOCS1*-mRNA- und der SOCS1-Proteinexpression in diesen Zelllinien sein.
Die über regulatorisch wirksame microRNAs vermittelte Induktion des mRNA-Abbaus mit nachfolgender Hemmung der Translation könnten hierbei eine Rolle spielen. Darüber hinaus erinnern die Ergebnisse an die von Gregorieff et al. [104] beschriebenen Beobachtungen an Lysaten aus T-Lymphozyten der Maus, die Ausgangspunkt der Arbeiten zur translationalen Repression von SOCS1 über zusätzliche Startkodons in der 5‘-nichttranslatierten Region der *SOCS1*-mRNA darstellten. Ein unzureichender Nachweis des SOCS1-Proteins durch die verwendeten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper kann weitgehend ausgeschlossen werden. Dass die verwendeten Antikörper Wildtyp-SOCS1 verlässlich nachweisen können, wurde eingangs durch die Transfektionsexperimente sichergestellt. Zudem ließ sich eine SOCS1-Proteinbande in Extrakten der Zelllinie HBL-1 mit allen verwendeten Antikörpern detektieren. Auch der Nachweis eines veränderten SOCS1-Proteins, wie es entsprechend den für die Zelllinien L428 und MedB-1 auf DNA-Ebene beschriebenen Mutationen zu erwarten wäre, sollte mittels kommerzieller Antikörperklone prinzipiell möglich sein. Eine differenzierte Betrachtung dieses Aspekts unter Berücksichtigung der Immunisierungssequenzen beziehungsweise Epitope der verwendeten anti-SOCS1-Antikörper folgt in einem separaten Abschnitt.
Im Hinblick auf die Zelllinie U-MM1b sollte bedacht werden, dass die Proteinexpression in den angefertigten Western Blots nur eingeschränkt beurteilt werden kann, da vergleichsweise geringe Mengen Proteinextrakt eingesetzt wurden. Dies spiegelt sich in der verhältnismäßig schwachen Bandenintensität der Ladekontrolle für diese Proteinextrakte wider.
Dass sich im Vergleich zur LCL geringe Mengen Wildtyp-*SOCS1*-mRNA auch in der NSCHL-Zelllinie L428 und PMBL-Zelllinie MedB-1 amplifizieren ließen, obwohl für

diese Zelllinien jeweils biallelisch *SOCS1*-Mutationen publiziert wurden [203, 367], könnte in diesem Versuchsteil auf die Wahl der *SOCS1*-Primer zurückzuführen sein. Die Zielsequenzen der Primer liegen außerhalb der beschriebenen Mutationen, eine Amplifizierung sollte unabhängig von den bekannten Mutationen durch diese Primer möglich sein, sofern die jeweiligen Mutationen die mRNA-Stabilität in den betreffenden Zelllinien nicht beeinträchtigen.

Für zwei Zelllinien ergab die Gegenüberstellung von *SOCS1*-mRNA- und SOCS1-Proteinexpression erhebliche Diskrepanzen: HBL-1-Zellen exprimierten vergleichsweise große Mengen an SOCS1-Protein und verhältnismäßig wenig wildtypische *SOCS1*-mRNA. Die L540-Zelllinie wies hingegen eine starke Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression auf, eine SOCS1-Proteinbande ließ sich im Western Blot für Extrakte dieser Zelllinie jedoch nicht nachweisen. Diese Ergebnisse legen eine dysregulierte SOCS1-Expression in diesen Zelllinien nahe, eine eindeutige Aussage hinsichtlich der Ursachen kann anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht getroffen werden. Im Folgenden sollen mögliche Erklärungsansätze diskutiert, potenzielle Ursachen eingegrenzt und Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen genannt werden.

Im Hinblick auf die DLBCL-Zelllinie HBL-1 kommt eine Akkumulation des SOCS1-Proteins beispielsweise durch eine erhöhte Proteinstabilität respektive einen verminderten Proteinabbau als Ursache der beobachteten Diskrepanz in Betracht. Dass sich eine den Ziellinien LCL und U-MM1b ähnliche *SOCS1*-mRNA-Expression zeigte, könnte ein Hinweis auf intakte Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene sein. Der ausschließliche Nachweis von SOCS1-Protein in Proteinextrakten der HBL-1-Zelllinie spricht für eine vergleichsweise hohe Menge an endogenem SOCS1-Protein in HBL-1-Zellen und könnte auf eine Akkumulation des SOCS1-Proteins hindeuten. Die Ursachen für Letzteres sind vielfältig. In Frage kommen unter anderem eine erhöhte Proteinstabilität beispielsweise durch Assoziation mit stabilisierenden Faktoren, ein verminderter Proteinabbau durch Störungen des Ubiquitinierungsprozesses oder der proteasomalen Degradation oder eine verlängerte Halbwertszeit zum Beispiel durch Veränderungen des mutmaßlichen PEST-Motivs, wobei *SOCS1*-Genmutationen für die HBL-1-Zelllinie nicht bekannt sind. Wäre die vermehrte Proteinexpression Folge einer insgesamt gesteigerten *SOCS1*-Genexpression, wäre diese im Rahmen der qPCR-Experimente wahrscheinlich ebenfalls auf mRNA-Ebene erfasst worden,

nichtsdestotrotz sollte auch an die Möglichkeit eines vorzeitigen mRNA-Abbaus als Ursache der vergleichsweise geringen korrespondierenden *SOCS1*-mRNA-Expression in HBL-1-Zellen gedacht werden. Als Ansatzpunkte zur weiterführenden Ursachenfindung scheinen Untersuchungen der SOCS1-Proteinstabilität und des SOCS1-Ubiquitinierungsstatus sowie Untersuchungen zum mRNA-Abbau (Deadenylierungsreaktionen, Decapping) in HBL-1-Zellen sinnvoll. Übergeordnet stellt sich zudem die Frage, inwiefern das in HBL-1-Zellen nachgewiesene SOCS1-Protein funktionell intakt ist und seine regulierende Wirkung auf die JAK-STAT-Signaltransduktion ausüben kann. Gegebenenfalls wäre es hilfreich, sich hierzu näher mit den Zielstrukturen von SOCS1 zu beschäftigen und mögliche Auswirkungen der vermehrten Proteinexpression auf die Aktivität des JAK-STAT-Signalweges in HBL-1-Zellen zu untersuchen.

Die in der NSCHL-Zelllinie L540 gemessene *SOCS1*-mRNA-Expression überstieg die *SOCS1*-mRNA-Expression in den weiteren untersuchten Zelllinien um ein Vielfaches, sodass Störungen der mRNA-Abbaumechanismen mit nachfolgender Anhäufung der *SOCS1*-mRNA als Ursache in Frage kommen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, über die der mRNA-Abbau prinzipiell erfolgen kann, hierzu gehören deadenylierungsabhängige Wege mit Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes (Deadenylierung) und gegebenenfalls Hydrolyse der 5‘-Cap-Struktur (Decapping) und deadenylierungsunabhängige Wege über Decapping. Auch microRNAs können über mRNA-Destabilisierung den Abbau induzieren. Störungen dieser Prozesse können den mRNA-Abbau beeinträchtigen und eine Akkumulation der mRNA innerhalb der Zelle bewirken. Eine geringe korrespondierende Proteinexpression könnte in diesem Falle beispielsweise durch intakte Regulationsmechanismen auf Proteinebene, einen gestörten Translationsprozess oder Veränderungen des Proteins selbst erklärt werden.

Ebenso wäre eine insgesamt gesteigerte *SOCS1*-Genexpression als Ursache der verhältnismäßig hohen *SOCS1*-mRNA-Expression in L540-Zellen denkbar. Dass sich diese nicht auf die Proteinebene überträgt, könnten ebenfalls auf Störungen des Translationsprozesses, eine herabgesetzte Proteinstabilität, eine verkürzte Halbwertszeit des Proteins, einen gesteigerten Proteinabbau oder auch physiologische Mechanismen zur Regulierung der SOCS1-Proteinexpression zurückzuführen sein. Eine Beeinträchtigung des Translationsprozesses wäre beispielsweise infolge einer fehlerhaften 5‘-Cap-Struktur zu befürchten, da die Initiation der Translation auf das Vorhandensein der 5‘-Cap-Struktur der *SOCS1*-mRNA angewiesen ist [104]. Zur

genaueren Eingrenzung der Ursache sind weitere Versuche erforderlich. Erste Ansatzpunkte könnten Untersuchungen der *SOCS1*-mRNA-Stabilität und des *SOCS1*-mRNA-Abbaus (Deadenylierungsreaktionen, Decapping) sowie Untersuchungen der SOCS1-Proteinstabilität und des SOCS1-Ubiquitinierungsstatus in L540-Zellen darstellen.

Abschließend sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Transkription und Translation komplexe Prozesse darstellen und zahlreiche Faktoren bestehen, die die Gen- und Proteinexpression beeinflussen können. Auftretende Diskrepanzen müssen nicht per se pathologisch sein. Um die Bedeutung der beobachteten Diskrepanzen auch vor dem Hintergrund, dass sich die verwendeten Zelllinien von unterschiedlichen B-Zell-Lymphomentitäten ableiten, einordnen zu können, sind weiterführende Untersuchungen sowohl im Hinblick auf die physiologische Regulierung der SOCS1-Expression als auch hinsichtlich möglicher Störungen dieser Regulationsmechanismen in B-Zell-Lymphomen notwendig.

4.4 Biallelische *SOCS1*-Mutationen der Zelllinie L428

Mit der NSCHL-Zelllinie L428 wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem eine Zelllinie verwendet, für die biallelisch *SOCS1*-Mutationen auf DNA-Ebene beschrieben wurden. Weniger et al. konnten in L428 Zellen eine Frameshift-Mutation (c.349_359del11, monoallelisch) und eine In-frame-Deletion (c.393_407del15, monoallelisch) im für die SH2-Domäne codierenden Bereich nachweisen [367].

Um zu untersuchen, inwiefern die auf DNA-Ebene beschriebenen *SOCS1*-Mutationen auf RNA-Ebene exprimiert werden, wurden mutationsspezifische Primerkombinationen zur Erfassung der *SOCS1*-mRNA-Expression in L428-Zellen erstellt. Diese sollten die jeweils publizierten Mutationen respektive eine wildtypische Expression der betreffenden Sequenzabschnitte nachweisen. Die Primer umfassten jeweils 18 bis 24 Basen. Zur Überprüfung der Produktspezifität wurden im Anschluss an die qPCR Schmelzkurven ausgegeben und es erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte über Agarosegel-Elektrophorese mit Visualisierung der Banden über Anfärbung mit Ethidiumbromid.

Die Ergebnisse der mutationsspezifischen qPCR zeigten, dass die auf DNA-Ebene für die Zelllinie L428 beschriebenen *SOCS1*-Mutationen auf mRNA-Ebene exprimiert werden und sich durch semiquantitative Echtzeit-PCR unter Verwendung hierzu designter Primer (L428/1 mut, L428/2 mut) nachweisen lassen. Zudem konnte in den untersuchten Sequenzabschnitten durch die entsprechend designten Primer (L428/1 wt, L428/2 wt) eine Expression von Wildtyp-*SOCS1* detektiert werden.

Dass sich durch die Primer L428/1 wt und L428/2 wt eine Wildtyp-*SOCS1*-Expression quantifizieren ließ, steht hierbei nicht im Widerspruch dazu, dass L428-Zellen *SOCS1*-Mutationen aufweisen.

Vielmehr sollten bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse die Zielsequenzen der Primer und die jeweiligen Mutationen berücksichtigt werden. Weniger et al. beschrieben in L428-Zellen auf einem Allel eine Deletion, die zur Verschiebung des Leserasters führt (c.349_359del11 (fs), monoallelisch). Auf dem anderen Allel wiesen sie eine In-frame-Deletion nach (c.393_407del15 (if), monoallelisch). Die beschriebenen Mutationen liegen auf unterschiedlichen Allelen und in sich nicht überlappenden Sequenzabschnitten vor. Berücksichtigt man die Primersequenzen, bedeutet eine Wildtyp-Expression in diesem Zusammenhang lediglich, dass der jeweils untersuchte Sequenzabschnitt wildtypisch exprimiert wird. Dass die komplette Sequenz in wildtypischer Form vorliegt, kann hieraus nicht geschlossen werden. Zur weiteren Klärung würde sich hier eine Sequenzierung der vollständigen *SOCS1*-mRNAs mittels Nanopore-Sequenzierung anbieten.

Die Messung der Expression kann unter anderem durch die Effizienz der verwendeten Primer beeinflusst werden. Für die Primer L428/2 wt und L428/2 mut ließen sich in der durchgeführten Primereffizienztestung vergleichsweise geringere Effizienzen feststellen als für alle weiteren verwendeten Primer (vgl. Abschnitt 2.15.8). Daher ist es möglich, dass diese Primer aufgrund ihrer geringeren Effizienz die Expression unterschätzten.

Da die Schmelzkurven für die verwendeten Primer jeweils eindeutige Spitzen zeigten und sich auch nach Agarosegel-Elektrophorese in den jeweiligen Proben eine einzelne Bande bei der zu erwartenden Produktlänge nachweisen ließ, erscheint es wahrscheinlich, dass spezifische qPCR-Produkte entstanden sind. Ein eindeutiger Nachweis wäre an dieser Stelle durch Sequenzierung der qPCR-Produkte möglich gewesen. Ebenfalls wäre es denkbar, die verwendeten Primer noch zu validieren. Hierzu könnten Vektoren konstruiert werden, die die beschriebene Frameshift-

Mutation respektive In-frame-Deletion exprimieren können. Nach Transfektion beispielsweise von HEK 293T Zellen mit unterschiedlichen Plasmidmengen könnte durch qPCR-Experimente untersucht werden, wie verlässlich die designten Primer die entsprechende Mutation nachweisen können.

4.5 Die Charakterisierung des SOCS1-Proteinstatus und Schlussfolgerungen hinsichtlich einer Unterscheidung zwischen Mutationsarten im Western Blot

SOCS1-Mutationen lassen sich bei einer Vielzahl von B-Zell-Lymphomen beobachten und insgesamt existieren zahlreiche Studien, die sich mit der prognostischen Bedeutung des *SOCS1*-Mutationssubtyps („trunkierend (Major)“, „nichttrunkierend (Minor)“ und „Wildtyp“) beschäftigt haben [145, 146, 180, 202, 304]. Für klassische Hodgkin-Lymphome konnten Lennerz/Hoffmann et al. zeigen, dass dem *SOCS1*-Mutationssubtyp die Bedeutung eines tumorspezifischen prognostischen Biomarkers zukommt [180]. Trunkierende *SOCS1*-Mutationen sind demnach mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf, höheren Rezidivrisiko und geringeren Gesamtüberleben assoziiert [180]. Auch für das DLBCL haben mehrere Studien prognostische Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationssubtypen aufzeigen können, allerdings ist die Bedeutung des *SOCS1*-Mutationstatus im DLBCL aufgrund teils divergierender Ergebnisse bisher nicht abschließend geklärt [145, 146, 202, 304]. Eine Herausforderung bei der Bestimmung des *SOCS1*-Mutationssubtyps besteht in den teils aufwendigen und zeitintensiven Verfahren [180], in klassischen Hodgkin-Lymphomen stellt zudem die geringe Anzahl der HRS-Zellen im zu untersuchenden Gewebe einen erschwerenden Faktor dar [147, 180]. Insgesamt scheint vor allem die Differenzierung zwischen trunkierenden, das heißt die Proteinlänge beeinträchtigenden, und nichttrunkierenden, das heißt lediglich einige Aminosäuren ändernden *SOCS1*-Mutationen therapeutisch und prognostisch relevant zu sein. Vor diesem Hintergrund ist es naheliegend, sich noch einmal genauer mit dem SOCS1-Proteinstatus in B-Zell-Lymphomen zu beschäftigen.

