

**MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSE DER
PATHOGENESE PRIMÄRER LYMPHOME DES
ZENTRALEN NERVENSYSTEMS**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Cornelius Courts
aus Kleve

Köln, 2008

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Jens Brüning

Prof. Dr. Martina Deckert

Tag der mündlichen Prüfung:

4. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis.....	I
I. Abkürzungsverzeichnis.....	III
II. Abbildungsverzeichnis.....	V
III. Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Primäre Lymphome des Zentralen Nervensystems.....	1
1.2 Mechanismen der Karzinogenese.....	3
1.2.1 Dysregulation des NFκB-Signalwegs.....	3
1.2.2 Störung der PRDM1-vermittelten terminalen B-Zell-Differenzierung.....	5
1.2.3 Differentielle und dysregulierte Expression von FOXP1.....	8
1.2.4 Micro-RNA und ihre Rolle in der Tumorphogenese.....	11
1.3 Ziele der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	15
2.1.2 Puffer, Medien und Stammlösungen.....	16
2.1.3 Laborgeräte.....	17
2.1.4 Arbeitsmaterialien.....	18
2.1.5 Enzyme.....	19
2.1.6 Zelllinien, Bakterienstämme und Plasmide.....	19
2.1.7 Antikörper.....	19
2.1.8 Primer.....	20
2.1.9 Assays für Genexpressionsanalysen.....	21
2.1.10 Software und Internetressourcen.....	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Isolation von DNA aus Zellen, Blut und Frischgeweben.....	23
2.2.2 Isolation von RNA aus Zellen und Frischgeweben.....	23
2.2.3 Isolation von RNA aus FFPE-Gewebe.....	23
2.2.4 Isolation und Aufreinigung von micro-RNA aus total-RNA-Präparationen.....	24
2.2.5 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung.....	24
2.2.6 Agarosegelelektrophorese zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten.....	24
2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.2.8 Aufreinigung/Gelextraktion von PCR-Amplifikaten von PCR-Amplifikaten.....	25
2.2.9. DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	25
2.2.10 Isolation von GC-B-Zellen.....	26
2.2.11 Isolation von CD19/CD27-positiven B-Zellen *.....	26
2.2.12 Reverse Transkription und Quantitative RT-PCR (qPCR).....	26
2.2.13 Datenanalyse der quantitativen PCR.....	27
2.2.14 miRNA-Labeling und arraybasierte Analyse von miRNA-Expressionsprofilen..	27
2.2.15 Datenanalyse für miRNA-Arrays.....	28
2.2.16 Färbung von Gewebeschnitten.....	29
2.2.17 Immunhistochemie.....	29
2.2.18 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot.....	39
3. Ergebnisse.....	31
3.1 Kein Immunglobulinklassenwechsel in PCNSL.....	31
3.1.1 PCNSL exprimieren nur IgM und IgD.....	31
3.1.2 Herabregulierte AID-Expression.....	32
3.1.3 Die Switch-μ-Region trägt interne Deletionen.....	33
3.2 Molekulare Analyse des PRDM1-Locus' und der PRDM1-Expression in PCNSL.....	34
3.2.1 Der PRDM1-Locus ist Ziel rekurrenter Mutationen.....	35
3.2.2 Expression von PRDM1-mRNA und Protein.....	40

3.3 Genexpressionsprofil des NF κ B-Signalweges in PCNSL	42
3.3.1 Hierarchisches Clustering und Analyse des Überlebens.....	47
3.4 FOXP1-Regulation in PCNSL	49
3.5 Micro-RNA-Expression in PCNSL.....	53
4. Diskussion	56
5. Zusammenfassung	67
6. Literaturverzeichnis	69

Abkürzung **Bedeutung**

Ab	Antikörper (engl.: antibody)
ABC	aktivierte B-Zelle (engl.: activated B-cell)
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (engl.: aquired immunodeficiency syndrome)
AS	Aminosäure
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaar/e
CB	Centroblast
CD20	B-Zell-spezifisches Oberflächenantigen (B-lymphocyte surface antigen B1)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complimentary DNA)
CLL	Chronische B-Zell-Leukämie
CSR	Immunglobulin-Klassenwechsel (engl.: class switch recombination)
DLBCL	Diffus-großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (engl.: diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FFPE	mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (engl: formalin fixed, paraffine embedded)
FITC	Fluoreszein-Isotiozyanat
FL	Folikuläres Lymphom
GC	Keimzentrum (engl.: germinal center)
GCB	Keimzentrums-B-Zelle (engl.: germinal center B-cell)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high pressure liquid chromatography)
Ig	Immunglobulin
JJN3	Bezeichnung für eine Multiples Myelom-Zelllinie
kb	Kilobasenpaare
LOH	Verlust der Heterozygotie (engl.: loss of heterozygosity)
min	Minute(n)
miRNA	micro-RNA
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom

Abkürzung **Bedeutung**

nt	Nukleotide
PCNSL	Primäres ZNS-Lymphom (engl.: primary central nervous system lymphoma)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
qPCR	quantitative PCR (realtime PCR)
REAL	Revised European American Lymphoma Classification
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SHM	somatische Hypermutation
TSG	Tumorsuppressorgen
ÜN	über Nacht
URL	Uniformer Ressourcen-Lokator (für die Angabe einer Internetadresse)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: world health organization)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildung	Bezeichnung	Seite
1.1	Die Rel/NFκB-Proteinfamilie	4
1.2	Schematische und vereinfachte Darstellung des NFκB-Signalwegs und der Apoptoseinduktion	5
1.3	Terminale B-Zell-Differenzierung	6
1.4	Schematische Darstellung der Exonstruktur der alternativen FOXP1-Isoformen	9
1.5	Schematisches Modell der miRNA-Biogenese	11
2.1	Schematische Übersicht über die miRNA-Array-Prozedur	28
3.1	Relative Expression von AID in PCNSL	33
3.2	Interne Deletionen in der Switch-μ-Region von PCNSL	34
3.3	Schematische Darstellung von PRDM1-Lokus und PRDM1-mRNA und des Blimp1-Proteins	36
3.4	Elektropherogramme von PRDM1-inaktivierenden Mutationen in PCNSL	37
3.5	Demonstration einer 100bp-Insertion und einer 68bp-Deletion in PRDM1-cDNA in zwei PCNSL-Fällen	37
3.6	Expression der PRDM1-Splicevarianten α und β in PCNSL (Vergleich zu Centroblasten)	38
3.7	Expression der PRDM1-Splicevarianten α und β in PCNSL (Vergleich zu Positivkontrolle, JJN3)	41
3.8	PRDM1 Proteinexpression in PCNSL	42
3.9	Genexpressionsdaten-Übersicht als Box-Plot-Diagramm	44
3.10	Relatives Expressionsniveau von BCL2, CCND2 und cFLIP in PCNSL	45
3.11	Proteinexpression in PCNSL und normalen tonsillären GC-B-Zellen	46
3.12	Differentielle Expression von BCL10 in PCNSL	47
3.13	Cluster-Analyse (unsupervised) der Expression von 21 Genen des NFκB Signalwegs in PCNSL	48
3.14	Analyse des Überlebens für PCNSL-Cluster	48
3.15	Schematische Darstellung der Exonstruktur der alternativen FOXP1-Isoformen mit spezifischen Primerpaaren	49
3.16	Differentielle Transkription von FOXP1-Isoformen in GCB- und ABC-Zellen	50
3.17	Differentielle Proteinexpression von FOXP1-Isoformen in GCB- und ABC-Zellen	50
3.18	Relative Expression der FOXP1-Isoformen 1 und 3	51

Abbildung	Bezeichnung	Seite
3.19	Relative Expression der FOXP1-Isoform 9	51,52
3.20	Verhältnis der normalisierten und gegen Centroblasten kalibrierten Expression der FOXP1-Isoformen	52,53
3.21	Boxplotdiagramm der Expressionswerte aktivierter miRNAs in PCNSL	55

Tabelle	Bezeichnung	Seite
3.1	Immunglobulin Isotypexpression in PCNSL	32
3.2	Charakteristik und funktionelle Konsequenzen von PRDM1-Mutationen, PRDM1-mRNA- und Proteinexpression in PCNSL	36
3.3	Polymorphismen des PRDM1-Lokus', PRDM1-mRNA- und Proteinexpression in PCNSL	39
3.4	Gene des NFκB-Genexpressionsprofils in PCNSL	44
3.5	Aktivierte miRNAs in PCNSL	55
3.6	Aktivierte miRNAs in PCNSL (qPCR-Validierung)	56
4.1	In PCNSL aktivierte miRNAs mit Assoziation zu Tumorerkrankungen	64,65

1. Einleitung

1.1 Primäre Lymphome des Zentralen Nervensystems

Primäre Lymphome des ZNS (engl. primary lymphoma of the central nervous system; PCNSL) sind durch die WHO definiert als extranodale, hochmaligne Lymphome¹, die in Gehirnparenchym, Meningen und/oder Rückenmark in Abwesenheit von systemischem Befall auftreten. Innerhalb der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) werden sie in mehr als 92 - 98% aller Fälle der Entität der diffus-großzelligen Lymphome vom B-Zell-Typ (engl. diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) zugeteilt. In ca.15 bis 20% der Fälle sind initial die Augen in Form einer Glaskörper- oder Uveainfiltration betroffen, außerdem können multifokale oder diffuse intrazerebrale Tumoren oder intramedulläre Lymphome auftreten. Unabhängig von der initialen klinischen Präsentation kann die gesamte kraniospinale Achse vom Lymphom betroffen werden. Histopathologisch infiltrieren große, blastäre Lymphomzellen das Hirnparenchym diffus und zeigen dabei ein auffälliges und charakteristisches angiozentrisches Wachstumsmuster mit Durchsetzung der Gefäßwände und Bildung perivaskulärer Manschetten. PCNSL sind durch eine äußerst schlechte Prognose von im Mittel 1–2 Monaten (ohne Therapie) und einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von unter 5% gekennzeichnet. PCNSL sind von B-Zellen abgeleitete, diffus-großzellige Lymphome mit entsprechender Epitop-Expression der Pan-B-Zellmarker CD19, CD20 und CD79a und zeichnen sich durch hohe Mitoseaktivität und einen hohen Proliferationsindex (in der Regel >50%; häufig sind >90% Lymphomzellen positiv für den Proliferationsmarker MIB1/Ki67) sowie inhibierte Apoptose² aus. Die Lymphomzellen befinden sich typischerweise innerhalb eines Infiltrates nicht maligner, reaktiver B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen sowie aktivierter, hirneigener Zellen. Neuroimmunologisch lassen sich als Reaktionen des umliegenden, normalen ZNS-Gewebes eine reaktive astrozytäre Gliose sowie eine deutliche Aktivierung der Mikrogliazellen feststellen. Primäre Lymphome machen etwa 0,8 bis zu 6,6% aller primären malignen ZNS-Tumoren aus³, und aktuelle Schätzungen der Gesamtinzidenz belaufen sich auf 0,46 pro 100.000 Personenjahre. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung ist 60 Jahre, und die meisten Patienten sind zwischen 45 und 70 Jahre alt, wobei hauptsächlich Patienten in der sechsten und siebten Lebensdekade betroffen sind. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen, eine signifikante Häufung bei einer Ethnie ist nicht bekannt^{4,5}. Die Häufigkeit der Erkrankung hat in den letzten drei Dekaden einen deutlichen Anstieg erfahren. Die alterskorrigierte Inzidenz verdreifachte sich

im Zeitraum von 1973-1984 bis 1985-1997⁶. Frühere Arbeiten zeigten bereits einen ähnlichen Anstieg zwischen 1973 und 1984, und es wurde sogar die Möglichkeit erwogen, daß das primäre ZNS-Lymphom unter Einbeziehung HIV-assoziiertes Fälle bis zum Jahr 2000 der häufigste Hirntumor sein könne⁷. Bei diesen Berechnungen wurden bereits der Einfluß des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (engl.: Acquired Immune Deficiency Syndrome; AIDS) auf die Inzidenz, Verbesserungen bei Detektion und Diagnose und der Anstieg der Häufigkeit von mit Immunsuppression einhergehenden Organtransplantationen berücksichtigt. Dennoch wurde in anderen Studien eine stabile oder sogar sinkende Inzidenz berichtet, wobei der andernorts gezeigte Anstieg zumindest zum Teil der AIDS-Pandemie zugeschrieben wurde^{8,9}. Dies würde jedoch nicht den Anstieg der Anzahl von Patienten im Alter von über 60 Jahren erklären. Es ist noch nicht geklärt, ob dieser durch eine echte Veränderung im Krankheitsmuster oder nur durch verbessertes, sensitiveres klinisches Screening sowie Einschluß älterer Patienten begründet ist.

