

Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

# **Das Immuncheckpointmolekül PD-L1 in aggressiven, c-MYC positiven B-Zell-Lymphomen**

Melanie Brugger

Vollständiger Abdruck der von Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ulrich Keller
2. Priv. Doz. Dr. Günter Schneider

Die Dissertation wurde am 14.01.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.05.2020 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Lymphome.....	2
2.1.1 B-Zell Reifung .....	3
2.1.2 MYC als physiologischer Regulator der Keimzentren .....	5
2.1.3 Rekurrente genetische Veränderungen der Lymphomagenese .....	6
2.1.4 Aggressive B-Zell-Lymphome: BL und DLBCL .....	7
2.1.5 Behandlungsstrategien aggressiver Lymphome .....	9
2.2 MYC.....	11
2.2.1 Das Proto-Onkogen <i>MYC</i> .....	11
2.2.2 MYC in aggressiven B-Zell-Lymphomen .....	12
2.2.3 Bedeutung von MYC für das Immunsystem.....	13
2.3 Immuncheckpointmoleküle.....	14
2.3.1 PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2.....	15
2.3.2 Regulation der <i>PD-L1</i> Expression.....	17
2.3.3 <i>PD-1</i> und <i>PD-L1</i> Expression in Lymphomen.....	19
2.3.4 PD-1/PD-L1 Blockade in der Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen .....	23
3 Problemstellung .....	25
4 Material .....	26
4.1 Chemikalien und Reagenzien .....	26
4.2 Ausrüstung.....	27
4.3 Verbrauchsmaterialien, Kits .....	28
4.4 Puffer .....	30
4.5 Medien.....	30
4.6 Enzyme .....	31

4.7	Plasmide, Primer, Guides, Konstrukte .....	32
4.8	Zelllinien und Bakterienstämme .....	34
4.9	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	35
4.10	Software und Websites .....	35
5	Methoden .....	37
5.1	Arbeiten mit Zellkulturen .....	37
5.1.1	Murine Lymphomzelllinien.....	37
5.1.2	Weitere verwendete Zelllinien.....	38
5.1.3	Kryokonservierung von Zellen .....	38
5.1.4	P493-6 Zelllinie mit tetrazyklinabhängiger Suppression von MYC .....	39
5.2	Gelelektrophorese .....	39
5.3	Klonierung von <i>Pd-11</i> bzw. <i>Pd-12</i> in den MSCV-IRES-GFP Vektor mittels <i>SLIC Cloning</i> .....	40
5.3.1	Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR): .....	41
5.3.2	Verdau des Vektors .....	41
5.3.3	Ligation mittels T4-Polymerase:.....	42
5.3.4	Transformation des Vektors in kompetente Bakterien .....	42
5.3.5	Kontrolle der Transformation: Colony-PCR und Sequenzierung .....	43
5.4	Transfektion von Phoenix- <i>Packaging</i> Cells.....	44
5.5	Transduktion von Lymphomzellen .....	45
5.6	Anreichern der transduzierten Zellen durch FACS.....	46
5.7	Knockout von <i>Pd-11</i> mittels CRISPR/Cas9 System .....	46
5.7.1	Design von Guide-RNAs .....	47
5.7.2	Herstellung von doppelsträngigen Guide-RNAs .....	47
5.7.3	Klonieren der Guide-RNAs in den lenti CRISPR v2 Vektor .....	47
5.7.4	Knockout des Zielgens in einer Zelllinie .....	48
5.7.5	gDNA Extraktion .....	48
5.7.6	INDEL-Sequenzierung .....	49
5.8	Quantifizierung der Genexpression mittels qPCR.....	49
5.8.1	Extraktion von RNA .....	49
5.8.2	Synthese von cDNA .....	50
5.8.3	qPCR .....	50
5.9	Durchflusszytometrie .....	51
5.9.1	Färbung von extrazellulären Proteinen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. .....	54
5.9.2	BrdU-Assay zur Analyse des Zellzyklus .....	54
5.9.3	AnnexinV/PI-Assay .....	55

5.10	Analyse von Genexpressionsdaten .....	56
5.11	Auswertung der Daten .....	56
5.11.1	Statistische Auswertungen .....	56
5.11.2	Grafische Darstellungen .....	56
6	Ergebnisse .....	57
6.1	Reduzierte Expression von Immuncheckpointmolekülen im murinen E $\mu$ -MYC Modell.....	57
6.2	Verringerte Expression von Immuncheckpointmolekülen wie <i>PD-L1</i> in humanen BL im Vergleich zu DLBCL.....	60
6.3	MYC reguliert die <i>PD-L1</i> Expression in der humanen MYC-induzierbaren Zelllinie P493-6.....	61
6.4	Etablierung eines <i>Pd-I1</i> Knockout-Modell.....	63
6.5	Etablierung eines murinen Pd-I1(+) B-Zell-Lymphom Modell.....	67
6.6	Pd-I1 hat keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von E $\mu$ -MYC Lymphomen in vitro.....	70
7	Diskussion.....	72
7.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	72
7.2	Vermehrte <i>MYC</i> Expression im B-Zell-Lymphom ist assoziiert mit einer verminderten <i>PD-L1</i> Expression .....	72
7.2.1	Limitationen der eigenen Methodik: Messung der Genexpression .....	72
7.2.2	Zusammenhang zwischen <i>MYC</i> und <i>PD-L1</i> in anderen Studien .....	74
7.2.3	Klinische Bedeutung der Studienergebnisse.....	77
7.3	Etablierung von murinen Lymphomzelllinien mit aberranter <i>Pd-I1</i> Genexpression .....	79
7.3.1	Limitation der eigenen Methodik: retrovirale Transduktion und CRISPR/Cas9 .....	79
7.3.2	Auswirkungen der <i>PD-L1</i> Expression auf den Krankheitsverlauf von Lymphomen in anderen Studien .....	81
7.3.3	Klinische Bedeutung der Studienergebnisse.....	83
7.4	Schlussfolgerungen .....	85
8	Danksagung .....	86
9	Anhang.....	87
10	Literaturverzeichnis.....	92



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die PD-1 / PD-L1/PD-L2 Achse.....	16
Abbildung 2: Expression von Immuncheckpointmolekülen im E $\mu$ -MYC Modell.....	58
Abbildung 3: Pd-I1 Oberflächenexpression im primären E $\mu$ -MYC Lymphom .....	59
Abbildung 4: Immuncheckpointmoleküle in humanen B-Zell-Lymphomen.....	60
Abbildung 5: <i>PD-L1</i> mRNA Expression in Abhängigkeit von MYC in der MYC-induzierbaren Lymphomzelllinie P493-6 .....	62
Abbildung 6: Regulation der <i>PD-L1</i> mRNA Expression in der MYC-induzierbaren Lymphomzelllinie P493-6.....	63
Abbildung 7: Ablauf des <i>Pd-I1</i> Knockouts mittels CRISPR/Cas9.....	64
Abbildung 8: <i>Pd-I1</i> Knockout mittels CRISPR/Cas9 System in der murinen Lymphomzelllinie A20 .....	65
Abbildung 9: Ergebnisse der INDEL-Sequenzierung von gDNA aus A20 Zellen mit <i>Pd-I1</i> Knockout durch Guide 1 .....	67
Abbildung 10: Pd-I1 Oberflächenexpression diverser Lymphomzelllinien.....	68
Abbildung 11: Etablierung von Lymphomzelllinien mit ektopter <i>Pd-I1</i> Expression.....	69
Abbildung 12: Analyse der generierten Pd-I1(+) Zelllinien hinsichtlich Proliferation und Apoptose.....	71
Abbildung 13: MSCV-IRES-GFP Vektor .....	90
Abbildung 14: lenti CRISPR v2 Vektor .....	90
Abbildung 15: <i>Pd-I2</i> Expression generierter Lymphomzelllinien.....	91



# Abkürzungsverzeichnis

ABC DLBCL	<i>activated B-cell like</i> diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AITL	angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom
ALCL	anaplastisches großzelliges Lymphom
ALL	akute lymphatische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ASCT	Autologe Stammzelltransplantation
ATLL	adulte T-Zell Leukämie
BCR	B-Zell-Rezeptor
BET	<i>bromodomain and extra-terminal motif</i>
BL	Burkitt's Lymphom
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CRISPR	<i>clustered regulatory interspaced short palindromic repeats</i>
CTCL	kutanen T-Zell Lymphom
Ct-Wert	<i>cycle of threshold</i> Wert
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
E-Box	Enhancer Box Sequenz
EBV	Eppstein Barr Virus
FACS	<i>fluorochrome activated cell sorting</i>
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FL	Follikuläres Lymphom
FS	<i>forward scatter</i> der Durchflusszytometrie
GCB DLBCL	<i>germinal center B-cell like</i> diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HGBCL	<i>high grade B-cell lymphoma</i>
HL	Hodgkin Lymphom
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IFNg	Interferon g
Ig	Immunglobulin
IL 10	Interleukin 10
IPI-Score	<i>International Prognostic Index Score</i>
LBCL	großzelliges B-Zell-Lymphom
MCL	Mantelzell Lymphom
ME	<i>Microenvironment</i> , Mikroumgebung des Tumors
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHL	Non-Hogkin Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NOS	nicht weiter klassifiziert
ORR	<i>overall response rate</i> , Ansprechrate
OS	<i>overall survival</i> , Gesamtüberleben

PBL	Plasmablastisches Lymphom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death 1 ligand 1
PD-L2	programmed cell death 1 ligand 2
PI	Propidiumiodid, Lebend-Tot-Farbstoff
PL	plasmablastisches Lymphom
PMBL	primär mediastinales B-Zell-Lymphom
PTCL	peripheres T-Zell-Lymphom
PTLD	Posttransplantation Lymphoproliferative Erkrankung
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R-CHOP	Rituximab-CHOP
RT	reverse Transkription
SHM	somatische Hypermutation
SS	<i>sideward</i> der Durchflusszytometrie
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
WHO	Weltgesundheitsorganisation

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Costimulatorische und inhibitorische Immuncheckpointmoleküle .....	15
Tabelle 2: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 in BL und DLBCL.....	19
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien .....	26
Tabelle 4: Ausrüstung .....	27
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 6: Kits.....	29
Tabelle 7: Puffer .....	30
Tabelle 8: Medien .....	30
Tabelle 9: Enzyme .....	31
Tabelle 10: Puffer .....	31
Tabelle 11: Standards .....	31
Tabelle 12: Plasmide .....	32
Tabelle 13: Primer .....	32
Tabelle 14: Oligonukleotide.....	33
Tabelle 15: Konstrukte .....	33
Tabelle 16: Zelllinien.....	34
Tabelle 17: Bakterienstämme.....	34
Tabelle 18: Antikörper der Durchflusszytometrie .....	35
Tabelle 19: Software .....	35
Tabelle 20: Websites .....	36
Tabelle 21: Pipettierschema PCR mit Pfu-Polymerase.....	41
Tabelle 22: Temperaturprofil Gradienten-PCR.....	41
Tabelle 23: Pipettierschema Ligation mittels T4-Polymerase .....	42
Tabelle 24: Pipettierschema Colony-PCR mittels Taq-Polymerase.....	43
Tabelle 25: Temperaturverlauf Colony-PCR .....	44
Tabelle 26: Pipettierschema Golden Gate Cloning .....	48
Tabelle 27: Temperaturverlauf Golden Gate Reaktion .....	48
Tabelle 28: Pipettierschema cDNA Synthese .....	50
Tabelle 29: Temperaturverlauf cDNA-Synthese.....	50
Tabelle 30: Pipettierschema Mastermix qPCR .....	50
Tabelle 31: Temperaturverlauf qPCR .....	51
Tabelle 32: Verwendete Fluorochrome und ihre Eigenschaften .....	52
Tabelle 33: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 in diversen Lymphomentitäten .....	87
Tabelle 34: Korrelation der Expression von <i>MYC</i> und Immuncheckpointmolekülen ....	91
Tabelle 35: Anreicherung von GFP(+) Lymphomzellen mittels FACS-Sorting .....	91



# 1 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor MYC spielt in der Pathogenese von aggressiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen eine entscheidende Rolle und trägt zu vielen Charakteristika von Krebszellen – wie beispielsweise der Unabhängigkeit von Wachstumssignalen sowie einem starken Replikationspotential der Zellen – bei. Ein weiteres Schlüsselmerkmal von Krebszellen ist die Fähigkeit, einer gegen sie gerichteten, körpereigenen Immunantwort zu entgehen, unter anderem indem sie Immuncheckpointmoleküle wie PD-L1 auf ihrer Oberfläche präsentieren. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, inwiefern MYC-positive B-Zell-Lymphome Immuncheckpointmoleküle exprimieren. Dafür wurden zunächst Expressionsdaten aus diversen Microarrays von murinen sowie humanen Proben hinsichtlich der mRNA-Expression von Immuncheckpointmolekülen und MYC untersucht. Anschließend wurde der Zusammenhang in vitro und an Hand von Primärmaterial von E $\mu$ -MYC Lymphomen überprüft. Zuletzt wurden mittels retroviraler Transduktion murine Lymphomzelllinien mit aberranter *Pd-11* Expression generiert, welche zukünftig für weitere funktionelle Studien verwendet werden können. Es konnte gezeigt werden, dass murine E $\mu$ -MYC Lymphome sowie humane Lymphome mit hoher Expression von MYC auf mRNA Ebene mit einer insgesamt verminderten Expression von Immuncheckpointmolekülen insbesondere auch von *PD-L1* assoziiert waren, wobei sich keine signifikante negative Korrelation für MYC und PD-L1 errechnen ließ. In der MYC-induzierbaren humanen Zelllinie P493-6 führte das Ausschalten von MYC nach 48h zu einer signifikanten Zunahme der *PD-L1* mRNA um das 2,7-fache. Wir liefern damit Hinweise darauf, dass in MYC(+), aggressiven B-Zell-Lymphomen die Präsentation von PD-L1 auf der Zelloberfläche nicht maßgeblich zum Immun-Escape beiträgt. Gerade im Hinblick auf zum Teil widersprüchliche neuere Publikationen muss der Zusammenhang zwischen MYC und PD-L1 dringend tiefer in den verschiedenen Lymphomentitäten beleuchtet werden. Dadurch kann auch geklärt werden, inwiefern Lymphome mit hohem MYC-Level sich besonders für eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren wie anti-PD-L1 oder anti-PD-1 eignen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Lymphome

Lymphome sind eine heterogene Gruppe von hämatologischen Krebserkrankungen, welche durch maligne Transformation aus B- oder T-Lymphozyten sowie Natürlichen Killer (NK)-Zellen entstehen. Es werden Hodgkin-Lymphome (HL) von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) unterschieden, welche wiederum in verschiedene Entitäten eingeteilt werden können. Lymphome sind in Deutschland eher seltene Krebserkrankungen. 2014 waren NHL für Männer die 8. bzw. für Frauen die 7. häufigste Tumormanifestation der Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Dabei stellt sich die Gruppe der sogenannten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome als die häufigste Entität innerhalb der Lymphome dar. Laut Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut lag die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr) für die NHL in Deutschland im Jahr 2014 für Männer bei 8850 und für Frauen bei 7800. Insgesamt nimmt die Inzidenz altersadjustiert seit den letzten 40 Jahren kontinuierlich zu, wobei die Mortalität in diesem Zeitraum durch verbesserte Therapien abgenommen hat. (Barnes B 2016)

Die einzelnen Lymphomentitäten weisen nicht nur klinische, sondern auch pathophysiologisch große Unterschiede auf. Auf Grund der Heterogenität der Lymphome liegt der Fokus dieser Arbeit auf den aggressiven B-Zell-Lymphomen, andere Lymphome werden nur am Rande erwähnt.

Den verschiedenen Entitäten der B-Zell-Lymphome kann gemäß der normalen B-Zell-Reifung zumeist eine physiologisch entsprechende Entwicklungsstufe zugeordnet werden. Dabei kann eine maligne Entartung prinzipiell während jeder B-Zell-Reifungsstufe stattfinden. Dem klinischen Bild nach lassen sich Lymphome in indolente und aggressive Formen einteilen. Indolente B-Zell-NHL zeichnen sich durch einen über Jahre chronisch-progredienten Verlauf aus. Sie sind in der Regel nicht heilbar. Beispiele für indolente NHL sind die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL) oder das Follikuläre Lymphom (FL). Im Gegensatz dazu zeigen aggressive NHL oft einen rapiden Verlauf. Aggressive

B-Zell-Lymphome sind prinzipiell mittels Chemo-Immuntherapien heilbar (siehe Abschnitt 2.1.5). Die Lymphomzellen aggressiver NHL weisen Merkmale von B-Zellen auf, welche gerade das Keimzentrum der Lymphfollikel durchlaufen. Sie werden daher auch Keimzentrums-Lymphome genannt. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) stellt dabei die häufigste Form der aggressiven NHL dar. Des Weiteren gehören das Burkitt Lymphom (BL) oder das Mantelzell Lymphom (MCL) dazu. Da durch verbesserte molekularpathologischen Methoden eine immer genauere Einteilung in Subtypen erfolgen kann, wurde die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erstellte Klassifikation der Lymphome immer wieder und zuletzt 2016 erneut überarbeitet. (Swerdlow et al. 2016)

### **2.1.1 B-Zell Reifung**

B-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) der lymphoiden Linie im Knochenmark. Diese lymphoiden Progenitorzellen sind Vorläuferzellen sowohl der B- als auch der T-Zellen und NK-Zellen. Über die Zwischenstufen von pro-B-Zelle und prä-B-Zelle entstehen unreife B-Zellen, welche jeweils einen antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor tragen und das Knochenmark in Richtung der sekundären lymphatischen Organe verlassen. Die Differenzierung der Vorläuferzellen wird sowohl durch membrangebundene Rezeptormoleküle auf Stromazellen (z.B. FLT3-Ligand) als auch durch sezernierte lösliche Faktoren (z.B. Interleukin-7) der Knochenmark-Nische reguliert. (Murphy 2012, S.276-278)

Während der Entwicklung von pro-B-Zellen zu unreifen B-Zellen im Knochenmark kommt es antigenunabhängig durch Umlagerungen der Immunglobulin-Gene (Ig-Gene) zu der Bildung des B-Zell-Rezeptors (BCR). Die durch Kombination verschiedener variabler Gensegmente entstandenen Varianten des BCR bilden die Grundlage für die Antikörpervielfalt der humoralen Immunantwort. Zunächst erfolgt die Umlagerung des Locus der schweren Immunglobulinkette (IgH Locus). Nach erfolgreicher Umlagerung der schweren Kette kann diese als ein Teil des prä-B-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wodurch aus der pro-B-Zelle eine prä-B-Zelle entstanden ist. Nach einigen Runden der Zellteilung entsteht aus jeder

Zelle eine Population aus prä-B-Zellen, welche nun mit Umlagerungen des Locus der leichten Immunglobulinkette (IgL Locus) beginnen. Nach erfolgreicher Umlagerung der leichten Kette können vollständige IgM-Moleküle an der Oberfläche präsentiert werden, man spricht ab jetzt von unreifen B-Zellen. Um die B-Zell-Population auf autoreaktive B-Zell-Rezeptoren zu überprüfen, findet ein Selektionsprozess statt: nur B-Zellen, deren Rezeptor niedrige Affinität zu körpereigenen Antigenen zeigt, können das Knochenmark zu den sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten verlassen. (Murphy 2012, S. 278-290)

Trifft eine unreife, Antigen-naive B-Zelle in den sekundär lymphatischen Organen auf ihr passendes Antigen, wird dieses am BCR gebunden, internalisiert, prozessiert und auf *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Damit die B-Zelle zu proliferieren und zu differenzieren beginnt, muss sie zusätzlich mit einer bereits aktivierten antigenspezifischen T-Helferzelle interagieren. Dabei spielt nicht nur die Ligation des MCH Klasse II Moleküls mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Helferzelle eine Rolle, sondern auch Interaktionen zwischen weiteren costimulatorischen Rezeptormolekülen wie z.B. CD40 mit dem Ligand CD40L oder von T-Zellen sezernierte Zytokine (Murphy 2012, S. 389-392). Nach erfolgreicher Aktivierung der B-Zellen wandern diese in die Lymphfollikel, um dort ein Keimzentrum zu bilden. Hier findet in der dunklen Zone des Keimzentrums der Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) zur Herstellung hochaffiner Antikörper statt. Dabei werden mit Hilfe des Enzyms *activation-induced cytidine deaminase* (AID) Punktmutationen in den variablen Abschnitt der Ig-Gene der Zentroblasten eingefügt. Zusätzlich findet im Keimzentrum auch der Klassenwechsel der Ig-Schwerketten statt, wodurch neben den zuerst produzierten IgM und IgD auch Antikörper der Klassen G und A sezerniert werden können. Diese physiologisch stattfindenden Veränderungen im Genom der B-Zelle ermöglichen eine äußerst spezifische Immunantwort gegen diverse Erreger, allerdings bergen sie zugleich die Gefahr, dass genetische Aberrationen außerhalb der vorgesehenen Gene stattfinden und zur malignen Transformation führen können. (Murphy 2012, S. 396-401)

SHM und Klassenwechsel der Antikörper finden in der dunklen Zone der Keimzentren statt. In der hellen Zone kommt es zur Selektion der entstandenen Zentrozyten. Nur die Zentrozyten deren Rezeptor weiterhin eine hohe Affinität zum Antigen hat überleben, die restlichen Zellen werden von Makrophagen abgebaut. Dabei wandern die B-Zellen mehrmals zwischen dunkler und heller Zone hin und her und durchlaufen so mehrere Zyklen der SHM zur Verbesserung der Antigenaffinität. (Murphy 2012, S. 396-401)

Zentrozyten differenzieren sich weiter zu Antikörper produzierenden Plasmazellen, welche sich sowohl in sekundär lymphatischen Organen als auch im Knochenmark ansiedeln. Eine weitere Population der Zentrozyten differenziert sich in B-Gedächtniszellen, welche bei Reaktivierung des bekämpften Antigens erneut eine Immunantwort auslösen können. (Murphy 2012, S.402-404)

### **2.1.2 MYC als physiologischer Regulator der Keimzentren**

Die Keimzentrumsreaktion unterliegt der Kontrolle von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. So ist der Transkriptionsfaktor c-MYC (MYC), der von dem Gen *MYC* codiert wird, in Zellen der hellen Zone der Keimzentren sowie in Zellen vor Eintritt in das Keimzentrum aktiv, allerdings nicht in den stark proliferierenden Zellen der dunklen Zone. MYC ist dabei essentiell für die Formierung der Keimzentren nach Interaktion der aktivierten B-Zelle mit der entsprechenden T-Zelle. Nach Eintritt der Zellen in das Keimzentrum erfolgt eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors *BCL6*, welcher *MYC* inhibiert. *BCL6* ist einer der wichtigsten Regulatoren der Keimzentrumsreaktion in der dunklen Zone: die Expression von *BCL6* verhindert die weitere Differenzierung der Zentroblasten, ermöglicht die SHM und die Klassenwechsel-Reaktion in der dunklen Zone und schaltet DNA-Reparaturmechanismen ab. Nach Durchlaufen der dunklen Zone kommt es durch Expression von *IRF4* und verminderter Expression von *BCL6* in einigen Zellen der hellen Zone wieder zu verstärkter *MYC*-Expression, wobei auch dieser Vorgang abhängig von Antigen- und T-Zell-Kontakt ist. Diese MYC(+) Zellen der hellen Zone entsprechen laut Modell B-Zellen mit hochaffinen B-Zell-Rezeptoren, die anschließend wieder in die dunkle Zone eintreten, um

erneut eine Runde der SHM zu durchlaufen. Die MYC(-) Zellen der hellen Zone verlassen wohl das Keimzentrum und reifen zu Gedächtniszellen oder über Induktion von BLIMP1 zu Plasmazellen heran. (Calado et al. 2012; Dominguez-Sola et al. 2012; Pasqualucci and Dalla-Favera 2015)

### **2.1.3 Rekurrente genetische Veränderungen der Lymphomagenese**

Im Laufe der B-Zell-Entwicklung können inhibierende Mutationen von Tumorsuppressorgenen sowie aktivierende Mutationen von Proto-Onkogenen zur malignen Transformation von B-Zellen führen. Diese genetischen Veränderungen resultieren z.B. in gesteigerter Proliferation, Apoptoseresistenz oder in einem Differenzierungsblock in der betroffenen Zelle. Dabei zeigen verschiedene Lymphome genetische Veränderungen, die oft charakteristisch für den jeweiligen Subtyp sind und damit die Möglichkeit für zielgerichtete Therapieoptionen bieten.

Es ist bekannt, dass diese genetischen Aberrationen häufig aus den Umlagerungsvorgängen der Ig-Gene im Knochenmark sowie später im Keimzentrum resultieren. Fehlgesteuerte Translokationen können einerseits zu Bildung von Fusionsgenen (z.B. das BCR-ABL Fusionsprotein der chronischmyeloischen Leukämie) oder andererseits zu Störungen der Regulation der Genexpression führen. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.11)

Die Fehlregulation der Genexpression in Folge einer Translokation ist ein häufig zu beobachtender Mechanismus in der Lymphomentstehung. Ein Proto-Onkogen wie z.B. *MYC* wird durch eine Translokation unter den Einfluss eines regulierenden DNA-Abschnitts, z.B. ein Promotor oder Enhancer der Ig-Gene, gebracht. Es kommt zu einer verstärkten Expression des Onkogens, welches physiologischerweise nicht oder nicht in der jeweiligen Differenzierungsstufe der Zelle exprimiert wird. Neben *MYC* sind z.B. auch das anti-apoptotische Protein *BCL-2* oder der Keimzentrumsregulator *BCL-6* häufige Partner einer Translokation. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.11, 13-14)

Zudem können im Keimzentrum Punktmutationen, welche normalerweise während der SHM nur in Genen der variablen Immunglobulin-domänen vorkommen, auch in anderen Genen eingefügt werden. Dies kann durch

Aktivierung von Onkogenen oder Abschalten von Tumorsuppressorgenen ebenso die Tumorentstehung begünstigen (Pasqualucci et al. 2001).

#### **2.1.4 Aggressive B-Zell-Lymphome: BL und DLBCL**

Zwei wichtige Subtypen der aggressiven B-NHL sollen hier näher betrachtet werden. Das BL und das DLBCL zeigen histologische sowie genetische Überlappungen. Erst seit der Erarbeitung einer molekularen Signatur des Genexpressionsprofils der beiden Entitäten lassen sich diese besser voneinander abgrenzen. Zudem existieren Zwischenformen, welche in der 2016 veröffentlichten Überarbeitung der WHO Klassifikation von 2008 als "*High-grade B-cell lymphomas (HGBCL), with and without MYC and BCL-2 or BCL-6 translocations*" im Sinne von *double hit* oder *triple hit* Lymphomen klassifiziert werden. (Swerdlow et al. 2016)

##### Burkitt's Lymphom (BL):

Das BL tritt in drei Varianten auf, die zwar histologisch ein ähnliches Bild bieten, klinisch sowie genetisch aber deutliche Unterschiede zeigen: eine endemische Form, eine mit HIV und Immunsuppression assoziierte Form sowie eine sporadisch auftretende Form.

Die endemische Form tritt vor allem bei Kindern in Afrika auf und ist für 30 - 50% aller pädiatrischen Krebserkrankungen in Äquatorialafrika verantwortlich (Magrath 2012). Das aggressive BL wächst hier häufig invasiv als Tumormasse in den Knochen des Gesichtsschädels, seltener treten abdominelle Manifestationen auf (Burkitt 1958). Schon in den 1970er Jahren wurde eine Koinfektion der B-Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (De-The 1979) sowie die Überlappung des Verbreitungsgebietes des BL mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (Kafuko and Burkitt 1970) festgestellt, welche beide eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen.

Im Gegensatz dazu zeigt die sporadische Form des BL einen weniger invasiven Befall der Knochen. Das sporadische BL präsentiert sich klinisch häufig als abdominelle Tumormasse und ist ebenfalls vor allem als pädiatrische Erkrankung von Bedeutung. Bei Erwachsenen in Westeuropa tritt das BL selten auf und macht nur etwa 1-2% aller B-NHL aus. Die sporadische Form zeigt

sich je nach Region in circa 30% der Fälle mit EBV assoziiert. (Swerdlow et al. 2016)

Für alle Formen des BL sind Translokationen des *MYC* Gens charakteristisch (Dalla-Favera et al. 1982). Dabei kommt am häufigsten die Translokation t(8;14) vor, welche *MYC* unter die Kontrolle des Enhancers des *IgH*-Gens bringt, seltener sind die Translokationen t(2;8) oder t(8;22) (Taub et al. 1982). Ferner wurde gezeigt, dass die Bruchpunkte der jeweiligen Translokationen für jede der Formen des BL spezifisch sind (Neri et al. 1988), was einen Hinweis auf die unterschiedliche Pathogenese der verschiedenen Varianten des BL gibt.

Neben den typischen Translokationen des *MYC*-Gens sind gehäuft weitere genetische Aberrationen wie z.B Mutationen in *MYC* oder bei bis zu 30% aller BL Mutationen in *TP53* (Gaidano et al. 1991) beschrieben. Trotzdem zeigt das BL insgesamt einen weniger komplexen Karyotyp als das DLBCL.

Anhand von Daten aus Genexpressionsanalysen wird angenommen, dass das BL aus Zellen der Keimzentren entsteht. Dabei entspricht das Transkriptionsprofil des BL vermutlich B-Zellen aus der dunklen Zone der Keimzentren, während DLBCL eher das Transkriptionsprofil von Zellen aus der hellen Zone besitzen. (Victoria et al. 2012)

#### Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL):

Das DLBCL ist mit circa 25% die häufigste Form der NHL bei Erwachsenen (Swerdlow et al. 2016). DLBCL können *de novo* entstehen oder sich aus indolenten Lymphomen wie z.B. dem FL entwickeln. Klinisch präsentieren sich die DLBCL häufig als schmerzlose Lymphknotenschwellungen, z.B. zervikal oder supraklavikulär. Seltener sind extranodale Manifestationen wie die Manifestation im Knochenmark oder im Gastrointestinaltrakt. Prinzipiell können alle Organe betroffen sein, inklusive des zentralen Nervensystems. Etwa die Hälfte der Patienten zeigt bei Diagnosestellung bereits einen ausgedehnten Befund mit Befall weiterer Lymphknoten oder extranodaler Strukturen. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S. 81-82)

Es erfolgt eine Unterteilung der DLBCL in *Germinal Center B-Cell like* DLBCL (GCB DLBCL) und *Activated B-Cell like* DLBCL (ABC DLBCL), wobei das ABC

DLBCL den prognostisch etwas ungünstigeren Subtyp darstellt, da das ABC DLBCL oft nicht auf die standardmäßig durchgeführte Chemotherapie anspricht. Die beiden Formen der DLBCL lassen sich zuverlässig durch Genexpressionsanalysen unterscheiden, die immunhistochemische Klassifizierung ist dagegen oft nicht sicher möglich (Young et al. 2015).

Analysen durch *Next Generation Sequencing* haben genetische Veränderungen gezeigt, welche in beiden DLBCL Typen häufig auftreten, wie z.B. Mutationen in den Genen *TP53* und *BCL-6*. ABC DLBCL besitzen dazu häufig Mutationen, welche zu chronischer Aktivierung von BCR-, Toll Like Rezeptor- und NFkB-Signalwegen führen (z.B. in den Genen *MYD88*, *CD79A*, *CARD11*, *TNFAIP3*). GCB DLBCL hingegen zeigen häufig Translokationen von *BCL-2* und *MYC* sowie aktivierende Mutationen des *EZH2*-Gens, welches physiologisch vorübergehend die weitere Differenzierung von B-Zellen im Keimzentrum unterdrückt. Damit einhergehend ist die Hypothese, dass GCB DLBCL aus B-Zellen in der hellen Zone der Keimzentren entstehen, welche hoch proliferativ sind und in denen SHM aktiv ist. ABC DLBCL sollen aus B-Zellen entstehen, welche bereits die SHM abgeschlossen haben und im Begriff sind sich weiter zu differenzieren. Die unterschiedliche Biologie der ABC und GCB DLBCL machen auch verständlich, wieso in Zukunft an unterschiedlichen therapeutischen Ansätzen bei der Behandlung gearbeitet werden muss. (Pasqualucci and Dalla-Favera 2015)

### **2.1.5 Behandlungsstrategien aggressiver Lymphome**

Aggressive NHL können unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tode führen. Allerdings sprechen sie im Gegensatz zu den indolenten Lymphomen sehr gut auf eine Chemotherapie an. Vollständige Remissionen sind sehr häufig, weshalb bei jedem Patienten zunächst eine Indikation zur kurativen Therapie gestellt werden kann. Hinzu kommen neben Chemo- und ggfs. Strahlentherapie auch unterstützende Behandlungsmaßnahmen wie Antibiotikaphylaxe, die Prophylaxe von Infektionen mit *Pneumocystis carinii* sowie die Gabe des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor zur Verkürzung der Neutropeniedauer nach der Chemotherapie hinzu. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.82-94)

Zur Therapieentscheidung bei DLBCL werden die Patienten in Risikogruppen nach dem *International Prognostic Index Score* (IPI-Score) eingeteilt, welcher Parameter wie LDH-Wert im Serum, Allgemeinzustand, Alter über 60 Jahre, Ausbreitung der Krankheit anhand des Ann Arbor Stadiums sowie extranodale Manifestationen berücksichtigt. Dabei spielt das Alter eine besonders wichtige Rolle, da Patienten über 60 Jahre auch IPI-Score-adaptiert eine deutlich schlechtere Prognose des Gesamtüberlebens zeigen. Hinzu kommt, dass sehr alte Patienten auf Grund von Komorbiditäten eine intensive Chemotherapie mit ihren Nebenwirkungen oft schlechter vertragen als jüngere Patienten. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.83)

McKelvey et al. konnten 1976 zeigen, dass mit dem intensiven Chemotherapieschema CHOP bestehend aus der Verabreichung einer Kombination von Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison in 21-tägigem Abstand auch bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium in 50 - 70% der Fälle eine komplette Remission erreicht werden konnte (McKelvey et al. 1976). Lange galt das so genannte CHOP-Schema als Standard der Polychemotherapie für aggressive Lymphome.

Ein weiterer Meilenstein in der Therapie der aggressiven Lymphome folgte mit der Einführung des CD20-Antikörper Rituximab (R), welcher zu einer weiteren Steigerung der Rate an kompletten Remissionen und somit zu einer höheren Heilungsrate führte (Coiffier et al. 2002). Das so genannte R-CHOP Protokoll wird seither als Standard Chemo-Immuntherapie zur Behandlung der aggressiven CD20(+) B-NHL verwendet. Damit sind bei den DLBCL Heilungsraten von ca. 60-70% möglich (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.85-94). In zahlreichen Studien wird nun aktuell untersucht, inwieweit eine Modifikation des R-CHOP-Schemas für bestimmte Patientengruppen einen weiteren Vorteil erbringen kann. Für die 30-40% der Patienten, welche nicht auf die Chemo-Immuntherapie ansprechen oder früh ein Rezidiv aufweisen ist die Prognose leider deutlich schlechter, hier kann z.B. die Option einer autologen Stammzelltransplantation diskutiert werden. Insbesondere dieses Patientenkollektiv könnte von neuen Therapiestrategien abseits der klassischen

Chemotherapie wie z.B. neue Immuntherapien oder Kinaseinhibitoren profitieren. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.85-94)

Im Moment stehen für die einzelnen Lymphomentitäten noch keine spezifischeren Therapien zur Verfügung. Dies könnte sich in Zukunft durch ein besseres Verständnis der Genetik der Subtypen sowie durch neue Therapieansätze ändern. So zeigt z. B. das ABC DLBCL in Studien ein gutes Ansprechen auf Ibrutinib, einen Inhibitor der Bruton's Tyrosinkinase (Wilson et al. 2015).