Mit der NSCHL-Zelllinie L428 und der PBML-Zelllinie MedB-1 wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Zelllinien untersucht, für die biallelisch *SOCS1*-Mutationen bekannt sind. Weniger et al. beschrieben in L428-Zellen eine Frameshift-Mutation

(c.349_359del11) und eine In-frame-Deletion (c.393_407del15) im für die SH2-Domäne codierenden Bereich [367]. Melzner et al. konnten in MedB-1-Zellen eine Frameshift-Mutation (c.526_533del8) und eine In-frame-Deletion (c.552_575del24) in der DNA-Sequenz, die für die SOCS Box codiert, ermitteln [203]. Aus den *SOCS1*-DNA-Mutationen der L428- und MedB-1-Zellinie lassen sich die folgenden mutmaßlichen Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz ableiten: Die Frameshift-Mutation in L428-Zellen bedingt durch eine Verschiebung des Leserasters die Veränderung der SOCS1-Aminosäuresequenz ab aa 117, die In-frame-Deletion führt zum Verlust von fünf Aminosäuren (aa 131-135), ändert die übrige Aminosäureabfolge jedoch nicht. Die für MedB-1-Zellen publizierte Frameshift-Mutation bewirkt eine Veränderung der SOCS1-Aminosäuresequenz ab aa 176, die In-frame-Deletion bedingt ein um acht Aminosäuren (aa 184-191) verkürztes SOCS1-Protein, lässt die übrigen Proteinabschnitte jedoch intakt.

Im Folgenden sollen die Western Blot-Ergebnisse mit Hauptaugenmerk auf den Zelllinien L428 und MedB-1 rekapituliert werden. Besondere Berücksichtigung sollen hierbei die Immunisierungssequenzen beziehungsweise Epitope der genutzten monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper finden und es soll diskutiert werden, inwiefern eine Differenzierung zwischen Mutationsarten durch die verwendeten Antikörperklone möglich ist.

Die kommerziell verfügbaren anti-SOCS1-Antikörper erkennen ein unbekanntes Epitop im Bereich des Aminoterminus des SOCS1-Proteins. Die Immunisierungssequenz dieser Antikörper umfasst den Abschnitt aa 2-78. Im Rahmen der Transfektionsexperimente wurde gezeigt, dass ein SOCS1-Nachweis im Western Blot mittels kommerzieller Antikörper möglich ist und auch in Extrakten der HBL-1-Zelllinie ließ sich SOCS1-Protein unter Verwendung kommerzieller Antikörperklone nachweisen. Da die Immunisierungssequenz und folglich auch das Epitop der kommerziellen Antikörper der DNA-Sequenz nach zu urteilen von den Mutationen der L428- und MedB-1-Zelllinie nicht betroffen sind, sollten diese Antikörper in der Lage sein, SOCS1 in allen verwendeten, das *SOCS1*-Gen exprimierenden Zelllinien nachzuweisen. Dass ein Nachweis wider Erwarten nicht gelang, könnte unter anderem mit einer infolge der Proteinveränderung herabgesetzten Proteinstabilität zusammenhängen, jedoch wären physiologische Regulierungsprozesse, wie sie im Abschnitt 4.3 diskutiert wurden, als Ursache ebenfalls denkbar.

Die institutseigenen Antikörper binden ein klar definiertes Epitop von acht Aminosäuren (aa 196-203, LNPVRLDY) im Bereich der carboxyterminal gelegenen SOCS Box. Dass ein SOCS1-Nachweis mit den institutseigenen Antikörperklonen verlässlich möglich ist, haben die Transfektionsexperimente gezeigt. In Proteinextrakten aus HBL-1-Zellen ließ sich ebenfalls SOCS1-Protein zuverlässig nachweisen. Die für die Zelllinien L428 und MedB-1 beschriebenen Frameshift-Mutationen gehen der DNA-Sequenz nach zu urteilen mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz carboxyterminal der jeweiligen Mutation einher und führen dazu, dass das Epitop der institutseigenen Antikörperklone nicht mehr vorhanden ist. Hierdurch ist der fehlende Nachweis dieses infolge der Frameshift-Mutation veränderten SOCS1-Proteins erklärbar. Die beschriebenen In-frame-Deletionen beeinträchtigen das Epitop der institutseigenen Antikörperklone hingegen nicht. Ein Nachweis des durch die In-frame-Deletion veränderten Proteins erscheint möglich, dass dieser jedoch nicht gelang, könnte wiederum mit einer herabgesetzten Proteinstabilität oder Regulierungsmechanismen der Proteinexpression zusammenhängen.

Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen hinsichtlich einer weiterführenden Aussage über den SOCS1-Status ableiten?
In der Theorie scheint es möglich, mit Hilfe der verwendeten Antikörperklone eine erste grobe Differenzierung zwischen trunkiertem und nichttrunkiertem SOCS1 über Western Blots vornehmen zu können. Die kommerziellen Antikörper erkennen den Aminoterminus des Proteins beziehungsweise ihr intaktes aminoterminales Epitop. Die institutseigenen Antikörper können hingegen den SOCS1-Carboxyterminus respektive ihr intaktes carboxyterminal gelegenes Epitop nachweisen. Ein mit beiden Antikörpern gelingender SOCS1-Nachweis bei 24 kDa würde für ein nichttrunkiert vorliegendes SOCS1-Protein sprechen, wie es bei einer wildtypischen *SOCS1*-Genexpression oder einer nichttrunkierenden *SOCS1*-Mutation ohne Beeinträchtigung der jeweiligen Epitope zu erwarten wäre. Ein trunkiertes Protein würde hingegen durch ein geringeres Molekulargewicht im Western Blot auffallen. Je nachdem, welche Proteinbereiche infolge der Mutation verändert vorliegen, würde ein Nachweis des Epitops durch die entsprechenden Antikörper nicht mehr gelingen, dies wäre bei allen Änderungen der Aminosäureabfolge mit Verlust der Epitopsequenz der Fall.

Ob eine solche Unterscheidung in der Praxis durch die verwendeten Antikörper möglich ist, bleibt offen. Es wäre zunächst notwendig, die Ursachen des fehlenden Proteinnachweises einzugrenzen. Untersuchungen der SOCS1-Proteinstabilität und anderer SOCS1-Regulationsmechanismen könnten als weiterführende Arbeiten zur Klärung dieser Beobachtungen beitragen. Als Ansatzpunkt wäre auch eine ektopische Expression der beschriebenen Mutationen in beispielsweise HEK 293T Zellen durch transiente Transfektion mit Vektoren, die die jeweiligen Mutationen tragen, denkbar. So könnte eingeschätzt werden, inwiefern der Nachweis infolge einer Mutation veränderter SOCS1-Proteine durch die verwendeten Antikörper gelingt.

4.6 Die Spezifität der untersuchten anti-SOCS1-Antikörper und mögliche Konsequenzen hinsichtlich einer Verwendung in der Immunhistochemie

Zur Untersuchung der Proteinexpression existieren praktikable und bereits in Forschung und im klinischen Alltag etablierte Verfahren. Neben Western Blot-Experimenten stellt die Immunhistochemie ein zur Charakterisierung des Proteinstatus geeignetes Verfahren dar. Im Gewebe erlaubt sie die Untersuchung von Expressionsmustern, je nach Lokalisation des vom jeweiligen Antikörper erkannten Epitops kann zudem eine Aussage über das Vorhandensein funktionell relevanter Proteinbereiche wie beispielsweise der SOCS Box im Fall von SOCS1 getätigt werden [365]. Als wesentliche Voraussetzung erfordert die Immunhistochemie Antikörper, die ihr Zielprotein spezifisch und zuverlässig nachweisen können [40].

Als wesentlicher Teil dieser Arbeit wurden verschiedene monoklonale anti-SOCS1-Antikörper systematisch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, SOCS1 im Western Blot spezifisch und zuverlässig nachzuweisen, untersucht. Diese Arbeiten können vor dem Hintergrund einer möglichen Verwendung der jeweiligen Antikörper in der Immunhistochemie als wichtige Vorarbeiten im Sinne eines Antikörpervalidierungsverfahrens betrachtet werden. Als Ausgangspunkt der durchgeführten Experimente dienten zwei kommerziell verfügbare monoklonale anti-SOCS1-Antikörper, die ein durch die Hersteller nicht näher spezifiziertes aminoterminal gelegenes Epitop erkennen, und zwei institutseigene monoklonale anti-SOCS1-Antikörper, die in den wesentlichen Eigenschaften mit dem publizierten

Antikörper 424C [365] übereinstimmen und ein klar definiertes Epitop am Carboxyterminus des SOCS1-Proteins im Bereich der SOCS Box binden können.
Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellung wurden Western Blot-Experimente durchgeführt. Es wurden einerseits Proteinextrakte aus transient mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors transfizierten HEK 293T Zellen und andererseits Proteinextrakte aus sich von B-Zell-Lymphomen ableitenden Zelllinien (PMBL, MM, DLBCL, NSCHL) sowie einer lymphoblastoiden Zelllinie eingesetzt. Die transient transfizierten HEK 293T Zellen erfüllten hierbei die Funktion einer Positivkontrolle, da durch die Transfektion mit dem Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektor die Wildtyp-SOCS1-Proteinexpression unter kontrollierten Bedingungen sichergestellt werden konnte. Eine zeitlich begrenzte Expression von SOCS1 in HEK 293T Zellen, die durch transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Methode erreicht werden kann, war zur Nutzung der jeweiligen Extrakte als Positivkontrolle ausreichend und besitzt gegenüber der stabilen Transfektion den Vorteil, dass die Durchführung methodisch weniger komplex ist. Die Zelllinie Karpas 1106 diente aufgrund ihrer bekannten biallelischen *SOCS1*-Defizienz als Negativkontrolle. Wie für alle verwendeten B-Zell-Lymphomzelllinien war für sie initial eine Zelllinien-Authentifizierung mittels STR-Analyse erfolgt. Die Extraktionsarbeiten mit nachfolgender Durchführung der Western Blot-Experimente wurden pro Transfektionsansatz respektive Zelllinie jeweils mindestens dreimal wiederholt, um eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Pro Extrakt wurden zudem vier Western Blots angefertigt, um die jeweiligen Blots unter vergleichbaren Voraussetzungen mit den zu untersuchenden monoklonalen Antikörpern inkubieren zu können.
Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnten alle verwendeten anti-SOCS1-Antikörper ihr Zielprotein im Western Blot zuverlässig nachweisen. Auf Western Blots, die mit kommerziellen Antikörperklonen inkubiert wurden, ließ sich neben der zu erwartenden 24 kDa-Bande (SOCS1) mehrheitlich eine weitere Bande bei 38 kDa detektieren. Unter Verwendung institutseigener Antikörperklone trat diese zusätzliche Bande hingegen nicht auf.

Welche Konsequenzen ergeben sich aus diesen Ergebnissen bezüglich einer Verwendung der untersuchten Antikörper in der Immunhistochemie?

Unter Berücksichtigung gängiger Antikörpervalidierungsalgorithmen legen die Ergebnisse nahe, dass die untersuchten kommerziellen Antikörper aufgrund mangelnder Spezifität für diese Verfahren nicht geeignet sind. Gelingt es im Western Blot anhand unterschiedlichen Molekulargewichts zwischen mehreren detektierbaren Proteinen zu differenzieren, kann dies auf Ebene der Immunhistochemie nicht geleistet werden. Es ist von einem unspezifischen Färbverhalten dieser Antikörper in der Immunhistochemie auszugehen, das eine zuverlässige Ermittlung des SOCS1-Status und -Expressionsmusters nicht zulässt. Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die Problematiken hinsichtlich Spezifität, Kreuzreaktivität, Reproduzierbarkeit und Chargenvariabilität kommerziell erworbener Antikörper thematisieren [24, 33, 299, 309].

Die institutseigenen Antikörperklone könnten hingegen für eine Verwendung in der Immunhistochemie geeignet sein. Analog zum publizierten Antikörper 424C [365] können sie in Western Blots ihr klar definiertes Epitop im Bereich der funktionell bedeutsamen carboxyterminal gelegenen SOCS Box spezifisch und verlässlich nachweisen und sind über Epitop-Kartierung und Kreuzreaktivitätstestung gut charakterisiert worden. Sie erfüllen hiermit die Grundvoraussetzungen für weitere Untersuchungsschritte im Sinne der Antikörpervalidierung [40]. Diese umfassen unter anderem die Ermittlung einer geeigneten Antikörperverdünnung und Gewebevorbehandlung sowie die Evaluierung der Ergebnisreproduzierbarkeit und des Expressionsmusters an Gewebeschnitten. Ein spezifischer und zuverlässiger Nachweis des Zielproteins im Western Blot bedeutet im Allgemeinen nicht, dass sich diese Ergebnisse auf weitere Einsatzbereiche der Antikörper übertragen lassen [40]. Ob eine Verwendung der untersuchten institutseigenen Antikörperklone in der Immunhistochemie umsetzbar ist, werden abschließend erst weiterführende Untersuchungen mittels Immunhistochemie zeigen können.

4.7 Bestrebungen zur Proteinidentifizierung

Nach regelmäßiger Detektion der 38 kDa-Bande auf Western Blots, die mit den verwendeten kommerziellen Antikörperklonen inkubiert wurden, stellte sich die Frage, welches Protein die 38 kDa-Bande hervorrief. Überlegungen, dass es sich um eine modifizierte Form des SOCS1-Proteins oder ein trunkiertes SOCS1-Protein

handeln könnte, wurden rasch verworfen. Ausschlaggebend hierfür war neben Faktoren wie dem regelmäßigen und selektiven Auftreten der 38 kDa-Bande unter Verwendung kommerzieller Antikörper, einem höheren Molekulargewicht des unbekannten Proteins und einer im Vergleich zur SOCS1-Bande fehlenden Dynamik der Bandenintensität in den Transfektionsexperimenten insbesondere die Tatsache, dass die 38 kDa-Bande auch auf Western Blots nachweisbar war, die mit Extrakten der biallelisch *SOCS1*-defizienten Zelllinie Karpas 1106 angefertigt wurden. Am naheliegendsten erschien die Möglichkeit, dass es sich um ein unspezifisches, zusätzlich zum Zielprotein SOCS1 durch die jeweiligen kommerziellen Antikörper erkanntes Protein handelte.

Es wurden Versuche mit dem Ziel, das unbekannte Protein zu identifizieren, durchgeführt. Zunächst sollte eine Anreicherung des Proteins durch die hierzu gebräuchliche Methode der Immunpräzipitation erfolgen. Nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung des Gels zur Visualisierung der Proteinbanden war die Bestimmung der Aminosäuresequenz des zu identifizierenden Proteins in einem externen Labor vorgesehen. Im Rahmen der Immunpräzipitation mittels Protein G-Sepharose-Partikeln wurden die kommerziellen anti-SOCS1-Antikörper als spezifische Antikörper eingesetzt, da diese das zu identifizierende Protein im Western Blot erkennen und nachweisen konnten. Als unspezifischer Kontrollantikörper, der das zu identifizierende Protein nicht nachweisen sollte, wurde ein anti-β-Tubulin-Antikörper verwendet. Laut Herstellerangaben waren alle eingesetzten Antikörper für die Immunpräzipitation geeignet. Es wurden Proteinextrakte aus HBL-1- und Karpas 1106-Zellen eingesetzt. Für jeden Antikörper wurden Ansätze mit Proteinextrakten aus HBL-1-Zellen, Karpas 1106-Zellen (je 600 µg Protein pro Probe) und TNT^{++}-Puffer ohne Zusatz von Proteinextrakten als Kontrolle vorbereitet.

Trotz wiederholter Durchführung gelang es nicht, das unbekannte Protein mit dem verwendeten Verfahren zu präzipitieren. Im Coomassie-gefärbten Gel stellten sich unspezifische Banden dar, eine Bande bei 38 kDa trat nicht hervor. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze, einige sollen im Folgenden kurz dargelegt werden.