PCNSL betreffen zwei voneinander verschiedene Personengruppen: immunkompetente und immundefiziente Patienten. Zur letzteren Kategorie gehören Patienten, die von HIV-Infektionen, mit Organtransplantationen einhergehender Immunsupprimierung oder erblich bedingten Immunschwächen betroffen sind. Die Entstehung der PCNSL, die diese Gruppe betrifft, ist in der Regel mit einem hohen Anteil (>95%) Epstein-Barr-Virus-positiver Tumorzellen assoziiert, unterscheidet sich biologisch von den PCNSL immunkompetenter Patienten und ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die Ätiologie und Pathogenese der PCNSL immunkompetenter Patienten ist noch größtenteils ungeklärt. Was die Forschung an diesen Lymphomen bislang stark erschwert ist, daß es sich dabei um eine seltene Erkrankung handelt und hauptsächlich mit sehr kleinen, stereotaktischen Biopsaten gearbeitet werden muß, sowie daß für funktionelle Experimente derzeit keine repräsentative Zelllinie und kein Tiermodell zur Verfügung steht.

PCNSL weisen einen sog. „late germinal center exit“-B-Zell-Phänotyp auf¹⁰. Als solche tragen sie die B-Zell-typischen Oberflächenmarker CD19, CD20 und CD79a, jedoch nicht CD138 (Plasmazellmarker) und CD10 (sehr früher Keimzentrummarker) und sind in der Mehrzahl der Fälle positiv für BCL6 (Keimzentrummarker) und IRF4/MUM1 (Differenzierungsmarker für GC-B-Zellen). Die Immunglobulingene (Ig-Gene) der Lymphome sind rearrangiert und tragen somatische Mutationen, was auf die Teilnahme der Lymphomzellen an einer Keimzentrumreaktion schließen läßt. Außerdem zeigen PCNSL Evidenz für anhaltende, aktive somatische Hypermutation (SHM)¹¹ und sind häufig von BCL6-Translokationen und BCL6-Dysregulation betroffen^{12,13}. Der komplexe, „gemischte“

Phänotyp dieser diffus-großzelligen Lymphome und auch der Vergleich der Genexpressionssignaturen¹⁰ mit systemischen DLBCL des aktivierten B-Zell- (engl.: activated B-cell; ABC) und Keimzentrums-B-Zell-Typs (engl.: germinal center B-cell; GCB) nach Wright-Klassifizierung¹⁴ läßt keine eindeutige Zuordnung zu einer dieser Subentitäten zu.

Ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese von PCNSL ist die genaue Eingrenzung des Reifezustandes, den ihre Vorläuferzellen im Keimzentrum erreicht haben. Zu klären ist, ob diese Zellen neben der SHM den Ig-Klassenwechsel (engl.: class switch recombination; CSR) vollziehen und ob sie im folgenden die terminale B-Zell-Differenzierung durchlaufen können. Für ein besseres Verständnis der starken Proliferation und der inhibierten Apoptose, die diesen Lymphomen zueigen ist, sollte außerdem die Regulation des NF κ B-Signalwegs, dessen Aktivierung charakteristisch für ABC-DLBCL ist, untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, die PCNSL-Pathogenese zu analysieren, stellt das Profiling des micro-RNA-Transkriptoms dar.

1.2 Mechanismen der Karzinogenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere mit der Tumorentstehung assoziierte Mechanismen im Zusammenhang mit der Pathogenese der PCNSL untersucht. Diese werden im folgenden vorgestellt:

1.2.1 Dysregulation des NF κ B-Signalwegs

„Nukleärer Faktor κ B“ (NF κ B) ist eine Sammelbezeichnung für eine 1986 entdeckte¹⁵ Familie von Signalproteinen, die aus den Mitgliedern RelA (p65), RelB, cRel, p105/p50 (NF κ B1) und p100/p52 (NF κ B2) besteht und die Engstelle eines zentralen zellulären Signalwegs bilden, für den über 150 induzierende Stimuli und ebenso viele Zielgene bekannt sind¹⁶. In Wirbeltieren reguliert der NF κ B-Signalweg u.a. Immunmechanismen, Entzündungs- und Akutphase-Reaktionen.

Die fünf NF κ B-Faktoren sind strukturell verwandt, denn sie alle enthalten eine etwa 300 Aminosäuren (AS) umfassende N-terminale Domäne, die als „REL homology domain“ (RHD) bezeichnet wird¹⁷ (Abb. 1.1).

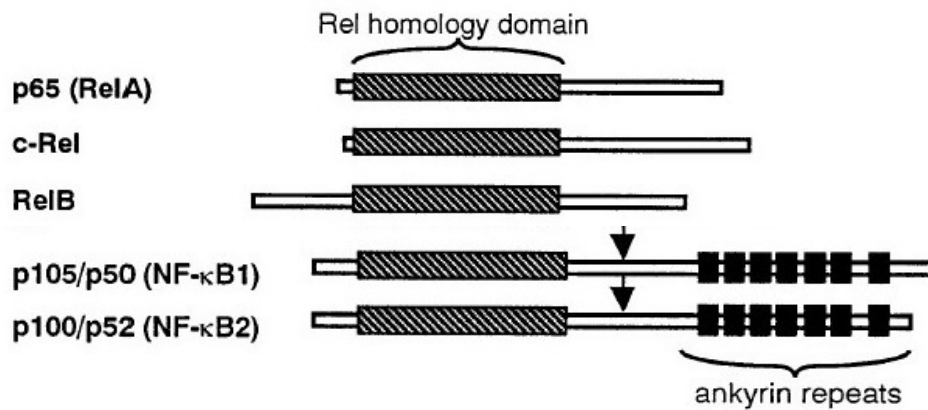


Abb.1.1: Die Rel/NFκB-Proteinfamilie (modifiziert nach: Annu Rev Immunol. 1996;14:649-83).

Die RHD enthält Sequenzen, welche DNA-Bindung, Dimer-Bildung, Transport zum Zellkern und die Bindung des spezifischen Inhibitors (IκB) ermöglichen.

Die C-terminalen Hälften von RelA, RelB und cRel enthalten Domänen für transkriptionale Aktivierung, die C-terminalen Hälften von p105/p50 und p100/p52 hingegen enthalten inhibitorische Domänen, bestehend aus sog. „ankyrin-repeats“, die ubiquitinvermittelt hinter der RH-Domäne abgespalten werden (s. Pfeile in Abb. 1.1), um die jeweils reife, zur DNA-Bindung befähigte Form (p50 bzw. p52) zu erzeugen. Fast alle Rel/NFκB-Proteine können zu Hetero- und/oder Homodimeren zusammentreten, die dann an spezielle DNA-Sequenzen (sog. „κB-sites“) binden und die Genexpression beeinflussen können. In den meisten normalen Zellen werden diese Rel/NFκB-Dimere jedoch als inaktive Komplexe durch die direkte Bindung des IκB-Inhibitors im Cytoplasma zurückgehalten. Erst wenn durch spezifische Signale, darunter zahlreiche Cytokine, die durch Phosphorylierung initiierte, ubiquitinvermittelte Degradation von IκB vollzogen wird, können die so freigesetzten Rel/NFκB-Dimere in den Kern transloziert werden¹⁸.

NFκB-Proteine spielen außerdem eine Rolle beim Zellwachstum und bei der Entstehung von Neoplasien¹⁹. So wurden Chromosomenamplifikationen, Rearrangements und Überexpression von Genen, die für Rel/NFκB-Faktoren kodieren, in vielen verschiedenen hämatopoetischen und soliden Tumoren festgestellt (Übersicht in Rayet und Gélinas, 1999). Diese Arbeiten weisen auf eine Korrelation hin zwischen der Aktivierung zellulärer Genexpression durch Rel/NFκB-Faktoren und deren Beitrag zum pathogenen Prozeß. Andere Experimente bringen NFκB mit der Kontrolle der Apoptosereaktion in Verbindung. NFκB induziert die Expression einer Reihe von Genen, deren Produkte die Apoptose inhibieren, darunter cIAP-1, cIAP2, cFLIP und BCL2 (s. Tab. 3.4, S. 44 und Abb.1.2).

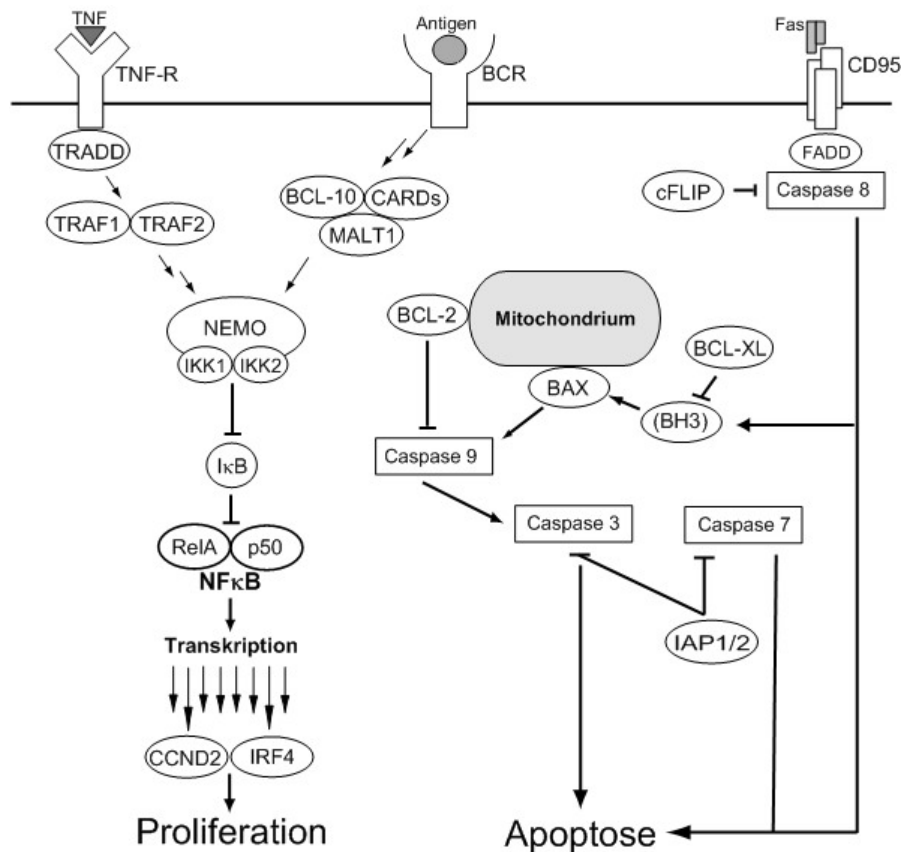


Abb. 1.2: Schematische und vereinfachte Darstellung des NF κ B-Signalwegs und der Apoptoseinduktion
 TNF: tumor necrosis factor; TNF-R: TNF-Rezeptor; BCR: B-Zell-Rezeptor; Fas: Fas-Ligand; CD95: Fas-Rezeptor;
 TRADD: TNFRSF1A-associated via death domain; FADD: Fas (TNFRSF6)-associated via death domain;
 (BH3): „BH-only“-Proteine
 →: aktiviert / induziert;
 ⊥: inhibiert / blockiert.

NF κ B kommt somit eine wahrscheinliche Rolle bei der Onkogenese und der Resistenzbildung in Tumorzellen gegen Chemotherapeutika²⁰⁻²⁴ zu. Insbesondere wurde eine zentrale Rolle des NF κ B-Signalwegs für die Pathogenese von DLBCL des ABC-Typs festgestellt^{25,26}. Es ist daher unstrittig, daß die durch unterschiedliche mögliche Mechanismen hervorgerufene, konstitutive Aktivierung von NF κ B von kritischer Bedeutung für gesteigerte Proliferation und Apoptoseresistenz von Tumorzellen ist.

1.2.2 Störung der PRDM1-vermittelten terminalen B-Zell-Differenzierung

Die B-Zell-Entwicklung verläuft über mehrere Stadien von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark über Pro- und Prä-B-Zell-Stufen bis hin zur reifen B-Zelle in den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe, wo nach Affinitätsreifung durch SHM des B-Zell-Rezeptors, neuerlicher Selektion und CSR die terminale und irreversible Differenzierung zum Effektorstadium der hochspezifischen Plasmazelle initiiert wird²⁷ (s. Abb. 1.3).

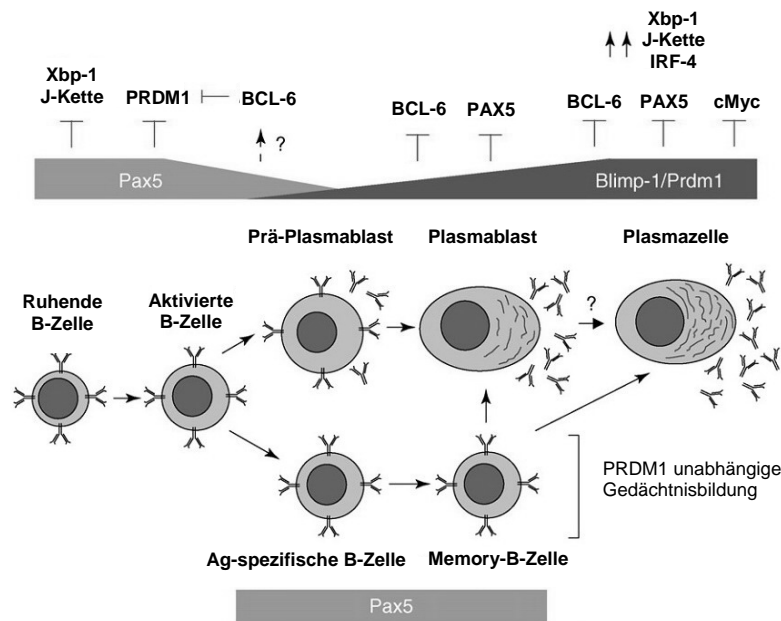


Abb. 1.3 Terminale B-Zell-Differenzierung (schematisch; modifiziert nach: *Curr Opin Immunol.* 2007 Apr;19(2):156-62)

Die Abbildung zeigt die Differenzierungsstadien von der ruhenden B-Zelle bis zur antikörpersezernierenden Plasmazelle, die diesen Stadien zugeordneten, relativen Level von Pax5 und PRDM1, sowie die durch diese vermittelte Regulation wichtiger Zielgene.