Abweichend vom DLBCL wird das noch aggressivere BL in Deutschland in der Regel nach den (pädiatrischen) Chemotherapieschemata der Akuten Lymphatischen Leukämie (B-ALL) behandelt, zusätzlich ebenfalls mit Verwendung des CD20 Antikörpers Rituximab. (Hiddemann, Dreyling et al. 2005, S.95-96)

## 2.2 MYC

### 2.2.1 Das Proto-Onkogen *MYC*

*MYC* kodiert für den Transkriptionsfaktor c-MYC, welcher nach Bildung eines Heterodimers mit dem Protein MAX an Enhancer Box Sequenzen (E-Box) CACGTG der DNA bindet. In der MYC-Familie kommen drei Proteine mit ähnlicher Struktur vor: c-MYC, N-MYC und L-MYC. In der vorliegenden Arbeit konzentrieren wir uns auf c-MYC (im folgenden MYC genannt), da es eine gesicherte Rolle in der Pathogenese von hämatologischen Erkrankungen spielt. In Zellen mit hohem MYC-Level kann MYC neben E-Box-Sequenzen auch an weitere Motive der DNA binden und so E-Box unabhängige Gene regulieren (Wolf et al. 2015). Nach erfolgreicher Bindung an die DNA kommt es zu einer verstärkten Transkription der durch MYC regulierten Gene. Es steht noch zur Diskussion, ob MYC dabei global die Transkription aller bereits aktivierten Gene verstärkt (Lin et al. 2012; Nie et al. 2012) oder ob es spezifisch Gene reguliert (Sabo et al. 2014; Walz et al. 2014). Zudem ist bekannt, dass MYC in Kooperation mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie z.B. MIZ1 auch zu einer verminderten Transkription von Genen führen kann (Claassen and Hann 1999).

MYC greift vermutlich in die Regulation von 10-15% aller menschlichen Gene ein, wobei dem Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und Zellwachstum, DNA-Synthese, Proteinbiosynthese, Metabolismus, sowie im Fortschreiten des Zellzyklus spielt (Ott, Rosenwald, and Campo 2013). MYC führt über Induktion des „*DNA replication stress*“ zu genomischer Instabilität, welche das onkogene Potential von MYC weiter verstärkt (Srinivasan et al. 2013). Zudem induziert MYC den Vorgang der Apoptose (Evan et al. 1992).

Das Onkogen *MYC* spielt eine wichtige Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung diverser maligner Tumoren, besonders von B-Zell-Lymphomen. Erst seit kurzem wird die physiologische Funktion des Transkriptionsfaktors in der B-Zell-Reifung besser verstanden (siehe Abschnitt 2.1.2), was einen weiteren wichtiger Baustein zum Verständnis der Rolle von MYC in der Lymphomagenese bildet. Allerdings ist die Überexpression von *MYC* allein ohne weitere genetische Veränderungen nicht ausreichend, um die Lymphomagenese auszulösen (Sander et al. 2012).

### **2.2.2 MYC in aggressiven B-Zell-Lymphomen**

MYC spielt in der Pathogenese von verschiedenen Subtypen von B-Zell-Lymphomen eine wichtige Rolle: in BL, DLBCL, HGBCL, plasmablastischen Lymphomen (PBL) und dem ALK-positiven großzelligen B-Zell-Lymphom (LBCL) ist bekannt, dass *MYC* verstärkt exprimiert wird oder das *MYC*-Gen verändert ist. In BL ist eine Translokation von *MYC* in fast allen Fällen nachweisbar (siehe Abschnitt 2.1.4). (Dalla-Favera et al. 1982)

Weniger eindeutig ist die Bedeutung von MYC in der Pathogenese des DLBCL. DLBCL zeigen nur in ca. 5-15% der Fälle *MYC*-Translokationen mit Ig-Genen aber auch mit anderen Genen wie z.B. *PAX5* und *BCL-6* (Karube and Campo 2015). Dabei gehören DLBCL mit *MYC* Translokationen häufiger zum GCB Typ (Valera et al. 2013) als zum ABC Typ. Ein Anteil von 30-50% aller DLBCL weisen zwar keine Translokationen von *MYC* auf, zeigen allerdings eine erhöhten Proteingehalt z.B. aufgrund von Amplifikation des *MYC*-Gens, sonstigen Mutationen des Gens oder sogar ohne Nachweis von strukturellen Veränderungen innerhalb des Gens (Pasqualucci et al. 2001).

Es ist bekannt, dass die verstärkte *MYC* Expression auch einen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat. So ist eine *MYC*-Translokationen ein negativer Prognosefaktor für Patienten mit DLBCL (Savage et al. 2009; Barrans et al. 2010). Das gilt besonders für Fälle von DLBCL, die ein Rearrangement von *MYC* und *BCL-2* sowie ggf. *BCL-6* besitzen – so genannte *double-hit* bzw. *triple-hit* Tumoren (Pedersen et al. 2014). Dabei unterscheidet sich die Prognose der Patienten auch dahingehend, ob *MYC* in ein Ig-Gen oder ein anderes Gen transloziert ist. Vor allem Patienten mit *double-* oder *triple-hit* Tumoren, bei denen ein Rearrangement zwischen *MYC* und Ig-Gen stattgefunden hat, zeigen eine schlechtere Prognose (Rosenwald et al. 2019). Zusätzlich ist eine Verschlechterung der Prognose auch für Patienten beschrieben, die erhöhte *MYC* Proteinlevel ohne entsprechende Genveränderungen zeigen. (Valera et al. 2013; Swerdlow et al. 2016; Ott, Rosenwald, and Campo 2013)

### **2.2.3 Bedeutung von *MYC* für das Immunsystem**

*MYC* ist enorm wichtig für die Entstehung einer spezifischen Immunantwort gegen ein Antigen und ist essentiell für Proliferation und Reifung von B-Zellen nach Aktivierung des BCR Signalwegs (siehe Abschnitt 2.1.2). (Murn et al. 2009; Patsoukis et al. 2017)

Erst seit kurzer Zeit wird deutlich, dass *MYC* auch eine Rolle dabei spielt, wie Tumoren der Abwehr des körpereigenen Immunsystems entgehen. So ist bekannt, dass das BL kaum eine Antwort des spezifischen Immunsystems hervorruft. Dies lässt sich wohl unter anderem darauf zurückführen, dass eine erhöhte *MYC* Expression die über MHC Klasse I-vermittelte Immunogenität der Tumorzellen reduziert und somit die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen verhindert (Schlee et al. 2007). Hinzu kommt, dass die verstärkte *MYC* Expression auch die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort beeinträchtigt, indem für die Antigenpräsentation über MHC Klasse II Moleküle wichtige Proteine reguliert werden (God et al. 2015).

Inzwischen gibt es eine Vielzahl an Publikationen, welche die Expression von Immuncheckpointmolekülen (siehe Abschnitt 2.3) in Abhängigkeit von diversen Proto-Onkogenen oder Signalwegen beleuchten. Da diese wissenschaftlichen

Beiträge erst nach Beginn der experimentellen Arbeit im Juni 2015 veröffentlicht wurden, werden sie erst in der Diskussion (siehe Abschnitt 7.2.2) behandelt.

### 2.3 Immuncheckpointmoleküle

Mechanismen, bei denen Tumorzellen der Immunantwort entgehen (sog. Immun-Escape Mechanismen) sind charakteristisch für Tumoren. Dunn, Koebel und Schreiber beschreiben 2006 in ihrem Review-Artikel ein dreiphasiges Modell der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem. Zunächst entstehen demnach im Körper häufig maligne Zellen, die durch präsentierte Tumor-Antigene vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden (Eliminationsphase). Proliferiert ein maligner Klon weiter, so entsteht zunächst ein Gleichgewicht zwischen Abbau der Tumorzellen durch das Immunsystem und Wachstum der malignen Population durch Zellteilung, sodass der Tumor in seinem Wachstum eingedämmt ist (Gleichgewichtsphase). Schließlich kommt es dazu, dass Tumorzellen dem Immunsystem entgehen und sich so weiter im Körper ausbreiten (Phase des Immun-Escape). Durch den Prozess des „*immuno editing*“ akquirieren sie Veränderungen wie z.B. den Verlust von Tumorantigenen oder MCH Klasse II Proteinen, welche sie für das Immunsystem unsichtbar machen. (Dunn, Koebel, and Schreiber 2006)

Ein weiterer möglicher Mechanismus von Krebszellen, der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen ist die Expression von so genannten Immuncheckpointmolekülen auf Tumorzellen oder Zellen der Mikroumgebung des Tumors (*microenvironment*, ME). Unter Immuncheckpointmolekülen versteht man eine Vielzahl von Rezeptoren mit ihren Liganden, welche modulierend in die Aktivierung sowie Aufrechterhaltung einer Immunantwort eingreifen können (siehe Tabelle 1). Man unterscheidet dabei costimulatorische Immuncheckpointmoleküle, welche eine Immunantwort verstärken, wie z.B. CD28 oder ICOS von inhibitorischen Immuncheckpointmolekülen wie z.B. CTLA4 oder PD-1, welche die Immunantwort dämpfen (Pardoll 2012). Viele dieser Moleküle werden inzwischen als therapeutischer Ansatzpunkt in der Onkologie untersucht oder bereits genutzt. Insbesondere Antikörper gegen

CTLA4 und PD-1 oder seinen Liganden PD-L1 sind in klinischer Erprobung und bereits für bestimmte Erkrankungen zugelassen (siehe Abschnitt 2.3.4). Für die PD-1 und PD-L1/2 wurde bereits gezeigt, dass sie auf Zellen diverser Lymphomentitäten vorhanden sind und möglicherweise auch pathophysiologisch eine Rolle spielen, was im Folgenden näher betrachtet werden soll.

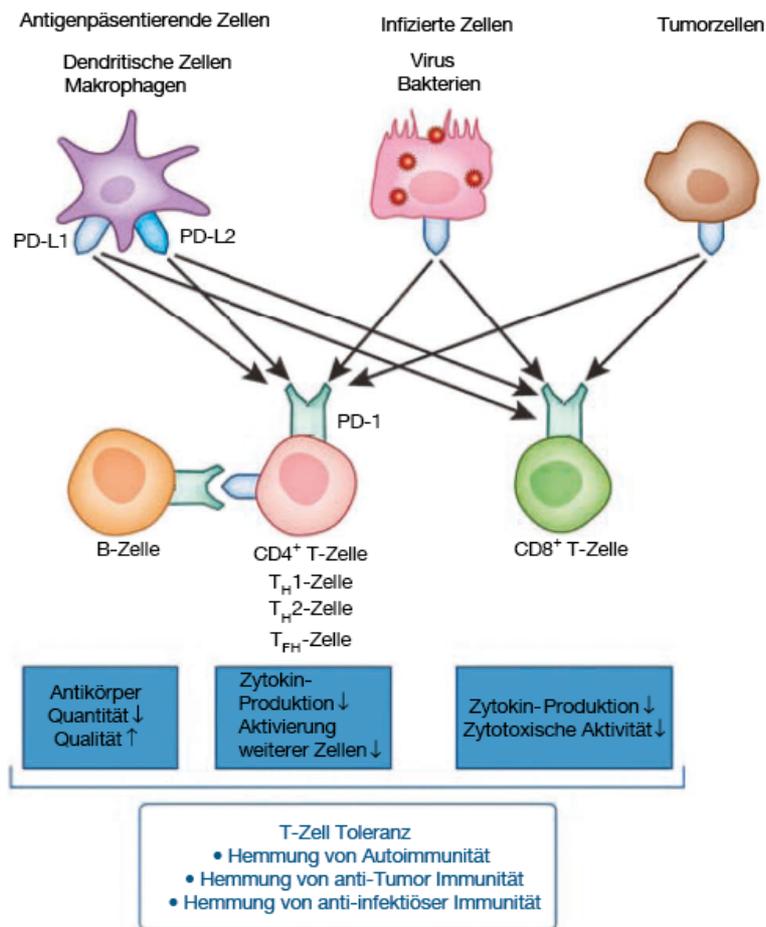
**Tabelle 1: Costimulatorische und inhibitorische Immuncheckpointmoleküle**

Auflistung von bekannten Immuncheckpointmolekülen auf T-Zellen und ihren entsprechenden Liganden auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Zusammenstellung aus gängigen Review-Artikeln (Pardoll 2012; Le Mercier, Lines, and Noelle 2015). ?: interagierendes Molekül aktuell unklar (Stand November 2019).

Costimulatorische Immuncheckpointmoleküle		Inhibitorische Immuncheckpointmoleküle	
Rezeptor (T-Zelle)	Ligand (APC)	Rezeptor (T-Zelle)	Ligand (APC)
CD28	CD80/CD86	PD-1	PD-L1/PD-L2
ICOS	ICOSL	CTLA4	CD80/CD86
CD137 (4-1BB)	CD173L (4-1BBL)	BLTLA	HVEM
OX40	OX40L	LAG3	MHC Klasse II
CD27	CD70	TIM-3	IGAL9
GITR	GITRL	?	CD276 (B7-H3)
CD30L	CD30	A2AR	Adenosin
CD40L	CD40	?	B7-H4
CD28H	H7-H7		

### 2.3.1 PD-1 und seine Liganden PD-L1 und PD-L2

Das inhibitorische Immuncheckpointmolekül Programmed Cell Death 1 (PD-1) ist ein Oberflächenrezeptor, der vor allem auf T-Zellen, aber auch auf weiteren myeloischen Zellen, präsentiert wird. PD-1 wird von dem Gen *PDCD1* kodiert und gehört zu der Immunglobulin Superfamilie. PD-1 besitzt zwei Liganden aus der Familie der B7-Proteine: Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1, auch: CD274) und Programmed Cell Death 1 Ligand 2 (PD-L2, auch: B7-DC), welche von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie B-Zellen und Makrophagen auf ihrer Zelloberfläche präsentiert werden. PD-L1 kann außerdem auf Epithelzellen sowie verschiedenen anderen nicht-lymphatischen Geweben nachgewiesen werden. (Freeman et al. 2000)



**Abbildung 1: Die PD-1 / PD-L1/PD-L2 Achse**

Die Liganden PD-L1 und PD-L2 können auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, auf von Krankheitserregern infizierten Zellen oder auf Tumorzellen präsentiert werden. Binden die Liganden an PD-1 auf T-Zellen führt dies über diverse Mechanismen zu einer Verhinderung von Autoimmunität sowie Hemmung der Immunantwort gegen Tumorzellen oder gegen infizierte Körperzellen. Bild adaptiert nach Okazaki et al. (Okazaki et al. 2013).

PD-1 wird von T-Zellen nach deren Aktivierung an der Oberfläche präsentiert. Nach Bindung seines Liganden kommt es in den T-Zellen über Aktivierung der Phosphatase SHP-2 zu Inaktivierung von Kinasen des TCR-Signalwegs, was letztendlich zu einer Verminderung der T-Zell-Aktivität führt (Freeman et al. 2000). Physiologisch spielt PD-1 damit eine wichtige Rolle bei der Begrenzung einer andauernden Immunantwort und führt damit zur Vermeidung von Autoimmunität und Gewebeschäden im Kontext einer Entzündungsreaktion im peripheren Gewebe (Nishimura et al. 1999). PD-1 wird auch auf regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ -Zellen) präsentiert und verstärkt möglicherweise deren Proliferation, womit die Immunantwort zusätzlich supprimiert werden könnte (Francisco et al. 2009). Zudem wird PD-1 auch von NK-Zellen sowie einigen B-Zellen exprimiert (Pardoll 2012).

PD-1 wird ebenfalls als Folge chronischer Antigenstimulation wie z.B. im Rahmen chronischer Infektionen von T-Zellen vermehrt auf der Oberfläche präsentiert. Nach Bindung eines Liganden von PD-1 werden die antigenspezifischen T-Zellen so in einen anergen Zustand versetzt, man spricht von „*t cell exhaustion*“, charakterisiert durch z.B. verminderte Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Dieser Zustand ist durch Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs zumindest teilweise reversibel. (Barber et al. 2006)

Man geht davon aus, dass das Phänomen der *t cell exhaustion* durch chronische Antigenstimulation nicht nur bei Virusinfektionen, sondern auch bei Krebserkrankungen eine Rolle spielt. PD-1 lässt sich auf einem Großteil der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (*tumor infiltrating lymphocytes*, TILs) nachweisen (Ahmadzadeh et al. 2009). Hinzu kommt, dass die Liganden PD-L1 und PD-L2 auf verschiedenen murinen sowie humanen Tumorzellen nachweisbar sind. Dong et al konnten 2002 erstmals zeigen, dass ektoper Expression von *Pd-1* auf murinen Tumorzellen die T-Zell-vermittelte Immunantwort blockieren kann und so das Tumorstadium fördert (Dong et al. 2002).

Neben den oben beschriebenen Interaktionen ist zudem eine Interaktion von PD-L1 mit dem costimulatorischen Rezeptor CD80 bekannt (Sugiura et al. 2019; Butte et al. 2007; Butte et al. 2008). Darüber hinaus wird diskutiert, ob PD-L1 und PD-L2 zusätzlich zu PD-1 mit einem costimulatorisch wirkendem Rezeptor interagieren (Pardoll 2012).

### **2.3.2 Regulation der *PD-L1* Expression**

Die Genexpression von Immuncheckpointmolekülen wird durch verschiedene zellinterne Stimuli sowie Stimuli aus dem umgebenden Gewebe reguliert. Zudem wird die Expression sowohl auf der genetischen als auch auf der transkriptionellen und posttranskriptionellen Ebene reguliert. Dies trifft sowohl für die physiologische Expression als auch für die verstärkte *PD-L1* Expression von Krebszellen zu. (Zerdes et al. 2018)

So kann die Präsentation von PD-L1 auf der Zelloberfläche als Reaktion auf Zytokine, welche bei einer Entzündung freigesetzt werden, induziert werden.

Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) führt nach Bindung an den IFN $\gamma$ -Rezeptor über den JAK2/STAT1 Signalweg zur verstärkten Bildung von PD-L1 mRNA (Bellucci et al. 2015; Chen, Crabill, et al. 2019). Möglicherweise induzieren so TIL im ME durch IFN $\gamma$  Sekretion die *PD-L1* Expression auf Melanom-Zellen (Taube et al. 2012). Auch im Kontext von hämatologischen Erkrankungen spielt dies eine Rolle. So kann die *PD-L1* Expression in Zellen des Multiplen Myeloms durch die Gabe von IFN $\gamma$  verstärkt werden (Liu et al. 2007). Auch andere Zytokine wie z.B. Interleukin 10 (IL-10) oder Interleukin 27 können die Proteinsynthese von PD-L1 verstärken (Gupta et al. 2012; Chen, Crabill, et al. 2019).

Auf ähnliche Weise könnten Mutationen in Proteinen dieser Signalwege ebenfalls die Präsentation von PD-L1 auf der Zelloberfläche verstärken. Eine solche Wirkung wurde z.B. für eine Mutation des JAK2-Inhibitors SOCS-1, wodurch JAK2 verstärkt aktiv ist, gezeigt (Weniger et al. 2006). Ähnlich wirkt auch eine verminderte Expression von der negativ regulierenden microRNA miR-135a (Navarro et al. 2009) oder *MYD88*-Mutationen (Choi et al. 2013). Eine Aktivierung des JAK3/STAT3 Signalwegs kann auch durch die für das NPM-ALK-positive anaplastische großzellige Lymphom (ALCL) typische Translokation NPM-ALK stattfinden (Marzec et al. 2008).

Im ME kann PD-L1 als Reaktion auf Chemotherapeutika verstärkt von Stromazellen oder Immunzellen präsentiert werden. Yang et al. bestätigten dies anhand einer Behandlung von murinen Stromazellen des Knochenmarks mit Doxorubicin sowie anhand mit Chemotherapeutika vorbehandelten Patientenproben (Yang et al. 2017). Weiterhin ist bekannt, dass Hypoxie über HIF1 $\alpha$  die Expression von *PD-L1* sowohl in Tumorzellen als auch in Zellen des ME induziert (Barsoum et al. 2014; Noman et al. 2014).

Daneben gibt es eine Reihe von zellintrinsischen Signalwegen, welche zu einer Induktion von PD-L1 führen. So können Immuncheckpointmoleküle auch über onkogene Signalwege induziert werden. Beispielsweise führt in Glioblastomen der Verlust des Tumorsuppressorgens *PTEN* über Aktivierung des PI3K-Signalwegs zu einem erhöhten PD-L1 Proteingehalt (Parsa et al. 2007). Ferner konnten Green et al. zeigen, dass über den AP-1 Signalweg sowie über das bei

EBV-Infektion der Zelle entstehenden LMP1 in Zellen des HL die Menge an PD-L1 mRNA und Protein erhöht werden (Green et al. 2012).

### 2.3.3 PD-1 und PD-L1 Expression in Lymphomen

In letzter Zeit wurde in verschiedenen Studien die Bedeutung der PD-1/PD-L1 Achse in diversen Lymphomen untersucht. Während PD-1 auf Immunzellen im ME zu finden ist, wird PD-L1 sowohl von den Lymphomzellen selbst, als auch von Zellen des ME – neben TIL auch auf Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) – auf der Oberfläche präsentiert. Dabei unterscheidet sich die Genexpression von *PD-L1* zwischen den Lymphomtypen und variiert auch innerhalb der Gruppen substantiell. Bei Patienten mit HL, T-NHL sowie EBV-assoziierten Lymphomen ist häufig ein hoher PD-L1 Proteingehalt in den Zellen nachweisbar. Hingegen sind im DLBCL nur in einem Teil der Fälle PD-L1(+) Zellen beschrieben. Hinzu kommt, dass aktuell zur Bestimmung der PD-L1 Expression an klinischem Primärmaterial verschiedene Antikörper für die Immunhistochemie sowie verschiedene Cut-Off-Werte verwendet wurden. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über verschiedene Arbeiten mit der jeweiligen verwendeten Methode sowie die Ergebnisse bezüglich dem immunhistochemischen Nachweis von PD-L1 im DLBCL und BL (Gravelle et al. 2017). In der Tabelle 33 im Anhang sind Studien für weitere Lymphomentitäten aufgelistet.

**Tabelle 2: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 in BL und DLBCL**

Übersicht über PD-L1 auf Lymphomzellen sowie auf Zellen des ME (genannt mPD-L1) in Fällen von BL und DLBCL. Nachweis mittels Immunhistochemie (IHC). Adaptiert nach Gravelle, Burroni et al. 2017, Stand Dezember 2019. BL = Burkitt Lymphom, DLBCL = diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, FFPE = Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe, NOS = nicht weiter Klassifiziert, OS = Gesamtüberleben, rDLBCL = refraktäres DLBCL.

	Studie und Fallzahl	Methode (Hersteller/Klon)	Cut Off Tumor	Cut Off ME	PD-L1 Proteingehalt	Therapieergebnis
BL	Chen et al. 2013, n=7	PD-L1 IHC FFPE (Sino Bio / 15)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	0% der EBV+ BL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen, 0% der EBV+ BL Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME	NA

<b>BL</b>	Panjwani et al. 2018, n=2	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen des ME positives Staining zeigten	0% der BL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 0% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
<b>BL (päd.)</b>	Majzner et al. 2017, n=10	PD-L1 IHC FFPE (Epitomics Inc /28-8)	PD-L1(+) wenn >1% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >1% der Zellen des ME positives Staining zeigten	80% der pädiatrischen Fälle von sporadischem BL zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 80% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
<b>DLBCL</b>	Chen et al. 2013, n=66 DLBCL NOS und 9 DLBCL EBV+	PD-L1 IHC FFPE (Sino Bio / 15)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	11% der DLBCL NOS Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen; 14% der DLBCL NOS Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME; 100% der EBV+ DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen; 100% der EBV+ DLBCL Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
<b>DLBCL</b>	Kiyasu et al. 2015, n=1121	PD-L1 IHC FFPE (Abcam / EPR1161)	PD-L1(+) wenn >30% positives Staining zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME positives Staining zeigten	10.5% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen, 15.3% der DLBCL Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	Fälle von PD-L1(+) DLBCL zeigten niedrigeres OS als Fälle von PD-L1(-) DLBCL (50% vs 75% nach 2 Jahren, p=0.0009) (multivariate Analyse mit adjustiertem p=0.0323). Kein signifikanter Unterschied des OS zwischen mPD-L1(+) und mPD-L1(-) DLBCL (p=0.31). PD-L1 Expression ist mit dem ABC Typ der DLBCL (p<0.0001) sowie mit EBV-Positivität (p=0.0014) assoziiert.
<b>DLBCL</b>	Laurent et al. 2015, n=27	PD-L1 IHC FFPE (Ventana / SP142)	PD-L1(+) wenn >10% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	41% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen; 26% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Zellen im ME.	NA
<b>DLBCL</b>	Vranic et al. 2016, n=49	PD-L1 IHC FFPE (Ventana / SP142), PD-L1 ICH FFPE (Ventana / SP263)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	NA	SP142: 50% der rDLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen; SP263: 57% der rDLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA

DLBCL	Kwon et al. 2016, n=126	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >10% der Zellen Level 1, 2 oder 3 der Staining Intensität zeigten	NA	61,1% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) (ABC>GCB) Tumorzellen.	Kein signifikanter Unterschied zwischen PD-L1(+) und PD-L1(-) DLBCL (p=0,238) (univariate Analyse). PD-L1 Expression korreliert mit EBV-Positivität (p=0,015).
DLBCL	Menter et al. 2016, n=260	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	NA	31% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA
DLBCL	Hu et al. 2017, n=204	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >20% der Zellen positives Staining zeigten	49% der DLBCL NOS Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 44% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	Fälle mit PD-L1(+) Tumorzellen zeigten ein schlechteres OS (5 Jahre: 50% vs 67,3%, p=0,02). mPD-L1(+) im ME zeigt eine negative Korrelation mit c-Myc (r=-0,20, p=0,04).
DLBCL	Panjwani et al. 2018, n=125	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen des ME positives Staining zeigten	10% der DLBCL NOS Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 6% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
DLBCL	Sun et al. 2019, n=287	PD-L1 ICH FFPE (Dako pharmDx/ IHC 22C3)	PD-L1(+) wenn $\geq$ 50% der Zellen positives Staining zeigten	NA	11,9% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) (non-GCB>GCB) Tumorzellen.	Hohe PD-L1 Expression zeigte sich assoziiert mit einem verkürzten OS von DLBCL-Patienten (p=0,0295). Sowohl hohe PD-L1 mRNA Expression als auch hohe Protein-Level zeigten sich als unabhängige prognostische Faktoren für schlechteres OS (multivariate Analyse, mRNA: p=0,004, Protein: p=0,039).
DLBCL	Chen, Dashnam oorthy, et al. 2019, n=122	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >30% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level zeigten	15,6% der DLBCL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 36,1% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME (TIL und TAM). Auch Untersuchung von weiteren Checkpoints wie TIM-3 und LAG3.	NA

In klassischen Hodgkin Lymphomen ist eine Amplifikation des Chromosomenabschnitts 9p24.1, welche unter anderem die Gene *PD-L1* und *PD-L2* enthält, in 97% aller untersuchten Fälle nachweisbar. Dies führt zu verstärkten PD-L1 und PD-L2 Level auf der Oberfläche der Reed-Sternberg Zellen (Green et al. 2010). Zusätzlich soll eine indirekte PD-L1 Erhöhung über

die konstitutive Aktivierung von JAK2 zu dem immunsuppressiven Tumormikromilieu des HL beitragen (Roemer et al. 2016). Die 9p24.1 Amplifikation und eine hohe Anzahl an PD-L1(+) Fällen konnte auch in PMBL nachgewiesen werden (Green et al. 2010).

Für das DLBCL konnte PD-L1 auf den Tumorzellen in 10% bis 61,1% der Fälle beobachtet werden. Zudem wurden von PD-L1(+) Zellen im ME bei 6% bis 26% der Fälle berichtet (siehe Tabelle 2). Dabei scheinen beim ABC oder Non-GCB Typ der DLBCL häufiger hohe PD-L1 Proteinmengen aufzutreten als beim GCB Typ. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *PD-L1* Expression mit einer EBV-Infektion der Zellen assoziiert ist (Kiyasu et al. 2015). Der hohe PD-L1 Proteingehalt lässt sich neben einer Koinfektion mit EBV möglicherweise bei einem Teil der Fälle durch genetische Anomalitäten des *PD-L1* Gens erklären. Georgiou et al berichten von 12% Copy-Gains, 3% Amplifikationen und 4% Translokationen des *PD-L1/PD-L2* Locus bei DLBCL NOS, wobei die genetischen Veränderungen häufiger im ABC Typ als im GCB Typ auftraten (Georgiou et al. 2016). Dabei konnten Translokationen nicht nur mit Ig-Genen, sondern z B. auch mit dem *TP63* Gen nachgewiesen werden (Fang et al. 2017). Andererseits zeigen auch Fälle von DLBCL ohne genetische Veränderungen von *PD-L1* eine erhöhte Expression des Moleküls auf der Oberfläche. Kataoka et al konnten in ihren Untersuchungen Veränderungen der 3' untranslatierte Region des PD-L1 Transkripts in 8% der untersuchten Fälle von DLBCL NOS zeigen. Diese Veränderung führte zu einer erhöhten Stabilität des Transkripts und als Konsequenz zu einer verstärkten Proteintranslation (Kataoka et al. 2016). 2018 wurde ferner gezeigt, dass es im DLBCL über den BCR-Signalweg JAK2/STAT3-vermittelt zu einem verstärkten PD-L1 Proteingehalt kommen kann (Li et al. 2018).

In mehreren Studien wurde auch untersucht, inwiefern der Nachweis von PD-L1 einen prognostischen Wert besitzt. Erhöhte PD-L1 Level scheinen ein negativer prognostischer Marker bezüglich des Gesamtüberlebens für DLBCL zu sein (Kiyasu et al. 2015). Dies wurde kürzlich in einer Meta-Analyse von 13 Studien mit insgesamt 1613 Fällen bestätigt (Qiu, Zheng, and Zhao 2019).

Für das BL liegen bis dato nur wenige Daten vor. In einer Arbeit von Chen et al. mit nur 4 Fällen von adultem BL konnte immunhistochemisch kein PD-L1 auf den Zellen nachgewiesen werden (Chen et al. 2013). In einer neueren Studie von pädiatrischen BL aus Frankreich wurde PD-L1(+) Zellen in 80% der untersuchten Proben beobachtet. Allerdings wurde hier der Cut-Off-Wert für ein positives Staining sehr niedrig gesetzt (Majzner et al. 2017).

#### **2.3.4 PD-1/PD-L1 Blockade in der Therapie von hämatologischen Krebserkrankungen**

Es sind bis jetzt mehrere Checkpoint-Inhibitoren der PD-1/PD-L1 Achse für die klinische Anwendung bei diversen Krebserkrankungen weltweit zugelassen. Dabei handelt es sich um die anti-PD-1 Antikörper Nivolumab der Firma Bristol Myers Squibb und Pembrolizumab von der Firma Merck. Zusätzlich sind auch drei anti-PD-L1 Antikörper zugelassen: Atezolizumab von Genentech/Roche, sowie Durvalumab von AstraZeneca und Avelumab von Merck (Stand September 2019).

Allerdings sind für hämatologische Krebserkrankungen nur Nivolumab und Pembrolizumab bei refraktärem oder rezidivierendem klassischen HL nach autologer Stammzelltransplantation (ASCT) und Brentuximab-Vedotin Therapie für Erwachsene seit 2016 bzw. 2017 zugelassen. Für Nivolumab konnte 2015 in einer ersten Studie mit 23 Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem HL nach einer ASCT oder einer Therapie mit Brentuximab-Vedotin ein sehr gutes Therapieansprechen sowie ein geringes Nebenwirkungsprofil gezeigt werden. Ein Ansprechen zeigte sich in 87% der Patienten, davon bei bei 17% der Patienten mit einer kompletten Remission (Ansell et al. 2015). In einer einarmigen Phase II Studie mit 80 mehrmals vorhertherapierten Patienten konnten diese Ergebnisse 2016 bestätigt werden (Younes et al. 2016). Ähnliche Ergebnisse bezüglich Ansprechen und Nebenwirkungen wurden auch in Studien für Pembrolizumab gezeigt (Armand et al. 2016).

Für die Behandlung der DLBCL laufen zur Zeit mehrere Phase I und II Studien bezüglich des therapeutischen Nutzens einer PD-1/PD-L1 Blockade mittels der oben genannten Wirkstoffe. Beispielsweise wurden Anfang 2019 die Ergebnisse eine Phase II Studie mit Nivolumab bei Patienten mit DLBCL nach

gescheiterter ASCT oder bei Patienten, welche nicht für eine ASCT geeignet waren veröffentlicht. Es zeigte sich insgesamt ein niedriges Ansprechen von 10% (nach ASCT, n=87) oder 3% (ungeeignet für ASCT, n=34) auf vier bzw. drei Dosen Nivolumab als Monotherapie. (Ansell et al. 2019)

Für die Behandlung des BL werden bis dato keine Immuntherapien im Rahmen von klinischen Studien erprobt.

Neben der Ausweitung der Zulassung der bereits etablierten Checkpoint-Inhibitoren für weitere Lymphome werden in verschiedensten Studien auch die Kombinationstherapie der Checkpoint-Inhibitoren mit konventionellen Chemotherapien oder anderen Immuntherapien, wie z.B. *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zell Therapie in hämatologischen Neoplasien untersucht. (Ok and Young 2017; Goodman, Patel, and Kurzrock 2017)

### 3 Problemstellung

MYC spielt, wie oben dargestellt, als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle in der Tumor- und Lymphomagenese. Neben verstärkter Proliferation oder verändertem Metabolismus besteht eine weitere Eigenschaft von Tumor- und Lymphomzellen in der Fähigkeit, dem körpereigenen Immunsystem durch sogenannte Immun-Escape Mechanismen zu entgehen und so das eigene Wachstum zu fördern. Einer dieser Mechanismen ist die Expression von inhibitorischen Immuncheckpointmolekülen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen.

Wir stellen die Hypothese auf, dass das Protoonkogen *MYC* über eine verstärkte Präsentation des Immuncheckpointmoleküls *PD-L1* auf B-Zell-Lymphomen weiter zum Immun-Escape der Tumorzellen beitragen kann. So wäre das klinisch aggressive Verhalten *MYC(+)* Lymphome auch über eine insuffiziente Immunantwort des Körpers gegen die Tumorzellen zu erklären. Die Genexpression verschiedener Immuncheckpointmoleküle wie u.a. *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA4*, *CD80/86* oder *ICOSLG* sollen in dieser Arbeit mittels Analyse von humanen und murinen Genexpressionsdaten sowie in entsprechenden Modellen von *MYC*-induzierten B-Zell-Lymphomen untersucht werden. Vor allem Daten auf Grundlagen von Genexpressionsdaten liegen in dieser Form noch nicht vor. Zusätzlich soll die Regulation der *PD-L1* Expression durch *MYC* beleuchtet werden. Ferner untersuchen wir die Auswirkung aberranter *PD-L1* Expressionen durch Gentransfer auf das Verhalten von Lymphomzellen in vitro.