Es ist möglich, dass in den verwendeten Proben eine zu geringe Konzentration des zu präzipitierenden Proteins vorlag. Bei der Auswahl der Proteinextrakte wurden die angefertigten Western Blots berücksichtigt. Es wurden Extrakte der Zelllinie HBL-1

verwendet, da diese in den durchgeführten Western Blots eine deutliche 38 kDa-Bande gezeigt hatten. In Extrakten aus Karpas 1106-Zellen stellte sich die 38 kDa-Bande schwächer dar, durch die *SOCS1*-Defizienz sollte jedoch die Unterscheidung von einer möglichen SOCS1-Bande erleichtert werden. Von einer Expression des unbekannten Proteins in den verwendeten Proteinextrakten ist insgesamt auszugehen. Über die Konzentration des unbekannten Proteins in den jeweiligen Proben kann hingegen keine Aussage getroffen werden. Pro Probe wurden 600 µg Proteinextrakt verwendet, hinsichtlich der Durchführung einer Immunpräzipitation liegt die eingesetzte Proteinmenge im mittleren Bereich der empfohlenen Proteinmenge von 300 bis 1000 µg pro Probe. Ein weiterer Grund für die erfolglosen Präzipitationsversuche könnte zudem eine zu geringe Affinität der verwendeten Antikörper zum zu identifizierenden Protein sein, die für die Immunpräzipitation nicht ausreichte. Dass die Antikörper das unbekannte Protein im Western Blot nachweisen konnten, eine Bindung desselben Proteins durch die verwendeten Antikörper in der Immunpräzipitation jedoch nicht möglich war, könnte darüber hinaus mit der Struktur des unbekannten Proteins zusammenhängen. Im Western Blot werden Proteine nachgewiesen, die durch Denaturierung nicht mehr in ihrer ursprünglichen dreidimensionalen Struktur vorliegen. Das Gelingen der Immunpräzipitation erfordert in aller Regel jedoch eine Bindung des anzureichernden Proteins in seiner nativen Konformation. Ist das Epitop in der ursprünglichen Proteinstruktur für den Antikörper nicht zugänglich, kann es nicht durch den Antikörper gebunden werden. Eine Immunpräzipitation verläuft in diesem Fall ebenfalls erfolglos. Generell sollte auch eine Störung der Detektion durch die kopräzipitierten Antikörperketten in Betracht gezogen werden. Besitzt das zu untersuchende Protein ein ähnliches Molekulargewicht wie die Antikörperleichtkette oder -schwerkette, kann der Proteinnachweis durch die jeweiligen Antikörperketten maskiert werden. Eine Unterscheidung zwischen Antikörperketten und zu untersuchendem Protein ist dann nicht möglich. Im konkreten Fall wäre das unbekannte Protein bei einem Molekulargewicht von 38 kDa zu erwarten. Dass es zu einer Störung der Detektion aufgrund der kopräzipitierten Schwerkette kam, welche in aller Regel bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa nachweisbar ist, erscheint möglich, insgesamt jedoch wenig wahrscheinlich. Im Fall von SOCS1 ist hingegen eine Beeinträchtigung der SOCS1-Detektion bei 24 kDa durch kopräzipitierte Leichtketten bei ca. 25 kDa plausibel. Anhand der vorliegenden Informationen und Ergebnisse ist eine Ursachenklärung nicht abschließend möglich.

Weitere Versuche zur Proteinidentifizierung wurden von mir nicht durchgeführt. Neben der Wiederholung der Immunpräzipitation mit höheren Proteinmengen käme die Durchführung anderer Präzipitationssysteme beispielsweise mit magnetischen Perlen in Frage. Als weiterer Ansatzpunkt wäre eine Epitop-Kartierung der verwendeten kommerziellen Antikörper mit Kreuzreaktivitätsanalyse zur Identifizierung potenzieller weiterer Zielproteine dieser Antikörper denkbar.

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Diskrepanzen zwischen *SOCS*1-mRNA- und SOCS1-Proteinexpression in einer DLBCL- (HBL-1) und einer NSCHL-Zelllinie (L540) aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse könnten einen Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen der SOCS1-Expression in diesen Zelllinien und den entsprechenden B-Zell-Lymphomentitäten darstellen. Hierbei wären eine genauere Beschäftigung mit der *SOCS1*-mRNA-Stabilität und dem *SOCS1*-mRNA-Abbau sowie die Durchführung von Versuchen zur Halbwertszeit, Stabilität und zum Abbau des SOCS1-Proteins interessant. Untersuchungen von Deadenylierung und Decapping der *SOCS1*-mRNA sowie eine Ermittlung des SOCS1-Ubiquitinierungsstatus in den genannten Zelllinien wären als erste Ansatzpunkte denkbar. Da sich für den überwiegenden Teil der weiteren untersuchten Zelllinien eine geringe *SOCS1*-mRNA-Expression zeigte und mittels Western Blot kein SOCS1-Protein detektierbar war, könnte es zudem von Interesse sein, sich noch einmal genauer mit den in der Literatur beschriebenen Regulationsmechanismen der SOCS1-Expression zu beschäftigen und die Rolle dieser in den untersuchten, sich von B-Zell-Lymphomen ableitenden Zelllinien und der lymphoblastoiden Zelllinie zu erfassen.

In einem weiteren wesentlichen Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten institutseigenen monoklonalen anti-SOCS1-Antikörper ihr Epitop im Bereich der funktionell bedeutsamen SOCS Box am SOCS1-Carboxyterminus im Western Blot zuverlässig und spezifisch nachweisen können. Hiermit erfüllen sie die Grundvoraussetzungen für weitere Validierungsschritte hinsichtlich einer Verwendung in der Immunhistochemie. Diese umfassen die Bestimmung von Gewebevorbehandlung und Antikörperverdünnung sowie Untersuchungen des Expressionsmusters und der Ergebnisreproduzierbarkeit an Gewebeschnitten

beispielsweise mittels Tissue Microarray. Die Verfügbarkeit von validierten Antikörpern, die das Vorhandensein des SOCS1-Carboxyterminus in der Immunhistochemie belegen, könnte die Ermittlung des SOCS1-Status erleichtern und insgesamt eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Rolle und Bedeutsamkeit von SOCS1 in B-Zell-Lymphomen bieten.

5 Zusammenfassung

Die aberrante Aktivierung intrazellulärer Signalwege spielt bei der Pathogenese maligner Lymphome eine wesentliche Rolle. Von Bedeutung ist unter anderem der Januskinase (JAK)-Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-Signalweg, der über Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert wird und grundlegende Zellvorgänge wie Zellproliferation, -differenzierung und -überleben beeinflussen sowie zur Apoptose und Immunaktivierung führen kann. Wichtige Regulatoren des JAK-STAT-Signalweges sind die Mitglieder der Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS)-Proteinfamilie, die im Sinne eines inhibitorisch wirksamen Regelkreises die über Zytokine induzierte und JAKs und STATs vermittelte Signaltransduktion unterbinden können. Besonders relevant ist hierbei der Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1). Veränderungen der *SOCS1*-Genexpression sind unter anderem in klassischen Hodgkin-Lymphomen (CHL), primär mediastinalen großzelligen B-Zell-Lymphomen (PMBL), multiplen Myelomen (MM) und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) beschrieben worden. In klassischen Hodgkin-Lymphomen kommt dem *SOCS1*-Mutationssubtyp die Bedeutung eines tumorspezifischen prognostischen Biomarkers zu. Bisherige Studien haben sich überwiegend mit der *SOCS1*-Genexpression und potentiellen Auswirkungen von *SOCS1*-Mutationen auf das SOCS1-Protein und seine Funktionalität beschäftigt, selten erfolgte eine Ermittlung des SOCS1-Proteinstatus durch einen direkten Nachweis des SOCS1-Proteins beziehungsweise funktionell bedeutsamer Proteindomänen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene, sich von oben genannten B-Zell-Lymphomen ableitende Zelllinien und eine lymphoblastoide Zelllinie hinsichtlich ihrer *SOCS1*-mRNA-Expression und ihres SOCS1-Proteinstatus untersucht. Die mRNA-Expression wurde hierbei durch semiquantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktionen (qPCR) erfasst, die Bestimmung des Proteinstatus erfolgte im Western Blot. Die Gegenüberstellung von mRNA- und Proteinexpression ergab für zwei Zelllinien deutliche Diskrepanzen: Die DLBCL-Zelllinie HBL-1 zeigte eine eindeutig nachweisbare und im Vergleich zu allen weiteren untersuchten Zelllinien hohe Wildtyp-SOCS1-Proteinexpression, wohingegen die relative Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression gering ausfiel. Zellen der CHL-Zelllinie L540 wiesen eine starke relative Wildtyp-*SOCS1*-mRNA-Expression auf, eine Wildtyp-SOCS1-Proteinexpression war jedoch nicht nachweisbar. Für alle weiteren, das *SOCS1*-Gen

exprimierenden Zelllinien konnte eine geringe relative *SOCS1*-mRNA-Expression gemessen werden, SOCS1-Protein ließ sich jeweils nicht detektieren. Durch mutationsspezifische qPCR konnte für die CHL-Zelllinie L428 zudem gezeigt werden, dass die auf DNA-Ebene beschriebenen *SOCS1*-Mutationen auf RNA-Ebene exprimiert werden. Diese Ergebnisse können insgesamt einen Ausgangspunkt weiterführender Untersuchungen im Hinblick auf Regulationsmechanismen der SOCS1-Expression in B-Zell-Lymphomen sowie die Protein-/mRNA-Stabilität und den Protein-/mRNA-Abbau in den genannten Zelllinien und entsprechenden Entitäten darstellen.

Da die verlässliche Charakterisierung der SOCS1-Proteinexpression Anforderungen an die jeweils verwendeten Antikörper stellt, wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit zwei kommerzielle und zwei institutseigene monoklonale anti-SOCS1-Antikörper hinsichtlich ihrer Fähigkeit, SOCS1 im Western Blot zuverlässig und spezifisch nachzuweisen, untersucht. Im Sinne einer Antikörpervalidierung für die Verwendung in der Immunhistochemie kann dies als relevante Vorarbeit betrachtet werden. Sowohl in Proteinextrakten aus transient mit absteigenden Mengen eines Wildtyp-*SOCS1*-Expressionsvektors transfizierten HEK 293T Zellen als auch in Extrakten ausgewählter B-Zell-Lymphomzelllinien konnten die verwendeten Antikörperklone SOCS1 vergleichbar zuverlässig nachweisen. In Western Blots, die mit kommerziellen Antikörpern inkubiert wurden, zeigte sich regelmäßig eine zusätzliche, unspezifische Bande bei 38 kDa, sodass sich die verwendeten kommerziellen Antikörperklone als unspezifisch herausstellten. Die institutseigenen Antikörper konnten hingegen in allen angefertigten Western Blots SOCS1 spezifisch nachweisen. Hinsichtlich einer möglichen Verwendung in der Immunhistochemie sind die kommerziellen Antikörperklone aufgrund ihrer geringeren Spezifität insgesamt als ungeeignet zu betrachten. Die institutseigenen Antikörper qualifizieren sich durch ihre Fähigkeit, den Carboxyterminus des SOCS1-Proteins im Western Blot zuverlässig und spezifisch nachzuweisen, hingegen für weitere Schritte der Antikörpervalidierung und -austestung.

6 Literaturverzeichnis

1. Abe M, Nozawa Y, Wakasa H, Ohno H, Fukuhara S: Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability. Cancer, 61: 483-490(1988)

2. Addis B J, Isaacson P G: Large cell lymphoma of the mediastinum: a B-cell tumour of probable thymic origin. Histopathology, 10: 379-390(1986)

3. Akilesh S, Alem A, Nicosia R F: Combined crystalline podocytopathy and tubulopathy associated with multiple myeloma. Human Pathology, 45: 875-879(2014)

4. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang X J, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T: Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. Cell, 77: 63-71(1994)

5. Alexander W S, Starr R, Fenner J E, Scott C L, Handman E, Sprigg N S, Corbin J E, Cornish A L, Darwiche R, Owczarek C M, Kay T W H, Nicola N A, Hertzog P J, Metcalf D, Hilton D J: SOCS1 Is a Critical Inhibitor of Interferon γ Signaling and Prevents the Potentially Fatal Neonatal Actions of this Cytokine. Cell, 98: 597-608(1999)

6. Alexander W S: Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. Nature Reviews Immunology, 2: 410-416(2002)

7. Alizadeh A A, Eisen M B, Davis R E, Ma C, Lossos I S, Rosenwald A, Boldrick J C, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell J I, Yang L, Marti G E, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis D B, Tibshirani R, Sherlock G, Chan W C, Greiner T C, Weisenburger D D, Armitage J O, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever M R, Byrd J C, Botstein D, Brown P O, Staudt L M: Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature, 403: 503-511(2000)

8. Al-Mansour M, Connors J M, Gascoyne R D, Skinnider B, Savage K J: Transformation to Aggressive Lymphoma in Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Lymphoma. Journal of Clinical Oncology, 28: 793-799(2010)

9. Anagnostopoulos I, Hansmann M, Franssila K, Harris M, Harris N L, Jaffe E S, Han J, van Krieken J M, Poppema S, Marafioti T, Franklin J, Sextro M, Diehl V, Stein H: European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. Blood, 96: 1889-1899(2000)

10. Anderson J R, Armitage J O, Weisenburger D D: Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Annals of Oncology, 9: 717-720(1998)

11. Anderson K C, Jones R M, Morimoto C, Leavitt P, Barut B A: Response Patterns of Purified Myeloma Cells to Hematopoietic Growth Factors. Blood, 73: 1915-1924(1989)

12. Arber D A, George T I: Bone Marrow Biopsy Involvement by Non-Hodgkin's Lymphoma: Frequency of Lymphoma Types, Patterns, Blood Involvement, and Discordance With Other Sites in 450 Specimens. The American Journal of Surgical Pathology, 29: 1549-1557(2005)

13. Argetsinger L S, Campbell G S, Yang X, Witthuhn B A, Silvennoinen O, Ihle J N, Carter-Su C: Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. Cell, 74: 237-244(1993)

14. Armitage J O, Weisenburger D D: New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Journal of Clinical Oncology, 16: 2780-2795(1998)

15. Armstrong A A, Alexander F E, Paes R P, Morad N A, Gallagher A, Krajewski A S, Jones D B, Angus B, Adams J, Cartwright R A: Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. The American Journal of Pathology, 142: 1683-1688(1993)

16. Artz A S, Pollyea D A, Kocherginsky M, Stock W, Rich E, Odenike O, Zimmerman T, Smith S, Godley L, Thirman M, Daugherty C, Extermann M, Larson R, van Besien K: Performance Status and Comorbidity Predict Transplant-Related Mortality After

Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 12: 954-964(2006)

17. Babon J J, Yao S, DeSouza D P, Harrison C F, Fabri L J, Liepinsh E, Scrofani S D, Baca M, Norton R S: Secondary structure assignment of mouse SOCS3 by NMR defines the domain boundaries and identifies an unstructured insertion in the SH2 domain. The FEBS Journal, 272: 6120-6130(2005)

18. 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. Molecular Cell, 22: 205-216(2006)

19. Babon J J, Sabo J K, Soetopo A, Yao S, Bailey M F, Zhang J, Nicola N A, Norton R S: The SOCS Box Domain of SOCS3: Structure and Interaction with the ElonginBC-Cullin5 Ubiquitin Ligase. Journal of Molecular Biology, 381: 928-940(2008)

20. Babon J J, Sabo J K, Zhang J, Nicola N A, Norton R S: The SOCS Box Encodes a Hierarchy of Affinities for Cullin5: Implications for Ubiquitin Ligase Formation and Cytokine Signalling Suppression. Journal of Molecular Biology, 387: 162-174(2009)

21. Bacon C M, McVicar D W, Ortaldo J R, Rees R C, O'Shea J J, Johnston J A: Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. Journal of Experimental Medicine, 181: 399-404(1995)

22. Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke A H: Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptor Signaling in Innate Immune Cells. Journal of Biological Chemistry, 279: 54708-54715(2004)

23. Baetz A, Koelsche C, Strebovsky J, Heeg K, Dalpke A H: Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 22: 4296-4305(2008)

24. Baker M: Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. Nature, 521: 274-276(2015)

25. Baras N, Dahm S, Haberland J Ö, Janz M, Emrich K, Kraywinkel K, Salama A: Subsequent malignancies among long-term survivors of Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of German cancer registry data (1990–2012). British Journal of Haematology, 177: 226-242(2017)

26. Barrans S L, Carter I, Owen R G, Davies F E, Patmore R D, Haynes A P, Morgan G J, Jack A S: Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. Blood, 99: 1136-1143(2002)