Wenn dieser terminale Entwicklungsschritt ausbleibt, wird der Abschluß der Keimzentrumsphase verhindert und die B-Zelle bleibt den Prozessen im Keimzentrum weiterhin ausgesetzt, was zu einer malignen Transformation führen kann, denn das genetische Programm, das mit dem Aufenthalt im Keimzentrum assoziiert ist und vor allem durch die komplexen Wechselwirkungen von BCL-6 charakterisiert wird, generiert einen riskanten Phänotyp, indem es die Zellen in die Lage versetzt, genotoxischen Stress gepaart mit rascher Proliferation und einem drastischen Eingriff in die DNA-Integrität zu tolerieren, ohne einen Halt des Zellzyklus oder Apoptose einzuleiten²⁸. Die DNA wird dabei durch Punktmutationen, die durch SHM entstehen, sowie durch für die CSR notwendige Rekombinationsereignisse modifiziert. Die Initiation der CSR bedarf hierfür cis-aktiver sogenannter Switch-Regionen auf der DNA, welche die korrekte Orientierung des CSR-Apparates ermöglichen. Diese Regionen liegen jeweils stromaufwärts von den ihnen zugeordneten Konstant-Regionen, welche den konstanten Teil eines Ig-Moleküls kodieren. Deletionen in diesen Switch-Regionen können zu einer Blockierung der CSR und einer Stabilisierung des Isotyps der betroffenen Zelle führen, wie an verschiedenen B-Zelllinien gezeigt wurde²⁹. Das häufige Auftreten von Chromosomentranslokationen und aberranter SHM in von Keimzentrums-B-Zellen abgeleiteten Lymphomen zeigt, daß die hochspezialisierte Physiologie des Keimzentrums die Zellen empfindlich gegen SHM- und

CSR-induzierte genetische Alterationen macht, die eine maligne Transformation bewirken können. Auch PCNSL weisen cytogenetische Defekte auf, was auf die Exposition der Lymphomzellen im Keimzentrums-Milieu schließen läßt¹³. Seit kurzem ist bekannt, daß für die keimzentrumsvermittelte Lymphomentstehung der aktive Mutator „Activation Induced Cytidine Deaminase“ (AID) notwendig ist³⁰, eine Cytidin-Deaminase, welche sowohl die Mutationen der SHM bewirkt als auch an der Erzeugung von Doppelstrangbrüchen der DNA im Rahmen des CSR beteiligt ist³¹.

Eine Störung der terminalen Differenzierung kann auftreten, wenn durch ein Ereignis eine Fehlsteuerung im regulatorischen Gleichgewicht ausgelöst wird (Abb. 1.2). Im Zusammenhang mit der B-Zell-Lymphomentstehung sind genetische Alterationen des Protoonkogens BCL-6 und des Tumorsuppressors PRDM1 häufig die Ursache für eine gestörte Differenzierung zur Plasmazelle. Das "positive regulatory domain I protein, with ZNF domain" (PRDM1) ist der zentrale Regulator der B-Zell-Differenzierung zur Plasmazelle³². Das PRDM1-Gen liegt auf Chromosom 6 im Bereich q21-q22.1, besteht aus 8 Exonen^{33,34}, und es existieren zwei Splicevarianten: PRDM1- α kodiert für die längere Isoform, PRDM1- β enthält eine distinkte 5'-UTR und entbehrt, verglichen mit der α -Variante, eines Stückes (in frame) der 5'-kodierenden Region. Die resultierende β -Isoform trägt einen kürzeren N-Terminus als die α -Variante. Als Protein weist PRDM1- β eine deutliche Schwächung der repressiven Funktion bei vielen PRDM1-Zielgenen auf wobei jedoch eine normale DNA-Bindungs-fähigkeit und die nukleäre Lokalisation erhalten bleibt³⁵.

Das durch PRDM1 kodierte Protein „B-lymphocyte induced maturation protein 1“ (Blimp-1) fungiert als Transkriptionsrepressor für mehr als 200 Gene, induziert jedoch auch die Expression von ca. 30 Genen³² und ist unentbehrlich für eine normale Plasmazelldifferenzierung³⁶, sowie die Aufrechterhaltung des Plasmazellstatus³⁷. Blimp-1 reprimiert dabei direkt die Gene für die Transkriptionsfaktoren Spi-B und Id3, welche die B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion regulieren, und es unterbindet den Ig-Klassenwechsel³⁸, indem es die Expression von AID (s.o.), Ku70, Ku86, DNA-PKcs und STAT6 blockiert³², aber auch die Gene für PAX5³⁹, CIITA⁴⁰ und cMyc⁴¹ werden durch Blimp-1 reprimiert. Blimp-1 kontrolliert also die Plasmazelldifferenzierung, indem es die genetischen Programme für die Signaltransduktion über den B-Zell-Rezeptor, für die Funktionen der GC-B-Zelle und für die Proliferation stoppt, dabei aber die Expression von wichtigen Plasmazellgenen wie XBP-1 zuläßt. Ein weiteres Zielgen für Blimp-1 ist BCL-6, dessen Expression durch Blimp-1 reprimiert wird. BCL-6-Überexpression wiederum reprimiert PRDM1 und unterdrückt daher die Plasmazelldifferenzierung^{42,43}. Die reziproke Fähigkeit von Blimp-1, die BCL-6-

Expression zu blockieren, generiert so einen "feedback loop", der eine strikte Kontrolle über die Entscheidung darüber, ob eine B-Zelle zur Plasmazelle ausdifferenziert, erzwingt. Solange BCL-6 in einer GC-B-Zelle exprimiert wird, ist die PRDM1-Expression und damit die Plasmazelldifferenzierung blockiert. Sobald aber PRDM1 aktiviert wird, wird BCL-6 reprimiert, und die irreversible Differenzierung zur Plasmazelle wird eingeleitet. So ist das Prä-Plasmablast-Stadium charakterisiert durch geringe, Blimp-1-unabhängige Antikörpersekretion. Plasmablasten weisen bereits eine intermediäre Blimp-1-Expression auf, proliferieren aber noch rasch und sezernieren Antikörper. Höhere Blimp-1-Werte sind mit langlebigen Plasmazellen assoziiert, die große Mengen an Antikörpern sezernieren und ihren Zellzyklus beendet haben.

Mutationen, die in einer Inaktivierung eines Blimp-1-Allels resultierten, wurden in zwei unabhängigen Studien in jeweils etwa einem Viertel aller untersuchten systemischen ABC-DLBCL gefunden^{44,45}. In all diesen Fällen war das zweite Blimp-1-Allel durch „loss of heterozygosity“ (LOH) deletiert – die Region wird bei NHL häufig von Deletionen betroffen 6q21⁴⁶ –, und die Zellen konnten kein intaktes Blimp-1-Protein mehr produzieren. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, daß Blimp1-Inaktivierung durch einen klassischen „two hit“-Mechanismus erfolgt und damit die Blockierung der terminalen B-Zell-Differenzierung ein rekurrentes Motiv in der Pathogenese von DLBCL ist.

1.2.3 Differentielle und dysregulierte Expression von FOXP1

Das „Forkhead box protein 1“ (FOXP1) gehört zur FOXP-Familie von Transkriptionsfaktoren, welche als gemeinsames Merkmal eine DNA-bindende, winged helix oder „forkhead“ Domäne, sowie N-terminale Zinkfinger- und Leucin-Zipper-Domänen besitzen. Das FOXP1-Gen liegt auf Chromosom 3 im Bereich p14.1 und besteht aus 21 Exonen, wovon die ersten 5 Exone, der 5'-Teil von Exon 6 und der 3'-Teil von Exon 21 nicht kodierend sind. Neben der kanonischen Isoform (Q9H334-1), die alle 21 Exone enthält, sind weitere Splicevarianten (Q9H334-2 bis -4) mit fehlenden Exonen sowie eine differentielle FOXP1-Expression in normalen Geweben, darunter Tonsillen, Bronchialepithelien, Kleinhirn, Niere, Schilddrüse, Pankreas, Dickdarm, Milz, Thymus, Haut und Ovarien sowie malignen Tumoren, darunter Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Adenokarzinom des Magens und des Pankreas, Plattenepithelkarzinom der Haut und Prostatakarzinom, mit vornehmlich nukleärer Lokalisation beschrieben^{47,48}. Durch bioinformatische Analysen der Sequenz von zusätzlichen FOXP1-Transkripten, insbesondere die der "expressed sequence

tag" (EST)-Datenbank innerhalb des humanen FOXP1 Unigene Ordners (Hs.431498), konnten 9 Isoformen von FOXP1 identifiziert werden⁴⁹. Ihre Exon-Struktur ist in Abb. 1.4 dargestellt.

Über die Wirkungsweise von FOXP-Transkriptionsfaktoren in der zellulären Signalvermittlung und der Regulation der Genexpression ist erst wenig bekannt. Es liegen jedoch bereits Evidenzen dafür vor, daß das Fox-Protein eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Aspekten der Immunregulation spielt, darunter die Entwicklung und Funktion von regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺), Differenzierung epithelialer Thymuszellen, Unterdrückung der T-Zell-Aktivierung und der Verhinderung von Autoimmunität sowie die Regulation lymphozytärer Proliferation und Apoptose (Übersicht in Coffe et al., 2004⁵⁰). Außerdem werden die FOX-Transkriptionsfaktoren allgemein mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht, da bei ihnen retrovirale Integration, Genamplifikation, chromosomale Translokation und transkriptionale Dysregulation beobachtet wurde⁵¹⁻⁵⁵. Insbesondere der Genlocus von FOXP1 ist bei einer Reihe von Tumoren beschädigt⁵⁶.

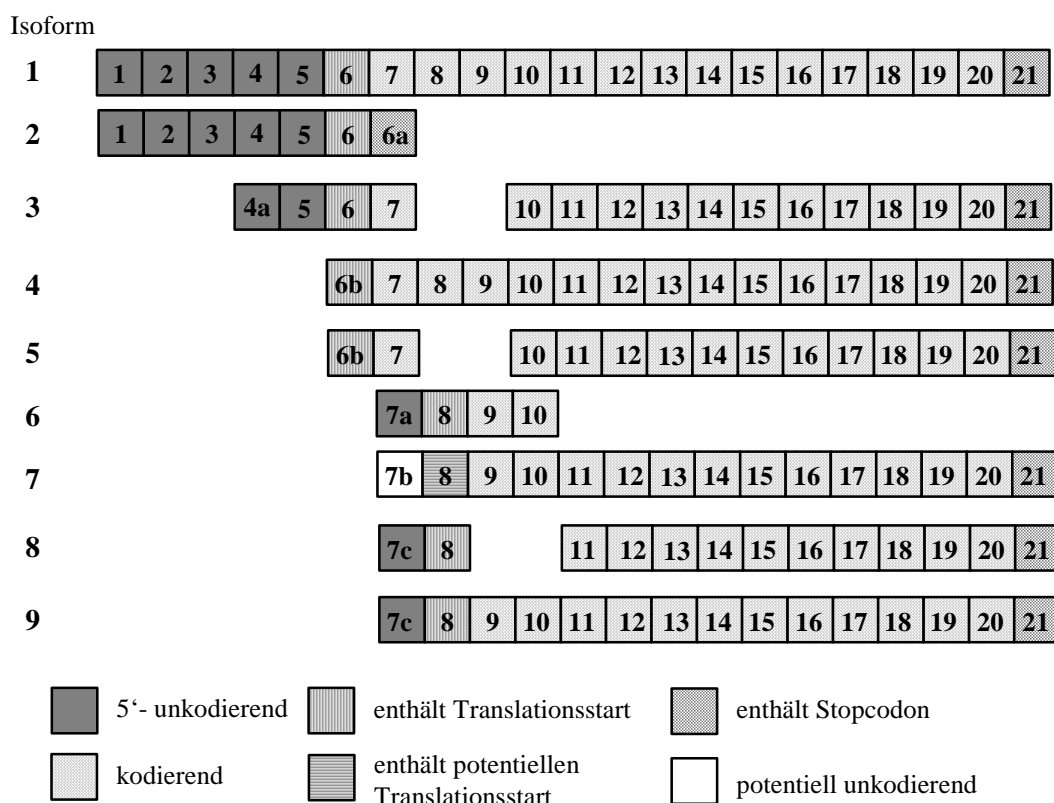


Abb.1.4: Schematische Darstellung der Exonstruktur der alternativen FOXP1-Isoformen (mod. nach Blood. 2008 Mar 1;111(5):2816-24.)