## 4 Material

### 4.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien**

<b>Substanz</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ACK Lyse Puffer	ACK Lysing Buffer	Gibco™
Agar Agar	Agar Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität Roti@garose	Carl Roth GmbH + Co. KG
alphaMEM Medium	alphaMEM	Gibco™
Ampicillin	Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Annexin Puffer	Annexin-V-binding Buffer (10X)	BD Pharmingen
BSA (Bovine Serum Albumin)	BSA (10X)	Thermo Fisher Scientific
DMEM Medium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco™
DMSO (Dimethylsulfoxid)	DMSO	Serva
dNTPs	dNTP Mix 100 µM	Bioline
DPBS (Dulbecco Phosphate-Buffered Saline)	DPBS	Gibco™
Ethidiumbromid (EtBr)	ethidium bromid solution (10mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol	Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco™
Formalin	Formaldehydlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycerol	Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hepes	Hepes Buffer Solution	Gibco™
HPBS	HPBS	Gibco™
Isofluran	Isofluran cp® 1ml/ml	cp-pharma
Isopropanol	Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
L-Glutamin	L-Glutamin 200mM (100X)	Gibco™
Lipofektamin	Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific
MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> 50mM	Thermo Fisher Scientific
NaCl	Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG

NEAA (Non-Essential Amino Acid)	MEM NEAA (100X)	Gibco™
Opti-MEM Medium	Opti-MEM® Reduced Serum Media	Gibco™
Osteosoft	Osteosoft®	Merck Millipore
Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin (100X)	Gibco™
Peptone	Peptone	Sigma-Aldrich
Polybrene	Polybrene (8mg/mL)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium	RPMI 1640	Gibco™
β-Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol 50mM	Gibco™
Tetrazyklin	Tetrazyklin	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Trypan Blue stain (0.4%)	Gibco™
Trypsin	0,5% Trypsin-EDTA (10X)	Gibco™
Wasser	Aqua B.Braun, Ecotainer®	B.Braun
Wasser (Rnase frei)	DEPC-treated Water	Thermo Fisher Scientific
Yeast	Yeast Nitrogen Base	Sigma-Aldrich

## 4.2 Ausrüstung

**Tabelle 4: Ausrüstung**

<b>Gerät</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Durchflusszytometer	FACS CyAn™ ADP	Beckman Coulter
Elektronische Pipette	Electronic Pipet Pipetboy 2	Integra Bioscience
Elektrophoresekamera	Electrophoresis System Maxigel	Biometra
GelDoc	GelDoc Universal Hood II	Bio-Rad
Homogenisator	Homogenisator Sonoplus HD2070	Bandelin
Inkubationsschüttler	Infors Minitron	Infors AG
Inkubator	Incubator Heracell 240, Hereaus	Thermo Fisher Scientific
Inkubator	Inkubator BD115	Binder
Mikroskop	Mikroskop CKX41	Olympus
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific
Spektrophotometer	Spectrophotometer NanoDrop™2000c	Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Pipetten (0,1-2,5ml, 0,5-10ml, 2-20ml, 10-100ml, 20-200ml, 100-1000ml)	Eppendorf
Powerpack	Power Pack P25T	Biometra
Powerpack	PowerPac 300	Bio-Rad

qPCR System	StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Sterile Arbeitsbank	Flow Biohit Steril-Antares 72	Steril S.p.a
Sterile Arbeitsbank	Flow HeraSafe KS18	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Genetouch Thermal Cycler Basis unit	Biozym
Thermocycler	Genetouch Thermal Cycler Block 48/48	Biozym
Thermocycler	Veriti 96 Well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems
Thermocycler	PTC-100® Thermal Cycler	MJ Research
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex-Gerät	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	Kern Präzisionswaage	Kern
Wasserbad	Water bath SUB6	Grant instruments
Zentrifuge	Zentrifuge Biofuge fresco, Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Zentrifuge MyFUGE™ Mini , C1008-B	Benchmark Scientific
Zentrifuge	Multifuge 3s Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Megafuge 16R, Heraeus	Thermo Fisher Scientific

### 4.3 Verbrauchsmaterialien, Kits

**Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
96-Well-Platten	96-Well-Plate U-Bottom	Falcon™
Absaugpipetten	Aspirierpipetten	Falcon™
Cryotubes	Cryo.S	Greiner bio-one
Eppendorfgefäße	Reaction tubes (2ml, 1,5ml)	Eppendorf
Filter	Cell culture filters GE Healthcare (0,45mm, 0,2mm)	GE Healthcare
Filter	Filter, Syringe Filcons (30 m)	BD
Filter	Stericup and Steritop	Millipore
Folie	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Glaspipetten	Pipettes CELLSTAR® (50 mL, 25 mL, 10 mL, 5 mL)	Greiner bio-one
Kanüle	Hypodermic needle Sterican® Gr.18	B.Braun
Kanüle	Hypodermic needle Sterican® Gr.20	B.Braun
Monovette	Monovette® 1.2ml	Sarstedt

Neubauer Zählkammer	haemocytometer Neubauer	Brand
PCR Tubes	PCR Single Cap 8er Soft Strips 0,2ml	Biozym
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (1000ml, 200ml, 100ml, 20ml, 10ml)	Biozym
qPCR Platten	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0.1 ml)	Applied Biosystems
Reaktionsgefäße	14ml Polypropylene Round-Bottom Tube	Falcon™
Reaktionsgefäße	CELLSTAR® Tubes (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Spritzen	Syringe Omnifix® Solo (30ml, 20ml, 10ml, 5 mL, 3mL)	B.Braun
Zellkultur Flaschen	Cell Culture Flasks CELLSTAR® (T175, T75, T25)	Greiner bio-one
Zellkultur Platten	Cell Culture Plates CELLSTAR® (6/12/24/96-Well)	Greiner bio-one
Zellkultur Platten	Cell Culture Dish w/2mm Grid	Corning Incorporated
Zellkultur Platten	Tissue Culture discs	Sigma Aldrich
Zellkultur Platten 10cm	Tissue Culture dish 100	TPP®

**Tabelle 6: Kits**

<b>Kit</b>	<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Kit APC BrdU	APC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen
Kit cDNA Synthese	Omniscript RT Kit	Qiagen
Kit gDNA Extraktion	Wizard Genomics DNA Purification	Promega
Kit Gelextraktion	QIAquick Gelextraction kit	Qiagen
Kit Intrazelluläre Färbungen	Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	Thermo Fisher Scientific
Kit Plasmid Präparation	HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Kit Plasmid Präparation	HiSpeed® Plasmid Mini Kit	Qiagen
Kit qPCR	Platinum SYBR Green qPCR SuperMix- UDG w/ROX	Invitrogen
Kit RNA Extraktion	RNeasy Kit	Qiagen
Kit Zellfixierung	FIX & PERM® Cell Permeabilization Kit	Thermo Fisher Scientific

## 4.4 Puffer

**Tabelle 7: Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
FACS-Puffer	500ml PBS (1x) 10%BSA
Freeze Medium	10% DMSO in FCS
HF2 Puffer	10% HPBS (10X) 2% FCS 1% Hepes 1% Penicillin/Streptomycin destilliertes Wasser steril filtriert
Annexin Puffer	10% Annexin-V-binding Buffer (10X) destilliertes Wasser
PI Workingsolution	50mg/ml PI in PBS
DAPI Solution	1 ml RNase A (5 mg/ml) 10 µl DAPI-Stock Solution (5mg/ml in destilliertem Wasser) 50 ml PBS

## 4.5 Medien

**Tabelle 8: Medien**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Eµ-MYC-Lymphomzell-Medium	RPMI 1640 10% FCS 1% NEAA 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 0,1% β-Mercaptoethanol
Transduktionsmedium (Eµ-MYC)	alpha-MEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% NEAA
A20 Medium	RPMI 1640 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 0,1% β-Mercaptoethanol
Transduktionsmedium (A20)	44,5ml alpha-MEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
Phönix-Medium	DMEM 10% FCS

LB-Medium	10g Pepton 5g Yeast 10g NaCl ad 1l Wasser
-----------	--

## 4.6 Enzyme

**Tabelle 9: Enzyme**

Enzym	Produktname	Hersteller
EcoRI	FastDigest EcoR I (1 FDU/ $\mu$ l)	Thermo Fisher Scientific Germany
DNase	DNase	Sigma
T4 Ligase	T4 DNA Ligase (400 U/ $\mu$ l)	NEB
Taq Polymerase	Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)	Qiagen
Pfu Polymerase	Pfu Turbo DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	Qiagen

**Tabelle 10: Puffer**

Puffer	Produktname	Hersteller
NEB Puffer	NEB Buffer	NEB
PCR Ladepuffer	CoralLoad Buffer 10x	Qiagen
PCR Puffer 10X	PCR Buffer 10X	Qiagen
Pfu Puffer	Pfu Polymerase Buffer	Qiagen
Q-Solution	Q-Solution 5x	Qiagen
T4 Ligase Puffer	T4 10xLigase Buffer 10 mM ATP	NEB

**Tabelle 11: Standards**

Standards	Produktname	Hersteller
DNA Standard	1 kb PLUS Ladder/Quick-Load Purple 2-log DNA Ladder	invitrogen/NEB
Loading Dye Gelelektrophorese	6X DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific

## 4.7 Plasmide, Primer, Guides, Konstrukte

**Tabelle 12: Plasmide**

Plasmid	Referenz
lenti CRISPR v2	Addgene plasmid # 52961 (von Feng Zhang) (Sanjana, Shalem, and Zhang 2014)
MSCV-IRES-GFP	Addgene plasmid #20672 (von Tannishtha Reya)

**Tabelle 13: Primer**

Primer	Sequenz	Hersteller
mUbiquitin forward	5' TGG CTA TTA ATT ATT CGG TCT GCA T 3'	Eurofins Genomics
mUbiquitin reverse	5' CTT GGC TAA GTC GAC CTT GTG A 3'	Eurofins Genomics
SLIC PD-L1 forward	5' TCC TTC TCT AGG CGC CGG AAT TCA TGA GGA TAT TTG CTG G 3'	Eurofins Genomics
SLIC PD-L1 reverse	5' TCC CGC TCG AGG TTA ACG AAT TCT TAC GTC TCC TCG AAT T 3'	Eurofins Genomics
SLIC PD-L2 forward	5' TTA AAG GAA CCA ATT CAG TCG ACA TGC TGC TCC TGC TGC C 3'	Eurofins Genomics
SLIC PD-L2 reverse	5' GCC GCG AAT TCG GTA CCG GAT CCC TAG ATC CTC TTT CTC T 3'	Eurofins Genomics
qPCR mPD-L1 forward	5' TTC CTC ATT GTA GTG TCC ACG G 3'	Eurofins Genomics
qPCR mPD-L1 reverse	5' GAGCTT GTA TCT TCA ACG CCA C 3'	Eurofins Genomics
qPCR mPD-L2 forward	5' TAC CTG CCA GGC TAG AGG TTA T 3'	Eurofins Genomics
qPCR mPD-L2 reverse	5' TGA AGT TTC TGC TAG GCT GAG G 3'	Eurofins Genomics
Sequencing Primer Guide 1 fwd	5' CAG GTT TTC AGA TGT GTT TGG A 3'	Eurofins Genomics
Sequencing Primer Guide 1 rev	5' CTT CCT TTT CCC AGT ACA CCA C 3'	Eurofins Genomics
Sequencing Primer Guide 2 fwd	5' TCT CTT TGC TTC TGA CCT AGC C 3'	Eurofins Genomics
Sequencing Primer Guide 2 rev	5' AGA CTG CTG GTC ACA TTG AGA A 3'	Eurofins Genomics
Sequencing Primer Guide 3 fwd	5' CAA CAC ATC CTC CAC AGA ACA G 3'	Eurofins Genomics
Sequencing Primer Guide 3 rev	5' AGT CAG TGT TTC CTG GTG AGG T 3'	Eurofins Genomics
qPCR hPD-L1 fwd	5' GCT GCA CTA ATT GTC TAT TGG GA 3'	Eurofins Genomics
qPCR hPD-L1 rev	5' AAT TCG CTT GTA GTC GGC ACC 3'	Eurofins Genomics
qPCR hUbiquitin fwd	5' CCT GAG GGG TGG CTG TTA AT 3'	Eurofins Genomics
qPCR hUbiquitin rev	5' ACC ATG CAA CGA AAC CTT TAT T 3'	Eurofins Genomics

**Tabelle 14: Oligonukleotide**

Oligonukleotide	Sequenz	Hersteller
Guide 1	5' GGC TCC AAA GGA CTT GTA CG 3'	Eurofins Genomics
Guide 1 fwd	5' GTC GTC TCC CAC CGG GCT CCA AAG GAC TTG TAC GGT TTC GAG ACG TG 3'	Eurofins Genomics
Guide 1 rev	5' CAC GTC TCG AAA CCG TAC AAG TCC TTT GGA GCC CGG TGG GAG ACG AC 3'	Eurofins Genomics
Guide 2	5' TGA ACT AAT ATG TCA GGC CG 3'	Eurofins Genomics
Guide 2 fwd	5' GTC GTC TCC CAC CGT GAA CTA ATA TGT CAG GCC GGT TTC GAG ACG TG 3'	Eurofins Genomics
Guide 2 rev	5' CAC GTC TCG AAA CCG GCC TGA CAT ATT AGT TCA CGG TGG GAG ACG AC 3'	Eurofins Genomics
Guide 3	5' GGA CCG TGG ACA CTA CAA TG 3'	Eurofins Genomics
Guide 3 fwd	5' GTC GTC TCC CAC CGG GAC CGT GGA CAC TAC AAT GGT TTC GAG ACG TG 3'	Eurofins Genomics
Guide 3 rev	5' CAC GTC TCG AAA CCA TTG TAG TGT CCA CGG TCC CGG TGG GAG ACG AC 3'	Eurofins Genomics

**Tabelle 15: Konstrukte**

Konstrukt	Sequenz	Hersteller
Mouse cDNA Clone <i>Pd-11/</i> <i>CD274</i>	5'ATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAGCCT GCTGTCACTTGCTACGGGCGTTTACTATCACGGCT CC AAAGGACTTGTACGTGGTGGAGTATGGCAGCA ACGTCACGATGGAGTGCAGATTCCCTGTAGAACG GGAGCTGGACCTGCTTGCGTTAGTGGTGTACTGG GAAAAGGAAGATGAGCAAGTGATTCAGTTTGTGGC AGGAGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCACAGCAAC TTCAGGGGGAGAGCCTCGCTGCCAAAGGACCAGC TTTTGAAGGGAAATGCTGCCCTTCAGATCACAGA CGTCAAGCTGCAGGACGCAGGCGTTTACTGCTGC ATAATCAGCTACGGTGGTGCAGACTACAAGCGAAT C ACGCTGAAAGTCAATGCCCCATACCGCAAAT CAACCAGAGAATTTCCGTGGATCCAGCCACTTCTG AG CATGAACTAATATGTCAGGCCGAGGGTTATCC AGAAGCTGAGGTAATCTGGACAAACAGTGACCAC CAA CCCGTGAGTGGGAAGAGAAGTGTCACCACTT CCCGGACAGAGGGGATGCTTCTCAATGTGACCAG CA GTCTGAGGGTCAACGCCACAGCGAATGATGTT TTCTACTGTACGTTTTGGAGATCACAGCCAGGGCA AAAC CACACAGCGGAGCTGATCATCCCAGAACT GCCTGCAACACATCCTCCACAGAACAGGACTCAC TGGGTGCTTCTGGGATCCATCCTGTTGTTCCCTCAT TGTAGTGTCCACGGTCCTCCTCTTCTTGAGAAAAC	OriGene Technolo- gies

	A AGTGAGAATGCTAGATGTGGAGAAATGTGGCGT TGAAGATAACAAGCTCAAAAAACCGAAA TGATACA CAATTCGAGGAGACG 3'	
Mouse cDNA Clone <i>Pd-12/</i> <i>Pdcd1lg2</i>	5' ATGCTGCTCCTGCTGCCGATACTGAACCTGAGC TTACAACTTCATCCTGTAGCAGCTTTATTACCGTG ACAGCCCCTAAAGAAGTGTACACCGTAGACGTCG GCAGCAGTGTGAGCCTGGAGTGCGATTTTGACCG CAGAGAATGCACTGAACTGGAAGGGATAAGAGCC AGTTTGCAGAAGGTAGAAAATGATACGTCTCTGCA AAGTGAAAGAGCCACCCTGCTGGAGGAGCAGCTG CCCCTGGGAAAGGCTTTGTTCCACATCCCTAGTGT CCAAGTGAGAGATTCCGGGCAGTACCGTTGCCTG GTCATCTGCGGGGCCGCTGGGACTACAAGTACC TGACGGTGAAAGTCAAAGCTTCTTACATGAGGATA GACACTAGGATCCTGGAGGTTCCAGGTACAGGG GAGGTGCAGCTTACCTGCCAGGCTAGAG GTTATC CCCTAGCAGAAGTGTCTGGCAAATGTCAGTGTT CCTGCCAACACCAGCCACATCAGGACCCC CGAA GGCCTCTACCAGGTCACCAGTGTCTGCGCCTCA AGCCTCAGCCTAGCAGAACTTCAGCTGCAT GTT CTGGAATGCTCACATGAAGGAGCTGACTTCAGCCA TCATTGACCCTCTGAGTCGGATGGAACCC AAAG TCCCCAGAACGTGGCCACTTCATGTTTTTCATCCCG GCCTGCACCATCGCTTTGATCTTCCTGGCCATAGT GATA ATCCAGAGAAAGAGGATC 3'	OriGene Technolo- gies

## 4.8 Zelllinien und Bakterienstämme

**Tabelle 16: Zelllinien**

Zelllinie		Referenz
483	E $\mu$ -MYC-Lymphomzelllinie	AG Keller
449	E $\mu$ -MYC-Lymphomzelllinie	AG Keller
665	E $\mu$ -MYC-Lymphomzelllinie	AG Keller
A20	murine B-Lymphozyten Zelllinie	AG Poeck/Haas
Phoenix	HEK T293 – human embryonic kidney fibroblasts	AG Keller
P493-6	Humane B-Zelllinie mit Tet-OFF System	AG Keller

**Tabelle 17: Bakterienstämme**

Bakterienstamm	Genom
DH5 $\alpha$ -E.coli	fhuA2 $\Delta$ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 $\Phi$ 80 $\Delta$ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

## 4.9 Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 18: Antikörper Durchflusszytometrie**

<b>Antigen</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Hersteller</b>
CD45	FITC, PE, PE-Cyanine5, PE-Cyanine7, APC; APC-Cyanine7, APC-eFluor 780, Pacific Blue	1/100	Leukozyten	eBioscience
CD19	FITC, PE, APC	1/100	B-Zellen	eBioscience
B220	FITC, PE, APC	1/100	B-Zellen	eBioscience
CD45	Brilliant Violet 421	1/100	Leukozyten	BD Pharmingen
PD-1	APC-eFluor 780	1/100	T-Zell-Exhaustion	eBioscience
PD-L1	Brilliant Violet 421	1/400	Immunchek pointmolekül	BD Pharmingen
AnnexinV	APC	1/100	Apoptose	eBioscience
BrdU	APC	1/100	DANN-Synthese	eBioscience
PD-L2	PE	1/100	Immunchek pointmolekül	eBioscience
Isotype Control Rat IgG2b κ	Brilliant Violet 421	1/400	Kontrolle	BD Pharmingen
Isotype Control Armenian Hamster	APC-eFluor 780	1/100	Kontrolle	eBioscience
DAPI		1/1000	Lebend-Tot-Färbung	Thermo Fisher
PI (Propidiumiodid)		1/10000	Lebend-Tot-Färbung	Sigma-Aldrich

## 4.10 Software und Websites

**Tabelle 19: Software**

<b>Name</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
NanoDrop 2000	Spektrophotometer	Thermo Scientific
StepOne	qPCR Software	Applied Biosystems
Quantity One Software	Gel-doc	Bio-Rad

RStudio (Version 0.99.903)	Statistische Analysen	RStudio
GraphPad Prism 6	Graphische Auswertungen	Graphpad Software, Inc
FlowJo_V10	Auswertung Durchflusszytometrie	FlowJo LLC
Adobe Illustrator CS6	Graphen, Bilder	Adobe Systems
Aperio ImageScope	Histologie	Leica Biosystems
Serial Cloner	Design von Primern	Serial Basics

**Tabelle 20: Websites**

<b>Name (Link)</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Referenz</b>
TIDE Onlinetool ( <a href="https://tide.nki.nl/">https://tide.nki.nl/</a> , Stand 03.12.2019)	Analyse von INDEL Sequenzierungen	Netherlands Cancer Institute (NKI) (Brinkman et al. 2014)
PrimerBank ( <a href="https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/">https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/</a> , Stand 03.12.2019)	Datenbank diverser Primer für qPCR	Harvard Medical School (Spandidos et al. 2010)
Gene Expression Omnibus (GEO) ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a> , Stand 03.12.2019)	Datenbank für Genexpressionsdaten	NCBI (Edgar, Domrachev, and Lash 2002)
ShinyGEO ( <a href="http://bioinformatics.easternct.edu/shinyGEO/">http://bioinformatics.easternct.edu/shinyGEO/</a> , Stand 03.12.2019)	R basierte App zur Analyse von GEO Datensätzen	Eastern Connecticut State University (Dumas, Gargano, and Dancik 2016)
NEBioCalculator ( <a href="https://nebiocalculator.neb.com/#/!/">https://nebiocalculator.neb.com/#/!/</a> igation, Stand 03.12.2019)	Berechnen der Vektor-Insert Ratio	New England BioLabs
CHOPCHOP ( <a href="http://chopchop.cbu.uib.no/">http://chopchop.cbu.uib.no/</a> , Stand 03.12.2019)	Design von Guides für CRISPR Cas9	(Labun et al. 2016; Montague et al. 2014)

# 5 Methoden

## 5.1 Arbeiten mit Zellkulturen

### 5.1.1 Murine Lymphomzelllinien

Es wurde insgesamt mit vier murinen Lymphomzelllinien gearbeitet: drei Zelllinien, die aus primären E $\mu$ -MYC Lymphomen generiert wurden sowie die kommerziell erhältliche Zelllinie A20. Bei transgenen E $\mu$ -MYC Mäusen unterliegt das *Myc*-Gen der Kontrolle des transkriptionellen IgH Enhancers. E $\mu$ -MYC Mäuse entwickeln mit einer Latenz von 3-12 Monaten eine Erkrankung, die sich ähnlich zum humanen BL präsentiert und ein etabliertes Modell der *Myc*-induzierten Lymphomagenese darstellt. (Adams et al. 1985; Harris et al. 1988)

Drei murine Lymphomzelllinien, die in der Arbeitsgruppe aus spontan entstandenen E $\mu$ -MYC Lymphomen generiert wurden, wurden im folgenden verwendet: 483, 449 und 665. In allen drei Zelllinien wurde *Myc* in hohem Level nachgewiesen, zudem wurde für die Zelllinie 483 eine Mutation im *tp53*-Gen gezeigt (nicht publizierte Daten der AG Keller).

Die Zelllinien wurden in Lymphomzellmedium (RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% NEAA, 1% L-Glutamin sowie 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol) unter Standardbedingungen als Suspensionszellen kultiviert. Im Falle von schlechtem Wachstum oder nach dem Auftauen wurden die Zellen in oben genanntem Medium mit 20% FCS kultiviert. Alle Media sowie deren Zusätze wurden durch einen 0,2  $\mu$ l Filter steril filtriert und vor der Verwendung bei Raumtemperatur oder im Wasserbad aufgewärmt. Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Abzugshaube mit der benötigten Biosicherheitsstufe 1 oder 2 durchgeführt.

Die Zellen wurden täglich versorgt indem zuerst unter dem Mikroskop die Viabilität beurteilt und Kontaminationen ausgeschlossen wurden. Anschließend wurden die Zellen aus der Kulturflasche in ein Reaktionsgefäß überführt. 20  $\mu$ l der Zellsuspension wurden abgenommen und mit dem gleichen Volumen

Trypan-Blau, einem Lebend-Tot-Farbstoff, gefärbt. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die lebenden Zellen unter dem Mikroskop gezählt und damit die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension errechnet. Anschließend wurden die Zellen ein Mal mit Medium gewaschen und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium in neue Zellkultur-Flaschen gegeben. Die Inkubation fand in einem geeigneten Inkubator mit einer Temperatur von 37 °C sowie einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% statt.

Des Weiteren wurde die murine Zelllinie A20 verwendet. A20 Zellen wurden in A20-Medium (RPMI 1640 Medium angereichert mit 10% FCS, 1% Pen/Strep und 0,1%  $\beta$ ME) kultiviert. Die Kultur der Zelllinie A20 entspricht der für E $\mu$ -MYC Zellen geschilderten Methodik.

### **5.1.2 Weitere verwendete Zelllinien**

Phönix-Zellen wurden verwendet, um als *Packaging*-Zellen Virusüberstand für Transduktionen zu generieren. Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in Phönix-Medium (DMEM + 10% FCS). Sobald die Zellen in der Kulturflasche einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurde zuerst das Medium vorsichtig mit der Pipette abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin (1X) von dem Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach dem Waschen mit Medium wurden die Zellen gezählt und mit der gewünschten Konzentration pro ml ausplattiert.

### **5.1.3 Kryokonservierung von Zellen**

Mittels Kryokonservierung konnten eingefrorene Zelllinien über eine lange Zeit gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut und in Kultur genommen werden. Um Zellen einzufrieren wurden zunächst  $10 \times 10^6$  viable Zellen mit Medium gewaschen und anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das entstandene Pellet in 1 ml Freeze-Medium (FCS + 10% DMSO) resuspendiert, in ein spezielles Gefäß zur Kryokonservierung umgefüllt und in einem Gefrierbehälter in einen Kühlschrank mit der Temperatur von -80 °C verfrachtet. Der benutzte Gefrierbehälter sorgte dafür, dass die Zellen mit einer konstanten Temperaturabnahme von -1 °C pro Minute schonend eingefroren wurden. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen in einen

Tank mit flüssigem Stickstoff bei -160 °C überführt, um hier über längere Zeit gelagert zu werden.

Für das Auftauen der konservierten Zellen wurde zunächst das Kulturmedium im Wasserbad vorgewärmt. Anschließend wurden die Röhrchen aus dem Stickstoff-Tank entfernt und die Zellsuspension in einem Volumen von 10 ml warmem Medium durch auf- und abpipettieren langsam aufgetaut. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen nun in Kulturflaschen gegeben und nach oben beschriebenen Methoden weiter kultiviert.

#### **5.1.4 P493-6 Zelllinie mit tetrazyklinabhängiger Suppression von MYC**

Die humane B-Zelllinie P493-6 beinhaltet ein Tet-OFF System, mit dem sich die *MYC* Expression der Zellen über die Gabe von Tetrazyklin an- und ausschalten lässt. Eine Kultivierung der Zellen ohne Tetrazyklin führt zu Expression von *MYC*, die Zugabe von Tetrazyklin führt zur Suppression.

Die Zelllinie P493-6 wurde verwendet, um Effekte von *MYC* auf die Expression von Immuncheckpointmolekülen zu studieren. Dabei wurde pro Versuch mit Triplikaten gearbeitet. Zunächst wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium in Lymphomzellmedium kultiviert und Zellen für weitere Analysen wie z.B. der quantitativen PCR gewonnen (*MYC* ON). Nach 24 h wurde Tetrazyklin (0,1 µg/ml) zum Medium hinzugefügt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. In einem Kontrollansatz wurde kein Tetrazyklin zugegeben, sodass die Zellen im *MYC* ON Stadium verblieben. Auch hier wurden wieder Zellen für Analysen entnommen (*MYC* OFF und Kontrolle). Dann wurden durch zweimaliges Waschen mit Medium das restliche Tetrazyklin aus der Zellkultur entfernt und die Zellen ohne Tetrazyklin kultiviert. Nach 48 h wurden erneut Zellen entnommen (*MYC* ON).

## **5.2 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese wurde genutzt, um eine Probe von DNA-Fragmente der Länge nach aufzutrennen, zum Beispiel als Kontrolle eines Vektorverbaus oder Identifizierung eines Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Produktes. Dazu wurde zunächst ein Agarosegel (1,5% Agarose in Wasser +

0.5 µg/ml Ethidiumbromid) hergestellt und in die Kammer gefüllt, welche mit NAB-Puffer aufgefüllt wurde. Die Proben wurden mit Ladepuffer (10X) versetzt und in die Taschen gegeben. Durch das Anlegen eines Spannungsfelds von 150-180 V wurden die negativ geladenen DNA-Fragmente Richtung Kathode bewegt. Größere Fragmente wanderten dabei langsamer als kleinere, wodurch eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe möglich war. Die Markierung der DNA-Fragmente erfolgte durch die in die DNA interkalierende Substanz Ethidiumbromid. Nach Abschluss der Gelelektrophorese konnten die DNA-Fragmente im Gel unter UV-Licht an der GelDoc Universal Hood II (BioRad) sichtbar gemacht werden. Anhand des DNA-Standards, welcher als Referenz mit aufgetragen wurde, konnte den entstandenen Banden eine bestimmte Größe von Basenpaaren (bp) zugeordnet werden.

Bei Bedarf erfolgte die Aufreinigung von Proben aus dem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers.

### 5.3 Klonierung von *Pd-11* bzw. *Pd-12* in den MSCV-IRES-GFP Vektor mittels *SLIC Cloning*

Zur Klonierung von murinem *Pd-11* und *Pd-12* in den MSCV-IRES-GFP Vektor wurden zunächst Konstrukte von OriGene Technologies (*Pd-11*: Artikelnummer MC201908, *Pd-12*: Artikelnummer MC210166) gekauft. Der MSCV-IRES-GFP Vektor (Addgene Plasmid #20672, im Anhang siehe Abbildung 13) wurde für eine konstitutive Expression des Zielgens in den Lymphomzellen verwendet. Anhand der im Vektor enthaltenen Sequenz für *green fluorescent protein* (GFP) ließen sich die transduzierten Zellen anschließend sicher identifizieren.

Zum Klonieren wurde ein sequenz- und ligationsunabhängiges Verfahren, genannt *SLIC-Cloning*, verwendet (Li and Elledge 2007). Durch spezielle Primer, die neben der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym sowohl Überhänge in den Vektor als auch in das Insert enthielten, wurden bei der Amplifikation des Inserts am PCR-Produkt komplementäre Überhänge zum geschnittenen Vektor generiert. So konnte im nächsten Schritt gleich die Zusammenlagerung der komplementären Fragmente stattfinden.

Alle im Folgenden verwendeten Primer wurden mit der Software Serial Cloners (Serial Basics) designt und von der Firma Eurofins Genomics bestellt.

### 5.3.1 Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Zunächst wurde mittels einer Gradienten-PCR die optimale Temperatur zur Amplifikation der cDNA-Konstrukte ermittelt. Nach Pipettieren des Mastermix (siehe Tabelle 21) wurden je 100 µl des Mastermix und 200 ng der cDNA in Reaktionsgefäße gefüllt und die Gradienten-PCR gestartet (für Temperaturprofil siehe Tabelle 22).

**Tabelle 21: Pipettierschema PCR mit Pfu-Polymerase**

10 µl	10X Pfu Puffer
5 µl	DMSO
4 µl	dNTPs [10 mM]
1 µl	Primer (vorwärts) [100 µM]
1 µl	Primer (rückwärts) [100 µM]
2 µl	Pfu Turbo
2 µl	MgCl <sub>2</sub> [50 mM]
200 ng	cDNA
ad 100 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 22: Temperaturprofil Gradienten-PCR**

95 °C	Denaturierung	2 min	x 30
95 °C	Denaturierung	30 s	
Gradient	Primerhybridisierung	30 s	
72 °C	Elongation	2 min	
72 °C	Elongation	10 min	
10 °C	Lagerung	unendlich	

Mit der ermittelten optimalen Temperatur wurde erneut eine PCR durchgeführt und die amplifizierte DNA aus dem PCR-Produkt mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Probe wurde mittels NanoDrop™2000c (Thermo Fisher) spektralphotometrisch bestimmt.

### 5.3.2 Verdau des Vektors

Zum Verdau des Vektors wurden 2 µg DNA je nach Protokoll des gewünschten Restriktionsenzym eingesetzt. Für den Verdau mittels EcoRI wurde 2,5 µl Cut

Smart Puffer, 1 µl EcoRI und 2 µg Vektor in einem Volumen von 12 µl für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl Cut Smart Puffer sowie 2 µl CIP zur Dephosphorylierung der DNA-Enden folgte eine erneute Inkubation bei 37 °C für 1 h. Durch Auftrennung des Produkts mittels Gelelektrophorese konnte die Linearisierung des Vektors bestätigt werden, da sich der zirkuläre Vektor langsamer als der verdaute Vektor durch das Gel in Richtung Kathode bewegte. Anschließend wurde der verdaute Vektor aus dem Versuchsansatz mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Auch hier wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop™2000c gemessen.

### 5.3.3 Ligation mittels T4-Polymerase:

Im nächsten Schritt erfolgte die Ligation mittels T4-Polymerase. Dazu wurde zunächst mit dem NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) die Vektor-Insert-Ratio von 1:2 berechnet. Dann wurde je ein Reaktionsansatz pro Konstrukt mit dem Mastermix (siehe Tabelle 23) vorbereitet und die berechnete Menge des cDNA Konstrukts zugegeben.

**Tabelle 23: Pipettierschema Ligation mittels T4-Polymerase**

100 ng	geclipter Vektor
1 µl	1X NEB Buffer
1 µl	10X BSA
0,2 µl	0,6 U T4 Polymerase
28,16 ng bzw 24 ng	Insert PD-L1 bzw PD-L2
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde nun für 150 s bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen.

### 5.3.4 Transformation des Vektors in kompetente Bakterien

Es folgte die Transformation des generierten Vektors in kompetente *DH5α E.coli* Bakterien zur Vervielfältigung der Plasmide. Dazu wurden 2 µl des Vektors zu 50 µl *DH5α E.coli* gegeben und die Transformation mittels Hitzeschock-Verfahren für 45 s bei 42 °C durchgeführt. Anschließend wurden jeweils 200 µl SOC-Medium zugeführt und je 50 µl des Produkts auf einer vorgewärmten Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) zur Selektion der

rekombinanten Bakterien ausplattiert. Zur Sicherheit wurden die restlichen 150 µl der Bakteriensuspension auf eine weitere Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Nach 12 h Inkubation wurden die Platten auf Kolonien untersucht und diese auf der Platte markiert. Die Platten wurden anschließend bei 8° C gelagert.

Um größere Mengen der Plasmide herzustellen, wurde eine Kultur eines der gewachsenen Klone in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C angesetzt. Anschließend wurde mittels HiSpeed® Plasmid Mini Kit (Qiagen) die Plasmid DNA nach Herstellerangaben extrahiert. Für weitere Experimente wurde mittels des HiSpeed® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) auch größere Mengen Plasmid DNA aus einem Volumen von 200 ml Bakteriensuspension extrahiert.

Zudem wurden 500 µl der Bakteriensuspension in 500 µl Glycerol (50%) bei -80 °C eingefroren, um jederzeit wieder neue Bakteriensuspension für DNA-Extraktion herstellen zu können, ohne erneut die Transformation durchführen zu müssen.