27. Barth T F E, Melzner I, Wegener S, Bucur A J, Brüderlein S, Dorsch K, Hasel C, Leithäuser F, Möller P: Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in MedB-1 mediastinal lymphoma line. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 89: 234-244(2005)

28. Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, Bryon P A, Coiffier B: Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. Journal of Clinical Oncology, 15: 1587-1594(1997)

29. Baxter E J, Scott L M, Campbell P J, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou G S, Bench A J, Boyd E M, Curtin N, Scott M A, Erber W N, Green A R: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. The Lancet, 365: 1054-1061(2005)

30. Behringer K, Breuer K, Reineke T, May M, Nogova L, Klimm B, Schmitz T, Wildt L, Diehl V, Engert A: Secondary Amenorrhea After Hodgkin's Lymphoma Is Influenced by Age at Treatment, Stage of Disease, Chemotherapy Regimen, and the Use of Oral Contraceptives During Therapy: A Report From the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Journal of Clinical Oncology, 23: 7555-7564(2005)

31. Behringer K, Mueller H, Goergen H, Thielen I, Eibl A D, Stumpf V, Wessels C, Wiehlpütz M, Rosenbrock J, Halbsguth T, Reiners K S, Schober T, Renno J H, von Wolff M, van der Ven K, Kuehr M, Fuchs M, Diehl V, Engert A, Borchmann P: Gonadal Function

and Fertility in Survivors After Hodgkin Lymphoma Treatment Within the German Hodgkin Study Group HD13 to HD15 Trials. Journal of Clinical Oncology, 31: 231-239(2013)

32. Beltran B E, Castillo J J, Morales D, de Mendoza F H, Quinones P, Miranda R N, Gallo A, Lopez-Ilasaca M, Butera J N, Sotomayor E M: EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: A case series from Peru. American Journal of Hematology, 86: 663-667(2011)

33. Berglund L, Björling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Al-Khalili Szigyarto C, Persson A, Ottosson J, Wernérus H, Nilsson P, Lundberg E, Sivertsson Å, Navani S, Wester K, Kampf C, Hober S, Pontén F, Uhlén M: A Genecentric Human Protein Atlas for Expression Profiles Based on Antibodies. Molecular & Cellular Proteomics, 7: 2019-2027(2008)

34. Berglund M, Thunberg U, Amini R, Book M, Roos G, Erlanson M, Linderoth J, Dictor M, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, Sundström C, Rehn-Eriksson S, Backlin C, Hagberg H, Rosenquist R, Enblad G: Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. Modern Pathology, 18: 1113-1120(2005)

35. Bethge W, Guggenberger D, Bamberg M, Kanz L, Bokemeyer C: Thyroid toxicity of treatment for Hodgkin's disease. Annals of Hematology, 79: 114-118(2000)

36. Biggar R J, Jaffe E S, Goedert J J, Chaturvedi A, Pfeiffer R, Engels E A, for the HIV/AIDS Cancer Match Study: Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. Blood, 108: 3786-3791(2006)

37. Bishop P C, Wilson W H, Pearson D, Janik J, Jaffe E S, Elwood P C: CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. Journal of Clinical Oncology, 17: 2479-2485(1999)

38. Bladé J, Lust J A, Kyle R A: Immunoglobulin D multiple myeloma: presenting features, response to therapy, and survival in a series of 53 cases. Journal of Clinical Oncology, 12: 2398-2404(1994)

39. Boivin J, Hutchison G B, Zauber A G, Bernstein L, Davis F G, Michel R P, Zanke B, Tan C T C, Fuller L M, Mauch P, Ultmann J E: Incidence of Second Cancers in Patients Treated for Hodgkin's Disease. Journal of the National Cancer Institute, 87: 732-741(1995)

40. Bordeaux J, Welsh A W, Agarwal S, Killiam E, Baquero M T, Hanna J A, Anagnostou V K, Rimm D L: Antibody validation. BioTechniques, 48: 197-209(2010)

41. Buske C, Dreyling M, Herold M, Raderer M, Zucca E: onkopedia - Leitlinie Nodales Marginalzonen Lymphom - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/nodales-marginalzonen-lymphom/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

42. Buske C, Dreyling M, Herold M, Neumeister P, Willenbacher W, Zenz T: onkopedia - Leitlinie Follikuläres Lymphom - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/follikulaeres-lymphom/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

43. Caffarel M M, Zaragoza R, Pensa S, Li J, Green A R, Watson C J: Constitutive activation of JAK2 in mammary epithelium elevates Stat5 signalling, promotes alveologenesis and resistance to cell death, and contributes to tumourigenesis. Cell Death & Differentiation, 19: 511-522(2012)

44. Calabrese V, Mallette F A, Deschênes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, Ilangumaran S, Ferbeyre G: SOCS1 Links Cytokine Signaling to p53 and Senescence. Molecular Cell, 36: 754-767(2009)

45. Campbell G S, Argetsinger L S, Ihle J N, Kelly P A, Rillema J A, Carter-Su C: Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 5232-5236(1994)

46. Carbone A, Gloghini A, Aldinucci D, Gattei V, Dalla-Favera R, Gaidano G: Expression pattern of MUM1/IRF4 in the spectrum of pathology of Hodgkin's disease. British Journal of Haematology, 117: 366-372(2002)

47. Carbone P P, Kaplan H S, Musshoff K, Smithers D W, Tubiana M: Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification. Cancer Research, 31: 1860-1861(1971)

48. Castillo J J, Winer E S, Olszewski A J: Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: An analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. American Journal of Hematology, 89: 310-314(2014)

49. Cazals-Hatem D, Lepage E, Brice P, Ferrant A, D'Agay M F, Baumelou E, Brière J, Blanc M, Gaulard P, Biron P, Schlaifer D, Diebold J, Audouin J: Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 141 Cases Compared with 916 Nonmediastinal Large B-cell Lymphomas, a GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) Study. The American Journal of Surgical Pathology, 20: 877-888(1996)

50. Chamberlain M C, Glantz M: Myelomatous meningitis. Cancer, 112: 1562-1567(2008)

51. Chen C L, Hsieh F C, Lieblein J C, Brown J, Chan C, Wallace J A, Cheng G, Hall B M, Lin J: Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. British Journal of Cancer, 96: 591-599(2007)

52. Chen C Y, Tsay W, Tang J L, Shen H L, Lin S W, Huang S Y, Yao M, Chen Y C, Shen M C, Wang C H, Tien H F: SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. Genes, Chromosomes & Cancer, 37: 300-305(2003)

53. Cheson B D, Fisher R I, Barrington S F, Cavalli F, Schwartz L H, Zucca E, Lister T A: Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. Journal of Clinical Oncology, 32: 3059-3067(2014)

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

55. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H: Long-term

outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. Blood, 116: 2040-2045(2010)

56. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, Colomer D, Falini B, Montserrat E, Campo E: Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood, 101: 78-84(2003)

57. Conconi A, Franceschetti S, Aprile von Hohenstaufen K, Margiotta-Casaluci G, Stathis A, Moccia A A, Bertoni F, Ramponi A, Mazzucchelli L, Cavalli F, Gaidano G, Zucca E: Histologic transformation in marginal zone lymphomas. Annals of Oncology, 26: 2329-2335(2015)

58. Coons A H, Creech H J, Jones R N, Berliner E: The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. Journal of Immunology, 45: 159-170(1942)

59. Coons A H, Kaplan M H: Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. Journal of Experimental Medicine, 91: 1-13(1950)

60. Damaj G, Mohty M, Vey N, Dincan E, Bouabdallah R, Faucher C, Stoppa A M, Gastaut J A: Features of extramedullary and extraosseous multiple myeloma: a report of 19 patients from a single center. European Journal of Haematology, 73: 402-406(2004)

61. David M, Chen H E, Goelz S, Larner A C, Neel B G: Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. Molecular and Cellular Biology, 15: 7050-7058(1995)

62. Davis R E, Dorfman R F, Warnke R A: Primary large-cell lymphoma of the thymus: A diffuse B-cell neoplasm presenting as primary mediastinal lymphoma. Human Pathology, 21: 1262-1268(1990)

63. De Bruin M L, Huisbrink J, Hauptmann M, Kuenen M A, Ouwens G M, van't Veer M B, Aleman B M P, van Leeuwen F E: Treatment-related risk factors for premature menopause following Hodgkin lymphoma. Blood, 111: 101-108(2008)

64. 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. The EMBO Journal, 18: 904-915(1999)

65. Depil S, Saudemont A, Quesnel B: SOCS-1 gene methylation is frequent but does not appear to have prognostic value in patients with multiple myeloma. Leukemia, 17: 1678-1679(2003)

66. Desouki M M, Post G R, Cherry D, Lazarchick J: PAX-5: a valuable immunohistochemical marker in the differential diagnosis of lymphoid neoplasms. Clinical Medicine & Research, 8: 84-88(2010)

67. Dickensheets H L, Venkataraman C, Schindler U, Donnelly R P: Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 10800-10805(1999)

68. Diehl V, Kirchner H H, Schaadt M, Fonatsch C, Stein H, Gerdes J, Boie C: Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lies. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 101: 111-124(1981)

69. DiGiandomenico A, Wylezinski L S, Hawiger J: Intracellular delivery of a cell-penetrating SOCS1 that targets IFN-gamma signaling. Science Signaling, 2: ra37(2009)

70. Dimopoulos M A, Sonneveld P, Leung N, Merlini G, Ludwig H, Kastritis E, Goldschmidt H, Joshua D, Orlowski R Z, Powles R, Vesole D H, Garderet L, Einsele H, Palumbo A, Cavo M, Richardson P G, Moreau P, San Miguel J, Rajkumar S V, Durie B G M, Terpos E: International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. Journal of Clinical Oncology, 34: 1544-1557(2016)

71. Dores G M, Metayer C, Curtis R E, Lynch C F, Clarke E A, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, van Leeuwen F E, Holowaty E J, Andersson M, Wiklund T, Joensuu T, van't Veer M B, Stovall M, Gospodarowicz M, Travis L B: Second Malignant Neoplasms Among Long-Term Survivors of Hodgkin's Disease: A Population-Based Evaluation Over 25 Years. Journal of Clinical Oncology, 20: 3484-3494(2002)

72. Dreyling M, Buske C, Cairoli A, Heß G, Mey U, Pott C, Raderer M: onkopedia - Leitlinie Mantelzell-Lymphom - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

73. Dubois S, Viailly P, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, Maingonnat C, Jais J, Peyrouze P, Figeac M, Molina T J, Desmots F, Fest T, Haioun C, Lamy T, Copie-Bergman C, Brière J, Petrella T, Canioni D, Fabiani B, Coiffier B, Delarue R, Peyrade F, Bosly A, André M, Ketterer N, Salles G, Tilly H, Leroy K, Jardin F: Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. Clinical Cancer Research, 22: 2919-2928(2016)

74. Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda L S, Advani R, Chen C C, Hessler J, Steinberg S M, Grant C, Wright G, Varma G, Staudt L M, Jaffe E S, Wilson W H: Dose-Adjusted EPOCH-Rituximab Therapy in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. The New England Journal of Medicine, 368: 1408-1416(2013)

75. Durbin J E, Hackenmiller R, Simon M C, Levy D E: Targeted Disruption of the Mouse Stat1 Gene Results in Compromised Innate Immunity to Viral Disease. Cell, 84: 443-450(1996)

76. Dusanter-Fourt I, Muller O, Ziemiecki A, Mayeux P, Drucker B, Djiane J, Wilks A, Harpur A G, Fischer S, Gisselbrecht S: Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells. The EMBO Journal, 13: 2583-2591(1994)

77. Ellinghaus D, Ellinghaus E, Nair R P, Stuart P E, Esko T, Metspalu A, Debrus S, Raelson J V, Tejasvi T, Belouchi M, West S L, Barker J N, Kõks S, Kingo K, Balschun T,

Palmieri O, Annese V, Gieger C, Wichmann H E, Kabesch M, Trembath R C, Mathew C G, Abecasis G R, Weidinger S, Nikolaus S, Schreiber S, Elder J T, Weichenthal M, Nothnagel M, Franke A: Combined Analysis of Genome-wide Association Studies for Crohn Disease and Psoriasis Identifies Seven Shared Susceptibility Loci. The American Journal of Human Genetics, 90: 636-647(2012)

78. Emmerich F, Meiser M, Hummel M, Demel G, Foss H, Jundt F, Mathas S, Krappmann D, Scheidereit C, Stein H, Dörken B: Overexpression of I Kappa B Alpha Without Inhibition of NF-κB Activity and Mutations in the I Kappa B Alpha Gene in Reed-Sternberg Cells. Blood, 94: 3129-3134(1999)

79. Emmerich F, Theurich S, Hummel M, Haeffker A, Vry M S, Döhner K, Bommert K, Stein H, Dörken B: Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed–Sternberg cells. Journal of Pathology, 201: 413-420(2003)

80. 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)

81. Engert A, Plütschow A, Eich H T, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, Berger B, Greil R, Willborn K C, Wilhelm M, Debus J, Eble M J, Sökler M, Ho A, Rank A, Ganser A, Trümper L, Bokemeyer C, Kirchner H, Schubert J Ö, Král Z, Fuchs M, Müller-Hermelink H, Müller R, Diehl V: Reduced Treatment Intensity in Patients with Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. The New England Journal of Medicine, 363: 640-652(2010)

82. Fermé C, Eghbali H, Meerwaldt J H, Rieux C, Bosq J, Berger F, Girinsky T, Brice P, van't Veer M B, Walewski J A, Lederlin P, Tirelli U, Carde P, Van Den Neste E, Gyan E, Monconduit M, Diviné M, Raemaekers J M M, Salles G, Noordijk E M, Creemers G, Gabarre J, Hagenbeek A, Reman O, Blanc M, Thomas J, Vié B, Kluin-Nelemans J, Viseu F, Baars J W, Poortmans P, Lugtenburg P J, Carrie C, Jaubert J, Henry-Amar M: Chemotherapy plus Involved-Field Radiation in Early-Stage Hodgkin's Disease. The New England Journal of Medicine, 357: 1916-1927(2007)

83. Feuerhake F, Kutok J L, Monti S, Chen W, LaCasce A S, Cattoretti G, Kurtin P, Pinkus G S, de Leval L, Harris N L, Savage K J, Neuberg D, Habermann T M, Dalla-Favera R, Golub

T R, Aster J C, Shipp M A: NFκB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. Blood, 106: 1392-1399(2005)

84. Firmbach-Kraft I, Byers M, Shows T, Dalla-Favera R, Krolewski J J: Tyk2, Prototype of a Novel Class of Non-Receptor Tyrosine Kinase Genes. Oncogene, 5: 1329-1336(1990)

85. Foss H, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopoulos I, Hummel M, Stein H: Frequent Expression of the B-Cell–Specific Activator Protein in Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Disease Provides Further Evidence for Its B-Cell Origin. Blood, 94: 3108-3113(1999)

86. Franceschi S, Lise M, Clifford G M, Rickenbach M, Levi F, Maspoli M, Bouchardy C, Dehler S, Jundt G, Ess S, Bordoni A, Konzelmann I, Frick H, Dal Maso L, Elzi L, Furrer H, Calmy A, Cavassini M, Ledergerber B, Keiser O, the Swiss HIV, Cohort Study: Changing patterns of cancer incidence in the early- and late-HAART periods: the Swiss HIV Cohort Study. British Journal of Cancer, 103: 416-422(2010)