Genexpressionsstudien und Immunphänotypisierungen zeigten ferner, daß FOXP1 in normalen peripheren, aktivierten B-Zellen exprimiert wird. Außerdem wird beschrieben, daß FOXP1 und in einer Untergruppe von „non-GCB“-DLBCL, die im Vergleich zu GCB-

DLBCL eine schlechtere Prognose aufweisen, überexprimiert wird^{48,57-59}. Eine kürzlich erschienene Studie beschreibt in Übereinstimmung dazu die Aktivierung peripherer B-Zellen als alternativen Mechanismus für eine Aktivierung der FOXP1-Expression⁴⁹. Welche Bedeutung der FOXP1-Überexpression in Lymphomen zukommt, ist noch nicht abschließend geklärt, allerdings präsentieren zwei verschiedene Arbeiten FOXP1 als unabhängigen prognostischen Faktor *innerhalb* der Subgruppe der „non-GCB“-DLBCL, dessen Proteinüberexpression mit noch schlechteren Überlebenschancen für Patienten korreliert ist^{58,60}. In weiteren Studien diente die Quantifizierung der FOXP1-Expression auch zur Identifikation von Patienten mit schlechter Prognose in primären kutanen großzelligen B-Zell-Lymphomen (PCLBCL) und Mucosa-assoziierten Lymphomen (MALT)^{61,62}. Diese Daten legen eine Funktion als Onkogen für FOXP1 nahe.

Andererseits ist der FOXP1-Genlocus (3p14.1) ein bekannter Tumorsuppressorloкус; in epithelialen Tumoren wie dem Mammakarzinom wird gewöhnlich eine niedrige FOXP1-Expression beobachtet. Hinzu kommt, daß der Verlust der nukleären Expression von FOXP1 beim Mammakarzinom sogar ein Korrelat für eine schlechte Prognose darstellt⁶³. In der Maus ist FOXP1 notwendig für embryonales Überleben⁶⁴ - in FOXP1-negativen Embryos kommt es zu schweren Defekten in der kardialen Morphogenese - was eine wichtige Funktion für die Entwicklung impliziert; in Myocardgeweben, die kein FOXP1 exprimieren können, traten erhöhte Proliferation und Apoptosehemmung in den Zellen auf⁴⁸. Diese Befunde sprechen im Gegensatz zum oben Dargelegten für eine Funktion von FOXP1 als Tumorsuppressorgen.

Eine aktuelle Studie⁴⁹ griff diesen Widerspruch auf und beobachtete eine differentielle Expression verschiedener FOXP1-Splicevarianten in ABC- und GCB-Zelllinien, die die widersprüchlichen Befunde erklären könnten: Für ABC-DLBCL wurde eine bevorzugte Transkription und Expression kleinerer FOXP1-Isoformen beschrieben. Diese Variabilität in der Expression des ungekürzten FOXP1-Proteins im Verhältnis zu kleineren Isoformen kann eine Erklärung dafür sein, warum die immunhistochemisch gemessene FOXP1-Expression, welche nicht zwischen den Isoformen unterscheidet, in einigen Fallserien nicht mit dem Überleben der Patienten korreliert ist. Die Dysregulation von FOXP1-Expression und eine vornehmliche Expression trunkierter, N-terminal deletierter FOXP1-Varianten könnte demnach ein onkogener Mechanismus sein. Die Quantifizierung der differentiellen Expression von FOXP1-Isoformen zusammen mit der Immunophänotypisierung könnte mithin prognostische Subgruppierung sogar innerhalb von Patientengruppen mit schlechter Prognose ermöglichen. Der FOXP1-Regulationsstatus ist für PCNSL bisher nicht beschrieben worden und soll in dieser Arbeit analysiert werden.

1.2.4 Micro-RNA und ihre Rolle in der Tumorphathogenese

Micro-RNAs (miRNAs) sind eine erst vor kurzem entdeckte Klasse von kleinen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen mit einer Länge von ca. 18 bis 24 Nukleotiden (nt) und spielen eine Rolle in der posttranskriptionalen Regulation^{65,66}. Die erste miRNA wurde 1993 in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt⁶⁷. Zum Zeitpunkt der Niederschrift sind mehr als 500 miRNAs identifiziert, und Schätzungen sagen die Existenz von über 1000 miRNAs in höheren Eukaryoten voraus⁶⁸. MiRNAs werden sequentiell nummeriert und in die offizielle „miRBase-Datenbank“ (<http://microrna.sanger.ac.uk>)⁶⁹ eingetragen, welche aktuelle Sequenzdaten (für sowohl Vorläufer- als auch reife Moleküle) und weitere Informationen enthält. Ungefähr die Hälfte der bekannten miRNAs werden von nicht proteinkodierenden Transkripten exprimiert, die andere Hälfte befindet sich in Intronregionen von kodierenden Genen. Intronsche miRNAs werden generell zusammen mit den sie beherbergenden Genen transkribiert.

In Säugerzellen werden die primären Transkripte für miRNA (pri-miRNA) in Form langer, polycistronischer Transkripte von einer Typ II Polymerase generiert^{70,71}. Die pri-miRNA wird im Zellkern von einem als Microprocessor bezeichneten Komplex, bestehend aus der RNase III *Drosha* und dem ds-RNA-bindenden Protein *DGCR8*, zu 60 bis 110 bp langen, Haarnadelstrukturen und einen 2 nt 3'-Überhang enthaltenden Vorläufer-miRNAs (pre-miRNA) verarbeitet^{72,73}. Exportin 5 transportiert die pre-miRNAs Ran-GTP-abhängig in das Cytoplasma wo die RNase III *Dicer* das Molekül zu doppelsträngigen, 18 bis 24 bp langen, reifen miRNAs weiterverarbeitet⁷⁴⁻⁷⁶ (s. Abb 1.5).

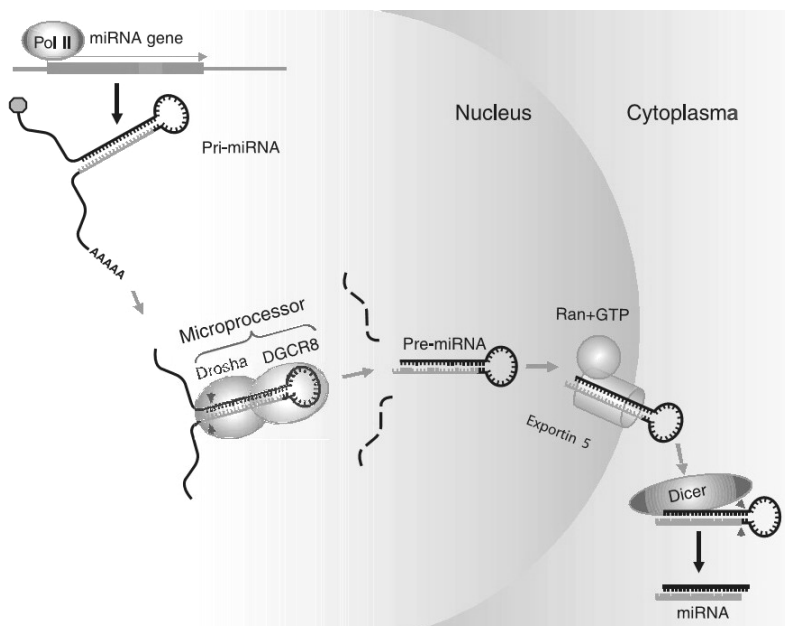


Abb.1.5: Schematisches Modell der miRNA-Biogenese (nach: *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9):3509-12)

Der Antisense-Strang der reifen miRNA wird dann von einem Ribonukleoproteinkomplex aufgenommen, der als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Der biologische Effekt der miRNA tritt ein, indem die Ziel-mRNA vom miRNA-RISC-Komplex durch komplementäre Basenpaarung spezifisch gebunden wird⁷⁷.

Vollständige oder fast vollständige Paarung von Ziel-mRNA und miRNA führt zur Degradation der Ziel-mRNA. Alternativ kann die miRNA:mRNA-Paarung auch nur partiell verlaufen, was zur Inhibition der Translation und dem Silencing der Ziel-mRNA führt^{78,79}. Neueste Erkenntnisse zeigen, daß miRNAs, abhängig von der Phase des Zellzyklus' und entgegen der gängigen Auffassung, auch translationsaktivierend wirken können⁸⁰, was das regulatorische Potential und die Bedeutung dieser Molekülklasse noch weiter erhöhen könnte. Zusätzlich kompliziert wird das Verständnis miRNA-vermittelter Regulation auch durch die kürzlich entdeckte Assoziation des „dead end 1“-Proteins (Dnd1) mit einigen menschlichen miRNAs⁸¹, die die Bindung dieser miRNAs an ihre Ziel-mRNAs verhindert, somit die regulative Funktion dieser miRNAs reguliert und also eine zusätzliche, sozusagen „metaregulatorische“ Instanz darstellt.

Obgleich die Präsenz und Bedeutung der miRNAs erst in den letzten Jahren ersichtlich wurde, liegt bereits reichhaltige Evidenz vor für die Schlüsselrolle, die dieser molekularen Spezies in einer Reihe von wichtigen biologischen Prozessen zukommt. So konnte die Bedeutung miRNA-vermittelter Regulation für frühe Entwicklung⁸²⁻⁸⁴, Zellproliferation und Zelltod⁸⁵⁻⁸⁷, Fettstoffwechsel⁸⁸, Glukose-Homöostase⁸⁹, Zelldifferenzierung⁹⁰⁻⁹², darunter insbesondere B-Zell-Reifung⁹³ (s. Abschnitt 1.2.2), und neuronale Entwicklung^{94,95} gezeigt werden.

Die Erkenntnisse über die wichtige Funktion der miRNAs bei der Regulation von Entwicklung und Differenzierung stützen die These, daß aberrante miRNA-Expression und -Funktion auch zur Entstehung von Tumoren beitragen können. Bereits in frühen Berichten wurden aberrante miRNA-Expression und miRNA-Genorte mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht: schon im Jahr 2002 konnten von damals 186 bekannten miRNAs 98 (53%) in bekannten, tumorassoziierten break-point Regionen, fragilen Stellen, minimalen Regionen von LOH und minimalen Regionen von Amplifikationen lokalisiert werden⁹⁶. In den folgenden Jahren stärkten zahlreiche Studien die Korrelation zwischen veränderter Expression von miRNAs und verschiedenen Tumorerkrankungen: unter den soliden Tumoren wurden beim Kolonkarzinom eine reprimierte Expression von miR-143 und -145⁹⁷ und beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom eine reprimierte Expression von let-7⁹⁸ aber eine erhöhte Expression von miR-155 beschrieben⁹⁹. MiR-155-Überexpression wurde zudem auch in Zellen von Mamma-Karzinomen festgestellt¹⁰⁰. Auch bei hämatopoetischen Neoplasien

wurde eine aberrante miRNA-Expression gefunden: in Tumorzellen der chronischen B-Zell-Leukämie (CLL) ist die Expression von miR-15a und -16 herabreguliert, in den Zellen pädiatrischer Burkitt-Lymphome (BL), von Hodgkin-Lymphomen, primären mediastinalen B-Zell-Lymphomen sowie systemischen DLBCL ist eine erhöhte Expression von miR-155 feststellbar^{87,101-104}. Die Lymphomentstehung ist darüber hinaus assoziiert mit einer erhöhten Expression des miR-17-92-Clusters¹⁰⁵. Die aberrante miRNA-Expression kann dabei durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden, wie Verlust oder Zugewinn von Genkopien, Keimbahnmutationen der pre-miRNAs, Promotermethylierung oder aberrante miRNA-Prozessierung durch fehlgestellte Expressionsregulation der an der miRNA-Biogenese beteiligten Komponenten¹⁰⁶. Dalmay und Edwards haben für einen Übersichtsartikel bioinformatische Vorherhsagen gesammelt und diese mit vorliegenden Microarray-Daten kombiniert. So konnten sie die hypothetische Funktion, die miRNAs bei den sechs von Hanahan und Weinberg¹⁰⁷ formulierten, für Tumore kennzeichnenden Prozessen zukommt, beschreiben¹⁰⁸.

Eine interessante Arbeit von Lu et al. lieferte Evidenz dafür, daß miRNA-Signaturen mit ca. 200 miRNAs bereits verwendet werden können, um selbst schlecht differenzierte menschliche Tumoren genauer zu klassifizieren, als dies durch mRNA-Expressionsprofile mit vielen Tausend Genen möglich ist¹⁰⁹. Auch Jiang et al. konnten durch Profiling von nur 201 miRNAs die gleiche Klassifizierung verschiedener Tumorgewebe erreichen, wie Ross et al. durch mRNA-Profiling von 8000 Genen^{110,111}. Ein möglicher Grund für die Überlegenheit des miRNA-Profiling ist, daß im Gegensatz zum mRNA-Profiling ein miRNA-Profiling die direkt biologisch wirksamen Moleküle (reife miRNAs) erfaßt, wohingegen zwischen mRNA-Molekülen und biologischer Wirkung vermittelt durch korrespondierende Proteine noch mehrere regulatorische Instanzen liegen, die durch mRNA-Profiling nicht erfaßt werden können. Weiterhin konnten Guo et al.¹¹² in einer aktuellen Arbeit zeigen, daß die differentielle Expression von nur zwei miRNAs gute Prognosen für das Überleben von Patienten mit Ösophaguskarzinom erlauben. Eine andere aktuelle Studie von Yu et al.¹¹³ führt eine Signatur bestehend aus fünf miRNAs an, die eine Vorhersage für gesamtes und krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit Lungenkarzinom ermöglicht.