### **5.3.5 Kontrolle der Transformation: Colony-PCR und Sequenzierung**

Um zu überprüfen, welche Klone erfolgreich einen Vektor mit Insert aufgenommen hatten wurden von jeder Platte zehn Kolonien ausgesucht, von denen eine Colony-PCR durchgeführt wurde. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze etwas von dem Klon abgenommen und in 50 µl Wasser resuspendiert sowie für 10 min bei 96 °C inkubiert. Anschließend wurde mit dem Mastermix aus Tabelle 24 mit je 24 µl Mastermix auf 1 µl DNA die Colony-PCR gestartet (Temperaturverlauf in Tabelle 25).

**Tabelle 24: Pipettierschema Colony-PCR mittels Taq-Polymerase (1X Volumen je DNA)**

0,3 µl	SLIC-Primer (vorwärts)
0,3 µl	SLIC-Primer (rückwärts)
2,5 µl	10X Puffer
5 µl	Q-Solution
0,7 µl	dNTPs [10 mM]
0,3 µl	Taq Polymerase
1 µl	MgCl <sub>2</sub> [50 mM]

13,9 µl      H<sub>2</sub>O  
je 1 µl        DNA

**Tabelle 25: Temperaturverlauf Colony-PCR**

95 °C	Denaturierung	2 min	
95 °C	Denaturierung	30 s	x 35
46 °C	Primerhybridisierung	30 s	
72 °C	Elongation	1 min	
72 °C	Elongation	10 min	
10 °C	Lagerung	unendlich	

Durch Auftrennung der Produkte mittels Gelelektrophorese konnte die Größe der entstandenen DNA-Produkte ermittelt werden. Nur Klone, welche den Vektor mit dem klonierten Insert aufgenommen hatten, zeigten eine Bande mit der entsprechenden Größe.

Um sicher zu stellen, dass während des Klonierens die Gensequenz der Konstrukte nicht verändert wurde, wurden jeweils Proben der aufgereinigten DNA zur Sequenzierung nach Sanger an die Firma Eurofins Genomics geschickt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte gemäß Protokolls des Herstellers.

#### 5.4 Transfektion von Phönix-*Packaging* Cells

Um eine unkontrollierte Replikation der generierten Plasmide in Zellen zu verhindern, fehlen in den Plasmiden wichtige Gene für die Replikation der viralen DNA. Erst durch Transfektion von speziellen Verpackungszelllinien, welche die entsprechenden Gene bzw Proteine besitzen, können durch die Verpackungszellen fertige, infektiöse Viruspartikel produziert werden.

Zur Virusgewinnung für nachfolgende Transduktionen wurden murine Phönix-Zellen (HEK T293 Zellen) benutzt. Diese wurden in Passage 8 aufgetaut und über Nacht in Medium (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Am nächsten Tag wurden jeweils  $4,5 \times 10^6$  Zellen auf eine Zellkultur-Platte mit einem Durchmesser von 10 cm ausplattiert. Am Tag darauf erfolgte die Transfektion mittels Lipofectamin 2000® (Thermo Fisher), welches durch Liposomenbildung den Transport von Plasmid-DNA über die Zellmembran in

das Zytoplasma erleichterte. Es wurden 20 µg DNA mit 750 µl Opti-MEM® Medium (Gibco™) sowie 30 µl Lipofectamin 2000® mit 750 µl Opti-MEM® Medium gemischt und die beiden Ansätze nach 10 min Inkubationszeit zusammengeführt. Danach erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt von 30 min bei Raumtemperatur. Inzwischen wurde das Medium der Zellkultur-Platten durch 4 ml DMEM + 10% FCS ohne Penicillin/Streptomycin ausgetauscht, um eine Beeinträchtigung der Transfektion durch die Antibiotika zu vermeiden. Danach wurden 1,5 ml des Reaktionsansatzes vorsichtig auf die Zellkultur-Platten mit den Phönix-Zellen geträufelt. Die Platten wurden für 4-6 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und neues Medium dazu gegeben. Dabei wurde das Medium passend zu der Zelllinie, die für die anschließende Transduktion verwendet wurde, ausgewählt.

24 h und 36 h nach der Transfektion wurde der Überstand mit dem damit enthaltenen Virus abgenommen, durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße gegeben und anschließend bei 8 °C aufbewahrt.

## 5.5 Transduktion von Lymphomzellen

Der Vorgang der Transduktion bezeichnet das Einbringen von DNA in eine Zelle durch einen viralen Vektor. Die Verwendung von Retroviren ermöglicht es dabei, die virale DNA stabil in das Genom der transduzierten Zelle zu integrieren. So kann eine stabile Expression des Zielgens in der Zelle und der daraus entstehenden Population gewährleistet werden.

Zur Transduktion wurde jeweils der Virus-Überstand im Verhältnis 1:5 mit Transduktionsmedium ( $\alpha$ MEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% NEAA) verdünnt. Dadurch konnte die Inzidenz von mehrfachen Transduktion pro Zelle gesenkt werden, wobei die Transduktionseffizienz noch bei circa 10% lag. Es wurden zunächst jeweils 3 ml verdünnter Virusüberstand in eine 6-Well-Platte gegeben. In jedes Well wurden  $2,5 \times 10^6$  der zu transduzierenden Lymphomzellen in 200 µl Transduktionsmedium gegeben. Anschließend wurden 3,2 µl Polybren (1 µl/ml Medium) pro Ansatz hinzugefügt.

Zur Verbesserung der Transduktions-Effizienz wurden die Platten in der vorgeheizten Zentrifuge bei 32 °C eine Stunde lang mit 1200 rpm zentrifugiert.

Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden die Zellen in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert. In eine 6-Well-Platte wurden erneut 3 ml des verdünnten Virus-Überstands gegeben und die Zellpellets nach der Zentrifugation in je 200 µl Transduktionsmedium resuspendiert und dazugegeben. Nach erneuter Zugabe von 3,2 µl Polybren pro Ansatz folgte erneut eine Zentrifugation für 1 h bei 32 °C und 1200 rpm.

Am 3. Tag nach der Transduktion wurde die Effizienz anhand des Prozentsatzes der GFP(+) Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

## 5.6 Anreicherung der transduzierten Zellen durch FACS

In Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum konnten die transduzierten Lymphomzellen anhand des GFP-Markers an einem BD FACSAria™ III (BD) am Institut für Klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar mittels FACS (*fluorochrome activated cell sorting*) angereichert werden. Nach der Anreicherung wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt, dass die Kultur nun mehr als 90% GFP-positive Zellen enthielt.

Nach dreitägiger Kultivierung der Zellen wurden diese jeweils in Portionen von  $10 \times 10^6$  in 1 ml Freeze-Medium (FCS + 10% DMSO) eingefroren und für die verschiedenen Versuche jeweils eine frische Portion aufgetaut.

## 5.7 Knockout von *Pd-11* mittels CRISPR/Cas9 System

CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas9 ist eine etablierte Methode, um präzise und kostengünstig genomische Veränderungen in diversen Organismen hervorzurufen und die damit assoziierten Phänotypen zu untersuchen. Es basiert auf dem natürlich vorkommenden CRISPR/Cas9 System aus *Streptococcus thermophiles* als Verteidigungsstrategie von Prokaryoten gegen Virusinfektionen (Barrangou et al. 2007; Doudna and Charpentier 2014). Das System besteht aus zwei Komponenten: der Guide-RNA, welche die Schnittstelle markiert und dem

Protein Cas9, einer RNA-vermittelte DNA-Endonuklease. Cas9 agiert als Genschere und führt einen Doppelstrangbruch der DNA herbei. In der Folge kommt es zu Reparaturmechanismen der DNA, wie dem *non homologous end-joining mediated repair* sowie dem *homology directed repair*. Infolgedessen können Insertionen oder Deletionen einzelner Basen im reparierten Zielgen entstehen. Diese führen schlussendlich über eine Leseraster-Verschiebung bei der Translation zum Ausfall des Genprodukts.

### **5.7.1 Design von Guide-RNAs**

Zunächst wurden mit dem Online Tool CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) Guide-RNAs erstellt, die später als Mediator für das Herausschneiden des Genfragments durch das Cas9-Protein wirkten. Die Auswahl der Guide-RNAs erfolgte anhand der von CHOPCHOP erstellten Rangliste, welche unter anderem mögliche *off target* Effekte sowie die Knockout-Effizienz berücksichtigte. Anhand der Sequenz der Guide-RNAs wurden jeweils zwei Oligonukleotide designt, die im Verlauf zu der Guide-RNA hybridisiert werden konnten. Alle Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt.

### **5.7.2 Herstellung von doppelsträngigen Guide-RNAs**

Im ersten Schritt wurden die komplementären Oligonukleotide, die für die drei Guide-RNAs bestellt wurden, jeweils zu einem doppelsträngigem DNA-Strang zusammengefügt. Dafür wurde in ein Reaktionsgefäß jeweils 1 µl Oligonukleotid (vorwärts, 100 µM), 1 µl Oligonukleotid (rückwärts, 100 µM) sowie 98 µl TE Buffer gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei 99 °C im Heizblock inkubiert und anschließend über den Zeitraum von 2 h auf Raumtemperatur abgekühlt.

### **5.7.3 Klonieren der Guide-RNAs in den lenti CRISPR v2 Vektor**

Die doppelsträngigen Guide-RNAs wurden nun mittels *Golden Gate Cloning* (Engler, Kandzia, and Marillonnet 2008) in den lenti CRISPR v2 Vektor (Addgene plasmid #52961, Vektorkarte im Anhang siehe Abbildung 14) kloniert. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerprotokoll (siehe Tabelle 26) hergestellt und in PCR-Gefäße gegeben. Die Golden Gate Reaktion lief nun in einem Thermo-Cycler mit folgendem Temperaturprofil (siehe Tabelle 27) ab.

**Tabelle 26: Pipettierschema Golden Gate Cloning (1X Volumen je Guide)**

50 ng	lenti-CAS9-eGFp Vektor
2 µl	T4 Promega Ligase Buffer
1 µl	T4 Promega Ligase (400.000 U/µl)
1 µl	BsmBI NEB (10 U/µl)
1 µl	Guide RNA (1:10 in H <sub>2</sub> O)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 27: Temperaturverlauf Golden Gate Reaktion**

37 °C	Restriktion	5 min	x 9
16 °C	Ligation	10 min	
55 °C	Digestion	5 min	
80 °C	Hitzeinaktivierung	5 min	

Mittels oben beschriebener Methode (siehe Abschnitt 5.3.4) wurde nun der ligierte Vektor in kompetente *DH5α E.coli* transformiert und die Bakterien zur Selektion auf Ampicillin-Platten ausgestrichen.

#### **5.7.4 Knockout des Zielgens in einer Zelllinie**

Der aufgereinigte lenti CRISPR v2 Vektor wurde nun zunächst in Phoenix-Zellen transfiziert, um Virusüberstand zu sammeln (siehe Abschnitt 5.4). Anschließend erfolgte die lentivirale Transduktion der gewünschten Lymphomzelllinie (analog zur retroviralen Transduktion, siehe Abschnitt 5.5). Nach einer Kulturdauer von 3 Tagen wurde der Erfolg des Knockdowns anhand der Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden zunächst die GFP(+) Zellen entsprechend der Zellen, welche einen Vektor aufgenommen haben, selektioniert und in diesen der Proteingehalt des Zielgens gemessen.

#### **5.7.5 gDNA Extraktion**

Um die Qualität des durchgeführten Knockouts beurteilen zu können, wurde eine quantitative Analyse der Insertions- und Deletionsmutationen durchgeführt. Dafür wurde zunächst genomische DNA aus Zellpellets gewonnen. Zur Extraktion der gDNA aus Zellpellets wurde das Wizard Genomics DNA Purification Kit (Promega) gemäß der Herstellerangaben inklusive eines zusätzlichen DNase-Verdaus verwendet. Die extrahierte DNA wurde in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 5.7.6 INDEL-Sequenzierung

Zunächst wurde das gewünschte gDNA-Fragment mittels PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase (Qiagen) gemäß Protokoll des Herstellers amplifiziert. Anschließend wurde das Produkt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt und zur Sequenzierung mit den zugehörigen Primern an Eurofins Genomics gesendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden nun mit dem Online-Tool CRISPR TIDE (<https://tide-calculator.nki.nl/>) auf Insertionen oder Deletionen untersucht und diese grafisch dargestellt. Als Kontrolle wurde genomische DNA einer mit dem Leervektor transduzierten Zellpopulation verwendet.

## 5.8 Quantifizierung der Genexpression mittels qPCR

Mittels quantitativer PCR (qPCR) wurde bestimmt, wie viele mRNA-Kopien eines bestimmten Gens in einer Probe vorlagen. Die Quantifizierung erfolgte am StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher sich während der Amplifikation an doppelsträngige DNA anlagerte. In dem StepOnePlus Real-Time PCR System wurde nach jedem Zyklus der Amplifikation die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Anzahl an Zyklen, nach dem sich die Fluoreszenzintensität erstmals deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhob wurde als *cycle of threshold* (Ct)-Wert bezeichnet. Ein niedriger Ct-Wert bedeutete, dass zu Beginn bereits viele Kopien der mRNA vorlagen. Ein hoher Ct-Wert bedeutete dementsprechend eine geringe Anzahl an mRNA Kopien in der untersuchten Probe. Ab dem gemessenen Ct-Wert verdoppelte sich die Anzahl der DNA Kopien und damit die Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus. Aus dem Ct-Wert ließ sich der relative Unterschied in der mRNA-Expression des Zielgens zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe berechnen. Normalisiert wurden die Daten auf ein *Housekeeping*-Gen, welches ubiquitär in allen Zellen exprimiert wurde.

### 5.8.1 Extraktion von RNA

Als erstes wurde RNA aus Zellpellets mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß Protokoll des Herstellers isoliert. Nach erfolgreicher Präparation wurde die

RNA-Konzentration sowie die Reinheit der Probe mit dem NanoDrop™2000c ermittelt.

### 5.8.2 Synthese von cDNA

Im nachfolgenden Schritt wurde aus der isolierten RNA mittels reverser Transkription (RT) cDNA synthetisiert. Hierfür wurde das Omniscript RT Kit (Qiagen) verwendet. Der Mastermix wurde nach Herstellerangaben zusammengestellt (siehe Tabelle 28). Je 8 µl des Mastermix wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und 1 µg RNA hinzugefügt. Die cDNA-Synthese lief in dem Genetouch Thermal Cycler (Biozym) mit folgendem Temperaturprofil ab (siehe Tabelle 29).

**Tabelle 28: Pipettierschema cDNA Synthese**

2 µl	10X Puffer RT
2 µl	dNTPs
2 µl	Oligo dTs
1 µl	Rnase Out
1 µl	reverse Transkriptase
1 µg	RNA
ad 12 µl	Wasser

**Tabelle 29: Temperaturverlauf cDNA-Synthese**

37 °C	Reverse Transkription	30 min
37 °C	Reverse Transkription	30 min
93 °C	Inaktivierung der RT	5 min
4 °C	Aufbewahrung	unendlich

### 5.8.3 qPCR

Für die qPCR wurde zunächst ein Mastermix nach Protokoll des Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen) vorbereitet. Danach wurden je 24,2 µl des Mastermix in eine 96-Well-Platte vorgelegt und 0,8 µl cDNA hinzugefügt.

**Tabelle 30: Pipettierschema Mastermix qPCR**

15,6 µl	SYBR-Green
0,5 µl	ROX Die
0,05 µl	Primer (vorwärts)
0,05 µl	Primer (rückwärts)

Als Referenz-Gen wurde murines oder humanes Ubiquitin verwendet. Alle Ansätze wurden als Duplikate pipettiert. Die Platte wurde mit selbstklebender Folie luftdicht verschlossen und kurz abzentrifugiert, bevor die qPCR gestartet wurde. Für die Durchführung der qPCR wurde im StepOnePlus Real-Time PCR System das Temperaturprotokoll aus Tabelle 32 verwendet.

**Tabelle 31: Temperaturverlauf qPCR**

95 °C	Aufbewahrung	10 min	
95 °C	Denaturierung	15 s	} x 40
60 °C	Primerhybridisierung	1 min	
95 °C	Denaturierung	15 s	
95 °C	Schmelzkurve	15 s	
60 °C	Schmelzkurve	1 min	
95 °C	Schmelzkurve	15 s	

Nach Beenden der qPCR wurden die Ergebnisse als Excel-Datei gespeichert und am Computer mittels der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet.

Dabei wurden zunächst die Ct-Werte der Zielgene zu den Werten des Housekeeping-Gens normalisiert (siehe Formel 1). Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert als mittleres  $\Delta\text{Ct}$  Mittelwert berechnet. Nach der Normalisierung der Ct-Werte wurden die Werte der Kontrollgruppe (z.B. MSCV Kontrollgruppe) von den Werten der Versuchsgruppe (z.B. PD-L1(+) Gruppe) subtrahiert (siehe Formel 2) und daraus der Mittelwert  $\Delta\Delta\text{Ct}$  berechnet. Die relative Differenz zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe konnte nun anhand Formel 3 berechnet werden.

Formel (1):  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$

Formel (2):  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Versuchsgruppe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrollgruppe}}$

Formel (3):  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{Mittelwert}}}$

## 5.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um einzelne Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität sowie den zuvor fluoreszenzgefärbten membrangebundenen oder intrazellulären Proteinen zu charakterisieren.

Die vorbereiteten Zellen wurden in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch das Durchflusszytometer an Lasern vorbeigeführt. Dabei registrierte ein Detektor die Streuung des Laserstrahles beim Auftreffen auf eine Zelle, wodurch sich Zellgröße (*forward scatter*, FS) und Granularität (*sideward scatter*, SS) bestimmen ließen. Zusätzlich wurden Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Durch den Laserstrahl wurden die Fluorochrome angeregt und emittierten daraufhin Licht mit einer für jedes Fluorochrom spezifischen Wellenlänge. Alle verwendeten Fluorochrome sowie ihre Eigenschaften finden sich in Tabelle 32. Durch Erfassung des emittierten Lichts konnte ermittelt werden, wie viele angefärbte Moleküle die einzelne Zelle besaß.

**Tabelle 32: Verwendete Fluorochrome und ihre Eigenschaften**

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Detektionskanal
FITC	494 nm	520 nm	FL1
GFP	488 nm	510 nm	FL1
PE	496 nm	578 nm	FL2
PI	535 nm	617 nm	FL3
Texas Red	596 nm	615 nm	FL3
PE-Cy5	496 nm	667 nm	FL4
PE-Cy7	496 nm	785 nm	FL5
APC	650 nm	660 nm	FL8
APC e-Fluor 780	645 nm	767 nm	FL9
APC-Cy7	650 nm	785 nm	FL9
e-Fluor 506	405 nm	506 nm	FL6
Pacific Blue	401 nm	452 nm	FL6
Brilliant Violet 421	405 nm	421 nm	FL6
DAPI	350 nm	470 nm	FL6

Im Allgemeinen wurde für die Analyse am Durchflusszytometer jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Rundboden-Röhrchen gegeben und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml HF2-Puffer gewaschen. Falls keine

Färbung erfolgte, wurden sie in 300 µl HF2-Puffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert, beispielsweise bezüglich des Prozentsatzes an GFP-positiven Zellen.

Es wurde ein FACS CyAn™ ADP (Beckman Coulter) Durchflusszytometer mit drei Lasern benutzt. Um Färbungen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen in einer Probe durchführen zu können, wurden Farbkontrollen aus entsprechenden Wildtyp-Zellen hergestellt. Dafür wurden für jedes verwendete Fluorochrom  $1 \times 10^6$  Zellen mit Anti-CD45-Antikörper, gekoppelt mit dem entsprechenden Fluorochrom, gefärbt. Bei Messung der Farbkontrollen konnte nun für jedes Fluorochrom eine positive und eine negative Population definiert werden. Anhand dieser wurden die Laser des Gerätes eingestellt und anschließend die eigentliche Messung der Proben durchgeführt.

Um die Expression eines Moleküls auf einer Zelle quantifizieren zu können wurden Isotyp-Kontrollen verwendet. Für diese wurden die Zellen mit Isotyp-Antikörpern gefärbt, welche derselben Antikörper-Klasse angehörten und an das entsprechende Fluorochrom gekoppelt waren wie der spezifische Antikörper. Durch die unspezifische Bindung der Isotyp-Antikörper an der Zelloberfläche ließ sich ein Wert der Hintergrund-Fluoreszenz feststellen. Bei der Auswertung der Expressionsdaten erfolgte die Quantifizierung mittels Normalisierung der Medianen Fluoreszenz Intensität (MFI) der Probe im Vergleich zu der Isotyp-Kontrolle.

Die generierten Dateien wurden am Computer mit der Software FlowJo\_V10 (FlowJo LLC) ausgewertet. Falls nötig wurde zuerst anhand der Farbkontrollen die Kompensation der spektralen Überlappungen der Fluorochrome mit der Software errechnet und auf die gemessenen Proben übertragen. Im Allgemeinen wurde dann zunächst die Zellpopulationen anhand der Größe und Granularität eingegrenzt und somit Zell-Debris aus der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden Proben eliminiert, bei denen zwei Zellen gleichzeitig in den Flüssigkeitsstrom der Maschine eingezogen wurden (Dupletten). Dann wurden anhand des verwendeten Leben-Tot-Farbstoff die lebenden Zellen eingegrenzt und für weitere Analysen ausgewählt.

### **5.9.1 Färbung von extrazellulären Proteinen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern**

Für eine Färbung wurde zunächst ein Mastermix mit den verwendeten Antikörpern vorbereitet. Pro Probe wurde ein Volumen von 100 µl zum Färben benötigt. Die Konzentration der Antikörper wurde empirisch ermittelt und betrug für die meisten Antikörper 1:100 (siehe Tabelle 18). Für die Färbung wurden die Zellpellets mit je 100 µl des Mastermix resuspendiert und für 30 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml FACS-Puffer, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 300 µl Propidiumiodid (PI)-Solution als Lebend-Tot-Färbung resuspendiert und bis zur Analyse am Durchflusszytometer auf Eis im Dunklen gelagert.

### **5.9.2 BrdU-Assay zur Analyse des Zellzyklus**

Der BrdU-Assay wurde verwendet, um die Verteilung der Zellzyklus-Stadien in einer Zellpopulation zu untersuchen. Nach Inkubation der Zellen mit dem Basenanalogon BrdU konnte gemessen werden, in welchen Zellen neue DNA synthetisiert wurde. Zusätzlich wurde ein weiterer Farbstoff wie PI oder DAPI verwendet, um den DNA-Gehalt einer Zelle messbar zu machen. Für die Zellzyklusanalyse wurde das APC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) sowie das FIX & PERM Cell Permeabilization Kit (Thermo Fisher) gemäß Protokoll des Herstellers verwendet.

In einer 6-Well-Platte wurden zunächst  $3 \times 10^6$  Zellen in frischem Medium ausplattiert und für circa 2 h im Brutschrank inkubiert. Pro Probe wurde 30 ml PBS auf Eis gestellt. 31 µl BrdU wurden in 1 ml Kulturmedium verdünnt. Nun wurde in jeden Ansatz 30 µl der verdünnten BrdU-Lösung gegeben und die Probe vorsichtig gemischt. Die Platten wurden für 3 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit bauten Zellen, welche sich gerade in der S-Phase des Zellzyklus befanden, BrdU in ihre neu synthetisierte DNA mit ein. Die Reaktion wurde dann durch Überführen der Zellen in 30 ml kalter PBS-Lösung abgestoppt. Die Reaktionsgefäße wurden abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 100 µl Cytoperm-Puffer aufgenommen. Es folgte eine

Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur und ein Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer. In der Regel wurde gleich mit den Zellen weiter gearbeitet, alternativ wurden die Zellen in 500 µl Freeze-Medium bei -80 °C eingefroren und später wieder aufgetaut.

Zur Färbung der Zellen mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst in Rundboden-Röhrchen überführt und in 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Cytoperm/Cytofix Puffer aufgenommen. Nach Inkubation von 5 min folgte ein Waschschrift in 1 ml 1X BD Perm/Wash Puffer (10X Puffer 1:10 in Wasser verdünnt). 30 µl DNase und 70 µl PBS wurden in einem Eppendorfer-Gefäß gemischt und auf das Zellpellet gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen mit 1 ml 1X BD Perm/Wash Puffer gewaschen. Der BrdU-APC-Antikörper wurde 1:50 in 1X BD Perm/Wash Puffer verdünnt, mit einem Endvolumen von 50 µl pro Probe. Nach Aufnahme der Zellen in der verdünnten Antikörperlösung wurden die Zellen für die Färbung 20 min lang im Dunklen inkubiert und danach erneut mit 1 ml 1X BD Perm/Wash Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden in 300 µl PI-Solution aufgenommen und bis zum Einlesen der Proben auf Eis im Dunklen gelagert.

### **5.9.3 AnnexinV/PI-Assay**

Eine Färbung mit Annexin V wurde verwendet, um die Apoptoserate der generierten Zelllinien zu untersuchen. Kombiniert mit dem Lebend-Tot-Farbstoff Propidiumiodid (PI) konnte unterschieden werden, welche Zellen einer Population lebend, apoptotisch oder nekrotisch waren.

Es wurden je  $0,5 \times 10^6$  Zellen in ein Rundboden-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl Annexin-Puffer mit 4 µl Anti-Annexin V-APC Antikörper sowie 10 µl PI-Solution resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis im Dunklen wurden die Proben innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen.

## 5.10 Analyse von Genexpressionsdaten

Für die Analyse der öffentlich zugänglichen Datensätze des *Gene Expression Omnibus* (GEO) Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) wurden zunächst die Daten aus dem GEO Browser in die Online-Applikation shinyGEO (<http://bioinformatics.easternct.edu/shinyGEO/>) geladen. Dort wurden die normalisierten Expressionsdaten der gewünschten Gene als Excel-Dateien exportiert. Die normalisierten Expressionsdaten wurden mit dem Programm RStudio in Form einer farbcodierten *heatmap* mittels gplot-Package und der heatmap.2 Funktion visualisiert (Gregory R. Warnes et al. 2016). Zudem wurden weitere statistische Auswertungen wie z.B. Korrelationen in R berechnet (R Development Core Team 2016).

## 5.11 Auswertung der Daten

### 5.11.1 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 6 (Graphpad Software, Inc) durchgeführt. Die in den Versuchen gemessenen Daten wurden unter Verwendung des passenden statistischen Tests auf Signifikanz geprüft. Dabei wurden unter anderem der Student's T-Test und die Varianzanalyse ANOVA verwendet. Im Allgemeinen wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant gewertet, sobald der berechnete p-Wert unter 0,05 lag ( $p < 0,05$ ). Falls multiple Teste durchgeführt wurden, erfolgte eine Anpassung des Signifikanzniveaus gemäß der Bonferroni-Korrektur.

### 5.11.2 Grafische Darstellungen

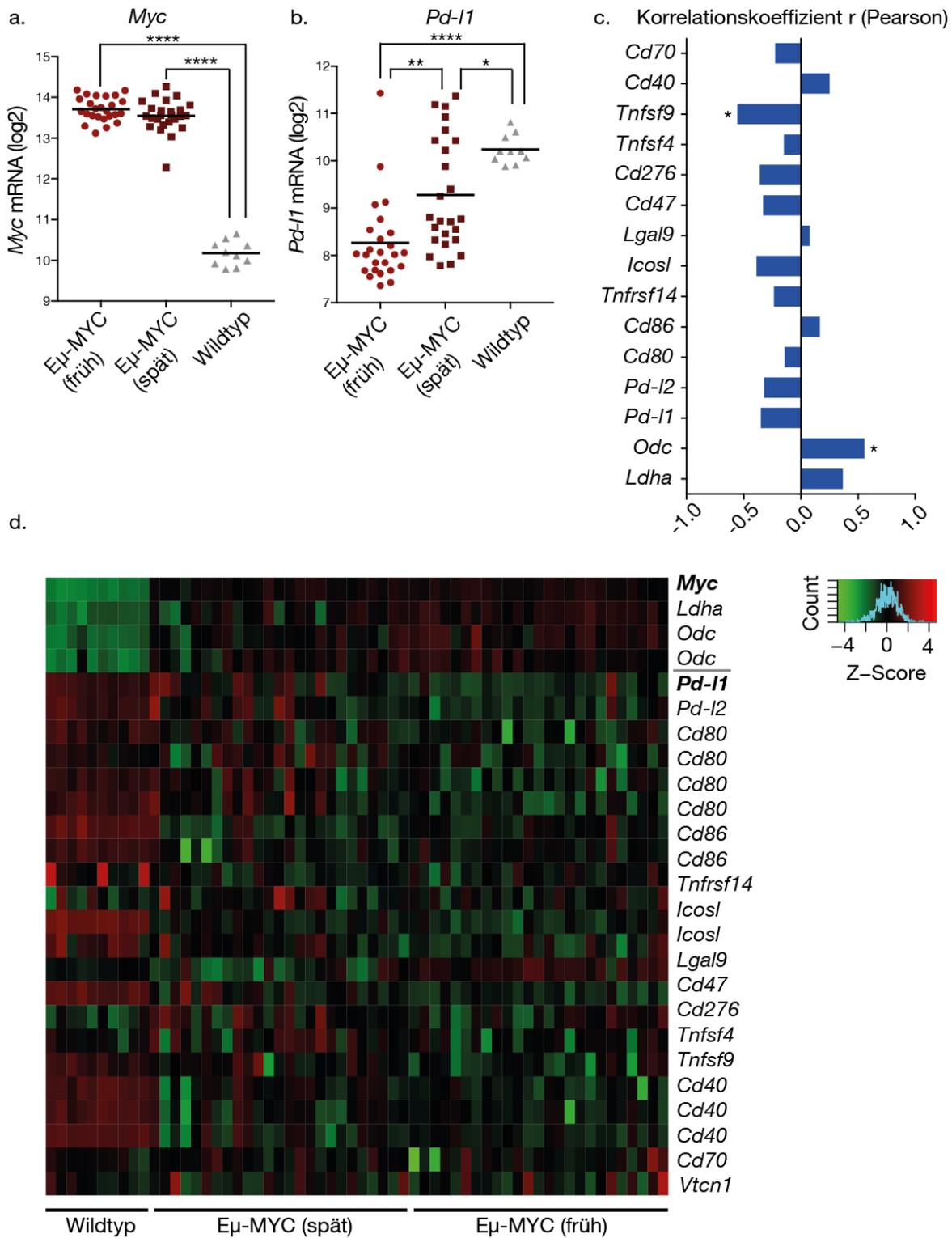
Grafische Darstellungen wurden mit der Software GraphPad Prism sowie mit Adobe Illustrator C6 (Adobe Systems) erstellt. Die Daten wurden in der Regel in Form einer Punktwolke oder als Säulendiagramm mit Angabe des Medians und der zugehörigen Standardabweichung dargestellt. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zweier Gruppen wurden mit Sternen entsprechend des p-Werts markiert (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Reduzierte Expression von Immuncheckpointmolekülen im murinen E $\mu$ -MYC Modell

Um einen ersten Überblick über die Expression verschiedener Immuncheckpointmoleküle auf murinen Myc(+) B-Zell-Lymphomen zu erhalten wurde der im GEO des National Center of Biotechnology Information (NCBI) (Edgar, Domrachev, and Lash 2002) öffentlich zugängliche Datensatz GSE7897 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7897](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7897)) (Mori et al. 2008) analysiert. Der Datensatz beinhaltet Genexpressionsdaten von 25 E $\mu$ -MYC Lymphomen mit frühem Krankheitsbeginn (Krankheitsbeginn nach 62.6 $\pm$ 11.0 d, Median: 65 d), 25 E $\mu$ -MYC Lymphomen mit spätem Krankheitsbeginn (Krankheitsbeginn nach 391.5 $\pm$ 101.8 d, Median: 398 d) und 10 gesunden Kontrollen, welche im Folgenden auf die Expression 15 verschiedener Immuncheckpointmoleküle untersucht wurde. Dabei wurden die normalisierten Expressionsdaten der einzelnen Checkpoints grafisch in Form einer sogenannten *heatmap* visualisiert sowie mit der *Myc*-Expression korreliert.

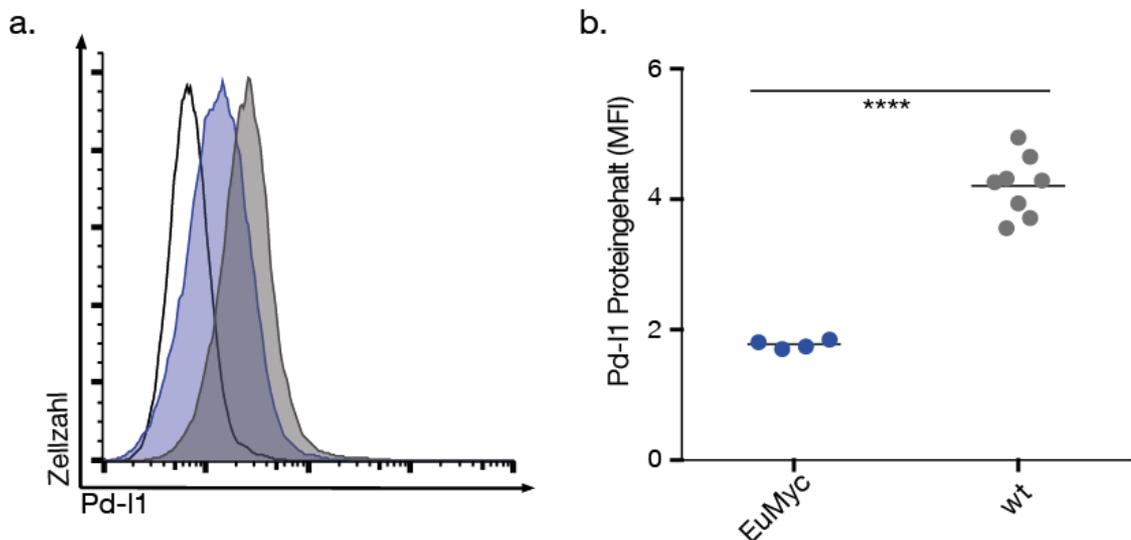
Es zeigte sich im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Expression von *Myc* in den E $\mu$ -MYC Lymphomen (Abbildung 2, dargestellt in rot). E $\mu$ -MYC Lymphome wiesen im Allgemeinen eine reduzierte Expression von Immuncheckpointmolekülen (dargestellt in grün) im Vergleich zu den Wildtyp Kontrollen auf. Die *Pd-1* Expression war in beiden E $\mu$ -MYC Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (One Way ANOVA mit Bonferroni Korrektur: frühe Tumoren:  $p < 0,0001$ , späte Tumoren:  $p < 0,05$ ). Dabei zeigte sich die *Pd-1* Expression in der Gruppe der frühen Tumoren niedriger als die in der Gruppe der späten Tumoren. Die Varianz der *Pd-1* Expression innerhalb der einzelnen E $\mu$ -MYC Gruppen erwies sich als deutlich größer als die Varianz der *Myc* Expression (siehe Abbildung 2a-b). Dies könnte sich z.B. durch unterschiedliche genetische Veränderung im Rahmen der jeweiligen Tumorentstehung in den Tieren erklären lassen.