87. Franke A, McGovern D P B, Barrett J C, Wang K, Radford-Smith G, Ahmad T, Lees C W, Balschun T, Lee J, Roberts R, Anderson C A, Bis J C, Bumpstead S, Ellinghaus D, Festen E M, Georges M, Green T, Haritunians T, Jostins L, Latiano A, Mathew C G, Montgomery G W, Prescott N J, Raychaudhuri S, Rotter J I, Schumm P, Sharma Y, Simms L A, Taylor K D, Whiteman D, Wijmenga C, Baldassano R N, Barclay M, Bayless T M, Brand S, Büning C, Cohen A, Colombel J, Cottone M, Stronati L, Denson T, De Vos M, D'Inca R, Dubinsky M, Edwards C, Florin T, Franchimont D, Gearry R, Glas J, Van Gossum A, Guthery S L, Halfvarson J, Verspaget H W, Hugot J, Karban A, Laukens D, Lawrance I, Lemann M, Levine A, Libioulle C, Louis E, Mowat C, Newman W, Panés J, Phillips A, Proctor D D, Regueiro M, Russell R, Rutgeerts P, Sanderson J, Sans M, Seibold F, Steinhart A H, Stokkers P C F, Torkvist L, Kullak-Ublick G, Wilson D, Walters T, Targan S R, Brant S R, Rioux J D, D'Amato M, Weersma R K, Kugathasan S, Griffiths A M, Mansfield J C, Vermeire S, Duerr R H, Silverberg M S, Satsangi J, Schreiber S, Cho J H, Annese V, Hakonarson H, Daly M J, Parkes M: Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nature Genetics, 42: 1118-1125(2010)

88. Frantsve J, Schwaller J, Sternberg D W, Kutok J, Gilliland D G: Socs-1 Inhibits TEL-JAK2-Mediated Transformation of Hematopoietic Cells through Inhibition of JAK2 Kinase Activity and Induction of Proteasome-Mediated Degradation. Molecular and Cellular Biology, 21: 3547-3557(2001)

89. Fu X Y, Kessler D S, Veals S A, Levy D E, Darnell J E: ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87: 8555-8559(1990)

90. Fu X Y: A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon α-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). Cell, 70: 323-335(1992)

91. Fuchs M, Borchmann P, Greil R, Hitz F, Naumann R, Sasse S, Engert A: onkopedia - Leitlinie Hodgkin-Lymphom- Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/hodgkin-lymphom/@@guideline/html/index.html (16.07.2021)

92. Gallagher R P, Spinelli J J, Elwood J M, Skippen D H: Allergies and agricultural exposure as risk factors for multiple myeloma. British Journal of Cancer, 48: 853-857(1983)

93. 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)

94. Galm O, Wilop S, Reichelt J, Jost E, Gehbauer G, Herman J G, Osieka R: DNA methylation changes in multiple myeloma. Leukemia, 18: 1687-1692(2004)

95. Gao S P, Mark K G, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald W L, Travis W D, Bornmann W, Veach D, Clarkson B, Bromberg J F: Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. Journal of Clinical Investigation, 117: 3846-3856(2007)

96. Gascoyne R D, Campo E, Jaffe E S, Chan W C, Chan J K C, Rosenwald A, Stein H, Swerdlow S H: Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS. In: Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Press, Lyon, S. 291-298(2017)

97. Gaulard P, Harris N L, Pileri S A, Stein H, Kovrigina A M, Jaffe E S, Möller P, Gascoyne R D: Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma. In: Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Press, Lyon, S. 314-317 (2017)

98. Ghilardi N, Skoda R C: The Leptin Receptor Activates Janus Kinase 2 and Signals for Proliferation in a Factor-Dependent Cell Line. Molecular Endocrinology, 11: 393-399(1997)

99. Gibson S E, Hsi E D: Epstein-Barr virus–positive B-cell lymphoma of the elderly at a United States tertiary medical center: an uncommon aggressive lymphoma with a nongerminal center B-cell phenotype. Human Pathology, 40: 653-661(2009)

100. Giordanetto F, Kroemer R T: A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). Protein Engineering Design & Selection, 16: 115-124(2003)

101. Goldin L R, Pfeiffer R M, Gridley G, Gail M H, Li X, Mellemkjaer L, Olsen J H, Hemminki K, Linet M S: Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. Cancer, 100: 1902-1908(2004)

102. Grandis J R, Drenning S D, Zeng Q, Watkins S C, Melhem M F, Endo S, Johnson D E, Huang L, He Y, Kim J D: Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 4227-4232(2000)

103. Greenhalgh C J, Rico-Bautista E, Lorentzon M, Thaus A L, Morgan P O, Willson T A, Zervoudakis P, Metcalf D, Street I, Nicola N A, Nash A D, Fabri L J, Norstedt G, Ohlsson C, Flores-Morales A, Alexander W S, Hilton D J: SOCS2 negatively regulates growth

hormone action in vitro and in vivo. Journal of Clinical Investigation, 115: 397-406(2005)

104. Gregorieff A, Pyronnet S, Sonenberg N, Veillette A: Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. Journal of Biological Chemistry, 275: 21596-21604(2000)

105. Greipp P R, Miguel J S, Durie B G M, Crowley J J, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child J A, Avet-Loiseau H, Kyle R A, Lahuerta J J, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J: International Staging System for Multiple Myeloma. Journal of Clinical Oncology, 23: 3412-3420(2005)

106. Guo H, Ingolia N T, Weissman J S, Bartel D P: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. Nature, 466: 835-840(2010)

107. Gupta S, Yan H, Wong L H, Ralph S, Krolewski J, Schindler C: The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. The EMBO Journal, 15: 1075-1084(1996)

108. Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark G R: A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. The EMBO Journal, 14: 1421-1429(1995)

109. Hanada T, Yoshida H, Kato S, Tanaka K, Masutani K, Tsukada J, Nomura Y, Mimata H, Kubo M, Yoshimura A: Suppressor of Cytokine Signaling-1 Is Essential for Suppressing Dendritic Cell Activation and Systemic Autoimmunity. Immunity, 19: 437-450(2003)

110. Hans C P, Weisenburger D D, Greiner T C, Gascoyne R D, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink H K, Campo E, Braziel R M, Jaffe E S, Pan Z, Farinha P, Smith L M, Falini B, Banham A H, Rosenwald A, Staudt L M, Connors J M, Armitage J O, Chan W C: Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood, 103: 275-282(2004)

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

112. Harpur A G, Andres A C, Ziemiecki A, Aston R R, Wilks A F: JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. Oncogene, 7: 1347-1353(1992)

113. 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 Science, 100: 730-736(2009)

114. Hehn S T, Grogan T M, Miller T P: Utility of Fine-Needle Aspiration As a Diagnostic Technique in Lymphoma. Journal of Clinical Oncology, 22: 3046-3052(2004)

115. Heim M H, Kerr I M, Stark G R, Darnell J E: Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. Science, 267: 1347-1349(1995)

116. Held G, Murawski N, Ziepert M, Fleckenstein J, Pöschel V, Zwick C, Bittenbring J Ö, Hänel M, Wilhelm S, Schubert J Ö, Schmitz N, Löffler M, Rübe C, Pfreundschuh M: Role of Radiotherapy to Bulky Disease in Elderly Patients With Aggressive B-Cell Lymphoma. Journal of Clinical Oncology, 32: 1112-1118(2014)

117. Henry-Amar M: Second cancer after the treatment for Hodgkin's disease: a report from the International Database on Hodgkin's Disease. Annals of Oncology, 3: 117-128(1992)

118. Hermann S, Kraywinkel K: Faktenblatt: Epidemiologie der Hodgkin-Lymphome in Deutschland. Der Onkologe, 24: 280-285(2018)

119. Herrera G A, Joseph L, Gu X, Hough A, Barlogie B: Renal Pathologic Spectrum in an Autopsy Series of Patients With Plasma Cell Dyscrasia. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 128: 875-879(2004)

120. Hertel C B, Zhou X, Hamilton-Dutoit S, 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)

121. Higgins J P, Warnke R A: CD30 Expression Is Common in Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. American Journal of Clinical Pathology, 112: 241-247(1999)

122. Hilton D J, Richardson R T, Alexander W S, Viney E M, Willson T A, Sprigg N S, Starr R, Nicholson S E, Metcalf D, Nicola N A: Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 114-119(1998)

123. Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C: Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Blood, 97: 2798-2807(2001)

124. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dörken 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. Journal of Experimental Medicine, 196: 605-617(2002)

125. Hoeller S, Tzankov A, Pileri S A, Went P, Dirnhofer S: Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. Human Pathology, 41: 352-357(2010)

126. Hofmann W J, Momburg F, Möller P: Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. Human Pathology, 19: 1280-1287(1988)

127. Holtick U, Vockerodt M, Pinkert D, Schoof N, Stürzenhofecker B, Kussebi N, Lauber K, Wesselborg S, Löffler D, Horn F, Trümper L, Kube D: STAT3 is essential for Hodgkin lymphoma cell proliferation and is a target of tyrphostin AG17 which confers sensitization for apoptosis. Leukemia, 19: 936-944(2005)

128. Hopfinger G, Herling M, de Leval L, Krasniqi F, Reimer P, Schmitz N, Wulf G: onkopedia - Leitlinie Periphere T-Zell Lymphome - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/periphere-t-zell-lymphome/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

129. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth T F E, Bernd H, Feller A C, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann M, Schmelter C, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Siebert R, Loeffler M, Rosenwald A, Ott G, for the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group: MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Blood, 121: 2253-2263(2013)

130. Hou J, Schindler U, Henzel W J, Ho T C, Brasseur M, McKnight S L: An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. Science, 265: 1701-1706(1994)

131. Hsu S, Jaffe E S: Leu M1 and Peanut Agglutinin Stain the Neoplastic Cells of Hodgkin's Disease. American Journal of Clinical Pathology, 82: 29-32(1984)

132. Hu S, Xu-Monette Z Y, Balasubramanyam A, Manyam G C, Visco C, Tzankov A, Liu W, Miranda R N, Zhang L, Montes-Moreno S, Dybkær K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards K L, Hsi E D, Choi W W L, Han van Krieken J, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri A J M, Zhao X, Winter J N, Zhang M, Li L, Møller M B, Piris M A, Li Y, Go R S, Wu L, Medeiros L J, Young K H: CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. Blood, 121: 2715-2724(2013)

133. Huang C, Li H, Wu W, Jiang T, Qiu Z: Regulation of miR-155 affects pancreatic cancer cell invasiveness and migration by modulating the STAT3 signaling pathway through SOCS1. Oncology Reports, 30: 1223-1230(2013)

134. Illidge T, Specht L, Yahalom J, Aleman B, Berthelsen A K, Constine L, Dabaja B, Dharmarajan K, Ng A, Ricardi U, Wirth A: Modern Radiation Therapy for Nodal Non-Hodgkin Lymphoma—Target Definition and Dose Guidelines From the International Lymphoma Radiation Oncology Group. International Journal of Radiation Oncology - Biology - Physics, 89: 49-58(2014)

135. Imada K, Bloom E T, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono J, Udy G B, Davey H W, Leonard W J: Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. Journal of Experimental Medicine, 188: 2067-2074(1998)

136. International Myeloma Working Group: Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. British Journal of Haematology, 121: 749-757(2003)

137. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The New England Journal of Medicine, 329: 987-994(1993)

138. Isaacson P G, Norton A J, Addis B J: The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. The Lancet, 330: 1488-1491(1987)

139. Iványi B: Frequency of light chain deposition nephropathy relative to renal amyloidosis and Bence Jones cast nephropathy in a necropsy study of patients with myeloma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 114: 986-987(1990)

140. James C, Ugo V, Le Couédic J, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval J L, Constantinescu S N, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature, 434: 1144-1148(2005)

141. Jiang S, Zhang H, Lu M, He X, Li Y, Gu H, Liu M, Wang E: MicroRNA-155 Functions as an OncomiR in Breast Cancer by Targeting the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene. Cancer Research,70: 3119-3127(2010)

142. Johnston J A, Kawamura M, Kirken R A, Chen Y, Blake T B, Shibuya K, Ortaldo J R, McVicar D W, O'Shea J J: Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. Nature, 370: 151-153(1994)

143. Jox A, Zander T, Küppers R, Irsch J, Kanzler H, Kornacker M, Bohlen H, Diehl V, Wolf J: Somatic Mutations Within the Untranslated Regions of Rearranged Ig Genes in a Case of Classical Hodgkin’s Disease as a Potential Cause for the Absence of Ig in the Lymphoma Cells. Blood, 93: 3964-3972(1999)

144. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Bräuninger A, Spieker T, Wolf J, Diehl V, Hansmann M, Rajewsky K, Küppers R: Clonal Deleterious Mutations in the Iκbα Gene

in the Malignant Cells in Hodgkin's Lymphoma. Journal of Experimental Medicine, 191: 395-402(2000)

145. Juskevicius D, Lorber T, Gsponer J, Perrina V, Ruiz C, Stenner-Liewen F, Dirnhofer S, Tzankov A: Distinct genetic evolution patterns of relapsing diffuse large B-cell lymphoma revealed by genome-wide copy number aberration and targeted sequencing analysis. Leukemia, 30: 2385-2395(2016)

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

147. Juskevicius D, Jucker D, Dietsche T, Perrina V, Rufle A, Ruiz C, Dirnhofer S, Tzankov A: Novel cell enrichment technique for robust genetic analysis of archival classical Hodgkin lymphoma tissues. Laboratory Investigation, 98: 1487-1499(2018)

148. Kamio M, Yoshida T, Ogata H, Douchi T, Nagata Y, Inoue M, Hasegawa M, Yonemitsu Y, Yoshimura A: SOCS1 inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein. Oncogene, 23: 3107-3115(2004)

149. Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, Hattori K, Hatakeyama S, Yada M, Morita S, Kitamura T, Kato H, Nakayama K, Yoshimura A: The SOCS Box of SOCS-1 Accelerates Ubiquitin-dependent Proteolysis of TEL-JAK2. Journal of Biological Chemistry, 276: 12530-12538(2001)

150. Kamper-Jørgensen M, Rostgaard K, Glaser S L, Zahm S H, Cozen W, Smedby K E, Sanjosé S, Chang E T, Zheng T, La Vecchia C, Serraino D, Monnereau A, Kane E V, Miligi L, Vineis P, Spinelli J J, McLaughlin J R, Pahwa P, Dosman J A, Vornanen M, Foretova L, Maynadie M, Becker N, Nieters A, Brennan P, Boffetta P, Cocco P, Hjalgrim H, Staines A: Cigarette smoking and risk of Hodgkin lymphoma and its subtypes: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). Annals of Oncology, 24: 2245-2255(2013)

151. 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 & Development, 12: 3872-3881(1998)

152. Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway R C, Conaway J W, Nakayama K I: VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. Genes & Development, 18: 3055-3065(2004)

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

154. Kaplan M H, Sun Y, Hoey T, Grusby M J: Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. Nature, 382: 174-177(1996)

155. Karunanayake C P, Singh G V, Spinelli J J, McLaughlin J R, Dosman J A, McDuffie H H, Pahwa P: Occupational Exposures and Hodgkin Lymphoma: Canadian Case–Control Study. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 7: 44(2009)

156. 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)

157. Kirken R A, Rui H, Malabarba M G, Farrar W L: Identification of interleukin-2 receptor-associated tyrosine kinase p116 as novel leukocyte-specific Janus kinase. Journal of Biological Chemistry, 269: 19136-19141(1994)

158. Klapper W, Fend F, Feller A, Hansmann M L, Möller P, Stein H, Rosenwald A, Ott G: Aggressive B Zell-Lymphome. Der Pathologe, 40: 152-156(2019)

159. Klein B, Zhang X, Jourdan M, Content J, Houssiau F, Aarden L, Piechaczyk M, Bataille R: Paracrine Rather Than Autocrine Regulation of Myeloma-Cell Growth and Differentiation by Interleukin-6. Blood, 73: 517-526(1989)

160. Klein B, Wijdenes J, Zhang X, Jourdan M, Boiron J, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B, Lu Z, Mannoni P, Sany J, Bataille R: Murine Anti-

Interleukin-6 Monoclonal Antibody Therapy for a Patient With Plasma Cell Leukemia. Blood, 78: 1198-1204(1991)

161. Kluk M J, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg D S, Monti S, Pinkus G S, Shipp M A, Rodig S J: Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. Public Library of Science one PLoS 1, 7: e33813(2012)

162. Knudsen L M, Hjorth M, Hippe E, Nordic Myeloma S G: Renal failure in multiple myeloma: reversibility and impact on the prognosis. European Journal of Haematology, 65: 175-181(2000)

163. Koelsche C, Strebovsky J, Baetz A, Dalpke A H: Structural and functional analysis of a nuclear localization signal in SOCS1. Molecular Immunology, 46: 2474-2480(2009)