Die hier aufgeführte, indirekte Evidenz legt also einen Beitrag von miRNA-Dysregulation bei der Tumorentstehung nahe (Übersicht in Calin, 2006¹¹⁴) und zeigt auf, daß miRNA-Expressionsprofile bereits wichtige diagnostische und prognostische Marker bei verschiedenen Tumorerkrankungen sind. Es ist daher sinnvoll und innovativ, miRNA-Profiling-Methoden in die Tumoranalytik einzubeziehen.

1.3 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht molekularbiologische Aspekte von PCNSL. Sie befaßt sich hierzu mit der Analyse pathogener Funktionszusammenhänge, welche potentiell an der Entstehung von PCNSL beteiligt sind, mit der Zielsetzung, die Rolle, die diese Mechanismen für die Pathogenese primärer ZNS-Lymphome spielen, aufzuklären.

Die Aufklärung der Bedeutung dieser pathogenen Mechanismen dient der Verbesserung des Verständnisses dieser Erkrankung und kann hilfreich für die diagnostische Klassifizierung von Patienten und deren prognostischer Einordnung sein. Die übergeordnete Zielsetzung ist ein Beitrag zur Ermöglichung einer auf den Erkenntnissen der molekularpathologischen Analyse beruhenden, spezifischen und hochwirksamen Therapie dieser Erkrankung.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Können die Tumorzellen von PCNSL den Reifungsschritt der CSR abschließen und welche Rolle spielt dabei AID? Hierzu wurden Mutationsanalysen der IGHV- und Switch- μ -Region sowie eine Untersuchung der AID-Transkription und – Proteinexpression durchgeführt.
- Liegt bei PCNSL eine Störung der terminalen B-Zellreifung vor? Hierzu wurde eine umfassende Mutationsanalyse des PRDM1-Lokus' sowie eine Untersuchung der Transkription von PRDM1-Isoformen und der Blimp-1-Proteinexpression durchgeführt.
- Was bedingt die starke Proliferation und Apoptoseresistenz der Tumorzellen? Hierzu wurde mittels qPCR ein Transkriptionsprofil des NF κ B-Signalwegs und einer Reihe von Mediatoren und Zielgenen erstellt, mit der Proteinexpression korreliert und auf differentielle Expression untersucht.
- Zeigen PCNSL eine differentielle mRNA-Expression von FOXP1-Isoformen? Hierzu wurden die Expressionswerte von drei FOXP1-Isoformen quantitativ analysiert und mit den jeweiligen Werten in GCB- und ABC-DLBCL-Zelllinien verglichen.
- Weisen PCNSL überexprimierte miRNAs auf und haben diese potentiell eine Funktion bei der Pathogenese dieser Lymphome? Hierzu wurde das miRNAom von PCNSL mittels miRNA-Arrays analysiert und Kandidaten-miRNAs mittels qPCR validiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Hersteller und Ort
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma
Ameisensäure	Merck
Ammoniumchlorid	Sigma
APS Ammonium Persulfat	Amresco, Solon, OH, USA
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Chloralhydrat	Merck
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
ECL-Detektion-Kit (Komponenten: Luminol/Enhancer und Peroxide-Buffer)	Bio-Rad
Eosin	Merck
Ethanol >99,8%, p.a.	Sigma
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
ExoSAP-IT	USB Corporation, Cleveland, Ohio, US
Ficoll	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
flashPAGE Buffer Kit	Ambion
flashPAGE precast Gels	Ambion
flashPAGE Reaction Clean Up Kit	Ambion
Glycerin	Sigma
Glycin	Merck
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Hämatoxylin	Merck
Kaliumaluminiumsulfat	Merck
Kaliumkarbonat	Sigma
Milchpulver	Herler Cenovis GmbH, Radolfzell, Deutschland
Magnetic Beads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
mirVana™ miRNA Labeling Kit	Ambion
mirVana™ Bioarray Essentials Kit	Ambion
mirVana™ miRNA Bioarrays V2	Ambion
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid	Sima
Natriumjodat	Merck
Natronlauge	Merck

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Puregene DNA-Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA
Qiaprep Spin, Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit	Ambion, Austin, TX, USA
RNAse ZAP	Ambion
Salzsäure 37%, rauchend	Merck
Super Script III – RT-Kit	Invitrogen
TaqMan Low Density Arrays	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Mastermix, NoAmpErase UNG	Applied Biosystems
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Amresco
Tris-Base [(Hydroxymethyl)Aminomethan]	Sigma
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)	Bio-Rad
Wasser (HPLC-gereinigt)	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
Xylol p.a.	Roth
Zitronensäuremonohydrat	Merck

2.1.2 Puffer, Medien und Stammlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Hersteller
„ABC“-Puffer	100 mg DAB in 20 ml Tris-Puffer (Lsg. A) 37,5 µl H ₂ O ₂ + 125 µl Tris-Puffer (Lsg. B) 900 µl Tris-Puffer + 100µl Lsg. A + 10µl Lsg. B
DCS-Detection Line (2 Komponenten) - polyvalenter Link (Ziegen-Ig, biotinyliert; Anti-Maus, -Ratte, -Kaninchen, -Meerschweinchen) - Konjugat von Streptavidin mit Meerrettich-Peroxidase	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland
DNA-Größenstandards (versch. Größen)	Fermentas
DNA-Ladepuffer (6X)	Fermentas
Eosin-Lösung	1 g Eosin lösen in 100ml ddH ₂ O
Hämalaun-Lösung	1 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kaliumaluminiumsulfat zu 800 ml dd H ₂ O darin lösen: 50g Chloralhydrat 1 g kristallines Zitronensäuremonohydrat auffüllen mit ddH ₂ O auf 1l

Bezeichnung	Zusammensetzung bzw. Hersteller
„Lämmli“-Puffer	20% Glycerin 4,0 % SDS 0,125M Tris-HCl (pH 7,0) 0,7M β -Mercaptoethanol Brompheelblau
Lysepuffer für Erythrozyten	0,04 M Ammoniumchlorid 0,0018 M Kaliumkarbonat 0,001 M EDTA mit HCl eingestellt auf pH 7,4
Puffer und Fluoreszenzfarbstoffe für fluorimetrische Messungen (Qubit)	Invitrogen
Sammelgel für SDS-PAGE	5,0 % Acrylamid (38%)/Bisacrylamid (2%) 125 mM Tris-HCl, pH6,8 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
SDS-Laufpuffer (1X)	25 mM Tris-Base 0,25 M Glycin 0,1 % SDS
TAE-Puffer (50X)	2,0 M Tris-Base 0,05 M Ameisensäure 0,05 M EDTA
TBS-Puffer (1X)	10 mM Tris-Base 150 mM NaCl pH 7,6 eingestellt mit HCl
TE-Puffer	19 mM Tris 1 mM EDTA mit HCl eingestellt auf pH 7,6
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 150 mM Glycin 20% Methanol
Trenngel für SDS-PAGE	7,5 % Acrylamid (38%)/Bisacrylamid (2%) 375 mM Tris-HCl, pH8,8 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
Tris-Puffer	0,05 M Tris-Base mit HCl eingestellt auf pH 7,6
TTBS-Puffer (1X)	10 mM Tris-Base 150 mM NaCl 0,1 % Tween-20 pH 7,6 eingestellt mit HCl

2.1.3 Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Capillary Sequencer 3730	Applied Biosystems
flashPAGE Fractionator	Ambion

Bezeichnung	Hersteller und Ort
GenePix 4000B	Molecular Devices, Union City, CA, USA
Heizblock HB-1	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Megafuge 1.0 - Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
„Mini Protean“; Gelelektrophorese-Zelle und Nasstransferkammer für Western Blot	Bio-Rad
Minisub Cell GT (Gelelektrophorese)	BioRad, Hercules, CA, USA
pH-Meter	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Pipettierhilfe „Easypet“	Eppendorf
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Real Time PCR System 7300	Applied Biosystems
Real Time PCR System 7900HT	Applied Biosystems
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
„Trans-Blot“ Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad
UV-Transilluminator mit CCD-Kamera	LTF-Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Zentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf

2.1.4 Arbeitsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller und Ort
8-strip 0,5 ml-Reaktionsgefäße	Labomedic, Bonn, Deutschland
96 well Reaktionsplatten	Applied Biosystems
„Curix HT1.000G Plus“ – 18 x 24 cm Röntgenfilm	AGFA, Mortsel, Belgien
Fettstift	Dako, Hamburg, Deutschland
Latexuntersuchungshandschuhe (puderfrei)	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Mehrkanalpipette (verschiedene Größen)	Biohit, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
Mikropipetten „research“ und research pro“ (verschiedene Größen)	Eppendorf
Nitriluntersuchungshandschuhe (puderfrei)	Meditrade
Pipetten „Cellstar“ (versch. Volumina)	Greiner Group, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Labomedic, Bonn, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1ml; 2ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Group
Skalpell (Feather, Einweg)	pfm, Köln, Deutschland
„X-Omatic cassette“ (Expositionskassette für Immunoblot)	Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA

Alle verwendeten Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und –platten sind nuklease- und pyrogenfrei.

2.1.5 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Hot Start IT Taq Polymerase	USB Corporation
Taq Polymerase	Invitrogen
PstI (Restriktionsendonuklease)	Fermentas
HS Taq Polymerase	TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Anmerkung: Enzyme, die Bestandteile von Kits oder Mastermixen sind (s. 2.1.1), werden hier nicht aufgeführt.

2.1.6 Zelllinien, Bakterienstämme und Plasmide

Bezeichnung	Hersteller und Ort
JJN3 (Myelomzelllinie)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Heidelberg, Deutschland
Jurkat (T-Zelllinie)	institutseigener Zellbestand
E.Coli K12 Derivat (kompetent)	Invitrogen
HeLa (Zervixkarzinomzelllinie)	DSMZ
Karpas 422 (GCB-DLBCL-Zelllinie)	institutseigener Zellbestand
OCI-Ly3 (ABC-DLBCL-Zelllinie)	institutseigener Zellbestand
Raji (Burkitt-Lymphom-Zelllinie)	institutseigener Zellbestand
topo Cloning Vektor (Plasmid)	Invitrogen

2.1.7 Antikörper

<i>PRIMÄR-ANTIKÖRPER</i>			
Zielantigen*	Organismus	Klon	Hersteller und Ort
AID	Ratte	EK2-5G9 IgG _{2b}	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
BCL10	Maus	151	Zymed, Karlsruhe, Deutschland
BCL2	Maus	100/D5	DCS
BCL6	Maus	PG-B6p	Dako
PRDM1	Maus	3H2-E8	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
CD20	Maus	L26	Dako
CD3	Kaninchen	SP7	DCS
CD38-PE	Maus	AT13-5	BD
CD45	Maus	2B11+PD7/26	Dako
FOXP1	Maus	JC12	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Banham ⁴⁸
Ki-67	Kaninchen	SP6	DCS
MUM/IRF4	Maus	MUM1p	Dako
cREL	Kaninchen	polyklonal	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
REL A	Kaninchen	polyklonal	Labvision, Fremont, CA, USA

*Alle verwendeten Primär-Antikörper richten sich gegen menschliches Antigen.

SEKUNDÄR-ANTIKÖRPER[§]			
Zielantigen	Organismus	Kopplung	Hersteller und Ort
Maus-Konstantregion	Ziege	Peroxidase (POD)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien

[§]Nicht aufgeführt ist der Standard-Antikörper für Immunhistochemie (s. 2.2.17), der Teil des DCS-DetectionLine-Systems (s. 2.1.2) ist.