**Abbildung 2: Expression von Immuncheckpointmolekülen im Eμ-MYC Modell (GSE7897)**

**a, b:** *Myc* und *Pd-11* mRNA Expression in murinen Eμ-MYC Lymphomen (frühe bzw späte Tumoren je n=25) und Wildtyp Kontrollen (wt) (n=10). One Way ANOVA. *Myc*: Eμ-MYC (früh) vs Wildtyp:  $p < 0,0001$ ; Eμ-MYC (spät) vs Wildtyp:  $p < 0,0001$ . *Pd-11*: Eμ-MYC (früh) vs Wildtyp:  $p < 0,0001$ ; Eμ-MYC (spät) vs Wildtyp:  $p < 0,05$ , Eμ-MYC (früh) vs Eμ-MYC (spät):  $p < 0,01$ . **c:** Berechnung der Korrelation der Expression verschiedener Immuncheckpointmoleküle mit *Myc* (Korrelationskoeffizient *r* nach Pearson). Signifikante Ergebnisse sind mit einem Stern markiert. **d:** Darstellung der Expressionsdaten als *heatmap*. Relativ verminderte Expression in grün, relativ verstärkte Expression in rot dargestellt.

Um die Korrelation zwischen *Myc* und den verschiedenen Immuncheckpointmolekülen zu analysieren wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  nach Pearson berechnet (siehe Abbildung 2c). Zwei bekannte, durch *Myc* regulierte Gene (*Odc*, *Ldha*) wurden als Kontrolle in die Analyse mit aufgenommen. Neben *Odc* und *Ldha* zeigten außerdem *Cd40*, *Lgals9* und *Cd86* eine schwache positive Korrelation mit *Myc* (*Cd40*:  $r = 0,249007$ , *Lgals9*:  $r = 0,076805$ , *Cd86*:  $r = 0,164300$ ), wobei sich diese Korrelationen als nicht statistisch signifikant erwiesen. Die restlichen Immuncheckpointmoleküle zeigten eine negative Korrelation mit *Myc*. Für *Pd-1* betrug der Korrelationskoeffizient  $r = -0,350143$  (T-Test:  $p = 0,012677$ , Korrektur nach Bonferroni, statistisch signifikant wenn  $p < 0,003$ ). Die Expression des Gen *Tnfsf9* korrelierte innerhalb der analysierten Gene am stärksten mit der *Myc* Expression ( $r = -0,555570$ ,  $p = 0,000028$ ) und war auch neben *Odc* das einzige statistisch signifikante Ergebnis (Tabelle aller  $r$  und  $p$ : siehe Anhang, Tabelle 40).



**Abbildung 3: Pd-I1 Oberflächenexpression im primären Eμ-MYC Lymphom**

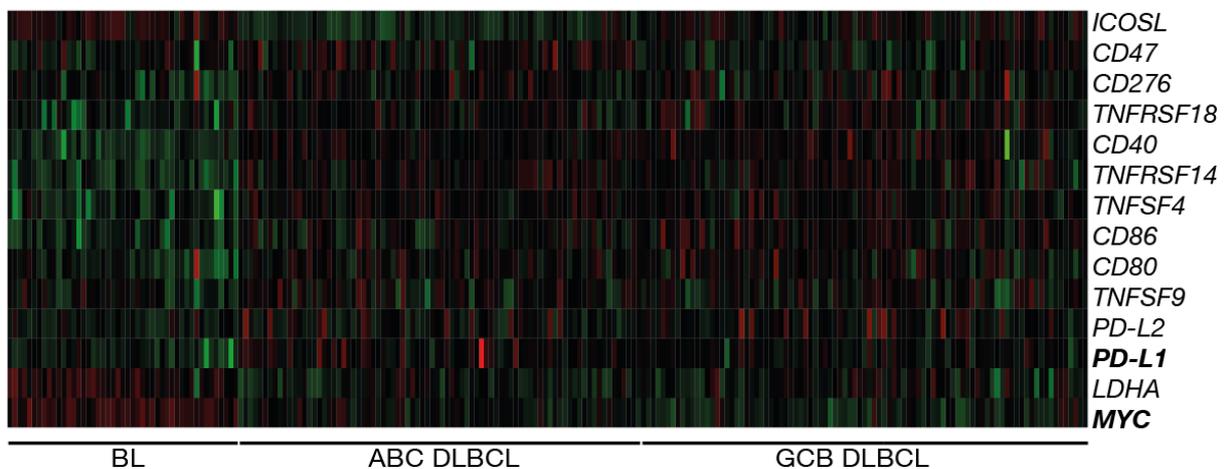
**a:** Repräsentatives Histogramm des Pd-I1 Proteingehalts auf malignen CD19(+)B220(+) B-Zellen einer Eμ-MYC Maus (blau) vs gesunde B-Zellen einer altersgleichen Wildtyp C57BL/6 Maus (grau), Material aus der Biobank der AG Keller. Isotyp-Kontrolle in schwarz. **b:** Pd-I1 Proteingehalt (MFI normalisiert zu MFI des Isotyp) der Eμ-MYC Tumoren vs gesunde B-Zellen. T-Test:  $p < 0,0001$ .

Die in silico erhobenen Daten bezüglich einer verminderten *Pd-1* Expression in Eμ-MYC Lymphomen konnten durch Analyse primärer Eμ-MYC Tumoren aus der Bioprobenbank der AG Keller bestätigt werden. Es wurde der Pd-I1

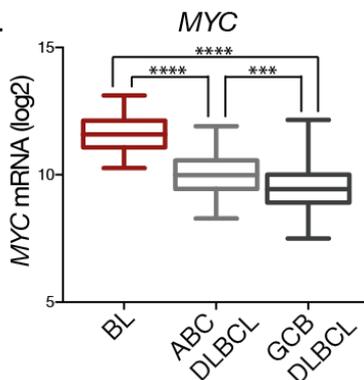
Proteingehalt auf Zellen verschiedener CD19(+) B220(+) Eμ-MYC Tumoren (n = 4) mittels Durchflusszytometrie mit der Expression auf gesunden B-Zellen von altersgleichen C57BL/6 Mäusen (n = 8) verglichen. Es zeigte sich ein signifikant erniedrigtes Pd-I1 Protein-Level auf der Zelloberfläche (p < 0,0001) bei den Eμ-MYC Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

## 6.2 Verringerte Expression von Immuncheckpointmolekülen wie *PD-L1* in humanen BL im Vergleich zu DLBCL

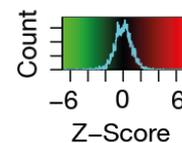
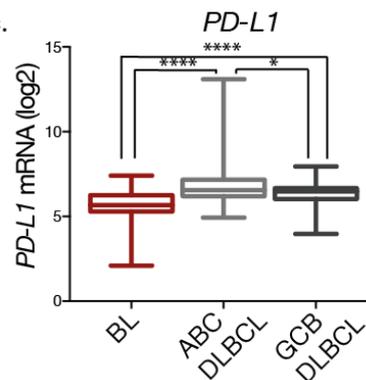
a.



b.



c.



### Abbildung 4: Immuncheckpointmoleküle in humanen B-Zell-Lymphomen (GSE4732)

**a:** Darstellung der Expressionsdaten als *heatmap*. Relativ erniedrigte Expression in grün, relativ verstärkte Expression in rot. BL (n = 47), DLBCL vom ABC-Typ (n = 81), DLBCL vom GCB-Typ (n = 92). **b:** Expression von *MYC* im BL, DLBCL vom ABC-Typ und DLBCL vom GCB-Typ. One Way ANOVA. BL vs ABC DLBCL: p<0,0001; BL vs GCB DLBCL: p<0,0001; ABC DLBCL vs GCB DLBCL: p<0,001. **c:** Expression von *PD-L1* in den untersuchten Gruppen. One Way ANOVA. BL vs ABC DLBCL: p<0,0001; BL vs GCB DLBCL: p<0,0001; ABC DLBCL vs GCB DLBCL: p<0,05.

Um der Fragestellung nachzugehen, inwiefern die Beobachtungen aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragbar sind, wurde eine Analyse des

GEO-Datensatz GSE4732, bestehend aus Genexpressionsdaten von Gewebeproben von Patienten mit BL (n = 47), DLBCL vom ABC-Typ (n = 81) und DLBCL vom GCB-Typ (n = 92) durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE4732>) (Dave et al. 2006; Lenz et al. 2007).

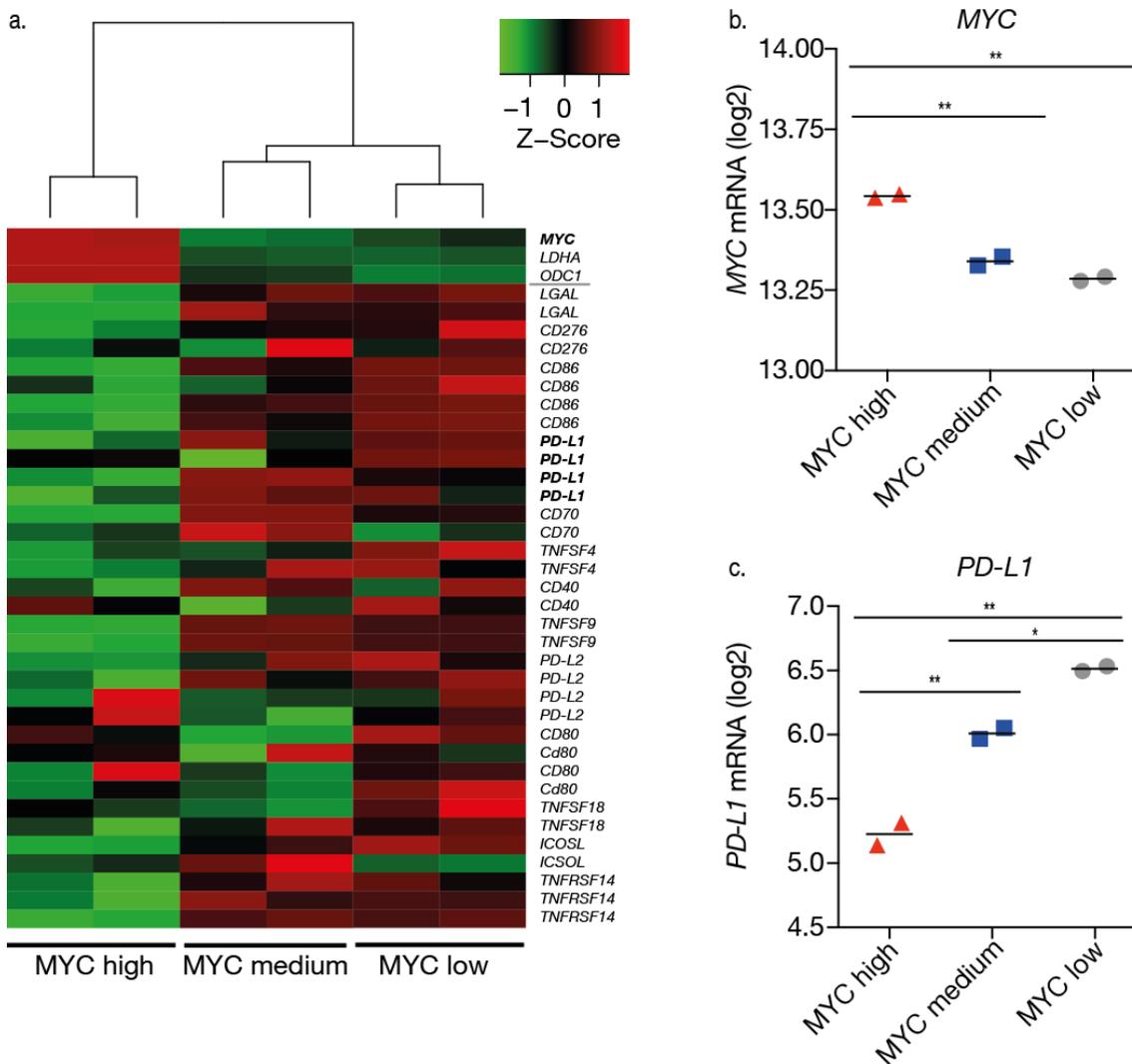
Es zeigte sich passend zu den Ergebnissen des Mausmodells eine reduzierte Expression von Immuncheckpointmolekülen in der Gruppe der BL bei gleichzeitig stärkster Expression von *MYC*. Es wurden die Expressionsdaten von insgesamt 12 im Datensatz enthaltene Immuncheckpointmoleküle analysiert. Als Kontrolle wurde die Expression von *MYC* und dem durch *MYC* regulierten Gen *LDHA* verwendet. Die *PD-L1* Expression war bei signifikant erhöhter *MYC* Expression im BL signifikant niedriger als bei den DLBCL. Übereinstimmend mit Ergebnissen von immunhistochemischen Studien (siehe Tabelle 2) konnte in den Fällen von ABC DLBCL eine im Durchschnitt höhere *PD-L1* Expression als in den Fällen von GCB DLBCL beobachtet werden. Eine unvoreingenommene Clustering-Analyse konnte zeigen, dass die Einteilung der Proben in BL, ABC DLBCL oder GCB DLBCL nicht mit den Clustern gemäß des Genexpressionsprofils der Immuncheckpointmoleküle zusammenfällt (Daten nicht dargestellt).

### 6.3 *MYC* reguliert die *PD-L1* Expression in der humanen *MYC*-induzierbaren Zelllinie P493-6

Die humane Lymphomzelllinie P493-6 besitzt ein induzierbares *MYC* System gesteuert durch Tetrazyklin. Kultivierung der Zellen ohne Tetrazyklin führt zu *MYC* Expression, durch Hinzufügen des Tetrazyklin zum Medium lässt sich die Expression von *MYC* stoppen. Damit bietet die Zelllinie eine bedeutende Möglichkeit, Effekte von *MYC* auf diverse Zellfunktionen in vitro schnell und einfach zu studieren.

Zuerst wurde anhand des im GEO des NCBI öffentlich zugänglichen Datensatz GSE40783 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE40783](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE40783)) (Loven et al. 2012) die Expression von *PD-L1* in Abhängigkeit von der *MYC* Expression

untersucht. Der Datensatz enthielt je 2 Proben mit hoher, mittlerer und geringer *MYC* Expression (*MYC* high, *MYC* medium, *MYC* low) welche im Folgenden untersucht wurden.

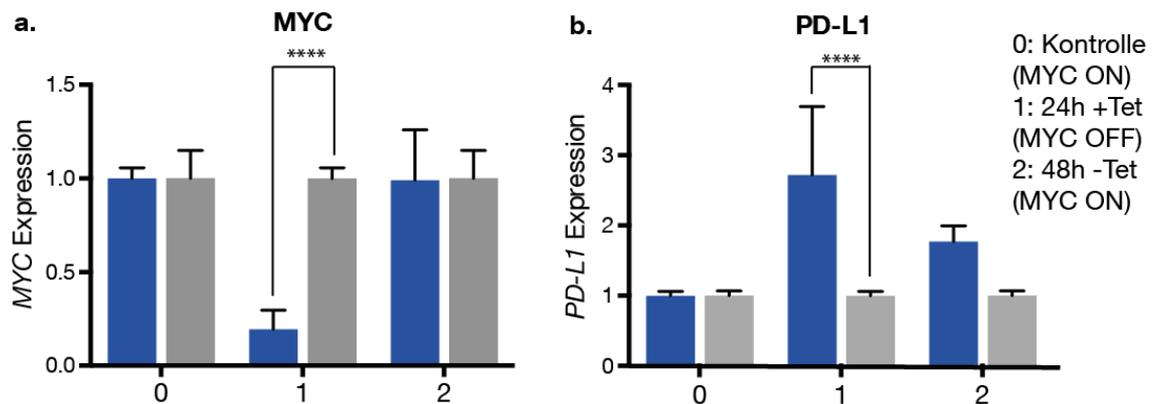


**Abbildung 5: *PD-L1* mRNA-Expression in Abhängigkeit von *MYC* in der *MYC*-induzierbaren Lymphomzelllinie P493-6 (GSE40783)**

**a:** Expression diverser Immuncheckpointmoleküle auf P493-6 Zellen in Zellen mit *MYC* high, *MYC* medium und *MYC* low Stadium. Verstärkte Expression in rot, verminderte Expression in grün dargestellt. Das Dendrogramm zeigt, dass die Gruppeneinteilung durch eine unvoreingenommene Clustering-Analyse der Proben nach dem Expressionsprofil bestätigt werden kann. **b:** *MYC* mRNA Expression der drei Gruppen. n=2 pro Gruppe, One Way ANOVA. *MYC* high vs *MYC* medium:  $p < 0,01$ ; *MYC* high vs *MYC* low:  $p < 0,01$ ; *MYC* medium vs *MYC* low: ns. **c:** *PD-L1* mRNA Expression. n=2 pro Gruppe, One Way ANOVA. *MYC* high vs *MYC* medium:  $p < 0,01$ ; *MYC* high vs *MYC* low:  $p < 0,01$ ; *MYC* medium vs *MYC* low:  $p < 0,05$ .

Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Expression von *PD-L1* in der Gruppe mit hoher *MYC* Expression im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen (One Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur). Auch die anderen untersuchten Immuncheckpointmoleküle wurden nach Inaktivierung von *MYC* analog zu den

oben gezeigten Microarray-Daten aus humanen und murinen Lymphomen vermindert exprimiert.



**Abbildung 6: Regulation der *PD-L1* mRNA Expression in der MYC-induzierbaren Lymphomzelllinie P493-6**

**a:** *MYC* mRNA Expression relativ zur Kontrollgruppe. n=3 pro Gruppe. T-Test:  $p < 0,0001$ . n = 3 pro Gruppe. **b:** *PD-L1* mRNA Expression relativ zur Kontrollgruppe. Im MYC OFF Zustand ist die *PD-L1* Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 2,7-fache erhöht. n = 3 pro Gruppe. T-Test:  $p < 0,0001$ .

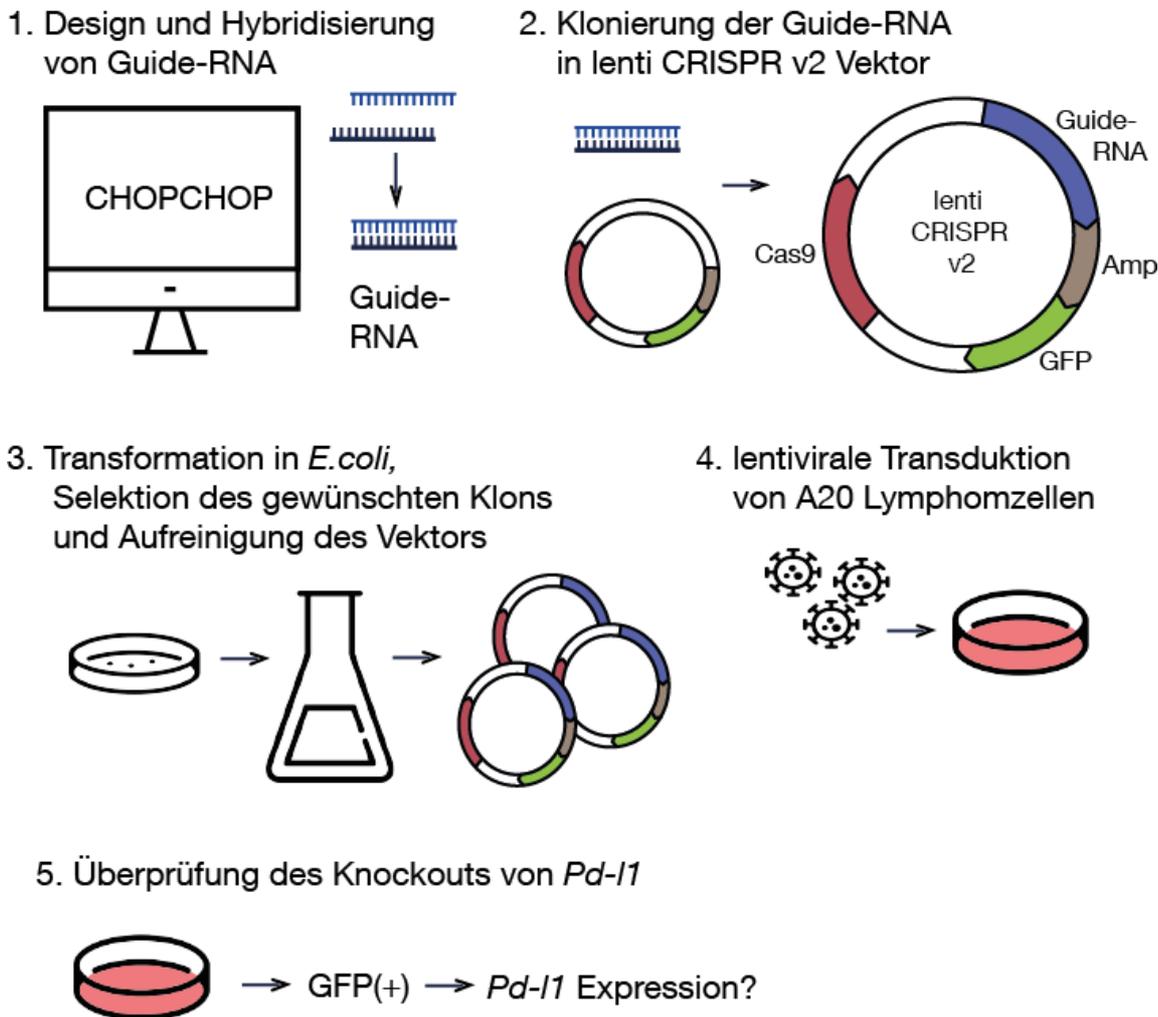
Diese Ergebnisse konnten in vitro anhand Messung von *PD-L1* mRNA in P493-6 Zellen bestätigt werden. Es wurde mittels qPCR die Expression von *MYC* und *PD-L1* zu Beginn, 24h nach Gabe von Tetrazyklin sowie 48h nach Auswaschen des Tetrazyklins bestimmt. Die Kontrollzellen wurden jeweils ohne Tetrazyklin kultiviert. Es konnte eine signifikant erhöhte *PD-L1* Expression nach Suppression von MYC (MYC OFF) im Vergleich zur Kontrolle (MYC ON) gezeigt werden (T-Test:  $p < 0,0001$ ).

Zusammenfassend ist eine verstärkte *MYC* Expression in verschiedenen Modellen von humanen und murinen B-Zell-Lymphomen mit einer erniedrigten Expression von Immuncheckpointmolekülen, insbesondere auch von *PD-L1*, assoziiert. MYC greift dabei in der Zelllinie P493-6 in die transkriptionelle Regulation von *PD-L1* ein.

#### 6.4 Etablierung eines *Pd-1* Knockout-Modell

Für zukünftige weitere Experimente wurde ein *Pd-1* Knockout in der murinen Lymphomzelllinie A20 mittels CRISPR/Cas9 etabliert (siehe Abschnitt 5.7).

Der Arbeitsablauf eines Knockouts mittels CRISPR/Cas9 ist in Abbildung 7 skizziert.



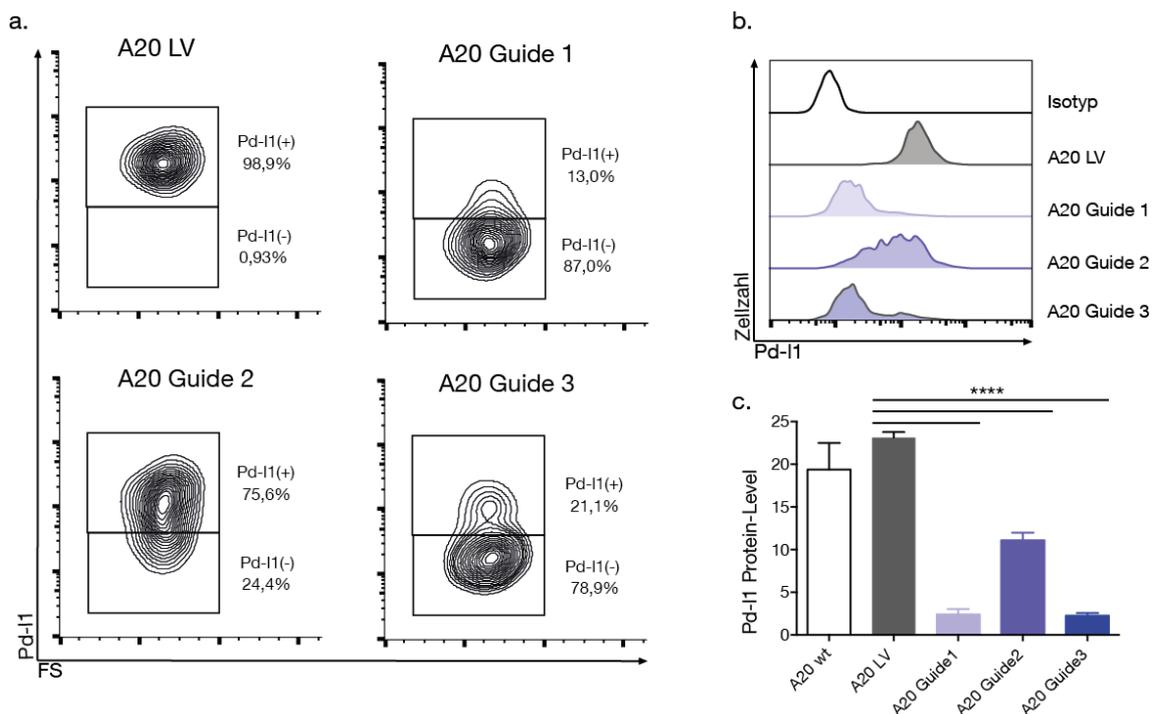
**Abbildung 7: Ablauf des *Pd-I1* Knockouts mittels CRISPR/Cas9**

Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes des *Pd-I1* Knockouts in der murinen Lymphomzelllinie A20. **1.** Design von Guide-RNAs, welche als Oligonukleotide bestellt und anschließend zu doppelsträngigen Guide-RNAs hybridisiert wurden. Auswahl der Guide-Sequenzen anhand des Online-Tools CHOPCHOP. **2.** Klonierung der jeweiligen Guide-RNA in den lenti CRISPR v2 Vektor mittels *Golden Gate Cloning*. In dem verwendeten Vektor sind u.a. die codierenden Sequenzen für das Cas9 Protein, eine Ampicillin-Resistenz und GFP als Markerprotein enthalten. **3.** Hitzeschock-Transformation des Vektors in kompetente *E. coli*. Selektion eines geeigneten Klon und erneute Kultivierung. Aufreinigung der Vektor-DNA aus der Bakterienkultur. **4.** Gewinnung von Virusüberstand von *Packaging*-Zellen und anschließende lentivirale Transduktion von A20 Lymphomzellen. Durch stabile Expression der Guide-RNA und Cas9 kommt es zu Insertionen und Deletionen in *Pd-I1* und folglich zum Knockout des Gens. **5.** Kontrolle des Pd-I1 Proteingehalts auf der Zelloberfläche anhand durchflusszytometrischer Messung von GFP und Pd-I1.

Zunächst wurden mit dem Online Tool CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) verschiedene Guide-RNAs erstellt, die später als Mediator für das Zerschneiden des Genfragments durch das Cas9-Protein

wirken können. Es wurden drei verschiedene Guides designt, die jeweils spezifisch für eine Gensequenz in Exon 3 (Guide-RNA 1), Exon 4 (Guide-RNA 2) oder 5 (Guide-RNA 3) von *Pd-I1* waren (Sequenzen siehe Tabelle 14). Anhand der Sequenz der Guide-RNAs wurden jeweils zwei Oligonukleotide designt, welche anschließend zu je einer doppelsträngigen Guide-RNA hybridisiert werden konnten.

Die Guide-RNAs wurden nun in den lenti CRISPR v2 Vektor kloniert, der ligierte Vektor in kompetente *DH5α E.coli* transformiert und die Bakterien zur Selektion auf Ampicillin-Platten ausgestrichen. Nach Selektion eines einzelnen Klones der transformierten Bakterien konnte aus diesem der fertige Vektor extrahiert werden und zur Generierung von transgenen Zelllinien verwendet werden. Mittels lentiviraler Transduktion von A20 Lymphomzellen wurden die Konstrukte bezüglich des *Pd-I1*-Knockouts getestet.



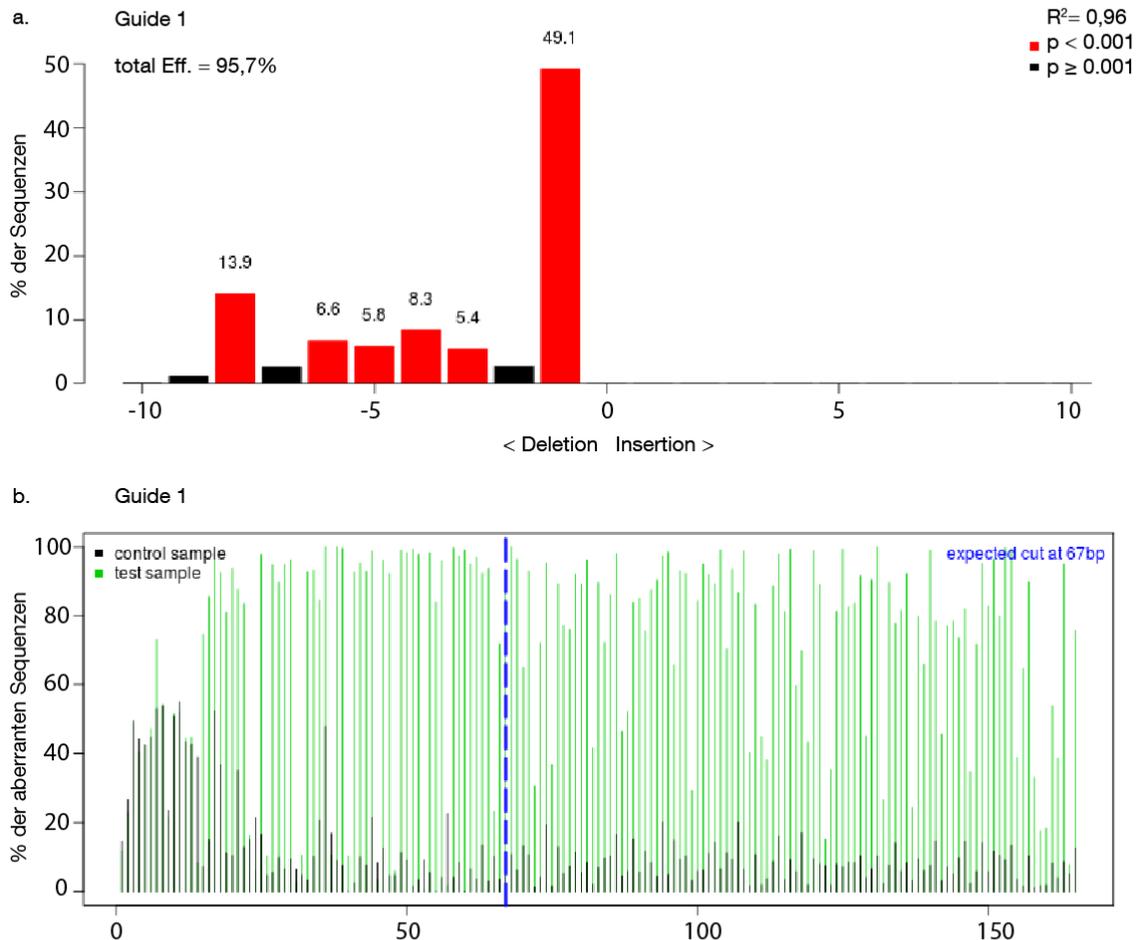
**Abbildung 8: *Pd-I1* Knockout mittels CRISPR/Cas9 System in der murinen Lymphomzelllinie A20**

Durchflusszytometrische Analyse des Pd-I1 Proteingehalts nach *Pd-I1* Knockout. **a:** Grafische Darstellung des Pd-I1 Proteingehalts auf der Zelloberfläche, Gating auf die lebenden, GFP(+) Zellen. **b:** Darstellung der Färbung mit anti-Pd-I1 und Isotyp-Kontrolle als Histogramm. **c:** Quantifizierung von Pd-I1 mittels MFI (normalisiert zu der MFI der Isotyp-Kontrolle). n = 3. One-Way ANOVA für A20 Guide 1 bis 3 vs A20 LV: p < 0,0001.

Dafür wurde zunächst durchflusszytometrisch die Transduktionseffizienz anhand des Anteils an GFP(+) Zellen an allen lebenden Zellen gemessen, welches nach Transduktion als Marker stabil in das Genom der Zellen integriert war. Für alle Versuchsansätze betrug die mediane Transduktionseffizienz 13,65 % GFP(+) Zellen bei einer Standardabweichung von 1,78 %. Anschließend wurde innerhalb der GFP(+) Populationen der Pd-I1 Proteingehalt auf der Zelloberfläche gemessen. Zwei der getesteten Guides zeigten in der Analyse mittels Durchflusszytometrie einen wirkungsvollen Knockout von *Pd-I1* mit einer Reduktion der Pd-I1(+) Zellpopulation von 98,9 % (Leervektor Kontrolle) auf 13,0 % (Guide RNA 1) bzw. 21,1 % (Guide RNA 3) (siehe Abbildung 8). Im Gegensatz dazu zeigte Guide RNA 2 keine ausreichende Reduktion des Pd-I1 Gehalts im Vergleich zur Kontrolle.

Da das aktive CRISPER/Cas9 System in den einzelnen Zellen der Population jeweils zu unterschiedlichen Insertionen und Deletionen in *Pd-I1* führt, sind Sequenzanalysen der genomischen DNA nötig, um die Qualität des Knockouts beurteilen zu können. Dafür wurde für die verschiedenen Guides aus angereicherten GFP(+) Pd-I1(-) Zellen die Sequenz von *Pd-I1* mittels PCR amplifiziert und nach Sanger sequenziert. Als Kontrolle diente das *Pd-I1* Gen der Leervektor-Kontrolle ohne Guide-RNA. Das Webtool CRISPR TIDE wurde verwendet, um Insertionen und Deletionen im Zielgen eines Versuchsansatzes im Vergleich zu einer Kontrollprobe quantitativ zu analysieren. Beispielhaft wurde dies für Guide RNA 1 durchgeführt (siehe Abbildung 9).

Die INDEL-Sequenzierung zeigte an, an welcher Position der DNA-Sequenz Insertionen oder Deletionen erfolgt waren (siehe Abbildung 9a). Dies wurde in Bezug zum erwarteten Schnittpunkt innerhalb von *Pd-I1* an Position 67 gesetzt. Dabei zeigten insgesamt 95,7% der sequenzierten DNA-Moleküle eine veränderte DNA-Sequenz verglichen mit der Kontrolle. Die häufigste Mutation (48,1%) war dabei eine Deletion von einer Base.