164. Korkolopoulou P, Cordell J, Jones M, Kaklamanis L, Tsenga A, Gatter K C, Mason D Y: The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. Histopathology, 24: 511-515(1994)

165. Kralovics R, Passamonti F, Buser A S, Teo S, Tiedt R, Passweg J R, Tichelli A, Cazzola M, Skoda R C: A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. The New England Journal of Medicine, 352: 1779-1790(2005)

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

167. Krolewski J J, Lee R, Eddy R, Shows T B, Dalla-Favera R: Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. Oncogene, 5: 277-282(1990)

168. Kyle R A, Linos A, Beard C M, Linke R P, Gertz M A, O'Fallon W M, Kurland L T: Incidence and Natural History of Primary Systemic Amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 Through 1989. Blood, 79: 1817-1822(1992)

169. Kyle R A, Gertz M A, Witzig T E, Lust J A, Lacy M Q, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar S V, Offord J R, Larson D R, Plevak M E, Therneau T M, Greipp P R: Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. Mayo Clinic Proceedings, 78: 21-33(2003)

170. Lacronique V, Boureux A, Valle V D, Poirel H, Quang C T, Mauchauffé 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)

171. Lamarre L, Jacobson J O, Aisenberg A C, Harris N L: Primary large cell lymphoma of the mediastinum. A histologic and immunophenotypic study of 29 cases. The American Journal of Surgical Pathology, 13: 730-739(1989)

172. Landgren O, Kyle R A, Pfeiffer R M, Katzmann J A, Caporaso N E, Hayes R B, Dispenzieri A, Kumar S, Clark R J, Baris D, Hoover R, Rajkumar S V: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood, 113: 5412-5417(2009)

173. Lavens D, Montoye T, Piessevaux J, Zabeau L, Vandekerckhove J, Gevaert K, Becker W, Eyckerman S, Tavernier J: A complex interaction pattern of CIS and SOCS2 with the leptin receptor. Journal of Cell Science, 119: 2214-2224(2006)

174. Lazzarino M, Orlandi E, Paulli M, Sträter J, Klersy C, Gianelli U, Gargantini L, Rousset M T, Gambacorta M, Marra E, Lavabre-Bertrand T, Magrini U, Manegold C, Bernasconi C, Möller P: Treatment outcome and prognostic factors for primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma: a multicenter study of 106 patients. Journal of Clinical Oncology, 15: 1646-1653(1997)

175. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL), Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 018-032OL.
https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/CLL/LL_CLL_Langversion_1.0.pdf (21.07.2021)

176. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten, Langversion 3.0, 2020, AWMF Registernummer: 018/029 OL.
https://www.leitlinienprogramm-

onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Hodgkin/Version_3/LL_Hodgkin_Lymphom_Langversion_3.0.pdf (16.07.2021)

177. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit einem follikulären Lymphom, Langversion 1.0, 2020, AWMF-Registernummer: 018/033OL. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Follikulaeres_Lymphom/LL_Foll_Lymphom_Langversion_1.0.pdf (21.07.2021)

178. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder Multiplen Myelom, Langversion 1.01 (Konsultationsfassung), 2021, AWMF Registernummer: 018/035OL. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Multiples_Myelom/LL_Multiples_Myelom_Langversion_1.01.pdf (21.07.2021)

179. Leitlinienprogramm Onkologie (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, AWMF): S2k-Leitlinie Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2015, AWMF-Registernummer: 030/059. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-059l_Prim%C3%A4re_ZNS_Lymphome_PZNSL_2015-06-abgelaufen.pdf (21.07.2021)

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

181. Lenz G, Chapuy B, Glaß B, Keil F, Klapper W, Nickelsen M, Urban N, Schmidberger H: onkopedia - Leitlinie Diffuses großzelliges B-Zell- Lymphom - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/diffuses-grosszelliges-b-zell-lymphom/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

182. Lewis E B: Leukemia, Multiple Myeloma, and Aplastic Anemia in American Radiologists. Science, 142: 1492-1494(1963)

183. Li Z, Metze D, Nashan D, Müller-Tidow C, Serve H L, Poremba C, Luger T A, Böhm M: Expression of SOCS-1, Suppressor of Cytokine Signalling-1, in Human Melanoma. Journal of Investigative Dermatology, 123: 737-745(2004)

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

185. Lichtenstein A K, Levine A, Taylor C R, Boswell W, Rossman S, Feinstein D I, Lukes R J: Primary mediastinal lymphoma in adults. The American Journal of Medicine, 68: 509-514(1980)

186. Linet M S, Harlow S D, McLaughlin J K: A Case-Control Study of Multiple Myeloma in Whites: Chronic Antigenic Stimulation, Occupation, and Drug Use. Cancer Research, 47: 2978-2981(1987)

187. Lister T A, Crowther D, Sutcliffe S B, Glatstein E, Canellos G P, Young R C, Rosenberg S A, Coltman C A, Tubiana M: Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. Journal of Clinical Oncology, 7: 1630-1636(1989)

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

189. Liu S, Ren S, Howell P, Fodstad O, Riker A I: Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. Pigment Cell & Melanoma Research, 21: 545-558(2008)

190. Liu T C, Lin S F, Chang J G, Yang M Y, Hung S Y, Chang C S: Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. Journal of Haematology, 123: 654-661(2003)

191. Liu X, Robinson G W, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L: Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92: 8831-8835(1995)

192. Liu X, Robinson G W, Wagner K U, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L: Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. Genes & Development, 11: 179-186(1997)

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

194. Lu X, Malumbres R, Shields B, Jiang X, Sarosiek K A, Natkunam Y, Tiganis T, Lossos I S: PTP1B is a negative regulator of interleukin 4–induced STAT6 signaling. Blood, 112: 4098-4108(2008)

195. Lukes R J, Butler J J, Hicks E B: Natural history of Hodgkin's disease as related to its pathologic picture. Cancer, 19: 317-344(1966)

196. Lund M B, Kongerud J, Nome O, Abrahamsen A F, Bjørtuft O, Forfang K, Boe J: Lung function impairment in long-term survivors of Hodgkin's disease. Annals of Oncology, 6: 495-501(1995)

197. Marafioti T, Hummel M, Foss H, 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)

198. Marine J, Topham D J, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle J N: SOCS1 Deficiency Causes a Lymphocyte-Dependent Perinatal Lethality. Cell, 98: 609-616(1999)

199. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A: CIS, a Cytokine Inducible SH2 Protein, Is a Target of the JAK-STAT5 Pathway and Modulates STAT5 Activation. Blood, 89: 3148-3154(1997)

200. McKenna R W, Kyle R A, Kuehl W M, Harris N L, Coupland R W, Fend F: Plasma cell myeloma. In: Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Press, Lyon, S. 243-249(2017)

201. Meier C, Hoeller S, Bourgau C, Hirschmann P, Schwaller J, Went P, Pileri S A, Reiter A, Dirnhofer S, Tzankov A: Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. Modern Pathology, 22: 476-487(2009)

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

203. Melzner I, Bucur A J, Brüderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth T F, Leithäuser F, Möller 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)

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

205. Meraz M A, White J M, Sheehan K C F, Bach E A, Rodig S J, Dighe A S, Kaplan D H, Riley J K, Greenlund A C, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois R N, Clark R, Aguet M, Schreiber R D: Targeted Disruption of the Stat1 Gene in Mice Reveals Unexpected Physiologic Specificity in the JAK–STAT Signaling Pathway. Cell, 84: 431-442(1996)

206. Metayer C, Lynch C F, Clarke E A, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, Joensuu T, van Leeuwen F E, van't Veer M B, Curtis R E, Holowaty E J, Andersson M, Wiklund T, Gospodarowicz M, Travis L B: Second Cancers Among Long-Term Survivors of Hodgkin's Disease Diagnosed in Childhood and Adolescence. Journal of Clinical Oncology, 18: 2435-2443(2000)

207. Metcalf D, Alexander W S, Elefanty A G, Nicola N A, Hilton D J, Starr R, Mifsud S, Rago L D: Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1. Leukemia, 13: 926-934(1999)

208. Migone T S, Cacalano N A, Taylor N, Yi T, Waldmann T A, Johnston J A: Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor; loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus type I-transformed T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 3845-3850(1998)

209. Miller K D, Siegel R L, Lin C C, Mariotto A B, Kramer J L, Rowland J H, Stein K D, Alteri R, Jemal A: Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 66: 271-289(2016)

210. Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle J N: Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. Molecular and Cellular Biology, 11: 4895-4902(1991)

211. Møller M B, Pedersen N T, Christensen B E: Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation – a population-based study of 1575 cases. British Journal of Haematology, 124: 151-159(2004)

212. Möller P, Lämmler B, Herrmann B, Otto H F, Moldenhauer G, Momburg F: The primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type has variable defects in MHC antigen expression. Immunology, 59: 411-417(1986 a)

213. Möller P, Lämmler B, Eberlein-Gonska M, Feichter G E, Hofmann W J, Schmitteckert H, Otto H F: Primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type. Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology, 409: 79-92(1986 b)

214. Möller P, Moldenhauer G, Momburg F, Lämmler B, Eberlein-Gonska M, Kiesel S, Dörken B: Mediastinal Lymphoma of Clear Cell Type is a Tumor Corresponding to Terminal Steps of B Cell Differentiation. Blood, 69: 1087-1095(1987)

215. Möller P, Hofmann W J, Mielke B, Otto H F: Primary mediastinal, clear cell B-cell lymphoma is an epithelium-associated thymus lymphoma. Der Pathologe, 10: 234-239(1989)

216. Möller P, Matthaei-Maurer D U, Hofmann W J, Dörken B, Moldenhauer G: Immunophenotypic similarities of mediastinal clear-cell lymphoma and sinusoidal (monocytoid) B cells. International Journal of Cancer, 43: 10-16(1989)

217. Möller P, Brüderlein S, Sträter J, Leithäuser 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. International Journal of Cancer, 92: 348-353(2001)

218. Monni R, Santos S C R, Mauchauffe M, Berger R, Ghysdael J, Gouilleux F, Gisselbrecht S, Bernard O, Penard-Lacronique V: The TEL-Jak2 oncoprotein induces Socs1 expression and altered cytokine response in Ba/F3 cells. Oncogene, 20: 849-858(2001)

219. Moriggl R, Topham D J, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster M Y, Bunting K D, Grosveld G C, Ihle J N: Stat5 Is Required for IL-2-Induced Cell Cycle Progression of Peripheral T Cells. Immunity, 10: 249-259(1999)

220. Morton L M, Wang S S, Devesa S S, Hartge P, Weisenburger D D, Linet M S: Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. Blood, 107: 265-276(2006)

221. Morton L M, Kim C J, Weiss L M, Bhatia K, Cockburn M, Hawes D, Wang S S, Chang C, Altekruse S F, Engels E A, Cozen W: Molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected patients in the pre-highly active antiretroviral therapy and pre-rituximab era. Leukemia & Lymphoma, 55: 551-557(2014)

222. Moser E C, Noordijk E M, van Leeuwen F E, Baars J W, Thomas J, Carde P, Meerwaldt J H, van Glabbeke M, Kluin-Nelemans H C: Risk of second cancer after treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma; an EORTC cohort study. Haematologica, 91: 1481-1488(2006 a)

223. Moser E C, Noordijk E M, van Leeuwen F E, le Cessie S, Baars J W, Thomas J, Carde P, Meerwaldt J H, van Glabbeke M, Kluin-Nelemans H C: Long-term risk of cardiovascular disease after treatment for aggressive non-Hodgkin lymphoma. Blood, 107: 2912-2919(2006 b)

224. Mottok A, Renné C, Seifert M, Oppermann E, Bechstein W, Hansmann M, Küppers R, Bräuninger 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)

225. Mottok A, Hung S S, Chavez E A, Woolcock B, Telenius A, Chong L C, Meissner B, Nakamura H, Rushton C, Viganò E, Sarkozy C, Gascoyne R D, Connors J M, Ben-Neriah S, Mungall A, Marra M A, Siebert R, Scott D W, Savage K J, Steidl C: Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. Blood, 134: 802-813(2019)

226. Mudie N Y, Swerdlow A J, Higgins C D, Smith P, Qiao Z, Hancock B W, Hoskin P J, Linch D C: Risk of Second Malignancy After Non-Hodgkin's Lymphoma: A British Cohort Study. Journal of Clinical Oncology, 24: 1568-1574(2006)

227. Mui A L, Wakao H, O'Farrell A M, Harada N, Miyajima A: Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. The EMBO Journal, 14: 1166-1175(1995)

228. Müller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur A G, Barbieri G, Witthuhn B A, Schindler C, Pellegrini S, Wilks A F, Ihle J N, Stark G R, Kerr l M: The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-α/β and -γ signal transduction. Nature, 366: 129-135(1993)

229. Murtagh B, Hammill S C, Gertz M A, Kyle R A, Tajik A J, Grogan M: Electrocardiographic findings in primary systemic amyloidosis and biopsy-proven cardiac involvement. American Journal of Cardiology, 95: 535-537(2005)

230. Myers M P, Andersen J N, Cheng A, Tremblay M L, Horvath C M, Parisien J, Salmeen A, Barford D, Tonks N K: TYK2 and JAK2 Are Substrates of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. Journal of Biological Chemistry, 276: 47771-47774(2001)

231. Nacheva E, Dyer M J, Metivier C, Jadayel D, Stranks G, Morilla R, Heward J M, Holloway T, O'Connor S, Bevan P C: B-cell non-Hodgkin's lymphoma cell line (Karpas 1106) with complex translocation involving 18q21.3 but lacking BCL2 rearrangement and expression. Blood, 84: 3422-3428(1994)

232. 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)

233. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, Seki E, Sato S, Takeuchi O, Takeda K, Akira S, Yamanishi K, Kawase I, Nakanishi K, Kishimoto T: SOCS-1 Participates in Negative Regulation of LPS Responses. Immunity, 17: 677-687(2002)

234. Nakajima H, Liu X, Wynshaw-Boris A, Rosenthal L A, Imada K, Finbloom D S, Hennighausen L, Leonard W J: An Indirect Effect of Stat5a in IL-2–Induced Proliferation: A Critical Role for Stat5a in IL-2–Mediated IL-2 Receptor α Chain Induction. Immunity, 7: 691-701(1997)

235. 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 13130-13134(1998)

236. Nasr S H, Preddie D C, Markowitz G S, Appel G B, D'Agati V D: Multiple myeloma, nephrotic syndrome and crystalloid inclusions in podocytes. Kidney International, 69: 616-620(2006)

237. Nasr S H, Valeri A M, Cornell L D, Fidler M E, Sethi S, D'Agati V D, Leung N: Renal Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease: A Report of 64 Patients from a Single Institution. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 7: 231-239(2012)

238. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: Gene [Internet] - SOCS1 Suppressor of Cytokine Signaling 1 [Homo sapiens (human)], Gene ID: 8651.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8651 (25.08.2021)

239. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: Protein [Internet] - SOCS1 Suppressor of Cytokine Signaling 1 [Homo sapiens (human)], NCBI Reference Sequence: NP_003736.1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003736.1 (25.08.2021)

240. Neitzel H: A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. Human Genetics, 73: 320-326(1986)

241. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K: Jak2 Deficiency Defines an Essential Developmental Checkpoint in Definitive Hematopoiesis. Cell, 93: 397-409(1998)

242. 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. The American Journal of Pathology, 174: 1921-1930(2009)

243. 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. The EMBO Journal, 18: 375-385(1999)

244. Noh K, Kim M, Kim Y, Kim H, Kim H, Byun J, Park Y, Lee H, Sil Lee Y, Choe J, Myeong Kim Y, Jeoung D: miR-122-SOCS1-JAK2 axis regulates allergic inflammation and allergic inflammation-promoted cellular interactions. Oncotarget, 8: 63155–63176(2017)

245. Nosaka T, van Deursen J M, Tripp R A, Thierfelder W E, Witthuhn B A, McMickle A P, Doherty P C, Grosveld G C, Ihle J N: Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. Science, 270: 800-802(1995)