2.1.8 Primer

Alle aufgeführten Primer wurden online bei Sigma bestellt und hergestellt. Als Aufreinigungsgrad wurde „HPLC“ gewählt. Die Überprüfung der Primer erfolgte unter Zuhilfenahme kostenloser Internet-Ressourcen (s. 2.1.10). Sie wurden für PCR, qPCR und Sequenzierreaktionen verwendet.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
BLIMP1a-E1F*	5'-TAGAGCCCAAGTAAGCGTTGA-3'
BLIMP1a-E1R*	5'-AGGAGCTCTGTCTGCCTCTG-3'
BLIMP1b-E1F*	5'-TTGCATAGTTGAAGCCTTGG-3'
BLIMP1b-E1R*	5'-ACTTGAGAATGACCAAAATGAT-3'
BLIMP1-E2F*	5'-TATACGGCTTCTTGGCTCTT-3'
BLIMP1-E2R*	5'-AGGAACAGTTGAAGGCTGG-3'
BLIMP1-E3F*	5'-AGATGGTCTCCCCCTATGGT-3'
BLIMP1-E3R*	5'-AAGCAAGCAACAAACTGTTTC-3'
BLIMP1-E4F*	5'-GCCCTGATTTCTGCTGATTC-3'
BLIMP1-E4R*	5'-GTCCCTAGCTTAAGCCACCT-3'
BLIMP1-E5F*	5'-TTGAGTGAGTGGCCCAGAG-3'
BLIMP1-E5R*	5'-AGGGAAGTCACTTGTCCAAA-3'
BLIMP1-E6F*	5'-AAACTCCCTGCTAGCCTGTG-3'
BLIMP1-E6R*	5'-GCCATCTCAAGTCATCAGCA-3'
BLIMP1-E7F	5'-ATACCACACTGGAGGTGCCACA-3'
BLIMP1-E7R	5'-CCTTGTTTCATGCCCTGAGATTTTC-3'
BLIMP-SpliceE4/I4-F	5'-ACCACTTCATTGACGGCTTT-3'
BLIMP-SpliceE4/I4-R	5'-CTGATGTGAGGGGTGAAATG-3'
BLIMP-SpliceE2/I2-F	5'-TGCGGATATGACTCTGTGGA-3'

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
BLIMP-SpliceE2/I2-R	5'-TGGCGTTCTTAGGAACTGTG-3'
FOXP1_E6F_alt.	5'-GAATCTGGGACTGAGACAAAAGTA-3'
FOXP1_E8R	5'-GATAACTTGAGGTGTCATCATAGCC-3'
FOXP1_E10R [#]	5'-AAGGCCTTGGCGCTGCAAAGACAGGA-3'
FOXP1_E4aF [#]	5'-CTCGGATCCGCATTTATTAACAGTGAGGCTGCTGAA-3'
FOXP1_E6R [#]	5'-CTCGAATTCTCACTGCTGGGCGTGGGCGAGGTCAGCTGC-3'
FOXP1_E7cF [#]	5'-GTAGCTAACTCAACTGTCAGAACTGC-3'
FOXP1_b-Act-F [#]	5'-ATCTGGCACCCACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'
FOXP1_b-Act-R [#]	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'

*Primersequenz entnommen aus Pasqualucci et al.⁴⁵

[#]Primersequenz entnommen aus Brown et al.⁴⁹

2.1.9 Assays für Genexpressionsanalysen

Alle verwendeten Assays enthalten ein Primerpaar und eine spezifisch bindende Hydrolysierungs-Sonde und wurden von Applied Biosystems bezogen. Alle aufgeführten Assays überspannen eine Exongrenze und sind somit cDNA-spezifisch.

Bezeichnung	Gen (Kürzel)
Hs00757808_m1	activation-induced cytidine deaminase (AICDA)
Hs00180269_m1	BCL2-associated protein (BAX)
Hs00184839_m1	B-cell CLL/lymphoma 10 (BCL10)
Hs00608023_m1	B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)
Hs00236329_m1	BCL2-like 1 (BCL-XL)
Hs00357350_m1	baculoviral IAP repeat-containing 2 (cIAP-1)
Hs00154109_m1	baculoviral IAP repeat-containing 3 (cIAP-2)
Hs00367225_m1	caspase recruitment domain family, member 10 (CARD10)
Hs00260906_m1	caspase recruitment domain family, member 10 (CARD11)
Hs00364499_m1	caspase recruitment domain family, member 10 (CARD14)
Hs00364485_m1	caspase recruitment domain family, member 10 (CARD9)
Hs00277041_m1	cyclin D2 (CCND2)
Hs00153439_m1	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (cFLIP)
Hs00180031_m1	interferon regulatory factor 4 (IRF4)

Bezeichnung	Gen (Kürzel)
Hs00198984_m1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 (MALT1)
Hs00765730_m1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105) (NFκB1)
Hs00174517_m1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) (NFκB2)
Hs01068508_m1	PR domain containing 1 alpha transcript (PRDM1-alpha)
Hs00153357_m1	PR domain containing 1 alpha and beta transcript (PRDM1-alpha/beta)
Hs00153294_m1	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (RELA)
Hs00232399_m1	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (RELB)
Hs00231279_m1	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian) (CREL)
Hs00427620_m1	TATA-Box binding protein (TBP)
Hs00194639_m1	TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)
Hs00184186_m1	TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)

2.1.10 Software und Internetressourcen

Bezeichnung	Hersteller bzw. URL
A7300 Sequence Detection Software	Applied Biosystems
ABI Prism 7900HT Sequence Detection Software	Applied Biosystems
MS-Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
Laser Gene Programmgruppe	DNASStar, Madison, WI, USA
Mutation Surveyor	SoftGenetics LLC, State College, PA, USA
Netprimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html
Primer 3 ¹¹⁵	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed

2.2 Methoden

Verwendete Gewebe: Für diese Arbeit wurden folgende Gewebe verwendet: cryoasservierte Biopsate und formalinfixierte, paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeblöcke von PCNSL; normale, nicht maligne, lymphatische Gewebe (Tonsillen); periphäres Blut.

Erklärung: Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt, und es wurde sichergestellt, daß bei Arbeiten an PCNSL-Biopsaten, lymphatischem Gewebe, entnommenen Tonsillen oder periphärem Blut von Patienten deren informiertes Einverständnis gemäß der Erklärung von Helsinki¹¹⁶ eingeholt worden war.

2.2.1 Isolation von DNA aus Zellen, Blut und Frischgeweben

DNA wurde unter Verwendung des Puregene DNA Isolation Kits (s. 2.1.1) nach Vorgabe des Herstellers isoliert. Das jeweils verwendete Protokoll wurde durch Art und Menge des Ausgangsmaterials bestimmt. Vor der Isolation von Leukozyten-DNA aus Vollblut wurden die Erythrozyten zuvor mit einem Lysepuffer (s. 2.1.2) lysiert. Isolierte DNA wurde bei 4°C oder längerfristig bei -20°C in TE-Puffer (s. 2.1.2) gelagert.

2.2.2 Isolation von RNA aus Zellen und Frischgeweben

RNA aus Frischgeweben und geernteten Kulturzellen wurde nach der Trizol-Methode (s. 2.1.1.) isoliert, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden. Isolierte RNA wurde in RNase freiem Wasser bei -80°C gelagert.

2.2.3 Isolation von RNA aus FFPE-Gewebe

Zur Isolation von RNA aus FFPE-Gewebe wurde das „RecoverAll Nucleic Acid Isolation“-Kit (s. 2.1.1) unter Befolgung der Herstellervorgaben verwendet. Es wurden jeweils 4 Scheiben von 20µm Dicke für eine Isolation eingesetzt und zuvor die atmosphäreausgesetzte Oberfläche vom Gewebeblock abgetragen und verworfen. Isolierte RNA wurde in RNase freiem Wasser bei -80°C gelagert.

2.2.4 Isolation und Aufreinigung von micro-RNA aus total-RNA-Präparationen

Die die micro-RNA (miRNA) enthaltende RNA-Fraktion der Größe ≤ 40 Nukleotide wurde aus jeweils 10 μg total-RNA (s. 2.2.3) unter Verwendung des „flashPAGE fractionators“, „flashPAGE pre cast gels“ und des „flashPAGE buffer kits“ (s. 2.1.1) nach Herstelleranweisung isoliert. Polyacrylamidgelfraktionierung reichert die RNA-Populationen der Größen zwischen 15 und 40 Nukleotiden etwa um das Zehntausendfache an. Diese Methode ermöglicht so eine 80%-Ausbeute an miRNA aus der total-RNA. Zudem erhält sie die für die total-RNA repräsentative, relative Häufigkeit der isolierten miRNAs, wie durch Northern Blot Analysen gezeigt wurde¹¹⁷. Hiernach erfolgte eine Aufreinigung des Isolates mit Hilfe des „flashPAGE Reaction Clean Up kit“ (s. 2.1.1) und eine Lagerung der microRNA bei -80°C .

2.2.5 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde fluorometrisch in einem fluoreszenzfreien 0,5 ml Reaktionsgefäß bestimmt. Dazu wurde zunächst eine „working solution“ bereitet, indem ein nukleinsäurespezifischer Fluoreszenzfarbstoff 1:200 in Puffer (s. 2.1.2) verdünnt wurde. In 199 μl dieser Lösung wurde 1 μl der die zu messende Nukleinsäure enthaltenden Lösung gegeben, vortexgemischt und nach 2-3 min Inkubation bei RT die Messung im Replikat mit dem Qubit-Fluorometer (s.2.1.3) vorgenommen.

2.2.6 Agarosegelelektrophorese zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten

Agarosegelelektrophoresen wurden in horizontalen Laufkammern mit 10 cm Laufstrecke durchgeführt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 X TAE-Puffer (s. 2.1.2) verwendet. Es wurden 0,8 – 1% Agarose-Gele hergestellt und mit 0,2 μg Ethidiumbromid pro 1 ml Gelvolumen versetzt. Je 10 μl der aufzutrennenden Probengemische wurden mit 2 μl 6X DNA-Ladepuffer (s. 2.1.2) vermischt und in vorgeformte Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurden je nach erwarteter Größe der Probenfragmente geeignete DNA-Größenstandards mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung an das Gel von 8 V pro 1 cm Laufstrecke. Photographien der Bandenmuster auf den Gelen nach der Auftrennung wurden auf einem UV-Transilluminator mit einer CCD-Kamera (s. 2.1.3) gemacht.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCRs wurden in Reaktionsvolumina von 25 µl oder 50 µl mit verschiedenen DNA-Polymerasen (s. 2.1.5) unter Verwendung eines T3 Thermocyclers (s. 2.1.3) durchgeführt. PCR-Puffer und dNTP-Präparationen wurden den Vorgaben der Polymerasehersteller angepaßt. Die MgCl₂-Konzentration und der Einsatz von Additiven wie DMSO wurde reaktionsspezifisch optimiert. Pro PCR wurden 200 ng DNA-Template eingesetzt und eine Primerkonzentration von 0,2 µM pro Primer (s. 2.1.8) verwendet.

Die Thermoprofile und Cycling-Bedingungen wurden unter Berücksichtigung von Primerbeschaffenheit und –schmelztemperatur, sowie von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz erstellt und ggf. reaktionsspezifisch optimiert.

2.2.8 Aufreinigung/Gelextraktion von PCR-Amplifikaten von PCR-Amplifikaten

Nach der Durchführung einer PCR (s. 2.2.7) wurden die erzeugten Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.6) analysiert. Wenn ausschließlich die gewünschte, spezifische Bande detektiert wurde, wurde das Amplifikat lediglich aufgereinigt, indem unter Verwendung von ExoSAP-IT (s. 2.2.1) überschüssige Nukleotide und Primer inaktiviert wurden. Wurden auch unspezifische Banden festgestellt, wurde die spezifische Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel exzidiert und das darin enthaltene, gewünschte Amplifikat mittels des Qiaquick Gel Extraction Kits (s. 2.1.1) protokollgemäß aufgereinigt.

2.2.9. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Zur Sequenzierung von PCR-Amplifikaten wurden diese nach der in 2.2.8 beschriebenen Aufreinigung mit fluoreszenzgekoppelten Didesoxynukleotiden nach modifizierter Sanger-Methode¹¹⁸ unter Verwendung des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (s. 2.1.1) markiert. Alle Sequenzierungen erfolgten bidirektional (alle verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.1.8 aufgelistet). Die Sequenzbestimmung erfolgte anschließend auf einem Capillary Sequencer 3730 (s. 2.1.3).

2.2.10 Isolation von GC-B-Zellen*

Menschliche Tonsillen wurden mechanisch zerkleinert und mononukleäre Zellen wurden mit einem Ficoll Dichtegradienten gewonnen (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). GC-B-Zellen wurden durch den monoklonalen Maus-Antikörper "CD77-FITC (BD, Heidelberg, Deutschland) angefärbt und mit anti-FITC-gekoppelten "magnetic beads"(Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) isoliert.

2.2.11 Isolation von CD19/CD27-positiven B-Zellen*

Periphere, mononukleäre Zellen aus menschlichem Blut wurden mit einem Ficoll Dichtegradienten gewonnen. B-Zellen wurden mittels CD19-gekoppelter "magnetic beads" angereichert. CD19-positive B-Zellen wurden anschließend mit dem monoklonalem Mausantikörper CD27-PE (BD, Heidelberg) angefärbt und nach CD27-positiven Zellen sortiert, wozu ein FACS Vantage Cell Sorter (BD, Heidelberg), verwendet wurde.

2.2.12 Reverse Transkription und Quantitative RT-PCR (qPCR)

Alle qPCR-Untersuchungen wurden an revers transkribierten cDNA-Äquivalenten von Gewebe- oder Zelltranskriptomen durchgeführt.

Reverse Transkriptionen von total-RNA-Präparationen (s. 2.2.2 und 2.2.3) wurden mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (s. 2.2.1) oder des Super Script III Kits (s. 2.2.1) unter Verwendung von Random-Hexameren jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Die quantitativen PCRs wurden entsprechend der Fragestellung mittels Low Density Arrays, die die aus Primern und Sonden bestehenden Assays in lyophilisierter Form bereits enthalten, oder manuell pipettierten 96-well-Reaktionsplatten in einem Real Time PCR System 7900HT bzw. 7300 durchgeführt (s. 2.1.3).

Alle verwendeten, kommerziell erworbenen qPCR-Assays (s. 2.1.9) enthalten FAM-Hydrolyse-Sonden mit TAMRA-Quencher, die zusätzlich einen „minor groove binder“ (MGB) zur Erhöhung der DNA-Bindesepezifität enthalten. Alle Assays wurden in Verbindung mit TaqMan-Universal Master Mix (s. 2.1.1) verwendet, weisen dieselbe PCR-Effizienz auf und benötigen identische Cycling-Bedingungen: 10 min bei 95°C, dann 15 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C (40 Wiederholungen).