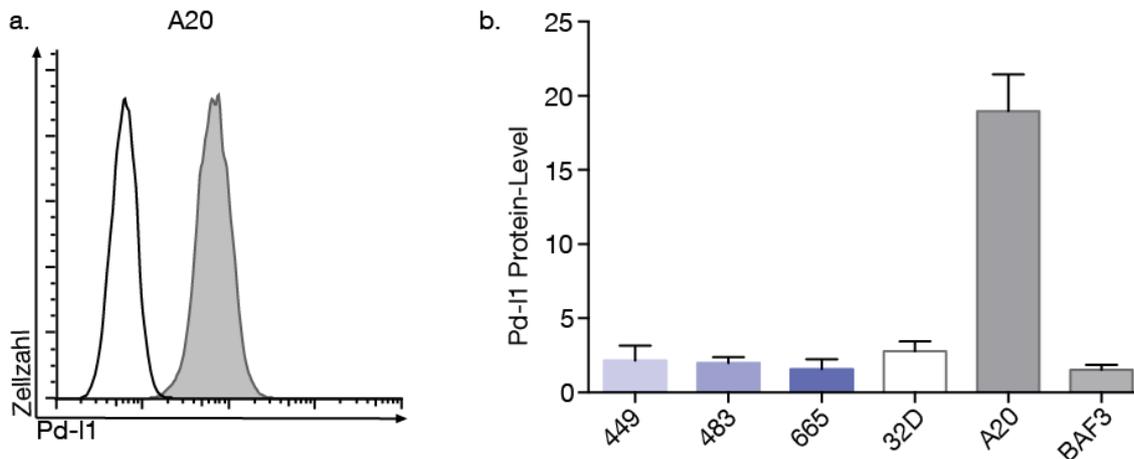
**Abbildung 9: Ergebnisse der INDEL-Sequenzierung von genomischer DNA aus A20 Zellen mit *Pd-I1* Knockout durch Guide 1**

**a.** Identifizierung der häufigsten Mutationen im Bereich um die erwartete Schnittstelle von Cas9 und Berechnung deren Häufigkeit in der Zellpopulation. Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0,96$ . Signifikanzniveau dargestellt in rot ( $p < 0,001$ ) und schwarz ( $p \geq 0,001$ ). **b.** Qualitätskontrolle. Abbildung adaptiert nach CRISPR TIDE (<https://tide.deskgen.com>, Stand 03.12.2019).

## 6.5 Etablierung eines murinen Pd-I1(+) B-Zell-Lymphom Modell

Um geeignete Zelllinien für ein Modell eines murinen Pd-I1(+) B-Zell-Lymphom zu finden wurde der Pd-I1 Proteingehalt verschiedener Zelllinien mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Zelllinien wurde für jede Zelllinie das Verhältnis der MFI des Pd-I1 Antikörpers zu der MFI der Antikörper Isotyp-Kontrolle berechnet. Dabei zeigte die murine MYC(+) Lymphomzelllinie A20 den höchsten Proteingehalt von Pd-I1 auf der Zelloberfläche. Auf allen weiteren untersuchten Zelllinien inklusive der getesteten E $\mu$ -MYC Zelllinien 449, 483 und 665 war Pd-I1 in nur sehr geringen

Mengen nachweisbar (siehe Abbildung 10). Da das E $\mu$ -MYC Modell als ein etabliertes System zur Untersuchung MYC-induzierter B-Zell-Lymphome gilt, wurden die drei oben genannten E $\mu$ -MYC Zelllinien für die Durchführung weiterer Experimente ausgewählt.

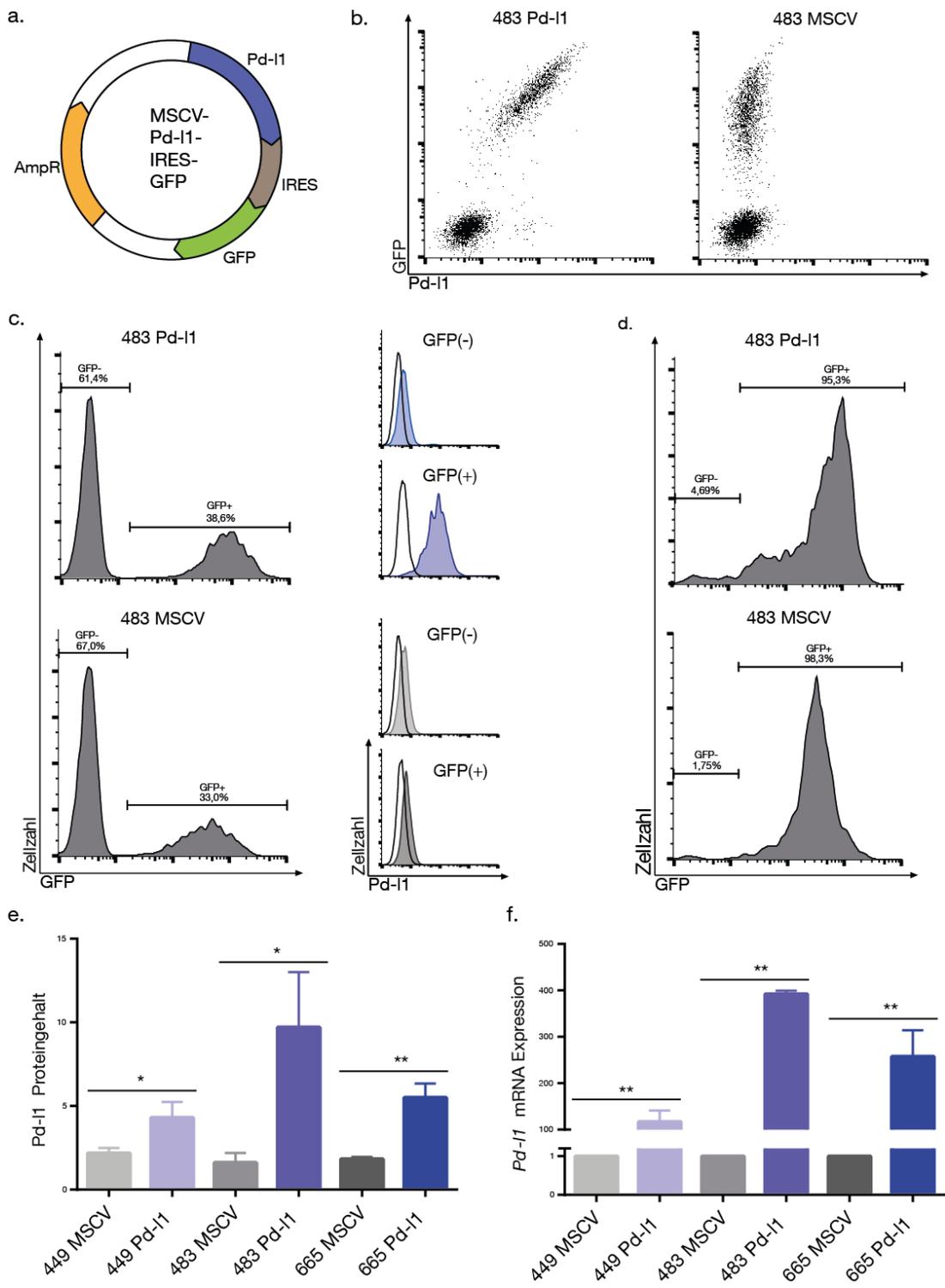


**Abbildung 10: Pd-I1 Oberflächenexpression diverser Lymphomzelllinien**

**a:** Beispielhafte Darstellung des Pd-I1 Proteingehalts auf der Zelloberfläche nach Analyse der Zelllinie A20 am Durchflusszytometer. Anti-Pd-I1 in grau, Isotyp-Kontrolle in schwarz.

**b:** Vergleich des Pd-I1 Proteingehalts mehrerer Zelllinien anhand des Antikörper/Isotyp-Verhältnisses. 449, 483, 665: E $\mu$ -MYC Zelllinien. 32D: Zelllinie aus murinem Knochenmark, lymphoblastisch. A20: murine B-Lymphozyten-Zelllinie. BAF3: murine Pro-B-Zelllinie. n = 3.

Damit die Auswirkungen von forcierter *Pd-I1* Expression in vitro untersucht werden konnten, wurden zunächst Pd-I1(+) E $\mu$ -MYC Zelllinien etabliert. Nach der Klonierung der murinen *Pd-I1* Sequenz mittels *SLIC-Cloning* in den MSCV-IRES-GFP Vektor wurden die drei E $\mu$ -MYC Zelllinien 449, 483 und 665 mit dem Vektor transduziert. Als geeignete Kontrollen wurden die Zelllinien mit dem Leervektor (MSCV-IRES-GFP ohne PD-L1 Insert) transduziert. Es konnte nach der Transduktion eine Anzahl von 10-30 % GFP(+) Zellen pro Versuchsansatz mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Nach Auswahl der GFP(+) Zellen konnte gezeigt werden, dass nur die GFP(+) Population, nicht aber die GFP(-) Population erhöhte Pd-I1-Level zeigte. In der Kontrollgruppe ließ sich weder in der GFP(+) noch in der GFP(-) Population Pd-I1 nachweisen (siehe Abbildung 11b-c).



**Abbildung 11: Etablierung von Lymphomzelllinien mit ektopter *Pd-I1* Expression**

**a:** Vektorkarte des MSCV-Pd-I1-IRES-GFP Vektor. **b und c:** Analyse der Oberflächenexpression von Pd-I1 sowie dem Markerprotein GFP nach Transduktion der murinen Lymphomzelllinie 483 mittels Durchflusszytometrie. Als geeignete Kontrolle wurden 483 Lymphomzellen mit dem MSCV-IRES-GFP Vektor (Leervektor) transduziert. Isotyp-Kontrolle in schwarz. Dargestellte Punktediagramme in b sind repräsentativ für alle verwendeten Zelllinien, n=3 für jede generierte Zelllinie. **d:** Analyse der Zellen nach FACS-Sorting. **e:** Pd-I1 Proteingehalt auf der Zelloberfläche (normalisiert zur MFI der Isotyp-Kontrolle) in allen transduzierten Lymphomzelllinien (T-Test: 449: p<0,05; 483: p<0,05; 665: p<0,01) **f:** Expression der *Pd-I1* mRNA in allen transduzierten Lymphomzelllinien, jeweils relativ zur Kontrollgruppe. (T-Test: 449: p=0,001; 483: p<0,000001; 665: p=0,001).

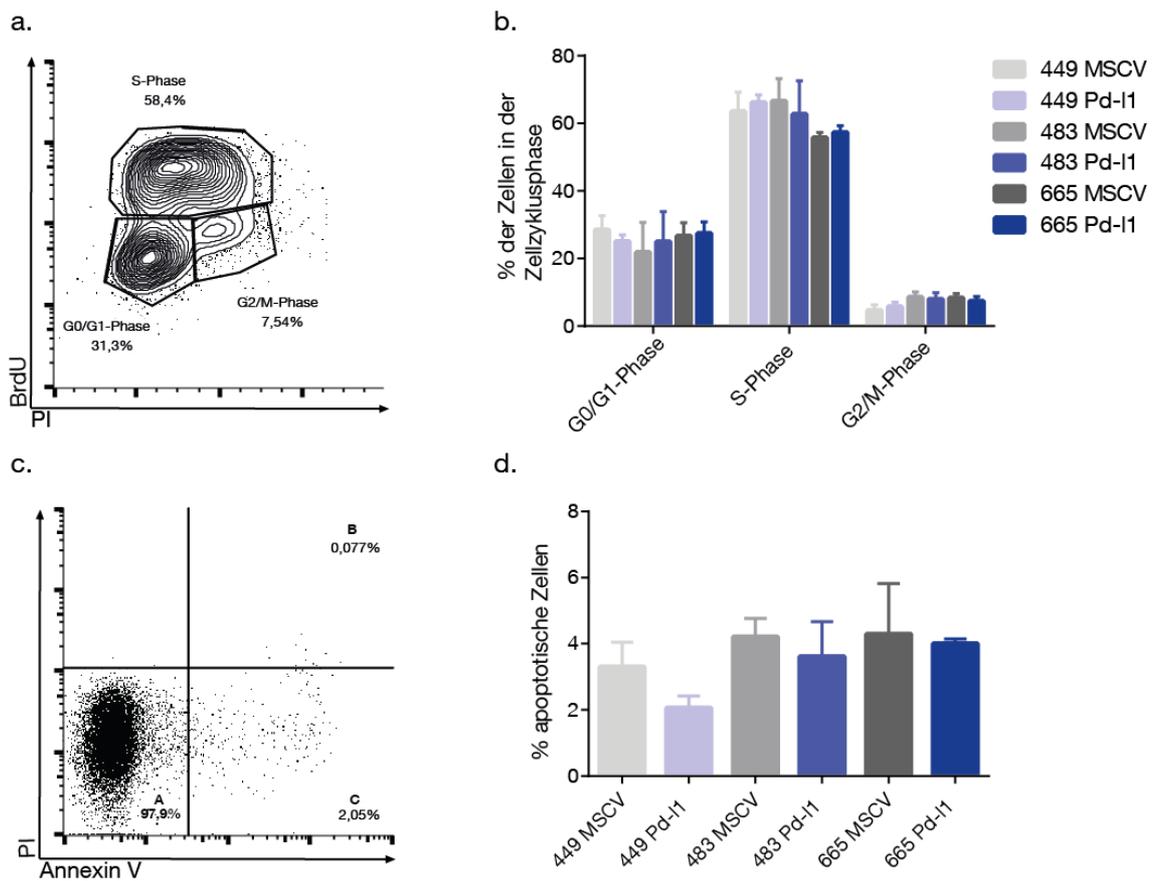
Mittels FACS-Sorting wurden anschließend GFP(+) Zellen in der Kultur angereichert, um weitere Experimente durchzuführen. Nach der Anreicherung lag der Prozentsatz von GFP(+) Zellen innerhalb der Gesamtpopulation bei ca. 95 % (siehe Abbildung 11d sowie Anhang).

In allen drei Zelllinien konnte nach der Transduktion eine stabile Expression von GFP sowie Pd-I1 auf der Zelloberfläche gezeigt werden (T-Test: 449:  $p = 0,021$ ; 483:  $p = 0,014$ ; 665:  $p = 0,002$ ) (siehe Abbildung 11e). Diese Ergebnisse konnten mittels qPCR auch für die Expression auf mRNA-Level bestätigt werden (siehe Abbildung 11f). Zudem wurde für weitere Experimente auch die Sequenz des Liganden *Pd-I2* in den MSCV-IRES-GFP Vektor kloniert und Lymphomzelllinien mit diesem transduziert. Hier wurde die ektope *Pd-I2* Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen (siehe Abbildung 15, Anhang).

## 6.6 Pd-I1 hat keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von E $\mu$ -MYC Lymphomen in vitro

Mit den etablierten Zelllinien wurde untersucht, ob die ektope *Pd-I1* Expression einen Einfluss auf das Zellzyklusverhalten sowie die Apoptoserate ausübt. Mittels BrdU Assay konnte der Anteil der Zellen in den Zellzyklusphasen innerhalb einer Population untersucht werden. Nach 3 Minuten Inkubationszeit mit BrdU, welches bei einer stattfindenden DNA Synthese in die DNA eingebaut wurde, wurden die Zellen mit einem anti-BrdU Antikörper sowie einem Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht ( $n = 3$ ). Die BrdU(+) Zellen lassen sich so als Zellen, welche sich gerade in der S-Phase befinden, identifizieren und von Zellen der G1/G0 und der G2/M Phase sicher unterscheiden. Tumorzellen zeigen eine verstärkte Proliferation, was unter anderem durch eine gestörte Regulation des Zellzyklus sowie einer verminderter Apoptoserate bedingt ist. Auch in den untersuchten E $\mu$ -MYC Zelllinien befand sich die Mehrzahl der Zellen in der S-Phase (50 - 70 %). Allerdings zeigte sich im Vergleich kein signifikanter Unterschied der Verteilung der Zellzyklusphasen zwischen Pd-I1(+) Zellen und Kontrollzellen (siehe Abbildung 12).

Des Weiteren wurde die spontane Apoptoserate analysiert (n = 3). Wie für Tumorzellen typisch zeigt sich insgesamt eine geringe spontane Apoptoserate von ca. 4 %, wobei die Varianz zwischen den einzelnen Versuchsdurchführungen innerhalb einer Zelllinie relativ hoch war. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Apoptoserate der Pd-I1(+) Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Analyse der generierten Pd-I1(+) Zelllinien hinsichtlich Proliferation und Apoptose**

**a:** Typische hufeisenförmige Darstellung der Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer nach Färbung der Zellen mit BrdU und PI, repräsentativ für alle untersuchten Proben (hier 483 MSCV). Folgende Phasen können unterschieden werden: G0/G1-Phase: BrdU(-)PI(-), S-Phase: BrdU(+), G2/M-Phase: BrdU(-)PI(+). **b:** Quantifizierung der jeweiligen Zellzyklusstadien der GFP(+) Lymphomzellen der generierten Zelllinien. n = 3. **c:** Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate. Die AnnexinV(-)PI(-) Population (A) entspricht den lebenden Zellen. Die AnnexinV(+)/PI(-) Population (C) den apoptotischen Zellen sowie die AnnexinV(+)/PI(+) Population (B) den nekrotischen Zellen. **d:** Prozent der apoptotischen Zellen an allen GFP(+) Zellen der Population. n = 3.

## 7 Diskussion

### 7.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl murine als auch humane B-Zell-Lymphome mit hohem MYC-Proteingehalt im Allgemeinen mit einer verminderten Expression von Immuncheckpointmolekülen, insbesondere auch von PD-L1, assoziiert sind. Diese zunächst *in silico* erhobenen Daten konnten sowohl in der humanen B-Zelllinie P493-6 *in vitro* als auch in Tumormaterial von E $\mu$ -MYC Mäusen bestätigt werden. Die Ergebnisse konnten dabei sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Protein Level gezeigt werden.

Zudem konnten drei murine MYC(+) B-Zell-Lymphomzelllinien mit ektopter *Pd-I1* Expression sowie ein *Pd-I1* Knockout mittels CRISPR/Cas9 in einer weiteren murinen Lymphomzelllinie etabliert werden. *In vitro* zeigte Pd-I1 keine Auswirkungen auf die Proliferation oder die Apoptoserate der Zellen. Die generierten Zelllinien könnten in Zukunft z.B. für *in vivo* Experimente verwendet werden, um Auswirkungen von Pd-I1 auf den Krankheitsverlauf von Lymphomen zu studieren.

### 7.2 Vermehrte MYC Expression im B-Zell-Lymphom ist assoziiert mit einer verminderten PD-L1 Expression

#### 7.2.1 Limitationen der eigenen Methodik: Messung der Genexpression

Um einen Überblick über die Expression von Immuncheckpointmolekülen durch Lymphomzellen zu erlangen, wurden Genexpressions-Microarrays von murinen und humanen Lymphomen ausgewertet. Mittels Analyse von Genexpressions-Microarrays können RNA-Expressionsprofile mehrerer Gruppen miteinander verglichen werden. Über den GEO Browser sind aktuell > 4000 Datensätze diverser Array- und sequenzierbasierter Methoden online für Analysen verfügbar (Edgar, Domrachev, and Lash 2002). Dabei weißt die Microarray-Analyse einige Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden müssen.

So werden bei der Analyse z.B. keine absoluten Expressionsdaten verglichen, sondern nur die relative Expression der verschiedenen Gene zwischen den Gruppen beurteilt. Zudem werden durch Microarrays nur mRNA Transkripte eines Gens gemessen, was nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächliche Menge an Zielprotein in einer Zelle zulässt, da viele weitere Vorgänge wie beispielsweise die Stabilität des Transkripts, posttranslationale Modifizierungen sowie Proteinstabilität und -abbau darauf Einfluss nehmen können. Es konnte gezeigt werden, dass nur etwa 40 % der Variation einer Proteinmenge in einer Zelle durch die Menge korrespondierender mRNA erklärt werden kann (Vogel and Marcotte 2012; Vogel et al. 2010). Des Weiteren muss zwischen der Translationsrate eines Proteins sowie der Konzentration des Proteins in der Zelle unterschieden werden. So ist es denkbar, dass ein Gen nur in einer geringen Rate transkribiert wird und dadurch nur eine geringe Anzahl an mRNA Transkripten vorliegt. Eine hohe Stabilität des Proteins kann dennoch dazu führen, dass sich dieses in hohen Konzentrationen in der Zelle anreichert. Demnach sollten zur Beurteilung der Genexpressionsanalysen mittels Microarray immer zusätzliche Experimente auf Proteinebene durchgeführt werden. Dafür sind neben dem Nachweis durch Western Blot oder der Durchflusszytometrie vor allem massenspektrometrische Analysen des gesamten Proteoms von Zellen geeignet. In dieser Arbeit wurden neben der mRNA Expression auch die Protein Level von PD-L1 auf E $\mu$ -MYC-Lymphomzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es gibt aktuell mehrere Publikationen die darauf hinweisen, dass die Anzahl der mRNA-Kopien von *PD-L1* und die Menge an PD-L1 Protein im DLBCL gut miteinander korrelieren (Sun et al. 2019; Wang et al. 2019). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass Ergebnisse der mRNA Expression in diesem Fall gut auf Proteinebene übertragbar sind.

Daneben muss festgehalten werden, dass in den analysierten Microarrays zum Teil Gewebeproben (Biopsien) für die Genexpressionsanalyse verwendet wurden. Damit enthalten die Proben nicht nur die eigentlichen Tumorzellen, sondern auch Zellen der ME des Tumors, z.B. Zellen des Immunsystems oder Bindegewebszellen. Da in diesen Zelltypen eine unterschiedliche Expression

von Immuncheckpointmolekülen angenommen werden kann, muss dieser methodische Fehler bei der Interpretation der Daten mit einbezogen werden.

Es muss weiter bemerkt werden, dass mit den verwendeten Genexpressionsanalysen nicht nachzuweisen ist, ob und in welcher Weise MYC direkt die Proteinbiosynthese des *PD-L1* Gens ursächlich beeinflusst. Es konnte lediglich eine Assoziation zwischen MYC und PD-L1 aufgezeigt werden. Nur die durchgeführten Versuche mit der MYC-induzierbaren Zelllinie P493-6 können in dieser Arbeit einen Hinweis darauf geben, dass MYC kausal in die transkriptionelle Regulierung der *PD-L1* Genexpression eingreift. Dennoch bleiben Fragen nach den genauen Mechanismen der Regulation ungeklärt.

### **7.2.2 Zusammenhang zwischen MYC und PD-L1 in anderen Studien**

Soweit bekannt gibt es derzeit in der Literatur keine vergleichbaren Studien, welche die Expression von Immuncheckpointmolekülen im Kontext von hämatologischen Erkrankungen mittels Microarrays im großen Stil untersuchen. Allerdings wurden in letzter Zeit mehrere Arbeiten publiziert, welche die Expression von Immuncheckpointmolekülen in Abhängigkeit des MYC Levels in unterschiedlichen Krankheitsmodellen untersuchen. Überraschender Weise liefern diese zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. (Durand-Panteix et al. 2012; Casey et al. 2016; Hogg et al. 2017)

Übereinstimmend mit den oben gezeigten Ergebnissen konnten Durand-Panteix et al. bereits im Jahr 2012 zeigen, dass die PD-L1 mRNA Level und die Oberflächenexpression in der humanen Zelllinie P493-6 durch Repression von MYC mittels Tetrazyklin erhöht wurden. Hierbei erfolgte die Messung mittels qPCR, Durchflusszytometrie sowie konfokaler Mikroskopie. Auch in sechs weiteren BL-Zelllinien unabhängig vom EBV-Status hatte eine MYC Inhibition durch den Inhibitor 10058-F4 eine verstärkte Proteinbiosynthese von PD-L1 zur Folge. Dabei stellen Durand-Panteix et al. die Hypothese auf, dass MYC die *PD-L1* Genexpression auf mRNA Level durch Inhibition von STAT1 supprimiert. Allerdings konnten die oben genannten Ergebnisse nicht durch die Messung der Gesamtkonzentration des Proteins mittels Western Blot bestätigt werden, wobei sich ähnlich hohe Proteinmengen von PD-L1 unabhängig vom MYC Status zeigten. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass sich zwar die

Gesamtkonzentration von PD-L1 in der Zelle bei MYC Inaktivierung nicht änderte, die Konzentration von PD-L1 im lysosomalen Zellkompartement und somit auch die auf der Zelloberfläche aber unter MYC Inaktivierung in P493-6 Zellen zunahm. Die Arbeit liefert dadurch Hinweise darauf, dass MYC einen Einfluss auf den Transport von PD-L1 durch die membranösen Kompartimente hat. (Durand-Panteix et al. 2012)

Elbaek et al. konnten 2019 an 126 Patientenproben von DLBCL zeigen, dass PD-L1 mRNA und Proteinlevel signifikant niedriger in Patienten mit *MYC* Translokation oder *double hit* Lymphomen waren, als in Patienten ohne genetische Veränderungen von *MYC* (Elbaek et al. 2019). In einer weiteren immunhistochemischen Studie konnte allerdings keine negative Korrelation zwischen dem Proteingehalt von MYC und PD-L1 Menge auf den Tumorzellen im DLBCL errechnet werden. Spannend ist, dass sich eine negative Korrelation zwischen PD-L1 und MYC für die Zellen des ME zeigen ließ (Hu et al. 2017).

In hepatozellulären Karzinomen wird die Präsentation von PD-L1 auf den Zellen wohl durch extrinsische Faktoren wie z.B. die Sekretion von IFN $\gamma$  in der Mikroumgebung des Tumors bedingt. Zou et al. zeigten in einer 2018 erschienenen in vitro Studie, dass ein *MYC* Knockdown zu signifikant verstärkten IFN $\gamma$ -induzierten PD-L1 Levels auf mRNA- und Proteinebene in humanen Leberzellkarzinom-Zelllinien führte. Passend dazu führte eine *MYC* Überexpression zu einem verringerten IFN $\gamma$ -induzierten PD-L1 Gehalt. Die Autoren nehmen an, dass die *PD-L1* Expression bei MYC-Inaktivierung über verstärktes STAT1-Signaling reguliert wird. Eine derartige Regulation könnte bei gegen MYC gerichteten Therapie von Tumoren dazu führen, dass die Anti-Tumor-Immunantwort über verstärkte PD-L1 Oberflächenexpression gehemmt wird (Zou et al. 2018). Es konnte z.B. gezeigt werden, dass *small molecule* Inhibitoren von Myc (MYCi975 und MYCi361) zu einer erhöhten *Pd-I1* Genexpression und erhöhter Immunogenität von Tumorzellen in einem MycCaP Xenograft Mausmodell des Prostatakarzinoms führte (Han et al. 2019).

Hogg et al. postulieren in ihrer Arbeit, dass BET-Inhibitoren die *Pd-I1* Expression in E $\mu$ -MYC-Lymphomen unabhängig von Myc Brd4-vermittelt negativ regulieren. BET-Inhibitoren verhindern die Interaktion zwischen

*bromodomain and extra-terminal motif* (BET) Proteinen wie BRD2 oder BRD4 und gelten als indirekte Myc-Inhibitoren. Dabei ist bekannt, dass im Eμ-MYC Modell nur die niedrigen Level von endogenem Myc durch JQ1 vermindert werden können, während die konstitutiv hohe Expressiom des Myc-Transgens erhalten bleibt (Hogg et al. 2016). Eμ-MYC-Lymphome, welche mit JQ1 behandelt wurden, zeigten in vitro schon nach 2 h eine signifikant erniedrigte mRNA Expression und nach 14 h eine signifikant erniedrigte Pd-I1 Oberflächenexpression. Ähnliches konnte in vivo bestätigt werden. Die *Pd-I1* Expression war dabei unabhängig von Myc und auch ein *Myc*-Knockdown via shRNA oder die retrovirale konstitutive Expression von *Myc* führten nicht zu einer signifikanten Änderung der *Pd-I1* Expression. Im Gegensatz dazu konnte die gleiche Arbeitsgruppe diese Ergebnisse in einem murinen Tet-OFF Pankreaskarzinom-Modell nicht bestätigen. Hier führte Myc zu einer verstärkten *Pd-I1* Expression (Hogg et al. 2017). Weitere Arbeitsgruppen konnten die BRD4-vermittelte transkriptionelle Regulierung von *PD-L1* durch JQ1 an Modellen von humanen Ovarial- und Prostata-Karzinomen bestätigen. Damit einhergehend besteht die Hypothese, dass eine Immuntherapie via PD-L1 Blockade synergistisch mit einer Therapie mit BET-Inhibitoren erfolgen könnte (Zhu et al. 2016; Mao et al. 2019).

Entgegen der bisher diskutierten Studien gibt es auch einige Arbeiten, die MYC als Induktor von PD-L1 und damit als Induktor von Immun-Escape Mechanismen postulieren. Casey et al. konnten 2016 an einem murinen Tet-OFF T-ALL-Modell zeigen, dass eine Inaktivierung von *Myc* mittels Tetrazyklin zu einer Reduktion der *Pd-I1* mRNA sowie der Pd-I1 Oberflächenexpression führte. Ähnliches wurde auch für das Protein Cd47 gezeigt, welches ebenfalls eine Rolle bei Immun-Escape Mechanismen spielt. Die Ergebnisse wurden durch shRNA und JQ1 vermittelter *Myc*-Inaktivierung bestätigt. Mittels ChiP-Seq konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Myc an den Promotor des *Pd-I1* Gens binden kann und so direkt die Expression regulieren könnte. Dieser Zusammenhang konnte in weiteren murinen und humanen T-ALL-Zelllinien sowie in Zelllinien von Melanomen und nichtkleinzellige Lungenkarzinomen nachgewiesen werden. Daten von B-Zell-Lymphomen wurden nicht publiziert. (Casey et al. 2016)

Wang et al. veröffentlichten 2019 eine Arbeit, in der sie sowohl humane DLBCL Zelllinien als auch Primärmaterial von Patienten mit DLBCL hinsichtlich BCR-Signalweg, MYC und PD-L1 untersuchten (Wang et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass in non-GCB Typ DLBCL PD-L1 verstärkt auf der Zelloberfläche präsentiert wurde. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass über den aktivierten BCR-Signalweg MYC verstärkt aktiv ist (Wang et al. 2017; Varano et al. 2017) und dies schließlich zur *PD-L1* Expression führt. In vitro führte *MYC* Knockdown mittels shRNA oder dem Inhibitor 10058-F.4 zu einem verminderten PD-L1 Proteingehalt in HBL1 und TMD8 Zelllinien (Wang et al. 2019).

Es gibt weitere Studien, welche die Theorie einer MYC-induzierten *PD-L1* Expression in diversen Krebserkrankungen unterstützen, wie z.B. an Primärproben von Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom, in denen sich eine positive Korrelation zwischen MYC und PD-L1 zeigte (Kim et al. 2017). In mehreren humanen Neuroblastomzelllinien führten eine Inhibition von MYC oder N-MYC zu einer signifikanten Reduktion von PD-L1 mRNA und Protein. In einem Genexpressions-Microarray von 477 primären Neuroblastom-Proben konnte gezeigt werden, dass *MYC* und *PD-L1* mRNA Expression signifikant positiv korrelieren ( $r = 0,514$ ), was allerdings nicht für N-MYC galt (Melaiu et al. 2017). In Zelllinien von ALK- ALCL konnte ebenfalls eine Regulation von *PD-L1* durch MYC und STAT3 bestätigt werden (Atsaves et al. 2017). In *triple*-negativem Brustkrebs konnte gezeigt werden, dass über eine Rekrutierung von MYC und NFkB p65 an den *PD-L1* Promotor das Gen reguliert wird (Maeda et al. 2018).

### **7.2.3 Klinische Bedeutung der Studienergebnisse**

Insgesamt bleibt offen, inwiefern MYC die Expression von Immuncheckpointmolekülen reguliert. Sehr wahrscheinlich ist, dass die diversen Effekte von MYC auf PD-L1 in verschiedenen Malignomen wohl auf deren unterschiedliche Tumorbiologie zurückgeführt werden kann. Somit ist es durchaus denkbar, dass MYC in einigen Malignomen zu einer verstärkten Expression von Immuncheckpointmolekülen führt, gleichzeitig in anderen Krebserkrankungen wie z.B. im BL deren Expression vermindert. Weiter muss

auch geklärt werden, ob MYC die Transkription von *PD-L1* nur dann reguliert, wenn es auf sehr hohem onkogenen Level exprimiert wird, oder ob MYC auch im physiologischen Kontext Einfluss auf Immuncheckpointmoleküle nimmt. Letztendlich muss auch evaluiert werden, inwiefern die veränderten PD-L1 Level überhaupt pathophysiologische Relevanz im Sinne von einer Tumorregression o.Ä. bewirken können.

Daneben gibt es zahlreiche weitere Mechanismen, welche die *PD-L1* Genexpression in diversen Malignomen regulieren. Dazu gehören nicht nur zellintrinsische Mechanismen, sondern auch extrinsische Signalwege wie z.B. Interaktionen mit Zellen in der Mikroumgebung des Tumors durch Sekretion von IFN $\gamma$  oder anderen Zytokinen. Viele Review-Artikel haben gute Zusammenfassungen des bisherigen Wissensstandes geleistet. (Zerdes et al. 2018; Topalian, Drake, and Pardoll 2012)

Trotz zahlreicher Studien zur Regulation von PD-L1 auf diversen Tumorzellen bleiben viele Fragen offen. Unsere Daten liefern deutliche Hinweise darauf, dass MYC als negativer Regulator von PD-L1 im aggressiven MYC(+) B-Zell-Lymphom fungieren könnte und diese Lymphome einen niedrigen Gehalt von PD-L1 mRNA und Protein zeigen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Lymphome primär kein attraktives Ziel für eine Checkpoint-Blockade mittels anti-PD-L1 oder anti-PD-1 Antikörper darstellen. Allerdings muss bedacht werden, dass durch die Therapie der Erkrankung mit Chemotherapeutika oder anderen zielgerichteten Therapien die Immunogenität der Tumorzellen gegenüber dem Immunsystem verändern kann. So könnte eine therapeutische MYC-Inhibition über eine verstärkte Proteinbiosynthese von PD-L1 den Tumor für eine Immuntherapie sensibilisieren.

## 7.3 Etablierung von murinen Lymphomzelllinien mit aberranter *Pd-11* Genexpression

### 7.3.1 Limitation der eigenen Methodik: retrovirale Transduktion und CRISPR/Cas9

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden sowohl murine Zelllinien mit ektopter *Pd-11* Expression über retrovirale Transduktion als auch eine Zelllinie mit *Pd-11* Knockout mittels CRISPR/Cas9 System etabliert.

CRISPR/Cas9 führt Guide-RNA vermittelt zu Doppelstrangbrüchen der DNA, welche anschließend von zellintrinsischen Mechanismen repariert werden. Dabei kann es zu Insertionen und Deletionen kommen, welche z.B. über eine Verschiebung des Leserasters schließlich den Abbruch der Proteintranslation des Gens verursachen und damit zum Knockout des Zielgens führen. Die durch CRISPR/Cas9 entstandenen Insertionen und Deletionen können experimentell durch Sequenzierung der genomischen DNA der veränderten Zellen nachgewiesen werden, womit der Knockout auf Sequenzebene bestätigt werden kann. Zwar arbeitet CRISPR/Cas9 dank der Guide RNA recht effizient, trotzdem kommt es zu Doppelstrangbrüchen außerhalb des gewünschten Gens z.B. im Rahmen von Sequenzhomologien mit anderen DNA-Abschnitten. Man spricht von so genannten *off target* Effekten (Fu et al. 2013). Diese *off target* Veränderungen des Genoms können funktionelle Auswirkungen auf die genetisch veränderten Zellen haben und müssen in die Interpretation der CRISPR/Cas9 Experimente mit einbezogen werden. Aktuell wird viel an der Entwicklung diverser Tools zur Vorhersage von *off target* Effekten und der Verbesserung der Methoden zur Erkennung von eingefügten DNA-Doppelstrangbrüchen gearbeitet (Wilson, O'Brien, and Bauer 2018; Cong et al. 2013).