246. Oshimo Y, Kuraoka K, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, Yasui W: Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. International Journal of Cancer, 112: 1003-1009(2004)

247. Palladini G, Campana C, Klersy C, Balduini A, Vadacca G, Perfetti V, Perlini S, Obici L, Ascari E, D'Eril G M, Moratti R, Merlini G: Serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide is a sensitive marker of myocardial dysfunction in AL amyloidosis. Circulation, 107: 2440-2445(2003)

248. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst H M, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta J J, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci M T, Orlowski R Z, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos M A, Durie B G M, Anderson K C, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar S V, Moreau P: Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. Journal of Clinical Oncology, 33: 2863-2869(2015)

249. Paoli D, Rizzo F, Fiore G, Pallotti F, Pulsoni A, Annechini G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L: Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. Human Reproduction, 31: 263-272(2015)

250. Pappa V I, Hussain H K, Reznek R H, Whelan J, Norton A J, Wilson A M, Love S, Lister T A, Rohatiner A Z: Role of image-guided core-needle biopsy in the management of patients with lymphoma. Journal of Clinical Oncology, 14: 2427-2430(1996)

251. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham D J, Marine J, Teglund S, Vanin E F, Bodner S, Colamonici O R, van Deursen J M, Grosveld G, Ihle J N: Jak2 Is Essential for Signaling through a Variety of Cytokine Receptors. Cell, 93: 385-395(1998)

252. Park C, Li S, Cha E, Schindler C: Immune Response in Stat2 Knockout Mice. Immunity, 13: 795-804(2000)

253. Park E S, Kim H, Suh J M, Park S J, Kwon O Y, Kim Y K, Ro H K, Cho B Y, Chung J, Shong M: Thyrotropin induces SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1) and SOCS-3 in FRTL-5 thyroid cells. Molecular Endocrinology, 14: 440-448(2000)

254. Park S Y, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Areas H, Hirayama N, Miyake K, Nakauchi H, Shirasawa T, Saito T: Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. Immunity, 3: 771-782(1995)

255. Pathak S, Grillo A R, Scarpa M, Brun P, D'Incà R, Nai L, Banerjee A, Cavallo D, Barzon L, Palù G, Sturniolo G C, Buda A, Castagliuolo I: MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. Experimental & Molecular Medicine, 47: 1-9(2015)

256. Paulli M, Sträter J, Gianelli U, Rousset M, Gambacorta M, Orlandi E, Klersy C, Lavabre-Bertrand T, Morra E, Manegold C, Lazzarino M, Magrini U, Möller P: Mediastinal B-cell lymphoma: A study of its histomorphologic spectrum based on 109 cases. Human Pathology, 30: 178-187(1999)

257. Perrone T, Frizzera G, Rosai J: Mediastinal diffuse large-cell lymphoma with sclerosis. A clinicopathologic study of 60 cases. The American Journal of Surgical Pathology, 10: 176-191(1986)

258. Pezet A, Favre H, Kelly P A, Edery M: Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. Journal of Biological Chemistry, 274: 24497-24502(1999)

259. Pfreundschuh M, Trümper L, Österborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani P, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M: CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. The Lancet Oncology, 7: 379-391(2006)

260. Pfreundschuh M, Ho A D, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, Belch A, Walewski J, Zinzani P L, Mingrone W, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Corrado C, Scheliga A, Loeffler M, Kuhnt E, MabThera International Trial (MInT) Group: Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. The Lancet Oncology, 9: 435-444(2008)

261. Philp J A C, Burdon T G, Watson C J: Differential activation of STATs 3 and 5 during mammary gland development. FEBS Letters, 396: 77-80(1996)

262. Pileri S A, Gaidano G, Zinzani P L, Falini B, Gaulard P, Zucca E, Pieri F, Berra E, Sabattini E, Ascani S, Piccioli M, Johnson P W, Giardini R, Pescarmona E, Novero D, Piccaluga P P, Marafioti T, Alonso M A, Cavalli F: Primary mediastinal B-call lymphoma: high frequency of BCL-6 mutations and consistent expression of the transcription factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the absence of immunoglobulins. The American Journal of Pathology, 162: 243-253(2003)

263. Pinkus G S, Said J W: Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular--a distinct entity? Unique staining profile for L&H variants of Reed-Sternberg cells defined by monoclonal antibodies to leukocyte common antigen, granulocyte-specific antigen, and B-cell-specific antigen. The American Journal of Pathology, 118: 1-6(1985)

264. Pinkus G S, Thomas P, Said J W: Leu-M1-- a marker for Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. An immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissues. The American Journal of Pathology, 119: 244-252(1985)

265. Poeschel V, Held G, Ziepert M, Witzens-Harig M, Holte H, Thurner L, Borchmann P, Viardot A, Soekler M, Keller U, Schmidt C, Truemper L, Mahlberg R, Marks R, Hoeffkes H, Metzner B, Dierlamm J, Frickhofen N, Haenel M, Neubauer A, Kneba M, Merli F, Tucci A, de Nully Brown P, Federico M, Lengfelder E, di Rocco A, Trappe R, Rosenwald A, Berdel C, Maisenhoelder M, Shpilberg O, Amam J, Christofyllakis K, Hartmann F, Murawski N, Stilgenbauer S, Nickelsen M, Wulf G, Glass B, Schmitz N, Altmann B, Loeffler M, Pfreundschuh M: Four versus six cycles of CHOP chemotherapy in combination with six applications of rituximab in patients with aggressive B-cell lymphoma with favourable prognosis (FLYER): a randomised, phase 3, non-inferiority trial. The Lancet, 394: 2271-2281(2019)

266. Powles T, Robinson D, Stebbing J, Shamash J, Nelson M, Gazzard B, Mandelia S, Møller H, Bower M: Highly Active Antiretroviral Therapy and the Incidence of Non–AIDS-Defining Cancers in People With HIV Infection. Journal of Clinical Oncology, 27: 884-890(2009)

267. Press O W, LeBlanc M, Lichter A S, Grogan T M, Unger J M, Wasserman T H, Gaynor E R, Peterson B A, Miller T P, Fisher R I: Phase III Randomized Intergroup Trial of Subtotal Lymphoid Irradiation Versus Doxorubicin, Vinblastine, and Subtotal

Lymphoid Irradiation for Stage IA to IIA Hodgkin's Disease. Journal of Clinical Oncology, 19: 4238-4244(2001)

268. Quock T P, Yan T, Chang E, Guthrie S, Broder M S: Epidemiology of AL amyloidosis: a real-world study using US claims data. Blood Advances, 2: 1046-1053(2018)

269. 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. British Journal of Cancer, 89: 524-532(2003)

270. Rajkumar S V, Dimopoulos M A, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson S Y, Caers J, Usmani S Z, Lahuerta J J, Johnsen H E, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle R A, Anderson K C, Durie B G M, Miguel J F S: International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. The Lancet Oncology, 15: e538-e548(2014)

271. Ram P A, Waxman D J: SOCS/CIS Protein Inhibition of Growth Hormone-stimulated STAT5 Signaling by Multiple Mechanisms. Journal of Biological Chemistry, 274: 35553-35561(1999)

272. Rane S G, Reddy E P: JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. Oncogene, 9: 2415-2423(1994)

273. Rapezzi C, Merlini G, Quarta C C, Riva L, Longhi S, Leone O, Salvi F, Ciliberti P, Pastorelli F, Biagini E, Coccolo F, Cooke R M, Bacchi-Reggiani L, Sangiorgi D, Ferlini A, Cavo M, Zamagni E, Fonte M L, Palladini G, Salinaro F, Musca F, Obici L, Branzi A, Perlini S: Systemic cardiac amyloidoses: disease profiles and clinical courses of the 3 main types. Circulation, 120: 1203-1212(2009)

274. Reddy A, Zhang J, Davis N S, Moffitt A B, Love C L, Waldrop A, Leppa S, Pasanen A, Meriranta L, Karjalainen-Lindsberg M L, Nørgaard P, Pedersen M, Gang A O, Høgdall E, Heavican T B, Lone W, Iqbal J, Qin Q, Li G, Kim S Y, Healy J, Richards K L, Fedoriw Y, Bernal-Mizrachi L, Koff J L, Staton A D, Flowers C R, Paltiel O, Goldschmidt N, Calaminici

M, Clear A, Gribben J, Nguyen E, Czader M B, Ondrejka S L, Collie A, Hsi E D, Tse E, Au-Yeung R K H, Kwong Y L, Srivastava G, Choi W W L, Evens A M, Pilichowska M, Sengar M, Reddy N, Li S, Chadburn A, Gordon L I, Jaffe E S, Levy S, Rempel R, Tzeng T, Happ L E, Dave T, Rajagopalan D, Datta J, Dunson D B, Dave S S: Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. Cell, 171: 481-494.e15(2017)

275. Reddy J, Shivapurkar N, Takahashi T, Parikh G, Stastny V, Echebiri C, Crumrine K, Zöchbauer-Müller S, Drach J, Zheng Y, Feng Z, Kroft S H, McKenna R W, Gazdar A F: Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. Oncogene, 24: 732-736(2005)

276. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein P G, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, Gaiolla R, Eng K, Brody J, Inghirami G, Carlo-Stella C, Santoro A, Rahal D, Totonchy J, Elemento O, Cesarman E, Roshal M: Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Blood, 125: 1061-1072(2015)

277. Reisinger J, Dubrey S W, Lavalley M, Skinner M, Falk R H: Electrophysiologic Abnormalities in AL (Primary) Amyloidosis With Cardiac Involvement. Journal of the American College of Cardiology, 30: 1046-1051(1997)

278. Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, Berger U, Telford N, Aruliah S, Yin J A, Vanstraelen D, Barker H F, Taylor P C, O'Driscoll A, Benedetti F, Rudolph C, Kolb H, Hochhaus A, Hehlmann R, Chase A, Cross N C P: The t(8;9)(p22;p24) Is a Recurrent Abnormality in Chronic and Acute Leukemia that Fuses PCM1 to JAK2. Cancer Research, 65: 2662-2667(2005)

279. Reithmeier A, Trenkwalder P, Kaess H, Lydtin H: Gastrointestinal amyloidosis in IgG-chi-light chain plasmacytoma. Diagnostic problems despite advanced changes. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 120: 641-645(1995)

280. Remmers E F, Plenge R M, Lee A T, Graham R R, Hom G, Behrens T W, de Bakker, Paul I W, Le J M, Lee H, Batliwalla F, Li W, Masters S L, Booty M G, Carulli J P, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen W V, Amos C I, Criswell L A, Seldin M F, Kastner D L, Gregersen P K: STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. The New England Journal of Medicine, 357: 977-986(2007)

281. Riccardi A, Gobbi P G, Ucci G, Bertoloni D, Luoni R, Rutigliano L, Ascari E: Changing clinical presentation of multiple myeloma. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 27: 1401-1405(1991)

282. Rieger M, Österborg A, Pettengell R, White D, Gill D, Walewski J, Kuhnt E, Loeffler M, Pfreundschuh M, Ho A D: Primary mediastinal B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: results of the Mabthera International Trial Group study. Annals of Oncology, 22: 664-670(2011)

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

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

285. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs gesamt, Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Auflage, Robert Koch-Institut, Berlin, S. 16-17(2019 a)

286. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Leukämien, Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Auflage, Robert Koch-Institut, Berlin, S. 134-137(2019 b)

287. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Morbus Hodgkin, Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Auflage, Robert Koch-Institut, Berlin, S. 122-125(2019 c)

288. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Multiples Myelom, Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Auflage, Robert Koch-Institut, Berlin, S. 130-133(2019 d)

289. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Non-Hodgkin-Lymphome, Krebs in Deutschland für 2015/2016, 12. Auflage, Robert Koch-Institut, Berlin, S. 126-129(2019 e)

290. Rodig S J, Meraz M A, White J M, Lampe P A, Riley J K, Arthur C D, King K L, Sheehan K C F, Yin L, Pennica D, Johnson E M, Schreiber R D: Disruption of the Jak1 Gene Demonstrates Obligatory and Nonredundant Roles of the Jaks in Cytokine-Induced Biologic Responses. Cell, 93: 373-383(1998)

291. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M: Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science, 234: 364-368(1986)

292. Rohatiner A Z, Whelan J S, Ganjoo R K, Norton A J, Wilson A, Lister T A: Mediastinal large-cell lymphoma with sclerosis (MLCLS). British Journal of Cancer, 69: 601-604(1994)

293. Rosenberg S A, Boiron M, DeVita V T, Johnson R E, Lee B J, Ultmann J E, Viamonte M: Report of the committee on Hodgkin's disease staging procedures. Cancer Research, 31: 1862-1863(1971)

294. Rosenwald A, Wright G, Chan W C, Connors J M, Campo E, Fisher R I, Gascoyne R D, Muller-Hermelink H, Smeland E B, Giltnane J M, Hurt E M, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson W H, Jaffe E S, Simon R, Klausner R D, Powell J, Duffey P L, Longo D L, Greiner T C, Weisenburger D D, Sanger W G, Dave B J, Lynch J C, Vose J, Armitage J O, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan T M, Miller T P, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt L M: The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. The New England Journal of Medicine, 346: 1937-1947(2002)

295. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne R D, Chan W C, Zhao T, Haioun C, Greiner T C: Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. Journal of Experimental Medicine, 198: 851-862(2003)

296. Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi F M, Zucchetto A, De Paoli L, Cresta S, Rasi S, Spina V, Franceschetti S, Lunghi M, Vendramin C, Bomben R, Ramponi A,

Monga G, Conconi A, Magnani C, Gattei V, Gaidano G: Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. British Journal of Haematology, 142: 202-215(2008)

297. 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)

298. Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou Y, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu K P: Regulation of NF-κB Signaling by Pin1-Dependent Prolyl Isomerization and Ubiquitin-Mediated Proteolysis of p65/RelA. Molecular Cell, 12: 1413-1426(2003)

299. Saper C B: A Guide to the Perplexed on the Specificity of Antibodies. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 57: 1-5(2009)

300. 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 to Cells, 4: 339-351(1999)

301. Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A: CIS3/SOCS-3 Suppresses Erythropoietin (EPO) Signaling by Binding the EPO Receptor and JAK2. Journal of Biological Chemistry, 275: 29338-29347(2000)

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

303. Schaadt M, Diehl V, Stein H, Fonatsch C, Kirchner H H: Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. International Journal of Cancer, 26: 723-731(1980)

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

305. Schindler C, Shuai K, Prezioso V R, Darnell J E: Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. Science, 257: 809-813(1992)

306. Schlüter G, Boinska D, Nieman-Seyde S: Evidence for Translational Repression of the SOCS-1 Major Open Reading Frame by an Upstream Open Reading Frame. Biochemical and Biophysical Research Communications, 268: 255-261(2000)

307. Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson P G: Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. The American Journal of Pathology, 139: 701-707(1991)

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

309. Schonbrunn A: Editorial: Antibody can get it right: confronting problems of antibody specificity and irreproducibility. Molecular Endocrinology, 28: 1403-1407(2014)

310. Schuhmacher B, Bein J, Rausch T, Benes V, Tousseyn T, Vornanen M, Ponzoni M, Thurner L, Gascoyne R, Steidl C, Küppers R, Hansmann M L, Hartmann S: JUNB, DUSP2, SGK1, SOCS1 and CREBBP are frequently mutated in T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma. Haematologica, 104: 330-337(2019)

311. Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V: Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg–Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. Nature, 299: 65-67(1982)

312. Schwarting R, Gerdes J, Durkop H, Falini B, Pileri S, Stein H: BER-H2: A New Anti-Ki-1 (CD30) Monoclonal Antibody Directed at a Formol-Resistant Epitope. Blood, 74: 1678-1689(1989)

313. Schweizer Institut für Bioinformatik SIB, Lausanne, Schweiz: ExPASy - Bioinformatics Resource Portal - Cellosaurus.
https://web.expasy.org/cellosaurus/ (25.01.2021)

314. Sehn L H, Scott D W, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, Connors J M, Gascoyne R D: Impact of Concordant and Discordant Bone Marrow Involvement on Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. Journal of Clinical Oncology, 29: 1452-1457(2011)

315. Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, Chen S: Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. Nature Biotechnology, 22: 1546-1553(2004)

316. Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, Iwahori K, Tachibana I, Takahashi T, Kumanogoh A, Kishimoto T, Naka T: Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells. Cancer Science, 104: 1483-1491(2013)

317. Shuai K, Schindler C, Prezioso V R, Darnell J E: Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. Science, 258: 1808-1812(1992)

318. Shuai K, Stark G R, Kerr I M, Darnell J E: A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. Science, 261: 1744-1746(1993)

319. Shuai K, Ziemiecki A, Wilks A F, Harpur A G, Sadowski H B, Gilman M Z, Darnell J E: Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. Nature, 366: 580-583(1993)

320. Shuai K, Horvath C M, Huang L H T, Qureshi S A, Cowburn D, Darnell J E: Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. Cell, 76: 821-828(1994)

321. Shugart Y Y, Hemminki K, Vaittinen P, Kingman A, Dong C: A genetic study of Hodgkin's lymphoma: an estimate of heritability and anticipation based on the familial cancer database in Sweden. Human Genetics, 106: 553-556(2000)

322. Sieniawski M, Reineke T, Nogova L, Josting A, Pfistner B, Diehl V, Engert A: Fertility in male patients with advanced Hodgkin lymphoma treated with BEACOPP: a report of the German Hodgkin Study Group (GHSG). Blood, 111: 71-76(2008)

323. Sigurdsson S, Nordmark G, Göring H H H, Lindroos K, Wiman A, Sturfelt G, Jönsen A, Rantapää-Dahlqvist S, Möller B, Kere J, Koskenmies S, Widén E, Eloranta M, Julkunen H, Kristjansdottir H, Steinsson K, Alm G, Rönnblom L, Syvänen A: Polymorphisms in the Tyrosine Kinase 2 and Interferon Regulatory Factor 5 Genes Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus. The American Journal of Human Genetics, 76: 528-537(2005)

324. Silvennoinen O, Ihle J N, Schlessinger J, Levy D E: Interferon-induced nuclear signalling by Jak protein tyrosine kinases. Nature, 366: 583-585(1993)

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

326. Slack G W, Steidl C, Sehn L H, Gascoyne R D: CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. British Journal of Haematology, 167: 608-617(2014)

327. Song M M, Shuai K: The Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but Not SOCS2 Proteins Inhibit Interferon-mediated Antiviral and Antiproliferative Activities. Journal of Biological Chemistry, 273: 35056-35062(1998)

328. Starr R, Willson T A, Viney E M, Murray L J L, 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)

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

330. Stein H, Mason D Y, Gerdes J, O'Connor N, Wainscoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K: 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)

331. Stein H, Pileri S A, Weiss L M, Poppema S, Gascoyne R D, Jaffe E S: Hodgkin lymphomas. In: Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Press, Lyon, S. 423-431(2017)

332. Strebovsky J, Walker P, Lang R, Dalpke A H: Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFκB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 25: 863-874(2011)

333. Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71: 209-249(2021)

334. Swerdlow A J, Douglas A J, Hudson G V, Hudson B V, Bennett M H, MacLennan K A: Risk of second primary cancers after Hodgkin's disease by type of treatment: analysis of 2846 patients in the British National Lymphoma Investigation. The BMJ : British Medical Journal, 304: 1137-1143(1992)

335. Swerdlow A J, Higgins C D, Smith P, Cunningham D, Hancock B W, Horwich A, Hoskin P J, Lister A, Radford J A, Rohatiner A Z, Linch D C: Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. ournal of the National Cancer Institute, 99: 206-214(2007)

336. Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J: Introduction to the WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow S H, Campo E, Harris N L, Jaffe E S, Pileri S A, Stein H, Thiele J (Hrsg) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues,

revised 4th edition, International Agency for Research on Cancer (IARC), IARC Press, Lyon, S. 13-14(2017)

337. Tada S, Iida M, Yao T, Kawakubo K, Yao T, Okada M, Fujishima M: Endoscopic features in amyloidosis of the small intestine: Clinical and morphologic differences between chemical types of amyloid protein. Gastrointestinal Endoscopy, 40: 45-50(1994)

338. Takahashi T, Shirasawa T: Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. FEBS Letters, 342: 124-128(1994)

339. Tal R, Botchan A, Hauser R, Yogev L, Paz G, Yavetz H: Follow-up of sperm concentration and motility in patients with lymphoma. Human Reproduction, 15: 1985-1988(2000)

340. Tanaka N, Asao H, Ohbo K, Ishii N, Takeshita T, Nakamura M, Sasaki H, Sugamura K: Physical association of JAK1 and JAK2 tyrosine kinases with the interleukin 2 receptor beta and gamma chains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 7271-7275(1994)

341. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen J M, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle J N: Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses. Cell, 93: 841-850(1998)

342. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. Blood, 89: 3909-3918(1997)

343. Thierfelder W E, van Deursen J M, Yamamoto K, Tripp R A, Sarawar S R, Carson R T, Sangster M Y, Vignali D A, Doherty P C, Grosveld G C, Ihle J N: Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. Nature, 382: 171-174(1996)

344. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, Penson A, Fortini E, Pettirossi V, Wang Y, Rosseto A, Venanzi A, Vlasevska S, Pacini R, Piattoni S, Tabarrini A, Pucciarini A, Bigerna B, Santi A, Gianni A M, Viviani S, Cabras A, Ascani S, Crescenzi B, Mecucci C, Pasqualucci L,

Rabadan R, Falini B: Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. Blood, 131: 2454-2465(2018)

345. Tiedemann R E, Gonzalez-Paz N, Kyle R A, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier S A, Chng W J, Ketterling R P, Gertz M A, Henderson K, Greipp P R, Dispenzieri A, Lacy M Q, Rajkumar S V, Bergsagel P L, Stewart A K, Fonseca R: Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. Leukemia, 22: 1044-1052(2008)

346. Tobelaim W S, Beaurivage C, Champagne A, Pomerleau V, Simoneau A, Chababi W, Yeganeh M, Thibault P, Klinck R, Carrier J C, Ferbeyre G, Ilangumaran S, Saucier C: Tumour-promoting role of SOCS1 in colorectal cancer cells. Scientific Reports, 5: 14301(2015)

347. Todeschini G, Ambrosetti A, Meneghini V, Pizzolo G, Menestrina F, Chilosi M, Benedetti F, Veneri D, Cetto G L, Perona G: Mediastinal large-B-cell lymphoma with sclerosis: a clinical study of 21 patients. Journal of Clinical Oncology, 8: 804-808(1990)

348. Tsimberidou A, O'Brien S, Khouri I, Giles F J, Kantarjian H M, Champlin R, Wen S, Do K, Smith S C, Lerner S, Freireich E J, Keating. M J: Clinical Outcomes and Prognostic Factors in Patients With Richter's Syndrome Treated With Chemotherapy or Chemoimmunotherapy With or Without Stem-Cell Transplantation. Journal of Clinical Oncology, 24: 2343-2351(2006)

349. Tward J D, Wendland M M M, Shrieve D C, Szabo A, Gaffney D K: The risk of secondary malignancies over 30 years after the treatment of non-Hodgkin lymphoma. Cancer, 107: 108-115(2006)

350. Udy G B, Towers R P, Snell R G, Wilkins R J, Park S, Ram P A, Waxman D J, Davey H W: Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 7239-7244(1997)

351. Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton D J, Silvennoinen O: Regulation of Jak2 through the Ubiquitin-Proteasome Pathway Involves Phosphorylation of Jak2 on Y1007 and Interaction with SOCS-1. Molecular and Cellular Biology, 22: 3316-3326(2002)

352. Ushmorov A, Ritz O, Hummel M, Leithäuser F, Möller P, Stein H, Wirth T: Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. Blood, 104: 3326-3334(2004)

353. Usmani S Z, Alsayed Y, Waheed S, Haider S, Restrepo A, Van Rhee F, Crowley J, Barlogie B, Heuck C, Mitchell A, Szymonifka J, Nair B, Hoering A: Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents. Haematologica, 97: 1761-1767(2012)

354. Van Nimwegen F A, Schaapveld M, Janus C P M, Krol A D G, Petersen E J, Raemaekers J M M, Kok W E M, Aleman B M P, van Leeuwen F E: Cardiovascular Disease After Hodgkin Lymphoma Treatment: 40-Year Disease Risk. Journal of the American Medical Association (JAMA) Internal Medicine, 175: 1007-1017(2015)

355. Varettoni M, Corso A, Pica G, Mangiacavalli S, Pascutto C, Lazzarino M: Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: a longitudinal study on 1003 consecutive patients. Annals of Oncology, 21: 325-330(2010)

356. Velazquez L, Fellous M, Stark G R, Pellegrini S: A protein tyrosine kinase in the interferon αβ signaling pathway. Cell, 70: 313-322(1992)

357. Verdier F, Chrétien 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. Journal of Biological Chemistry, 273: 28185-28190(1998)

358. Wagner K U, Krempler A, Triplett A A, Qi Y, George N M, Zhu J, Rui H: Impaired alveologenesis and maintenance of secretory mammary epithelial cells in Jak2 conditional knockout mice. Molecular and Cellular Biology, 24: 5510-5520(2004)

359. Wakao H, Gouilleux F, Groner B: Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. The EMBO Journal, 13: 2182-2191(1994)

360. Watanabe K, Yamashita Y, Nakayama A, Hasegawa Y, Kojima H, Nagasawa T, Mori N: Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed–Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. Histopathology, 36: 353-361(2000)

361. Watling D, Guschin D, Müller M, Silvennoinen O, Witthuhn B A, Quelle F W, Rogers N C, Schindler C, Stark G R, Ihle J N, Kerr l M: Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma; signal transduction pathway. Nature, 366: 166-170(1993)

362. Watson C J, Miller W R: Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. British Journal of Cancer, 71: 840-844(1995)

363. Weiss B M, Abadie J, Verma P, Howard R S, Kuehl W M: A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. Blood, 113: 5418-5422(2009)

364. Weiss B M, Lund S H, Bjorkholm M, Cohen A D, Dember L, Landgren O, Kristinsson S Y: Improved Survival in AL Amyloidosis: A Population-Based Study on 1,430 Patients Diagnosed in Sweden 1995-2013. Blood, 128: 4448(2016)

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

366. Wendtner C, Dreger P, Eichhorst B, Gregor M, Greil R, Hallek M, Knauf W U, Pritzkuleit R, Schetelig J, Staber P B, Wörmann B, Zenz T, Stilgenbauer S: onkopedia - Leitlinie Chronische lymphatische Leukämie (CLL) - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen. https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-lymphatische-leukaemie-cll/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

367. Weniger M A, Melzner I, Menz C K, Wegener S, Bucur A J, Dorsch K, Mattfeldt T, Barth T F, Möller 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)

368. Wilks A F: Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86: 1603-1607(1989)

369. Wilks A F, Harpur A G, Kurban R R, Ralph S J, Zürcher G, Ziemiecki A: Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. Molecular and Cellular Biology, 11: 2057-2065(1991)

370. Witthuhn B A, Quelle F W, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle J N: JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. Cell, 74: 227-236(1993)

371. Witthuhn B A, Silvennoinen O, Miura O, Lai K S, Cwik C, Liu E T, Ihle J N: Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. Nature, 370: 153-157(1994 a)

372. Witthuhn B A, Silvennoinen O, Miura O, Lai K S, Cwik C, Liu E T, Ihle J N: Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. Nature, 370: 153-157(1994 b)

373. Wörmann B, Driessen C, Einsele H, Goldschmidt H, Gunsilius E, Kortüm M, Kröger N, Ludwig H, Mügge L, Naumann R, Pritzkuleit R, Röllig C, Scheid C, Taverna C, Weisel K, Weißinger F: onkopedia - Leitlinie Multiples Myelom - Empfehlungen der Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen.
https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html (21.07.2021)

374. Xu-Monette Z Y, Tu M, Jabbar K J, Cao X, Tzankov A, Visco C, Cai Q, Montes-Moreno S, An Y, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards K L, Hsi E D, Choi W W L, van Krieken J H, Huh J, Ponzoni M, Ferreri A J M, Zhao X, Møller M B, Farnen J P, Winter J N, Piris M A, Miranda R N, Medeiros L J, Young K H: Clinical and biological significance

of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. Oncotarget, 6: (2015)

375. Yahalom J, Illidge T, Specht L, Hoppe R T, Li Y, Tsang R, Wirth A: Modern Radiation Therapy for Extranodal Lymphomas: Field and Dose Guidelines From the International Lymphoma Radiation Oncology Group. International Journal of Radiation Oncology - Biology - Physics, 92: 11-31(2015)

376. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Akasaka T, Tamaru J, Suzuki R, Kagami Y, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S: De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. Blood, 99: 815-821(2002)

377. Yamamoto K, Quelle F W, Thierfelder W E, Kreider B L, Gilbert D J, Jenkins N A, Copeland N G, Silvennoinen O, Ihle J N: Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. Molecular and Cellular Biology, 14: 4342-4349(1994)

378. Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, Miura O: SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor β2 subunit. Biochemical and Biophysical Research Communications, 310: 1188-1193(2003)

379. 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)

380. Yao R, Ma Y, Liang W, Li H, Ma Z, Yu X, Liao Y: MicroRNA-155 Modulates Treg and Th17 Cells Differentiation and Th17 Cell Function by Targeting SOCS1. Public Library of Science one PLoS 1, 7: e46082(2012)

381. 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. The EMBO Journal, 18: 1309-1320(1999)

382. Yin T, Tsang M L, Yang Y C: JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes. Journal of Biological Chemistry, 269: 26614-26617(1994)

383. Yoshikawa H, Matsubara K, Qian G, 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. Nature Genetics, 28: 29-35(2001)

384. Yoshimura A, Lodish H F: In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp130. Molecular and Cellular Biology, 12: 706-715(1992)

385. 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. The EMBO Journal, 14: 2816-2826(1995)

386. You M, Yu D H, Feng G S: Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. Molecular and Cellular Biology, 19: 2416-2424(1999)

387. Zeng Y, Takahashi H, Shibata M, Hirokawa K: JAK3 Janus kinase is involved in interleukin 7 signal pathway. FEBS Letters, 353: 289-293(1994)

388. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Bösartige Neubildungen der blutbildenden und lymphatischen Organe (C81–C96), Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Robert Koch-Institut, Berlin, S. 44-48(2016)

389. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Morbus Hodgkin (Hodgkin-Lymphom). https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Non-Hodgkin-Lymphome/non-hodgkin-lymphome_node.html (18.07.2021)

390. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Non-Hodgkin-Lymphome.

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Morbus%20Hodgkin/morbus%20hodgkin.html (13.07.2021)

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

392. Zhang X G, Klein B, Bataille R: Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma. Blood, 74: 11-13(1989)

393. Zhong Z, Wen Z, Darnell J E: Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 4806-4810(1994 a)

394. Zhong Z, Wen Z, Darnell J E: Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. Science, 264: 95-98(1994 b)

395. Zhou Z, Sehn L H, Rademaker A W, Gordon L I, LaCasce A S, Crosby-Thompson A, Vanderplas A, Zelenetz A D, Abel G A, Rodriguez M A, Nademanee A, Kaminski M S, Czuczman M S, Millenson M, Niland J, Gascoyne R D, Connors J M, Friedberg J W, Winter J N: An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. Blood, 123: 837-842(2014)

396. Zinzani P L, Martelli M, Poletti V, Vitolo U, Gobbi P G, Chisesi T, Barosi G, Ferreri A J, Marchetti M, Pimpinelli N, Tura S, Italian Society of Hematology, Italian Society of Experimental Hematology, Italian Group for Bone Marrow Transplantation: Practice guidelines for the management of extranodal non-Hodgkin's lymphomas of adult non-immunodeficient patients. Part I: primary lung and mediastinal lymphomas. A project of the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. Haematologica, 93: 1364-1371(2008)

397. Zong C S, Chan J, Levy D E, Horvath C, Sadowski H B, Wang L H: Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. Journal of Biological Chemistry, 275: 15099-15105(2000)

398. Zukerberg L R, Collins A B, Ferry J A, Harris N L: Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. The American Journal of Pathology, 139: 475-483(1991)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.