* Die in Abschnitt 2.2.10 und 2.2.11 beschriebenen Arbeiten wurden durch das Institut für Zellbiologie an der Universität Essen (Direktor: Prof. Dr. R. Küppers) durchgeführt, die Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dort verwendete Materialien sind im entsprechenden Abschnitt aufgeführt.

Alternativ wurde die qPCR ohne Assay/Sonden, sondern mit Primern und mit SYBR-Green enthaltendem Universal-Mastermix (s.2.1.1) durchgeführt.

Wenn micro-RNAs mit qPCR quantifiziert wurden, wurden spezielle für reife miRNA-Formen spezifische „stem loop“-Primer (Applied Biosystems) für die Reverse Transkription und miRNA-spezifische Assays (Applied Biosystems) für die qPCR-Messung verwendet.

2.2.13 Datenanalyse der quantitativen PCR

Die Rohdatenverarbeitung wurde mit instrumentenspezifischer Software (s. 2.1.10) vorgenommen. Die Intermediärdaten wurden dann exportiert und mit MS-Excel (ebd.) weiter bearbeitet. Die Analyse wurde als relative Quantifizierung durchgeführt. Die Normalisierung der Rohdaten, die der Entfernung von nichtbiologischen Varianzen dient, wurde mittels der Expressionsdaten des Referenzgens TATA-Binding-Protein oder β -Aktin (interne Kontrolle) vorgenommen. Die Kalibrierung der Expressionsdaten in PCNSL wurde durch Vergleich mit den Expressionsdaten in GC-B-Zellen ermöglicht. Da die Amplifikationseffizienz aller verwendeten Assays identisch war, konnte auf eine Effizienzkorrektur¹¹⁹ verzichtet werden. Die rechnerische Ermittlung der normalisierten, relativen Expressionswerte erfolgte gemäß der $\Delta\Delta C_t$ -Methode¹²⁰.

Rechnerische Ermittlung von Expressionswerten durch Subtraktion ohne eigentliche Messung ist zulässig und erfolgte nur unter folgenden Bedingungen: 1.) die Amplifikations- und Bindungseffizienzen, sowie die Normalisierung für die der Berechnung zugrundeliegenden Assays sind identisch; 2.) beide Sonden detektieren dasselbe Molekül, eine der Sonden detektiert aber noch zusätzlich ein weiteres Molekül; 3.) die Assays wurden in demselben Experiment unter Verwendung desselben cDNA-Aliquots durchgeführt.

2.2.14 miRNA-Labeling und arraybasierte Analyse von miRNA-Expressionsprofilen

Für die Analysen des Micro-RNA-Transkriptoms von PCNSL wurde hochreine, gelfraktionierte miRNA (s. 2.2.4) aus insgesamt je 10 μ g total-RNA pro Sample verwendet. Um das Problem der sehr kleinen Cryo-Biopsate zu umgehen, aus denen schwerlich genügend miRNA für eine Array-Analyse isoliert werden kann, wurden FFPE-Biopsate verwendet. Die Eignung dieser Proben für miRNA-Analytik wurde von Xi et al.¹²¹ gezeigt. Die miRNA-Profile wurden mit „mirVana™ miRNA Bioarrays V2“ (s. 2.1.1) auf einem Genepix 4000B Scanner (s. 2.1.3) gemäß Herstellerprotokoll erstellt. Das „amine-tailing“ und direkte Cy3-

Labeling der miRNAs wurde mit dem mirVana™ miRNA Labeling Kit und dem mirVana™ Bioarray Essentials Kit (s. 2.1.1) durchgeführt. Anschließend wurden die Bioarrays mit den markierten miRNAs über Nacht hybridisiert, gewaschen und getrocknet. Hiernach wurden die Fluoreszenzsignale auf einem GenePix 4000B Reader (s. 2.1.3) ausgelesen. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die einzelnen Arbeitsschritte.

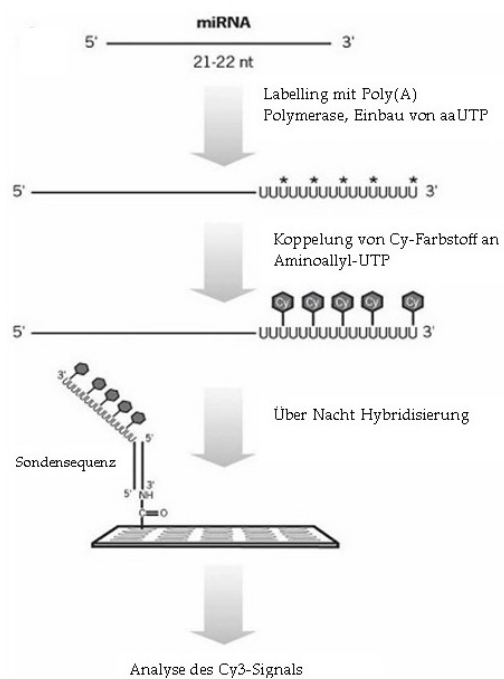


Abb. 2.1: Schematische Übersicht über die miRNA-Array-Prozedur (mod. nach: RNA; 2005 Sep;11(9):1461-70)

Die Microarrays waren zum Zeitpunkt der Verwendung auf dem aktuellen Stand der miRBase Sequence Database (Version 8.0)⁶⁹ und enthielten 662 Sondensets.

2.2.15 Datenanalyse für miRNA-Arrays

Die Arrays enthielten vier Replikate jedes miRNA-Komplementes. Die Replikate wurden unter Nichtberücksichtigung von Ausreißern gemittelt und gegen den Fluoreszenzhintergrund korrigiert. Die Normalisierung erfolgte, indem die ubiquitär exprimierte miRNA let-7a als Referenz verwendet wurde.

2.2.16 Färbung von Gewebeschnitten

Um Gewebe- und Zellstrukturen an Gewebeschnitten von Gefriermaterial (Schnittdicke 4 µm) oder FFPE-Material (Schnittdicke 6-10 µm) sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Hämalaun und Eosin (HE) angefärbt. FFPE-Schnitte wurden vor der Prozedur durch Xylol-Behandlung deparaffiniert. Zunächst wurden die Schnitte 20 min in Aceton fixiert, danach 7 min in Chloroform, anschließend wurden sie luftgetrocknet. Hiernach erfolgte die Anfärbung in Hämalaun-Lösung (s. 2.1.2) für 2 min, wonach zuerst unter warmem, fließendem Wasser gespült wurde und dann darin für 2 min inkubiert wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit Eosin gefärbt, indem sie 5 bis 10 sec in Eosin-Lösung (s. 2.1.2) inkubiert wurden. Zur Entwässerung wurden die Schnitte in Bädern mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 90% und 100%) jeweils 1 min, danach 1 min in Isopropanol und zuletzt dreimal 5 min in Xylol inkubiert. Abschließend konnten die angefärbten, fixierten Schnitte eingedeckt werden.

2.2.17 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen von Paraffin- bzw. Gefriergewebeschnitten wurden folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurden Objektträger (OT) mit Schnittpräparaten 20 – 30 min bei RT gehalten, anschließend für 10 min in Aceton und dann für 7 min in Chloroform fixiert. Die OT wurden luftgetrocknet und das Gewebe mit Fettstift umrandet. Hiernach erfolgte die Präinkubation in 5% BSA/PBS für 20 min, bevor der primäre Antikörper (s. 2.1.7) in geeigneter Verdünnung zugegeben und 60 min inkubiert wurde. Die Detektion des primären Antikörpers durch sekundäre Antikörper und der Nachweis durch Peroxidasereaktion wurde mit dem DCS-Detection-Line Nachweissystem (s. 2.1.2) nach Herstelleranleitung durchgeführt.

Danach wurden die OT 3 – 5 sec in Hämalaun-Lösung gehalten und durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 100%) geführt, darauf 5 min in Isopropanol und 3 mal 5 min in Xylol inkubiert. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte eingedeckt.

2.2.18 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Immunoblot

Proteingemische wurden durch diskontinuierliche PAGE nach der Größe aufgetrennt. Dazu wurde ein aus Trenngel und Sammelgel (s. 2.1.2) bestehendes Polyacrylamidgel gegossen. Pellets aus Kulturzellen wurden in 2 Volumenanteilen „Lämmli“-Puffer (s. 2.1.2)

resuspendiert und 4 min bei 95°C inkubiert. Diese Suspension wurde auf das Gel, umgeben von SDS-Laufpuffer (1X) (s. 2.1.2), aufgebracht und das darin enthaltene Proteingemisch durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 1h elektrophoretisch aufgetrennt.

Die so aufgetrennten Proteingemische wurden durch Blotting in einer Naßtransferkammer durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 1h unter Eiskühlung und umgeben von Transfer-Puffer (s.2.1.2) vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (s. 2.1.4) transferiert. Sowohl PAGE als auch Immunoblot wurden mit der „Mini Protean II“-Apparatur (s. 2.1.3) durchgeführt.

Anschließend wurden freie Bindestellen auf der Membran durch 1,5 h Inkubation in einer 5% Magermilchpulver-Lösung (s. 2.1.1) geblockt. Nach gründlichem Abspülen mit TBS (s. 2.1.2) wurde die Membran 1 h bei RT mit dem Primäantikörper (in TTBS) (s. 2.1.7 und 2.1.2) schüttelinkubiert, wonach dreimal 10 min mit reichlich TTBS gewaschen wurde. Hiernach wurde die Membran mit POD-gekoppeltem Sekundäantikörper (in TTBS) für 1 h bei RT schüttelinkubiert und erneut drei mal für 10 min mit reichlich TTBS gewaschen. Danach wurde die Membran kurz mit TBS gespült, abtropfen gelassen, 5 min in einem 1:1-Gemisch der beiden Komponenten des ECL-Kits (s. 2.1.1) inkubiert und durch Abtropfen und Abtupfen getrocknet. Anschließend wurde sie in Klarsichtfolie luftdicht verpackt und in einer Expositionskassette fixiert. In einer Dunkelkammer wurde in die Kassette ein für Chemolumineszenz sensitiver Film (s. 2.1.4) eingelegt, 30 sec bis 5 min belichtet und entwickelt.

3. Ergebnisse

3.1 Kein Immunglobulinklassenwechsel in PCNSL

PCNSL leiten sich von späten Keimzentrums-B-Zellen ab und weisen eine erhöhte SHM-Rate auf. Dies läßt auf eine verlängerte Teilnahme der Tumorzellen oder deren Vorläuferzellen an den Reaktionen im Keimzentrum schließen. Zudem wurde für PCNSL während der klonalen Expansion anhaltende SHM in den V-Gensegmenten gezeigt^{11,122}. Basierend auf diesen Beobachtungen sollte nun die Frage beantwortet werden, ob PCNSL den ebenfalls keimzentrumsgebundenen Reifungsschritt des Immunglobulin-Klassenwechsels (CSR) durchlaufen und welche Rolle dabei AID und der Switch- μ -Region im IGH-Locus in PCNSL zukommt.

3.1.1 PCNSL exprimieren nur IgM und IgD

Eine Gruppe von 11 PCNSL wurde auf IgH-Rearrangements untersucht, um festzustellen, ob eine Umlagerung stattgefunden hatte und welchen Ig-Isotyp die Tumorzellen exprimieren konnten. Die IGHV-Mutationsanalysen wurden von Manuel Montesinos-Rongen durchgeführt. Die Beschreibung von Material und Methoden für diese Analysen ist in Montesinos-Rongen et al. 2005¹²³ aufgeführt. Tab. 3.1 faßt die Ergebnisse zusammen.

Fall	IGHV	MF (%)	CDR3-Primer (5'→3')	Isotyp der Tumorzellen
1	V3-7	8,9	GAATGCGGGGAGTAATAATC	IgM + IgD
2	V3-74	12,2	GAGAATATAACGTCCTAAACC	IgM + IgD
3	V4-23	22,2	AAGACGACGGCAAAGGTGGTG	IgM + IgD
4	V3-7	12,6	CGTGGATCGGGAAGTGACGAC	IgM + IgD
5	V4-34	15,5	CTATACGGTAGTGACTCCGAAG	IgM + IgD
6	V4-34	4,1	CCACTGCCAGCTGGTATGATG	IgM + IgD
7	V4-59	21,0	AGTGCGACCTATGGCCGGCTC	IgM + IgD
8	V4-34	23,2	CATGAACGTCCTCTGAACGGC	IgM + IgD
9	V4-34	6,9	GATTTGCTCCGGGTATAGCAG	IgM + IgD
10	V4-48	8,2	CGGGCGATGGCCGCTACGGCA	IgM + IgD
11	V4-34	18,4	CGAGTAGTCGACGACGACTCC	IgM + IgD

Tab.3.1: Immunglobulin Isotypexpression in PCNSL (modifiziert nach: Am J Pathol. 2005 Jun;166(6):1773-9.)