Mittels Transduktion kann ein gewünschtes Zielgen in einem viralen Vektor in eine Zelle eingebracht werden, was zur Transkription und Proteintranslation des Zielgens in der transduzierten Zelle führt. Im Unterschied zu anderen Methoden der DNA-Einbringung in Zellen wie z.B. der Elektroporation oder mittels Liposomen wird die DNA-Sequenz des Zielgens bei der retroviralen

Transduktion stabil in das Genom der Zelle integriert und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. So konnte eine stabile Expression des Zielgens in der gesamten Zellpopulation sichergestellt werden (siehe Abbildung 11). Es bleibt zu bemerken, dass in unseren Versuchen die generierten Pd-I1(+) Zelllinien zwar auf mRNA-Ebene eine fast 400-fach erhöhte Expression des Zielgens zeigten, auf der Zelloberfläche aber nur eine 5- bis 10-fache Erhöhung des Proteingehalts messbar war. In der Literatur ist eine gute Korrelation der Menge von mRNA und Protein bei PD-L1 beschrieben (Sun et al. 2019; Wang et al. 2019). Der Pd-I1 Proteingehalt wurde in dieser Arbeit ausschließlich durchflusszytometrisch bestimmt, womit nur der Proteingehalt auf der Zelloberfläche gemessen wird. Eine Messung des intrazellulär vorliegenden Proteins z.B. in intrazellulär gespeicherten Vesikeln ist nicht erfolgt und wäre mittels Western Blot möglich. Inwiefern diese 5- bis 10-fach vermehrte Expression für funktionelle Studien der generierten Zelllinien ausreicht bleibt unklar. Andere Arbeitsgruppen arbeiten z.B. mit einem 20-fach erhöhten Proteingehalt für ähnliche Versuche (Hogg et al. 2017).

In den durchgeführten Versuchen der murinen Zelllinien mit aberranter Expression von *Pd-I1* konnten keine Unterschiede hinsichtlich Proliferation bzw. Zellzyklusphasen und Apoptose der Zellen im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass sich die genetisch veränderten Zellen im Vergleich zu Kontrollen nicht in ihrem Wachstum *in vitro* unterscheiden. Diese Ergebnisse liefern die Grundlage, um in möglichen zukünftigen Experimenten einen Einfluss von Pd-I1 auf die Lymphomentstehung oder den Krankheitsverlauf *in vivo* untersuchen zu können. Beispielsweise könnte der Krankheitsverlauf sowie die körpereigene Immunantwort gegen die Tumorzellen untersucht werden, indem die generierten Lymphomzellen in syngene Empfängermäuse intravenös injiziert werden. Neben der Injektion von veränderten Lymphomzellen wären auch andere experimentellen Ansätze möglich, wie z.B. eine Transplantation von zuvor *in vitro* genetisch veränderten Knochenmarksstammzellen oder ein genetisches Mausmodell. Diese aufwendigeren Versuchsansätze ermöglichen zusätzlich die Beurteilung der Rolle von Pd-I1 bei der Krankheitsentstehung von Lymphomen im Mausmodell.

### 7.3.2 Auswirkungen der PD-L1 auf den Krankheitsverlauf von Lymphomen in anderen Studien

Aktuell gibt es allerdings kaum Hinweise darauf, dass Pd-I1 einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf oder die -entstehung von Lymphomen im Mausmodell hat. In einer bereits angesprochenen Arbeit von Hogg et al, wurde der Effekt von Pd-I1 auf den Krankheitsverlauf von E $\mu$ -MYC Lymphomen untersucht. Nach Injektion von  $1,5 \times 10^5$  Pd-I1(+) E $\mu$ -MYC Lymphomzellen in syngene C75BL/6 Mäuse wurden diese bis zum Krankheitsbeginn beobachtet. Mäuse mit Lymphomzellen mit forcierter 20fach erhöhter *Pd-I1* mRNA Expression sowie die Kontrollgruppe mit Mäusen mit Lymphomzellen mit geringer *Pd-I1* Expression zeigten dabei kein signifikanten Unterschied im durchschnittlichen Überleben von 15-20 Tagen nach Zellinjektion (Hogg et al. 2017). Inwiefern die verstärkte Präsentation von Pd-I1 auf der Zelloberfläche funktionelle Auswirkungen auf die Immunantwort gegen die Tumorzellen hatte, wurde allerdings nicht untersucht.

Für das E $\mu$ -MYC-Mausmodell mit Ähnlichkeiten zum humanen BL ist bekannt, das für die Tumorentstehung in den Tieren neben der vermehrten *Myc* Expression zusätzliche Mutationen wie der Verlust von *tp53* oder die Überexpression des Apoptosehemmers *Bcl-2* notwendig ist (Adams et al. 1985; Eischen et al. 1999). Die zusätzlich entstandenen Mutationen der einzelnen Lymphome während der Tumorentstehung tragen dabei nicht nur zu zellintrinsic Veränderungen hinsichtlich der Proliferation bei, sondern auch zur Sichtbarkeit des Tumors gegenüber des Immunsystems (Schuster et al. 2011). So zeigten E $\mu$ -MYC Tiere mit Tumoren mit *tp53* Verlust einen früheren Erkrankungsbeginn und schienen im Gegensatz zu Tumoren mit *Bcl-2* Überexpression nicht der Kontrolle des Immunsystems zu unterliegen (Schuster et al. 2011). Interessanterweise konnte in unserer Microarray-Analyse von E $\mu$ -MYC Tumoren eine höhere *Pd-I1* mRNA Expression in der Gruppe der späten Tumoren (mittleres Erkrankungsalter ca. 1 Jahr) als in der frühen Gruppe (mittleres Erkrankungsalter ca. 6 Monate) beobachtet werden (ANOVA:  $p < 0.01$ ). Falls auch hier die Gruppe der späten Tumoren eine *Bcl-2* Überexpression zeigen würde, könnte die verstärkte *Pd-I1* Expression in den

immunologisch sichtbaren Tumoren im Verlauf durch *immuno-editing* akquiriert sein.

Ferner wurde in einer 2017 veröffentlichten Arbeit von Hilmenyuk et al. gezeigt, dass erkrankte E $\mu$ -MYC Mäuse eine deutlich reduzierte Zahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten im Vergleich zu C57BL/6 oder nicht-erkrankten Mäusen besaßen. Zudem wurde eine Präsentation von inhibitorischen Oberflächenmolekülen wie Pd-1, 2B4 und Lag-3 auf den tumorspezifischen T-Zellen der erkrankten Mäuse beobachtet, deren Höhe mit der Tumorlast (Zahl der malignen B-Zellen in der Milz) korrelierte. Zusammengefasst zeigte sich in Tumorgewebe von E $\mu$ -MYC Mäusen nicht nur eine reduzierte Anzahl sondern auch eine herabgesetzte Funktionalität von T-Zellen im Sinne einer *t cell exhaustion*. Eine Blockade von PD-1 führte zwar zu einer verbesserten Funktion der T-Zellen, allerdings hatte dies keine Auswirkungen auf die Tumorlast der Mäuse. Damit konnten die Autoren zeigen, dass eine alleinige Blockade von PD-1 nicht zu einer ausreichenden immunologischen Kontrolle des Lymphoms der E $\mu$ -MYC Mäuse führte. (Hilmenyuk et al. 2017) Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die PD-1 Blockade in noch nicht erkrankten E $\mu$ -MYC Mäusen alleine nicht ausreicht, um die Tumorentstehung in den Tieren zu verhindern oder auch signifikant zu verzögern (McKee et al. 2017).

Möglicherweise spielen die Immun-Escape Mechanismen über Immuncheckpointmoleküle in aggressiven B-Zell-Lymphomen wie dem BL oder dem DLBCL eine weniger prominente Rolle für den Krankheitsverlauf als bei anderen Malignomen wie z.B. dem HL, was das unterschiedliche Therapieansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren erklären könnte. Einen Hinweis darauf liefert eine Veröffentlichung die zeigt, dass eine PD-1/PD-L1 vermittelte Immun-Escape Strategie gegen NK-Zellen im ME des HL bedeutungsvoller als im DLBCL ist (Vari et al. 2018). Dagegen könnten andere Mechanismen wie z.B. eine reduzierte Expression von MHC I Molekülen (Challa-Malladi et al. 2011) auf der Oberfläche zu dem beobachteten Einfluss des Immunsystems auf den Verlauf von aggressiven B-Zell-Lymphomen führen.

### 7.3.3 Klinische Bedeutung der Studienergebnisse

Spannend ist, dass Wartewig et al. 2017 in einem murinen T-NHL Modell mit einem ITK-SYK-Fusionsprotein als onkogener Treiber das Gen *Pdcd1*, welches für das Immuncheckpointmolekül PD-1 codiert (siehe Abschnitt 2.3.1), als haploinsuffizientes Tumorsuppressorgen postulieren. Dabei war die *Pdcd1* Expression in murinen und humanen T-Zellen mit onkogener Aktivierung des TCR-Signalwegs verstärkt (Wartewig et al. 2017). Ein Verlust von PD-1 durch mono- oder biallelische Deletion des *Pdcd1* Locus führte zu einer rasant beschleunigten malignen Transformation der oben genannten prämaligen T-Zellen. Dies konnte auch nach Therapie mit PD-1 oder PD-L1 Inhibitoren beobachtet werden. Damit könnte eine Therapie der T-NHL mit Checkpoint-Inhibitoren über Inhibition von PD-1 zu einer Akzeleration der Erkrankung führen (Wartewig et al. 2017). Dass PD-1 auch im B-NHL als Tumorsuppressor funktioniert scheint aktuell nicht wahrscheinlich. PD-1 kann aber auch auf der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden, womit physiologisch existierende zellintrinsische Signalwege auch für die Funktion als Tumorsuppressor benutzt werden könnten. So wird klar, dass die Funktionen von Immuncheckpointmolekülen außerhalb des Immunsystems noch kaum verstanden sind. Inwiefern PD-L1 in B-Zellen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten oder onkogene Signalwege zeigt muss weiter untersucht werden, um negative Effekte einer anti-PD-L1 Therapie ausschließen zu können. Diese Arbeit kann keine Hinweise darauf liefern, dass Pd-L1 in murinen Lymphomzellen eine Auswirkung auf Proliferation und Apoptose der Zellen zeigt.

Im klinischen Kontext erfolgten bei bekannter PD-1 und PD-L1 Oberflächenexpression in DLBCL (siehe Tabelle 2) mehrere klinische Studien, welche das Therapieansprechen sowie die Verträglichkeit von PD-1/PD-L1 Checkpoint-Inhibitoren bei Patienten mit DLBCL untersuchten. 2019 wurde eine einarmige Phase 2 Studie mit Nivolumab (anti-PD-1 Antikörper) mit 121 Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem DLBCL, sowohl nach gescheiterter ASCT als auch bei Patienten, für welche eine ASCT nicht in Frage kam, veröffentlicht. Insgesamt zeigte sich dort bei tolerablem Nebenwirkungsprofil eine geringe Ansprechrate (*overall response rate*, ORR)

sowohl bei der Gruppe der Stammzelltransplantierten (10%) als auch bei der Gruppe ohne vorangegangene ASCT (3%). Allerdings konnte in dieser Studie aufgrund der geringen Ansprechrate keine Korrelation zum Ansprechen bei double-hit oder MYC(+) Lymphomen durchgeführt werden (Ansell et al. 2019). Eine weitere Phase 2 Studie mit Pembrolizumab (anti-PD-1 Antikörper), in der 9 Patienten mit DLBCL nach Richter-Transformation ausgehend von einer CLL eingeschlossen waren, konnte eine ORR von 44% zeigen. Im Vergleich dazu ließ sich bei den 16 eingeschlossenen Patienten mit rezidivierender CLL kein Ansprechen nachweisen (ORR 0%) (Ding et al. 2017). Eine 2019 veröffentlichte Phase 1/2a Studie untersucht die Kombinationstherapie von Nivolumab und Ibrutinib, einem Inhibitor der Bruton-Tyrosinkinase, in unterschiedlichen Lymphomen inklusive CLL, FL, DLBCL und Patienten mit Richter-Transformation. Es konnte eine ORR von 36% bei den Patienten mit DLBCL gezeigt werden, was im Bereich der Monotherapie mit Ibrutinib liegt. Interessant war hier die hohe ORR von Patienten nach Richter-Transformation mit einer ORR von 65%. Dabei korrelieren die PD-L1 Level auf den Tumorzellen mit dem Ansprechen auf die Kombinationstherapie von Ibrutinib und Nivolumab (Younes et al. 2019). Weitere klinische Studien mit anti-PD-L1 Antikörper wie Durvalumab und Atezolizumab untersuchen ebenfalls das Ansprechen und die Verträglichkeit einer Checkpoint Blockade in DLBCL. Dabei wird auch der mögliche Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren im Rahmen einer Kombinationstherapie mit konventionellen oder neueren Therapeutika beleuchtet. Publierte Ergebnisse liegen allerdings noch nicht vor. Für die Therapie des BL sind bislang noch keine Therapiestudie mit Checkpoint Inhibitoren durchgeführt worden.

Insgesamt scheint die Blockade von PD-1/PD-L1 im DLBCL nur ein geringes Ansprechen bei einem Teil der Patienten zu zeigen. Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit bestätigen, dass die Präsentation von PD-L1 auf den Tumorzellen einen eher untergeordneten Einfluss auf den Krankheitsverlauf von BL und DLBCL besitzt. Somit ist es nicht verwunderlich, dass eine Checkpoint-Blockade in Studien im DLBCL zu keiner durchgreifenden Verbesserung der Therapie geführt hat. Dennoch sind letztlich weitere Studien von Nöten, die insbesondere die heterogene Pathophysiologie der DLBCL miteinbeziehen und

überprüfen, ob nicht diverse Patientengruppen wie z.B. Patienten mit Richter-Transformation oder Patienten mit ABC DLBCL besonders von einer therapeutischen PD-1-Blockade profitieren können. Hierfür liegen für hämatologische Krebserkrankungen im Gegensatz zu dem HL und dem PMBL bezüglich des DLBCL noch keine stimmigen Daten vor. Es fehlen zudem zuverlässige prädiktive Marker für ein Ansprechen auf die PD-1/PD-L1-Blockade, um die richtige Zielgruppe für eine solche Therapie zu evaluieren.

## 7.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlussfolgerungen aus dieser Promotionsarbeit ziehen:

- 1.) Die Expression von Immuncheckpointmolekülen auf Krebszellen erscheint je nach Krankheitsentität in der Regulation kontextspezifisch und abhängig von diversen intrinsischen und extrinsischen Mechanismen. Wir liefern Hinweise darauf, dass der Transkriptionsfaktor MYC im aggressiven B-Zell-Lymphom das Immuncheckpointmolekül PD-L1 negativ reguliert.
- 2.) Die Mechanismen der Regulation von PD-1 und PD-L1 müssen in weiteren experimentellen Arbeiten in verschiedenen Krankheitsmodellen untersucht werden. Zudem muss die Frage geklärt werden, inwiefern PD-L1 auch zellintrinsische Funktionen besitzt. Ein besseres Verständnis des komplexen Zusammenspiels diverser Signalwege ermöglicht es, Aussagen bezüglich aussichtsreicher Kombinationstherapien mit neuen Wirkstoffen zu treffen.
- 3.) In klinischen Studien muss weiter untersucht werden, welche Patienten mit aggressiven B-Zell-Lymphomen von einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren profitieren und welche prädiktive Marker für die Identifizierung der Zielgruppe dafür verwendet werden können.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med Ulrich Keller, meinem Betreuer und Doktorvater, für die Einführung in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten. Zudem bedanke ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. med Günter Schneider für die Betreuung meiner Dissertation als Mentor. Weiter möchte ich allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der AG Keller danken, die mir das Arbeiten im Labor nähergebracht haben, mich in neue Methoden eingeführt und mir bei Fragen helfend zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich Frau Dr. med Sabine Steidle und Frau Jessica Grün hervorheben. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der AG Oostendorp, AG Götze und AG Ringshausen in den hämatologischen Laboren der Trogerstraße 32 sowie Herrn Alexander Wintges der AG Haas/Poeck für die Unterstützung bei Experimenten der Durchflusszytometrie. Zuletzt möchte ich mich herzlichst bei meiner Familie und meinen Freunden für das ausdauernde Interesse und Verständnis für meine Arbeit bedanken.

## 9 Anhang

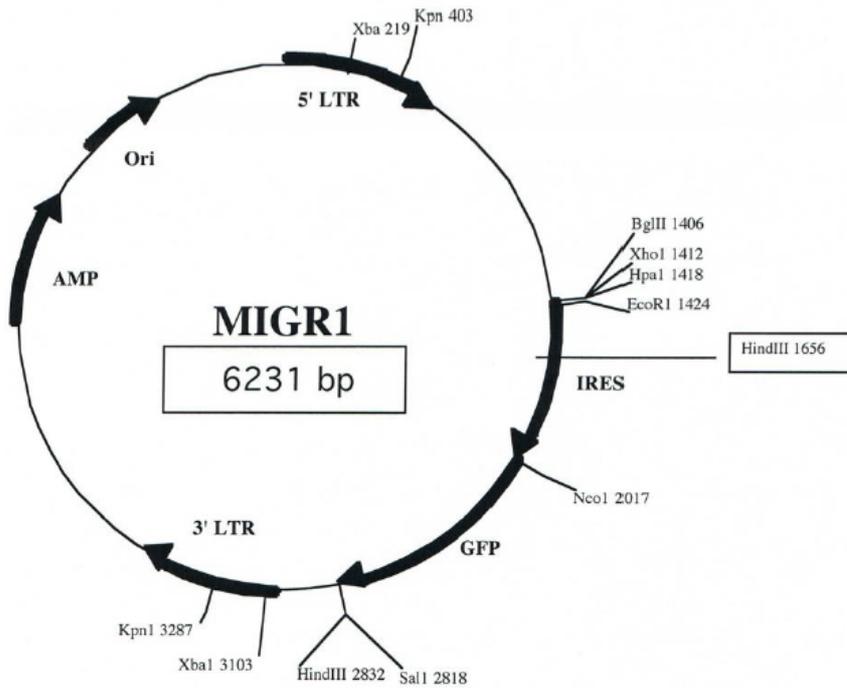
**Tabelle 33: Immunhistochemischer Nachweis von PD-L1 in diversen Lymphomentitäten**

Übersicht über PD-L1 auf Lymphomzellen sowie auf Zellen des ME (genannt mPD-L1) in diversen Subgruppen von NHL. Nachweise mittels Immunhistochemie (IHC). Adaptiert nach Gravelle, Burrioni et al. 2017. ALCL = anaplastisches großzelliges Lymphom, AITL = angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom, ATLL= adulte T-Zell Leukämie, CHL = klassisches Hodgkin Lymphom, CLL = Chronisch lymphatische Leukämie, CTCL = kutanes T-Zell Lymphom, FFPE = Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe, FL = follikuläres Lymphom, HPF = Hauptgesichtsgeld, PL = Plasmablastisches Lymphom, PMBL = primär mediastinales B-Zell-Lymphom, PTCL = peripheres T-Zell Lymphom, PTL D = Posttransplantations Lymphoproliferative Erkrankung.

	Studie und Fallzahl	Methode (Firma/ Klon)	Cut Off Tumor	Cut Off ME	PD-L1 Proteingehalt	Therapieergebnis
CHL	Ansell et al. 2015, n=10	PD-L1 IHC FFPE (G Freeman /405.9A1 1)	NA	NA	100% der CHL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA
CHL	Panjwani et al. 2018, n=51	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen des ME positives Staining zeigten	82% der CHL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 73% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME (bei n=49).	NA
CHL	Chen et al. 2013, n=38	PD-L1 IHC FFPE (Sino Bio / 15)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	87% der CHL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 82% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
CLL	Ramsay et al. 2012, n=35 für klinisch, n=71 für IHC	PD-L1 IHC FFPE (Abcam / polyclonal ); Durchfluss zytometrie (eBioscience / MIH1)	NA	NA	Verstärkte PD-L1 Expression in CD20+ B-Zellen aus CLL Lymphknoten und Blut (vs gesunde Spender).	Höhere PD-L1 Level in der Gruppe der CLL mit schlechterer Prognose (Überleben < 5 Jahre) vs in der Gruppe der CLL mit besserer Prognose (Überleben > 15 Jahre), (univariate Analyse).
CLL	Menter et al. 2016, n=37	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	NA	3% der CLL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA
EBV+ PTL D	Green et al. 2010, n=26	PD-L1 IHC FFPE (Bio Legend/ 29E.2A3)	NA	NA	73% der Fälle von EBV+ PTL D zeigten PD-L1(+) Staining.	NA

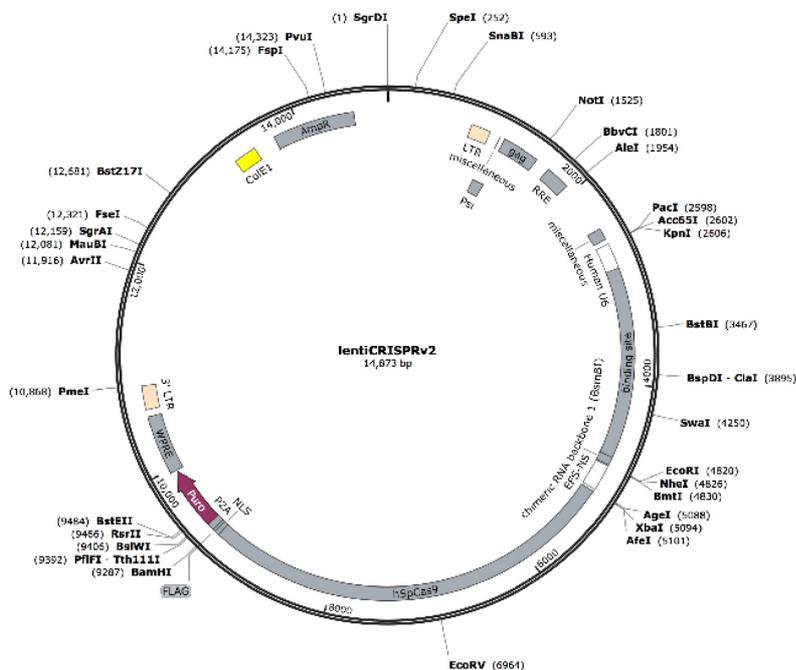
FL	Laurent et al. 2015, n=27	PD-L1 IHC FFPE (Ventana / SP142)	PD-L1(+) wenn >10% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	Alle FL Tumorzellen zeigten sich PD-L1(-), 10% der Zellen des ME waren PD-L1(+).	NA
FL	Panjwani et al. 2018, n=163	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen des ME positives Staining zeigten	0% der FL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 0% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
FL	Menter et al. 2016, n=59	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	NA	6% der Grad 1-2 FL und 11% der Grad 3 FL zeigten sich PD-L1(+) (schwache Expression).	NA
FL	Ramsay et al. 2012, n=59	PD-L1 IHC FFPE (Abcam / polyconal )	NA	NA	Intrafollikuläre FL Tumorzellen zeigten sich PD-L1(+).	Höhere PD-L1 Level in der Gruppe der FL mit schlechterer Prognose (Überleben < 5 Jahre) vs in der Gruppe der FL mit besserer Prognose (Überleben > 15 Jahre) (univariate Analyse).
PL	Laurent et al. 2015, n=40	PD-L1 IHC FFPE (Ventana / SP142)	PD-L1(+) wenn >10% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	2,5% der Fälle von PL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen; 60% der PL beinhalten mPD-L1(+) Zellen des ME; 78% der EBV+ PL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA (nur für EBV+)
PL	Chen et al. 2013, n=9	PD-L1 IHC FFPE (Sino Bio / 15)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	44% der Fälle von PL zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 44% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen des ME.	NA
PMBL	Andorsky et al. 2011, n=3	PD-L1 IHC gefrorenes Material (eBioscience / MIH1)	NA	NA	100% der PMBL sind PD-L1(+) (nicht definierter Zelltyp).	NA
PMBL	Chen et al. 2013, n=21	PD-L1 IHC FFPE (Sino Bio / 15)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	mPD-L1(+) wenn >20% der Zellen des ME (Gewebe) 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	71% der Fälle von PMBL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen; 90% der PMBL beinhalten mPD-L1(+) Zellen des ME.	NA

PMBL	Vranic et al. 2016, n=3	PD-L1 IHC FFPE (Ventana / SP142), PD-L1 ICH FFPE (Ventana / SP263)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	NA	100% der PMBL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen (SP142); 100% der PMBL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen (SP263).	NA
PMBL	Menter et al. 2016, n=51	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	36% der PMBL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA
PMBL	Panjwani et al. 2018, n=19	PD-L1 IHC FFPE (Cell Signaling / EIL3N)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen positives Staining zeigten	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen des ME positives Staining zeigten	53% der PMBL Fälle zeigten PD-L1(+) Tumorzellen. 39% der Fälle zeigten mPD-L1(+) Zellen im ME.	NA
T-NHL	Wilcox et al. 2009, n=54 PTCL; n=20 AITL; n=8 CTCL	PD-L1 IHC FFPE (NA / 5H1); PD-L1 IHC FFPE (NA / 5H2); PD-L1 IHC FFPE (NA / 5H3)	PD-L1(+) wenn >30% der Zellen positives Staining zeigten	NA	17% der PTCL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen, 5% der AITL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen; 27% der CTCL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen.	NA
T-NHL	Brown et al. 2003, n=11	PD-L1 IHC FFPE (mice immunization/ Ab29E.2A3)	PD-L1(+) wenn Zellen größere Stainingintensität besitzen als Isotyp Kontrolle	NA	64% der Fälle von ALCL zeigen PD-L1(+) Staining.	NA
T-NHL	Miyoshi et al. 2016, n=135	PD-L1 IHC FFPE (Abcam / EPR1161)	PD-L1(+) wenn >50% der Zellen positives Staining zeigten	mPD-L1(+) wenn >10 Zellen PD-L1(+) / HPF	7% der Fälle von ATLL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen; 59% der ATLL beinhalten mPD-L1(+) Zellen im ME.	PD-L1(+) ATLL (exprimiert auf Tumorzellen) zeigt ein schlechteres OS im Vergleich zu PD-L1(-) ATLL (40% vs 10% nach 2 Jahren, p=0.0085). PD-L1(+) ATLL (auf Zellen des ME) zeigt ein besseres OS im Vergleich zu PD-L1(-) ATLL (48% vs 20% nach 2 Jahren, p=β.ββ29) (multivariate Analyse mit Adjustierung p=0.0322 und p=0.0014).
T-NHL	Vranic et al. 2016, n=11	PD-L1 IHC FFPE (Ventana / SP142), PD-L1 ICH FFPE (Ventana / SP263)	PD-L1(+) wenn >5% der Zellen 2+ oder 3+ Level der Staining Intensität zeigten	NA	28% der PTCL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen (SP142); 28% der PTCL beinhalten PD-L1(+) Tumorzellen (SP263).	NA



**Abbildung 13: MSCV-IRES-GFP Vektor**

Vektorkarte und Sequenz des MSCV-IRES-GFP Vektors. Nach Klonieren eines Inserts in den Vektor wird das Zielgen über den MSCV-Promotor konstitutiv exprimiert (AG Keller).



**Abbildung 14: lenti CRISPR v2 Vektor**

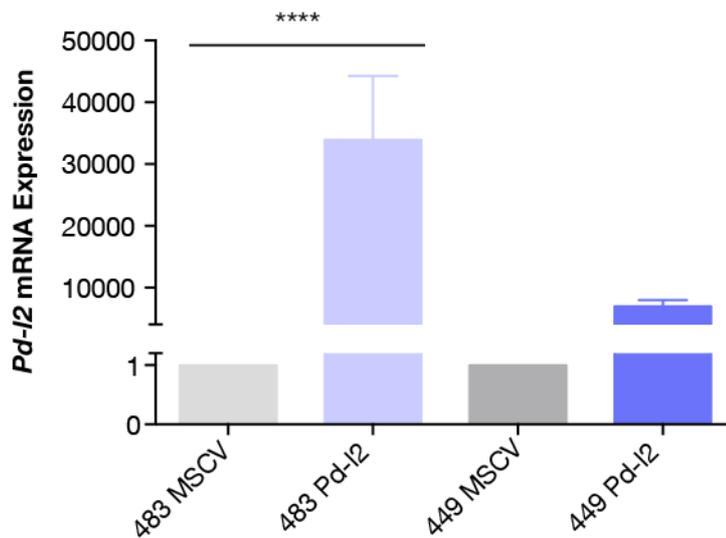
Vektor, welcher für den *Pd-1* Knockout in der murinen Zelllinie A20 verwendet wurde. Zusätzlich wurde von Mitarbeitern der AG Keller eine GFP-Sequenz als Marker in den Vektor kloniert. Abbildung adaptiert nach <https://www.addgene.org/52961/>, Stand 03.12.2019 (Sanjana, Shalem, and Zhang 2014).

**Tabelle 34: Korrelation der Genexpression von MYC und Immuncheckpointmolekülen**

Berechnung der Korrelation der Expressionsdaten von MYC und Immuncheckpointmolekülen aus dem Datensatz GSE7897 im Eμ-MYC Modell (siehe Abschnitt 6.1). Korrelationskoeffizient r nach Pearson.

Gen	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert	Signifikanz
<i>Ldha</i>	0,366460	0,008858	ns
<i>Odc</i>	0,556174	0,000027	*
<i>Pd-I1</i>	-0,350143	0,012677	ns
<i>Pd-I2</i>	-0,322590	0,022323	ns
<i>Cd80</i>	-0,143327	0,320719	ns
<i>Cd86</i>	0,164300	0,254220	ns
<i>Tnfrsf14 (HVEM)</i>	-0,235110	0,100268	ns
<i>Icosl</i>	-0,388342	0,005323	ns
<i>Lgals9</i>	0,076805	0,596013	ns
<i>Cd47</i>	-0,330549	0,019050	ns
<i>Cd276</i>	-0,358616	0,010547	ns
<i>Tnfsf4 (OX40L)</i>	-0,148366	0,303821	ns
<i>Tnfsf9 (41BBL/CD137L)</i>	-0,555570	0,000028	*
<i>Cd40</i>	0,249007	0,081195	ns
<i>Cd70</i>	-0,223405	0,118868	ns

(T-Test mit Bonferroni-Korrektur; Test gilt als statistisch signifikant wenn  $p < 0,003$ )



**Abbildung 15: Pd-I2 Expression generierter Lymphomzelllinien**

*Pd-I2* Expression auf mRNA-Ebene nach Transduktion von 483 bzw. 449 Lymphomzellen mit MSCV-Pd-I2-IRES-GFP Vektor im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. Jeweils relativ zur Kontrollgruppe. n= 3. One Way ANOVA: 483 MSCV vs 483 Pd-I2:  $p < 0,0001$ , 449 MSCV vs 449 Pd-I2:  $p = ns$ .

**Tabelle 35: Anreicherung von GFP(+) Lymphomzellen mittels FACS-Sorting**

Probe	Zielpopulation	Zellzahl	% GFP(+) nach FACS
449 Pd-I1	GFP(+)	1221451	98,3
449 MSCV	GFP(+)	515302	98,5
483 Pd-I1	GFP(+)	91506	95,9
483 MSCV	GFP(+)	148230	99,6
665 Pd-I1	GFP(+)	642298	97,2
665 MSCV	GFP(+)	601831	97,6

## 10 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1985. 'The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice', *Nature*, 318: 533-8.
- Ahmadzadeh, M., L. A. Johnson, B. Heemskerk, J. R. Wunderlich, M. E. Dudley, D. E. White, and S. A. Rosenberg. 2009. 'Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired', *Blood*, 114: 1537-44.
- Ansell, S. M., A. M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E. C. Scott, M. Gutierrez, S. J. Schuster, M. M. Millenson, D. Cattry, G. J. Freeman, S. J. Rodig, B. Chapuy, A. H. Ligon, L. Zhu, J. F. Grosso, S. Y. Kim, J. M. Timmerman, M. A. Shipp, and P. Armand. 2015. 'PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma', *N Engl J Med*, 372: 311-9.
- Ansell, S. M., M. C. Minnema, P. Johnson, J. M. Timmerman, P. Armand, M. A. Shipp, S. J. Rodig, A. H. Ligon, M. G. M. Roemer, N. Reddy, J. B. Cohen, S. Assouline, M. Poon, M. Sharma, K. Kato, S. Samakoglu, A. Sumbul, and A. Grigg. 2019. 'Nivolumab for Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Patients Ineligible for or Having Failed Autologous Transplantation: A Single-Arm, Phase II Study', *J Clin Oncol*, 37: 481-89.
- Armand, P., M. A. Shipp, V. Ribrag, J. M. Michot, P. L. Zinzani, J. Kuruvilla, E. S. Snyder, A. D. Ricart, A. Balakumaran, S. Rose, and C. H. Moskowitz. 2016. 'Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure', *Journal of Clinical Oncology*, 34: 3733-+.
- Atsaves, V., N. Tsesmetzis, D. Chioureas, L. Kis, V. Leventaki, E. Drakos, T. Panaretakis, D. Grander, L. J. Medeiros, K. H. Young, and G. Z. Rassidakis. 2017. 'PD-L1 is commonly expressed and transcriptionally regulated by STAT3 and MYC in ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma', *Leukemia*.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J. P. Allison, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. 'Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection', *Nature*, 439: 682-7.
- Barnes B, Berta J, Buttmann-Schweiger N, Liebig J, Jordan S, Kramwinkel K, Niemann H, Nowossadeck E, Poethko-Müller C, Prytz F, Rattay P, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U. 2016. "Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016." In.: Robert Koch Institut, Berlin.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath. 2007. 'CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes', *Science*, 315: 1709-12.
- Barrans, S., S. Crouch, A. Smith, K. Turner, R. Owen, R. Patmore, E. Roman, and A. Jack. 2010. 'Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab', *J Clin Oncol*, 28: 3360-5.
- Barsoum, I. B., C. A. Smallwood, D. R. Siemens, and C. H. Graham. 2014. 'A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells', *Cancer Res*, 74: 665-74.
- Bellucci, R., A. Martin, D. Bommarito, K. Wang, S. H. Hansen, G. J. Freeman, and J. Ritz. 2015. 'Interferon-gamma-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression', *Oncoimmunology*, 4: e1008824.

- Brinkman, E. K., T. Chen, M. Amendola, and B. van Steensel. 2014. 'Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition', *Nucleic Acids Res*, 42: e168.
- Brown, J. A., D. M. Dorfman, F. R. Ma, E. L. Sullivan, O. Munoz, C. R. Wood, E. A. Greenfield, and G. J. Freeman. 2003. 'Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production', *J Immunol*, 170: 1257-66.
- Burkitt, Denis. 1958. 'A sarcoma involving the jaws in African children', *British Journal of Surgery*, 46: 218-23.
- Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman. 2007. 'Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses', *Immunity*, 27: 111-22.
- Butte, M. J., V. Pena-Cruz, M. J. Kim, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2008. 'Interaction of human PD-L1 and B7-1', *Mol Immunol*, 45: 3567-72.
- Calado, D. P., Y. Sasaki, S. A. Godinho, A. Pellerin, K. Kochert, B. P. Sleckman, I. M. de Alboran, M. Janz, S. Rodig, and K. Rajewsky. 2012. 'The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers', *Nat Immunol*, 13: 1092-100.
- Casey, S. C., L. Tong, Y. Li, R. Do, S. Walz, K. N. Fitzgerald, A. M. Gouw, V. Baylot, I. Gutgemann, M. Eilers, and D. W. Felsher. 2016. 'MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1', *Science*.
- Challa-Malladi, M., Y. K. Lieu, O. Califano, A. B. Holmes, G. Bhagat, V. V. Murty, D. Dominguez-Sola, L. Pasqualucci, and R. Dalla-Favera. 2011. 'Combined genetic inactivation of beta2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma', *Cancer Cell*, 20: 728-40.
- Chen, B. J., B. Chapuy, J. Ouyang, H. H. Sun, M. G. Roemer, M. L. Xu, H. Yu, C. D. Fletcher, G. J. Freeman, M. A. Shipp, and S. J. Rodig. 2013. 'PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies', *Clin Cancer Res*, 19: 3462-73.
- Chen, B. J., R. Dashnamoorthy, P. Galera, V. Makarenko, H. Chang, S. Ghosh, and A. M. Evens. 2019. 'The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma', *Oncotarget*, 10: 2030-40.
- Chen, S., G. A. Crabill, T. S. Pritchard, T. L. McMiller, P. Wei, D. M. Pardoll, F. Pan, and S. L. Topalian. 2019. 'Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells', *J Immunother Cancer*, 7: 305.
- Choi, J. W., Y. Kim, J. H. Lee, and Y. S. Kim. 2013. 'MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma', *Hum Pathol*, 44: 1375-81.
- Claassen, G. F., and S. R. Hann. 1999. 'Myc-mediated transformation: the repression connection', *Oncogene*, 18: 2925-33.
- Coiffier, B., E. Lepage, J. Briere, R. Herbrecht, H. Tilly, R. Bouabdallah, P. Morel, E. Van Den Neste, G. Salles, P. Gaulard, F. Reyes, P. Lederlin, and C. Gisselbrecht. 2002. 'CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma', *N Engl J Med*, 346: 235-42.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339: 819-23.
- Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo, and C. M. Croce. 1982. 'Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 7824-7.
- Dave, S. S., K. Fu, G. W. Wright, L. T. Lam, P. Kluin, E. J. Boerma, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. Delabie, L. M. Rimsza, R. M. Braziel, T. M. Grogan, E. Campo, E. S. Jaffe, B.

- J. Dave, W. Sanger, M. Bast, J. M. Vose, J. O. Armitage, J. M. Connors, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, R. I. Fisher, T. P. Miller, E. Montserrat, W. H. Wilson, M. Bahl, H. Zhao, L. Yang, J. Powell, R. Simon, W. C. Chan, L. M. Staudt, and Project Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling. 2006. 'Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma', *N Engl J Med*, 354: 2431-42.
- De-The, G. 1979. 'The epidemiology of Burkitt's lymphoma: evidence for a causal association with Epstein-Barr virus', *Epidemiol Rev*, 1: 32-54.
- Ding, W., B. R. LaPlant, T. G. Call, S. A. Parikh, J. F. Leis, R. He, T. D. Shanafelt, S. Sinha, J. Le-Rademacher, A. L. Feldman, T. M. Habermann, T. E. Witzig, G. A. Wiseman, Y. Lin, E. Asmus, G. S. Nowakowski, M. J. Conte, D. A. Bowen, C. N. Aitken, D. L. Van Dyke, P. T. Greipp, X. Liu, X. Wu, H. Zhang, C. R. Secreto, S. Tian, E. Braggio, L. E. Wellik, I. Micallef, D. S. Viswanatha, H. Yan, A. A. Chanan-Khan, N. E. Kay, H. Dong, and S. M. Ansell. 2017. 'Pembrolizumab in patients with CLL and Richter transformation or with relapsed CLL', *Blood*, 129: 3419-27.
- Dominguez-Sola, D., G. D. Victora, C. Y. Ying, R. T. Phan, M. Saito, M. C. Nussenzweig, and R. Dalla-Favera. 2012. 'The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry', *Nat Immunol*, 13: 1083-91.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. 'Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion', *Nat Med*, 8: 793-800.
- Doudna, J. A., and E. Charpentier. 2014. 'Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346: 1258096.
- Dumas, J., M. A. Gargano, and G. M. Dancik. 2016. 'shinyGEO: a web-based application for analyzing gene expression omnibus datasets', *Bioinformatics*, 32: 3679-81.
- Dunn, G. P., C. M. Koebel, and R. D. Schreiber. 2006. 'Interferons, immunity and cancer immunoediting', *Nat Rev Immunol*, 6: 836-48.
- Durand-Panteix, Stéphanie, Mona Farhat, Ibtissam Youlyouz-Marfak, Pauline Rouaud, Catherine Ouk-Martin, Amandine David, Nathalie Faumont, Jean Feuillard, and Chantal Jayat-Vignoles. 2012. 'B7-H1, Which Represses EBV-Immortalized B Cell Killing by Autologous T and NK Cells, Is Oppositely Regulated by c-Myc and EBV Latency III Program at Both mRNA and Secretory Lysosome Levels', *The Journal of Immunology*, 189: 181-90.
- Edgar, R., M. Domrachev, and A. E. Lash. 2002. 'Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository', *Nucleic Acids Res*, 30: 207-10.
- Eischen, C. M., J. D. Weber, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and J. L. Cleveland. 1999. 'Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis', *Genes Dev*, 13: 2658-69.
- Elbaek, M. V., M. O. Pedersen, M. F. Breinholt, A. Reddy, C. Love, E. Clasen-Linde, H. Knudsen, S. L. Nielsen, A. O. Gang, E. Hogdall, S. Dave, and P. Norgaard. 2019. 'PD-L1 expression is low in large B-cell lymphoma with MYC or double-hit translocation', *Hematol Oncol*.
- Engler, C., R. Kandzia, and S. Marillonnet. 2008. 'A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability', *PLoS One*, 3: e3647.
- Evan, G. I., A. H. Wyllie, C. S. Gilbert, T. D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C. M. Waters, L. Z. Penn, and D. C. Hancock. 1992. 'Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein', *Cell*, 69: 119-28.
- Fang, X., B. Xiu, Z. Yang, W. Qiu, L. Zhang, S. Zhang, Y. Wu, X. Zhu, X. Chen, S. Xie, X. Yi, A. Liang, and Y. Zeng. 2017. 'The expression and clinical relevance of

- PD-1, PD-L1, and TP63 in patients with diffuse large B-cell lymphoma', *Medicine (Baltimore)*, 96: e6398.
- Francisco, L. M., V. H. Salinas, K. E. Brown, V. K. Vanguri, G. J. Freeman, V. K. Kuchroo, and A. H. Sharpe. 2009. 'PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells', *J Exp Med*, 206: 3015-29.
- Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. 'Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation', *J Exp Med*, 192: 1027-34.
- Fu, Y., J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung, and J. D. Sander. 2013. 'High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells', *Nat Biotechnol*, 31: 822-6.
- Gaidano, G., P. Ballerini, J. Z. Gong, G. Inghirami, A. Neri, E. W. Newcomb, I. T. Magrath, D. M. Knowles, and R. Dalla-Favera. 1991. 'p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 5413-7.
- Georgiou, K., L. Chen, M. Berglund, W. Ren, N. F. de Miranda, S. Lisboa, M. Fangazio, S. Zhu, Y. Hou, K. Wu, W. Fang, X. Wang, B. Meng, L. Zhang, Y. Zeng, G. Bhagat, M. Nordenskjold, C. Sundstrom, G. Enblad, R. Dalla-Favera, H. Zhang, M. R. Teixeira, L. Pasqualucci, R. Peng, and Q. Pan-Hammarstrom. 2016. 'Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas', *Blood*, 127: 3026-34.
- God, J. M., C. Cameron, J. Figueroa, S. Amria, A. Hossain, B. Kempkes, G. W. Bornkamm, R. K. Stuart, J. S. Blum, and A. Haque. 2015. 'Elevation of c-MYC disrupts HLA class II-mediated immune recognition of human B cell tumors', *J Immunol*, 194: 1434-45.
- Goodman, A., S. P. Patel, and R. Kurzrock. 2017. 'PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas', *Nat Rev Clin Oncol*, 14: 203-20.
- Gravelle, P., B. Burroni, S. Pericart, C. Rossi, C. Bezombes, M. Tosolini, D. Damotte, P. Brousset, J. J. Fournie, and C. Laurent. 2017. 'Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies', *Oncotarget*.
- Green, M. R., S. Monti, S. J. Rodig, P. Juszczynski, T. Currie, E. O'Donnell, B. Chapuy, K. Takeyama, D. Neuberg, T. R. Golub, J. L. Kutok, and M. A. Shipp. 2010. 'Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma', *Blood*, 116: 3268-77.
- Green, M. R., S. Rodig, P. Juszczynski, J. Ouyang, P. Sinha, E. O'Donnell, D. Neuberg, and M. A. Shipp. 2012. 'Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy', *Clin Cancer Res*, 18: 1611-8.
- Gregory R. Warnes, Ben Bolker, Lodewijk, Robert Gentleman Bonebakker, Wolfgang, Thomas Lumley Huber Andy Liaw, Martin, Arni Magnusson Maechler, Steffen, and Marc Schwartz and Bill Venables Moeller. 2016. "gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data." In.
- Gupta, M., J. J. Han, M. Stenson, M. Maurer, L. Wellik, G. Hu, S. Ziesmer, A. Dogan, and T. E. Witzig. 2012. 'Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation', *Blood*, 119: 2844-53.
- Han, H., A. D. Jain, M. I. Truica, J. Izquierdo-Ferrer, J. F. Anker, B. Lysy, V. Sagar, Y. Luan, Z. R. Chalmers, K. Unno, H. Mok, R. Vatapalli, Y. A. Yoo, Y. Rodriguez, I. Kandela, J. B. Parker, D. Chakravarti, R. K. Mishra, G. E. Schiltz, and S. A.

- Abdulkadir. 2019. 'Small-Molecule MYC Inhibitors Suppress Tumor Growth and Enhance Immunotherapy', *Cancer Cell*, 36: 483-97 e15.
- Harris, A. W., C. A. Pinkert, M. Crawford, W. Y. Langdon, R. L. Brinster, and J. M. Adams. 1988. 'The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells', *J Exp Med*, 167: 353-71.
- Hiddemann, W., M. Dreyling, and H. Stein. 2005. *Lymphome - Neue Erkenntnisse und Therapiestrategien* (Georg Thieme Verlag). S.11, S.13-14, S. 81-96.
- Hilmenyuk, T., C. A. Ruckstuhl, M. Hayoz, C. Berchtold, J. M. Nuoffer, S. Solanki, H. C. Keun, P. A. Beavis, C. Riether, and A. F. Ochsenbein. 2017. 'T cell inhibitory mechanisms in a model of aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma', *Oncoimmunology*, 7: e1365997.
- Hogg, S. J., A. Newbold, S. J. Vervoort, L. A. Cluse, B. P. Martin, G. P. Gregory, M. Lefebure, E. Vidacs, R. W. Tothill, J. E. Bradner, J. Shortt, and R. W. Johnstone. 2016. 'BET Inhibition Induces Apoptosis in Aggressive B-Cell Lymphoma via Epigenetic Regulation of BCL-2 Family Members', *Mol Cancer Ther*, 15: 2030-41.
- Hogg, Simon J., Stephin J. Vervoort, Sumit Deswal, Christopher J. Ott, Jason Li, Leonie A. Cluse, Paul A. Beavis, Phillip K. Darcy, Benjamin P. Martin, Andrew Spencer, Anna K. Traunbauer, Irina Sadovnik, Karin Bauer, Peter Valent, James E. Bradner, Johannes Zuber, Jake Shortt, and Ricky W. Johnstone. 2017. 'BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1', *Cell Reports*, 18: 2162-74.
- Hu, L. Y., X. L. Xu, H. L. Rao, J. Chen, R. C. Lai, H. Q. Huang, W. Q. Jiang, T. Y. Lin, Z. J. Xia, and Q. Q. Cai. 2017. 'Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study', *Chin J Cancer*, 36: 94.
- Kafuko, G. W., and D. P. Burkitt. 1970. 'Burkitt's lymphoma and malaria', *Int J Cancer*, 6: 1-9.
- Karube, K., and E. Campo. 2015. 'MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas', *Semin Hematol*, 52: 97-106.
- Kataoka, K., Y. Shiraishi, Y. Takeda, S. Sakata, M. Matsumoto, S. Nagano, T. Maeda, Y. Nagata, A. Kitanaka, S. Mizuno, H. Tanaka, K. Chiba, S. Ito, Y. Watatani, N. Kakiuchi, H. Suzuki, T. Yoshizato, K. Yoshida, M. Sanada, H. Itonaga, Y. Imaizumi, Y. Totoki, W. Munakata, H. Nakamura, N. Hama, K. Shide, Y. Kubuki, T. Hidaka, T. Kameda, K. Masuda, N. Minato, K. Kashiwase, K. Izutsu, A. Takaori-Kondo, Y. Miyazaki, S. Takahashi, T. Shibata, H. Kawamoto, Y. Akatsuka, K. Shimoda, K. Takeuchi, T. Seya, S. Miyano, and S. Ogawa. 2016. 'Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers', *Nature*, 534: 402-6.
- Kim, E. Y., A. Kim, S. K. Kim, and Y. S. Chang. 2017. 'MYC expression correlates with PD-L1 expression in non-small cell lung cancer', *Lung Cancer*, 110: 63-67.
- Kiyasu, J., H. Miyoshi, A. Hirata, F. Arakawa, A. Ichikawa, D. Niino, Y. Sugita, Y. Yufu, I. Choi, Y. Abe, N. Uike, K. Nagafuji, T. Okamura, K. Akashi, R. Takayanagi, M. Shiratsuchi, and K. Ohshima. 2015. 'Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma', *Blood*, 126: 2193-201.
- Kwon, D., S. Kim, P. J. Kim, H. Go, S. J. Nam, J. H. Paik, Y. A. Kim, T. M. Kim, D. S. Heo, C. W. Kim, and Y. K. Jeon. 2016. 'Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas', *Histopathology*, 68: 1079-89.

- Labun, K., T. G. Montague, J. A. Gagnon, S. B. Thyme, and E. Valen. 2016. 'CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering', *Nucleic Acids Res*, 44: W272-6.
- Laurent, Camille, Konstantina Charmpi, Pauline Gravelle, Marie Tosolini, Camille Franchet, Loïc Ysebaert, Pierre Brousset, Alexandre Bidaut, Bernard Ycart, and Jean-Jacques Fournié. 2015. 'Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas', *Oncoimmunology*, 4: e1026530.
- Le Mercier, I., J. L. Lines, and R. J. Noelle. 2015. 'Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators', *Front Immunol*, 6: 418.
- Lenz, G., I. Nagel, R. Siebert, A. V. Roschke, W. Sanger, G. W. Wright, S. S. Dave, B. Tan, H. Zhao, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, E. Campo, E. S. Jaffe, E. B. Smeland, R. I. Fisher, W. M. Kuehl, W. C. Chan, and L. M. Staudt. 2007. 'Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma', *J Exp Med*, 204: 633-43.
- Li, L., J. Zhang, J. Chen, Z. Y. Xu-Monette, Y. Miao, M. Xiao, K. H. Young, S. Wang, L. J. Medeiros, M. Wang, R. J. Ford, and L. V. Pham. 2018. 'B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma', *Blood*, 132: 1805-17.
- Li, M. Z., and S. J. Elledge. 2007. 'Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC', *Nat Methods*, 4: 251-6.
- Lin, C. Y., J. Loven, P. B. Rahl, R. M. Paranal, C. B. Burge, J. E. Bradner, T. I. Lee, and R. A. Young. 2012. 'Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc', *Cell*, 151: 56-67.
- Liu, J., A. Hamrouni, D. Wolowiec, V. Coiteux, K. Kuliczowski, D. Hetuin, A. Saudemont, and B. Quesnel. 2007. 'Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway', *Blood*, 110: 296-304.
- Loven, J., D. A. Orlando, A. A. Sigova, C. Y. Lin, P. B. Rahl, C. B. Burge, D. L. Levens, T. I. Lee, and R. A. Young. 2012. 'Revisiting global gene expression analysis', *Cell*, 151: 476-82.
- Maeda, T., M. Hiraki, C. Jin, H. Rajabi, A. Tagde, M. Alam, A. Bouillez, X. Hu, Y. Suzuki, M. Miyo, T. Hata, K. Hinohara, and D. Kufe. 2018. 'MUC1-C Induces PD-L1 and Immune Evasion in Triple-Negative Breast Cancer', *Cancer Res*, 78: 205-15.
- Magrath, I. 2012. 'Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma', *Br J Haematol*, 156: 744-56.
- Majzner, R. G., J. S. Simon, J. F. Grosso, D. Martinez, B. R. Pawel, M. Santi, M. S. Merchant, B. Georger, I. Hezam, V. Marty, P. Vielh, M. Daugaard, P. H. Sorensen, C. L. Mackall, and J. M. Maris. 2017. 'Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues', *Cancer*, 123: 3807-15.
- Mao, W., A. Ghasemzadeh, Z. T. Freeman, A. Obradovic, M. G. Chaimowitz, T. R. Nirschl, E. McKiernan, S. Yegnasubramanian, and C. G. Drake. 2019. 'Immunogenicity of prostate cancer is augmented by BET bromodomain inhibition', *J Immunother Cancer*, 7: 277.
- Marzec, M., Q. Zhang, A. Goradia, P. N. Raghunath, X. Liu, M. Paessler, H. Y. Wang, M. Wysocka, M. Cheng, B. A. Ruggeri, and M. A. Wasik. 2008. 'Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 20852-7.
- McKee, S. J., B. L. Doff, M. S. Soon, and S. R. Mattarollo. 2017. 'Therapeutic Efficacy of 4-1BB Costimulation Is Abrogated by PD-1 Blockade in a Model of Spontaneous B-cell Lymphoma', *Cancer Immunol Res*, 5: 191-97.

- McKelvey, E. M., J. A. Gottlieb, H. E. Wilson, A. Haut, R. W. Talley, R. Stephens, M. Lane, J. F. Gamble, S. E. Jones, P. N. Grozea, J. Gutterman, C. Coltman, and T. E. Moon. 1976. 'Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma', *Cancer*, 38: 1484-93.
- Melaiu, Ombretta, Marco Mina, Marco Chierici, Renata Boldrini, Giuseppe Jurman, Paolo Romania, Valerio D'Alicandro, Maria C Benedetti, Aurora Castellano, and Tao Liu. 2017. 'PD-L1 is a therapeutic target of the bromodomain inhibitor JQ1 and, combined with HLA class I, a promising prognostic biomarker in neuroblastoma', *Clinical Cancer Research*.
- Menter, T., A. Bodmer-Haecki, S. Dirnhofer, and A. Tzankov. 2016. 'Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas', *Hum Pathol*, 54: 17-24.
- Miyoshi, H., J. Kiyasu, T. Kato, N. Yoshida, J. Shimono, S. Yokoyama, H. Taniguchi, Y. Sasaki, D. Kurita, K. Kawamoto, K. Kato, Y. Imaizumi, M. Seto, and K. Ohshima. 2016. 'PD-L1 expression on neoplastic or stromal cells is respectively a poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma', *Blood*, 128: 1374-81.
- Montague, T. G., J. M. Cruz, J. A. Gagnon, G. M. Church, and E. Valen. 2014. 'CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing', *Nucleic Acids Res*, 42: W401-7.
- Mori, S., R. E. Rempel, J. T. Chang, G. Yao, A. S. Lagoo, A. Potti, A. Bild, and J. R. Nevins. 2008. 'Utilization of pathway signatures to reveal distinct types of B lymphoma in the Emicro-myc model and human diffuse large B-cell lymphoma', *Cancer Res*, 68: 8525-34.
- Murn, J., I. Mlinaric-Rascan, P. Vaigot, O. Alibert, V. Frouin, and X. Gidrol. 2009. 'A Myc-regulated transcriptional network controls B-cell fate in response to BCR triggering', *BMC Genomics*, 10: 323.
- Murphy, Kenneth P. 2012. *Janeway's immunobiology* (Garland Science). S.276-290, S. 389-392, S. 396-4004.
- Navarro, A., T. Diaz, A. Martinez, A. Gaya, A. Pons, B. Gel, C. Codony, G. Ferrer, C. Martinez, E. Montserrat, and M. Monzo. 2009. 'Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma', *Blood*, 114: 2945-51.
- Neri, A., F. Barriga, D. M. Knowles, I. T. Magrath, and R. Dalla-Favera. 1988. 'Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 2748-52.
- Nie, Z., G. Hu, G. Wei, K. Cui, A. Yamane, W. Resch, R. Wang, D. R. Green, L. Tessarollo, R. Casellas, K. Zhao, and D. Levens. 2012. 'c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells', *Cell*, 151: 68-79.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 1999. 'Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor', *Immunity*, 11: 141-51.
- Noman, M. Z., G. Desantis, B. Janji, M. Hasmim, S. Karray, P. Dessen, V. Bronte, and S. Chouaib. 2014. 'PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation', *J Exp Med*, 211: 781-90.
- Ok, C. Y., and K. H. Young. 2017. 'Targeting the programmed death-1 pathway in lymphoid neoplasms', *Cancer Treat Rev*, 54: 99-109.
- Okazaki, Taku, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, and Tasuku Honjo. 2013. 'A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application', *Nat Immunol*, 14: 1212-18.

- Ott, G., A. Rosenwald, and E. Campo. 2013. 'Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification', *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013: 575-83.
- Panjwani, P. K., V. Charu, M. DeLisser, H. Molina-Kirsch, Y. Natkunam, and S. Zhao. 2018. 'Programmed death-1 ligands PD-L1 and PD-L2 show distinctive and restricted patterns of expression in lymphoma subtypes', *Hum Pathol*, 71: 91-99.
- Pardoll, D. M. 2012. 'The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy', *Nat Rev Cancer*, 12: 252-64.
- Parsa, A. T., J. S. Waldron, A. Panner, C. A. Crane, I. F. Parney, J. J. Barry, K. E. Cachola, J. C. Murray, T. Tihan, M. C. Jensen, P. S. Mischel, D. Stokoe, and R. O. Pieper. 2007. 'Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma', *Nat Med*, 13: 84-8.
- Pasqualucci, L., and R. Dalla-Favera. 2015. 'The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma', *Semin Hematol*, 52: 67-76.
- Pasqualucci, L., P. Neumeister, T. Goossens, G. Nanjangud, R. S. Chaganti, R. Kuppers, and R. Dalla-Favera. 2001. 'Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas', *Nature*, 412: 341-6.
- Patsoukis, N., J. D. Weaver, L. Strauss, C. Herbel, P. Seth, and V. A. Boussiotis. 2017. 'Immunometabolic Regulations Mediated by Coinhibitory Receptors and Their Impact on T Cell Immune Responses', *Front Immunol*, 8: 330.
- Pedersen, M. O., A. O. Gang, T. S. Poulsen, H. Knudsen, A. F. Lauritzen, S. L. Nielsen, T. W. Klausen, and P. Norgaard. 2014. 'MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations', *Eur J Haematol*, 92: 42-8.
- Qiu, L., H. Zheng, and X. Zhao. 2019. 'The prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis', *BMC Cancer*, 19: 273.
- R Development Core Team. 2016. "R: A language and environment for statistical computing." In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ramsay, A. G., A. J. Clear, R. Fatah, and J. G. Gribben. 2012. 'Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer', *Blood*, 120: 1412-21.
- Roemer, M. G., R. H. Advani, A. H. Ligon, Y. Natkunam, R. A. Redd, H. Homer, C. F. Connelly, H. H. Sun, S. E. Daadi, G. J. Freeman, P. Armand, B. Chapuy, D. de Jong, R. T. Hoppe, D. S. Neuberg, S. J. Rodig, and M. A. Shipp. 2016. 'PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome', *J Clin Oncol*, 34: 2690-7.
- Rosenwald, A., S. Bens, R. Advani, S. Barrans, C. Copie-Bergman, M. H. Elsensohn, Y. Natkunam, M. Calaminici, B. Sander, M. Baia, A. Smith, D. Painter, L. Pham, S. Zhao, M. Ziepert, E. S. Jordanova, T. J. Molina, M. J. Kersten, E. Kimby, W. Klapper, J. Raemaekers, N. Schmitz, F. Jardin, W. B. C. Stevens, E. Hoster, A. Hagenbeek, J. G. Gribben, R. Siebert, R. D. Gascoyne, D. W. Scott, P. Gaulard, G. Salles, C. Burton, D. de Jong, L. H. Sehn, and D. Maucort-Boulch. 2019. 'Prognostic Significance of MYC Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium', *J Clin Oncol*: JCO1900743.
- Sabo, Arianna, Theresia R. Kress, Mattia Pelizzola, Stefano de Pretis, Marcin M. Gorski, Alessandra Tesi, Marco J. Morelli, Pranami Bora, Mirko Doni, Alessandro Verrecchia, Claudia Tonelli, Giovanni Faga, Valerio Bianchi, Alberto Ronchi, Diana Low, Heiko Muller, Ernesto Guccione, Stefano Campaner, and Bruno Amati. 2014. 'Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis', *Nature*, 511: 488-92.

- Sander, S., D. P. Calado, L. Srinivasan, K. Kochert, B. Zhang, M. Rosolowski, S. J. Rodig, K. Holzmann, S. Stilgenbauer, R. Siebert, L. Bullinger, and K. Rajewsky. 2012. 'Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis', *Cancer Cell*, 22: 167-79.
- Sanjana, N. E., O. Shalem, and F. Zhang. 2014. 'Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening', *Nat Methods*, 11: 783-84.
- Savage, K. J., N. A. Johnson, S. Ben-Neriah, J. M. Connors, L. H. Sehn, P. Farinha, D. E. Horsman, and R. D. Gascoyne. 2009. 'MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy', *Blood*, 114: 3533-7.
- Schlee, M., M. Schuhmacher, M. Holzel, G. Laux, and G. W. Bornkamm. 2007. 'c-MYC impairs immunogenicity of human B cells', *Adv Cancer Res*, 97: 167-88.
- Schuster, C., A. Berger, M. A. Hoelzl, E. M. Putz, A. Frenzel, O. Simma, N. Moritz, A. Hoelbl, B. Kovacic, M. Freissmuth, M. Muller, A. Villunger, L. Mullauer, A. I. Schmatz, B. Streubel, E. Porpaczy, U. Jager, D. Stoiber, and V. Sexl. 2011. 'The cooperating mutation or "second hit" determines the immunologic visibility toward MYC-induced murine lymphomas', *Blood*, 118: 4635-45.
- Spandidos, A., X. Wang, H. Wang, and B. Seed. 2010. 'PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification', *Nucleic Acids Res*, 38: D792-9.
- Srinivasan, S. V., D. Dominguez-Sola, L. C. Wang, O. Hyrien, and J. Gautier. 2013. 'Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress', *Cell Rep*, 3: 1629-39.
- Sugiura, D., T. Maruhashi, I. M. Okazaki, K. Shimizu, T. K. Maeda, T. Takemoto, and T. Okazaki. 2019. 'Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses', *Science*, 364: 558-66.
- Sun, C., Y. Jia, W. Wang, R. Bi, L. Wu, Q. Bai, and X. Zhou. 2019. 'Integrative analysis of PD-L1 DNA status, mRNA status and protein status, and their clinicopathological correlation, in diffuse large B-cell lymphoma', *Histopathology*, 74: 618-28.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles, A. D. Zelenetz, and E. S. Jaffe. 2016. 'The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms', *Blood*, 127: 2375-90.
- Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, G. Lenoir, D. Swan, S. Tronick, S. Aaronson, and P. Leder. 1982. 'Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 7837-41.
- Taube, J. M., R. A. Anders, G. D. Young, H. Xu, R. Sharma, T. L. McMiller, S. Chen, A. P. Klein, D. M. Pardoll, S. L. Topalian, and L. Chen. 2012. 'Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape', *Sci Transl Med*, 4: 127ra37.
- Topalian, S. L., C. G. Drake, and D. M. Pardoll. 2012. 'Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity', *Curr Opin Immunol*, 24: 207-12.
- Valera, A., A. Lopez-Guillermo, T. Cardesa-Salzman, F. Climent, E. Gonzalez-Barca, S. Mercadal, I. Espinosa, S. Novelli, J. Briones, J. L. Mate, O. Salamero, J. M. Sancho, L. Arenillas, S. Serrano, N. Erill, D. Martinez, P. Castillo, J. Rovira, A. Martinez, E. Campo, and L. Colomo. 2013. 'MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy', *Haematologica*, 98: 1554-62.
- Varano, G., S. Raffel, M. Sormani, F. Zanardi, S. Lonardi, C. Zasada, L. Perucho, V. Petrocelli, A. Haake, A. K. Lee, M. Bugatti, U. Paul, E. Van Anken, L. Pasqualucci, R. Rabadan, R. Siebert, S. Kempa, M. Ponzoni, F. Facchetti, K.

- Rajewsky, and S. Casola. 2017. 'The B-cell receptor controls fitness of MYC-driven lymphoma cells via GSK3beta inhibition', *Nature*, 546: 302-06.
- Vari, F., D. Arpon, C. Keane, M. S. Hertzberg, D. Talaulikar, S. Jain, Q. Cui, E. Han, J. Tobin, R. Bird, D. Cross, A. Hernandez, C. Gould, S. Birch, and M. K. Gandhi. 2018. 'Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL', *Blood*, 131: 1809-19.
- Victora, G. D., D. Dominguez-Sola, A. B. Holmes, S. Deroubaix, R. Dalla-Favera, and M. C. Nussenzweig. 2012. 'Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas', *Blood*, 120: 2240-8.
- Vogel, C., S. Abreu Rde, D. Ko, S. Y. Le, B. A. Shapiro, S. C. Burns, D. Sandhu, D. R. Boutz, E. M. Marcotte, and L. O. Penalva. 2010. 'Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line', *Mol Syst Biol*, 6: 400.
- Vogel, C., and E. M. Marcotte. 2012. 'Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses', *Nat Rev Genet*, 13: 227-32.
- Vranic, S., N. Ghosh, J. Kimbrough, N. Bilalovic, R. Bender, D. Arguello, Y. Veloso, A. Dizdarevic, and Z. Gatalica. 2016. 'PD-L1 Status in Refractory Lymphomas', *PLoS One*, 11: e0166266.
- Walz, S., F. Lorenzin, J. Morton, K. E. Wiese, B. von Eyss, S. Herold, L. Rycak, H. Dumay-Odelot, S. Karim, M. Bartkuhn, F. Roels, T. Wustefeld, M. Fischer, M. Teichmann, L. Zender, C. L. Wei, O. Sansom, E. Wolf, and M. Eilers. 2014. 'Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles', *Nature*, 511: 483-7.
- Wang, W. G., X. N. Jiang, D. Sheng, C. B. Sun, J. Lee, X. Y. Zhou, and X. Q. Li. 2019. 'PD-L1 over-expression is driven by B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma', *Lab Invest*.
- Wang, W. G., Z. B. Liu, X. N. Jiang, J. Lee, X. Y. Zhou, and X. Q. Li. 2017. 'MYC protein dysregulation is driven by BCR-PI3K signalling in diffuse large B-cell lymphoma', *Histopathology*, 71: 778-85.
- Wartewig, T., Z. Kurgyis, S. Keppler, K. Pechloff, E. Hameister, R. Ollinger, R. Maresch, T. Buch, K. Steiger, C. Winter, R. Rad, and J. Ruland. 2017. 'PD-1 is a haploinsufficient suppressor of T cell lymphomagenesis', *Nature*, 552: 121-25.
- Weniger, M. A., I. Melzner, C. K. Menz, S. Wegener, A. J. Bucur, K. Dorsch, T. Mattfeldt, T. F. Barth, and P. Moller. 2006. 'Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation', *Oncogene*, 25: 2679-84.
- Wilcox, R. A., A. L. Feldman, D. A. Wada, Z. Z. Yang, N. I. Comfere, H. Dong, E. D. Kwon, A. J. Novak, S. N. Markovic, M. R. Pittelkow, T. E. Witzig, and S. M. Ansell. 2009. 'B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders', *Blood*, 114: 2149-58.
- Wilson, L. O. W., A. R. O'Brien, and D. C. Bauer. 2018. 'The Current State and Future of CRISPR-Cas9 gRNA Design Tools', *Front Pharmacol*, 9: 749.
- Wilson, W. H., R. M. Young, R. Schmitz, Y. Yang, S. Pittaluga, G. Wright, C. J. Lih, P. M. Williams, A. L. Shaffer, J. Gerecitano, S. de Vos, A. Goy, V. P. Kenkre, P. M. Barr, K. A. Blum, A. Shustov, R. Advani, N. H. Fowler, J. M. Vose, R. L. Elstrom, T. M. Habermann, J. C. Barrientos, J. McGreivy, M. Fardis, B. Y. Chang, F. Clow, B. Munneke, D. Moussa, D. M. Beaupre, and L. M. Staudt. 2015. 'Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma', *Nat Med*, 21: 922-6.
- Wolf, E., C. Y. Lin, M. Eilers, and D. L. Levens. 2015. 'Taming of the beast: shaping Myc-dependent amplification', *Trends Cell Biol*, 25: 241-8.

- Yang, M., P. Liu, K. Wang, C. Glorieux, Y. Hu, S. Wen, W. Jiang, and P. Huang. 2017. 'Chemotherapy induces tumor immune evasion by upregulation of programmed cell death ligand 1 expression in bone marrow stromal cells', *Mol Oncol*, 11: 358-72.
- Younes, A., J. Brody, C. Carpio, A. Lopez-Guillermo, D. Ben-Yehuda, B. Ferhanoglu, A. Nagler, M. Ozcan, I. Avivi, F. Bosch, M. D. Caballero Barrigon, A. Hellmann, B. Kuss, D. D. F. Ma, F. Demirhan, M. Yagci, N. A. Horowitz, P. Marlton, R. Cordoba, T. Wrobel, D. Buglio, M. Streit, B. P. Hodgkinson, M. Schaffer, J. Alvarez, R. Ceulemans, S. Balasubramanian, J. de Jong, S. S. Wang, N. Fournau, and W. Jurczak. 2019. 'Safety and activity of ibrutinib in combination with nivolumab in patients with relapsed non-Hodgkin lymphoma or chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1/2a study', *Lancet Haematol*, 6: e67-e78.
- Younes, Anas, Armando Santoro, Margaret Shipp, Pier Luigi Zinzani, John M. Timmerman, Stephen Ansell, Philippe Armand, Michelle Fanale, Voravit Ratanatharathorn, John Kuruvilla, Jonathon B. Cohen, Graham Collins, Kerry J. Savage, Marek Trneny, Kazunobu Kato, Benedetto Farsaci, Susan M. Parker, Scott Rodig, Margaretha G. M. Roemer, Azra H. Ligon, and Andreas Engert. 2016. 'Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial', *The Lancet Oncology*, 17: 1283-94.
- Young, R. M., A. L. Shaffer, 3rd, J. D. Phelan, and L. M. Staudt. 2015. 'B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma', *Semin Hematol*, 52: 77-85.
- Zerdes, I., A. Matikas, J. Bergh, G. Z. Rassidakis, and T. Foukakis. 2018. 'Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations', *Oncogene*, 37: 4639-61.
- Zhu, H., F. Bengsch, N. Svoronos, M. R. Rutkowski, B. G. Bitler, M. J. Allegrezza, Y. Yokoyama, A. V. Kossenkov, J. E. Bradner, J. R. Conejo-Garcia, and R. Zhang. 2016. 'BET Bromodomain Inhibition Promotes Anti-tumor Immunity by Suppressing PD-L1 Expression', *Cell Rep*, 16: 2829-37.
- Zou, J., M. Zhuang, X. Yu, N. Li, R. Mao, Z. Wang, J. Wang, X. Wang, H. Zhou, L. Zhang, and Y. Shi. 2018. 'MYC inhibition increases PD-L1 expression induced by IFN-gamma in hepatocellular carcinoma cells', *Mol Immunol*, 101: 203-09.