IGHV: Immunglobulin SchwerekettenLocus V-Gensegment; MF: Mutationsfrequenz des IGHV verglichen mit dem am stärksten homologen Keimbahnsegment. Die Fälle 1 und 3 wurden auch in einer anderen Studie verwendet (Montesinos-Rongen et al. 1999) als Fälle 9 bzw. 3.

Alle untersuchten Tumoren wiesen potentiell funktionelle Umlagerungen für den B-Zell-Rezeptor (BCR) sowie eine präferentielle Umlagerung für bestimmte IGHV-Gensegmente auf. 45% (5 von 11) der Tumoren verwendeten ein Segment der VH3-Familie, der Rest (55%, 6 von 11) verwendete ein Segment der VH4-Familie, wobei 5 von diesen 6 Fällen das

Gensegment VH4-34 trugen und damit eine frühere Studie aus unserer Arbeitsgruppe, die eine präferentielle Verwendung dieses IGHV-Segmentes bei PCNSL beschreibt, bestätigten¹¹. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz dieser Gruppe war 13,9%. Alle Rearrangements ließen das Leseraster intakt, und in keinem Fall wurde ein Stop-Codon generiert. Die Sequenzen der IgH-Rearrangements für die Patienten 1 bis 11 sind in der GenBank annotiert unter den Nummern AF168818 und AY598953 bis AY598962.

Um den Ig-Isotyp der Tumorzellen zu bestimmen, wurden für jeden Tumor individuelle klonspezifische Primer erstellt, die in der CDR3 binden, und zusammen mit Primern, die spezifisch für die verschiedenen konstanten Regionen sind, für RT-PCR verwendet. Alle Tumoren dieser Serie exprimierten IgM und IgD (s. Tab. 3.1). IgG-, IgA- und IgE-Transkripte hingegen konnten in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden. Dieser Befund wurde immunhistochemisch bestätigt und erweitert, denn in allen Fällen konnte IgM an den Oberflächen der Tumorzellen nachgewiesen werden wohingegen IgG in keinem der Fälle detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, daß PCNSL den Immunglobulin-Klassenwechsel nicht vollziehen.

3.1.2 Herabregulierte AID-Expression

Um die Rolle von AID für das Ausbleiben der CSR bewerten zu können, wurde in 10 der 11 Fälle die AID-mRNA quantifiziert und bei drei Fällen die AID-Proteinexpression immunhistochemisch untersucht.

Die quantitative PCR detektierte in drei Fällen AID-mRNA-Werte, die vergleichbar mit der AID-Expression in normalen, nicht-malignen, tonsillären Centroblasten waren und in sechs Fällen eine deutliche Herabregulation von AID, verglichen mit Centroblasten (s. Abb. 3.1). Nur in einem Fall (Nr. 5), welcher eine ungewöhnliche Lokalisation des Tumors im Kleinhirn aufwies, wurde AID stärker als in Centroblasten exprimiert.

Die qPCR-Befunde wurden auf Proteinebene bestätigt: immunhistochemisch konnte in den Fällen 10 und 11 kein Protein nachgewiesen werden, wohingegen ein signifikanter Anteil der Zellen aus Fall 5 AID exprimierte.

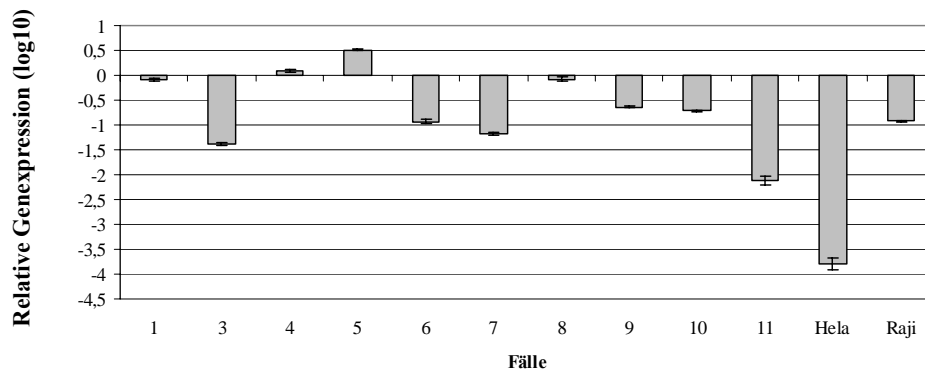


Abb.3.1: Relative Expression von AID in PCNSL

Die Expressionswerte sind auf die interne Kontrolle TBP normalisiert und in Relation zu den AID-Expressionswerten in normalen Centroblasten dargestellt, welche willkürlich gleich 0 gesetzt wurden. Raji ist eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie, HeLa-Zellen dienen als Negativkontrolle.

3.1.3 Die Switch- μ -Region trägt interne Deletionen

Um festzustellen, ob der ausbleibende Ig-Klassenwechsel bei PCNSL durch deletierte Switch- μ -Regionen (S_{μ}) bedingt sein kann (s. Abschnitt 1.2.2), wurden die S_{μ} -Regionen der PCNSL-Serie mittels „long-distance“-PCR amplifiziert und analysiert. Die S_{μ} -Mutationsanalysen wurden von Roland Schmitz¹ durchgeführt. Die Beschreibung von Material und Methoden für diese Analysen ist bei Montesinos-Rongen et al. 2005 angegeben. In allen Fällen konnte das Keimbahnprodukt (4,5 kb) nachgewiesen werden, in 6 von 11 Fällen wurde jedoch auch ein trunkiertes, in einem Fall zwei trunkierte Produkte detektiert (s. Abb. 3.2 A).

Alle trunkierten Produkte konnten in unabhängigen PCRs reproduziert werden, wohingegen DNA aus Jurkat-Zellen (T-Zelllinie mit einem IGH-Locus in Keimbahnkonfiguration) in mehrfach replizierten PCRs in keinem Fall ein trunkiertes Produkt erzeugte, so daß die Möglichkeit, daß es sich bei den kürzeren Produkten um dem stark repetitiven Charakter der S_{μ} -Region geschuldete Amplifikationsartefakte handelt, ausgeschlossen ist. In zwei Fällen stand eine ausreichende Menge Amplifikates für eine Sequenzierung zur Verfügung, wodurch nachgewiesen wurde, daß tatsächlich intern deletierte S_{μ} -Regionen amplifiziert worden waren (s. Abb. 3.2 B). Die Sequenzen sind in der GenBank einsehbar unter den IDs AY337410 und AY337411.

¹ Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen (Direktor: Prof. Dr. R. Küppers)

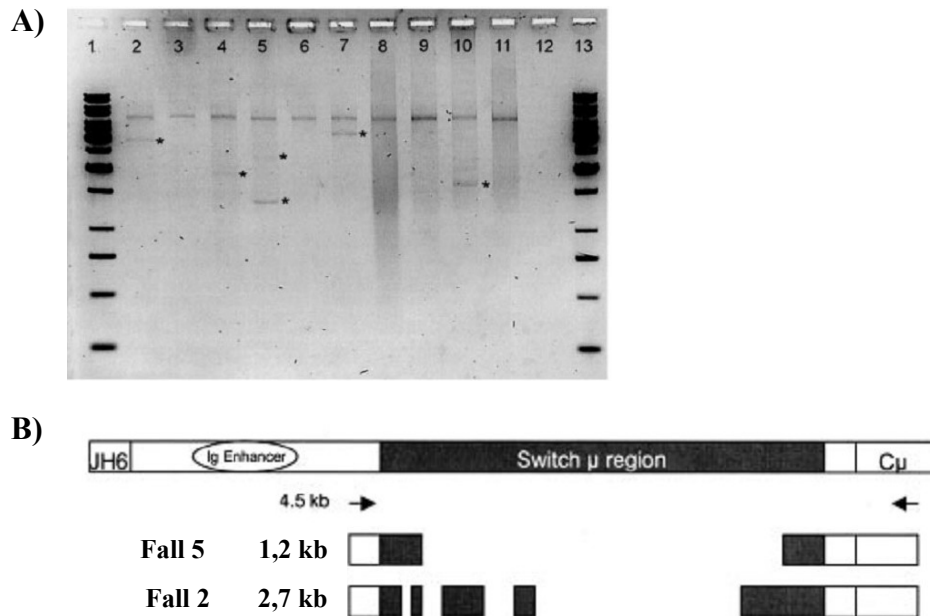


Abb.3.2: Interne Deletionen in der Switch- μ -Region von PCNSL (nach: *Am J Pathol.* 2005 Jun;166(6):1773-9.)

A: PCR Amplifikation der Switch- μ -Deletionen in 9 PCNSL (Spuren 2-10), Jurkat-Zell-DNA als Positivkontrolle (Spur 11), Wasser als Negativkontrolle (Spur 12) und 1kb-DNA-Massenstandards (Spuren 1 und 13). Zusätzlich zum Vollängenprodukt (4,5 kb) auftretende Banden sind mit * markiert.

B: Schematische Darstellung der Switch- μ -Region, 5' flankiert vom IGHJ6-Gensegment und dem IgH-Enhancer und 3' flankiert von IGHC-M. Die Pfeile zeigen die Lage der Primer an, die für die Amplifikation verwendet wurden. Die verkürzten Produkte, die bei den PCNSL Fällen 2 und 5 auftraten, wurden sequenziert. Sie wiesen Deletionen von 3,3 kb (Fall 5, Spur 5 in A) mit einem Bruchpunkt und 1,8 kb (Fall 2, nicht aufgeführt in A) mit mehreren Bruchpunkten in der Switch- μ -Region.

PCNSL weisen demnach in einer hohen Zahl von Fällen interne S_{μ} -Deletionen auf. Es stand jedoch nicht genug Tumormaterial zur Verfügung, um zu klären, ob die monoallelische Deletion in den sechs Fällen das exprimierte Allel betraf und ob das Keimbahnprodukt von tumorumgebenden Gewebezellen oder dem zweiten Allel des PCNSL-Klons stammte.

3.2 Molekulare Analyse des PRDM1-Locus' und der PRDM1-Expression in PCNSL

Da das PRDM1-Gen und sein Protein Blimp-1 für die terminale Differenzierung von B-Zellen unabdingbar sind und da PRDM1 durch seine antiproliferative Wirkung als Tumorsuppressoren fungiert, wurde anhand einer Serie von 21 PCNSL geprüft, ob die Inaktivierung von PRDM1 eine Rolle bei der PCNSL-Pathogenese spielt.

3.2.1 Der PRDM1-Locus ist Ziel rekurrenter Mutationen

Um den PRDM1-Locus auf Mutationen zu analysieren, wurden alle PRDM1-Exone amplifiziert und Exon/Intron-Grenzen überspannend sequenziert. Funktionell relevante Mutationen wurden bei 4 Fällen (19%) gefunden. Diese sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Fall	Exon (bp)*	Genetische Alterationen			PRDM1-mRNA		Protein-expression
		Nukleotid-austausch	Aminosäure-austausch	Funktionelle Konsequenzen	α	$\alpha + \beta$	
1	Exon 1 (299)	G→A	-	Ubekannt	+++	+++	-
	Exon 2 (452)	dupG	-	Frameshift			
2	Exon 2 – Intron 2 Splice site (525)	G→A	-	Frameshift, 100bp Insertion	+	++	-
3	Exon 4 – intron 4 Splice site (898)	G→C	-	Frameshift, 68bp Deletion	+++	+	-
4	Exon 5 (1164)	dupC	-	Frameshift	+++	+++	-

Tab.3.2: Charakteristik und funktionelle Konsequenzen von PRDM1-Mutationen, PRDM1-mRNA- und Proteinexpression in PCNSL

*Die Basenpaar-Angabe (bp) verweist auf die Referenzsequenz NM_001198; dup: Duplikation;

PRDM1-mRNA-Expression: gibt ein Rating der relativen, normalisierten PRDM1-Expression in PCNSL im Vergleich zu CB an;

α : Expression der alpha-Splicevariante; $\alpha+\beta$: Expression von alpha & beta-Splicevariante: (-): < CB; (0): kein Unterschied zu CB; (+): >CB<10fach CB; (++) : >10fach CB<100fach CB; (+++): >100fach CB

Proteinexpression: gibt ein Rating der Proteinexpression von Blimp-1 an: n.a.: kein Material verfügbar; (-): keine Proteinexpression; (+) : <10% der immunreaktiven Zellen; (++) : 10-50 % der immunreaktiven Zellen; (+++) : > 50% der immunreaktiven Zellen; festgestellt durch Immunhistochemie.

Abbildung 3.3 (s. folgende Seite) zeigt eine schematische Darstellung des PRDM1-Locus', der gesplitten mRNA der α -Variante und des Proteins mit der Lage der inaktivierenden Mutationen.

In Exon 1 (Fall 1) wurde eine G/A-Transition an Position 299 in der 5'-UTR gefunden, deren funktionelle Bedeutung unbekannt ist. Es wurden darüber hinaus in den Fällen 2 und 3 jeweils eine Splicesite-Mutation gefunden (Abb. 3.4 B, C). Bei Fall 2 trat eine G/A-Transition des letzten Nukleotids von Exon 2 (Position 525) auf, die das normale Splicing außer Kraft setzt und durch die Verwendung einer downstream gelegenen alternativen Splicesite zu einer 100bp-Insertion führt, was eine Verschiebung des Leserasters herbeiführte (Abb. 3.5A).

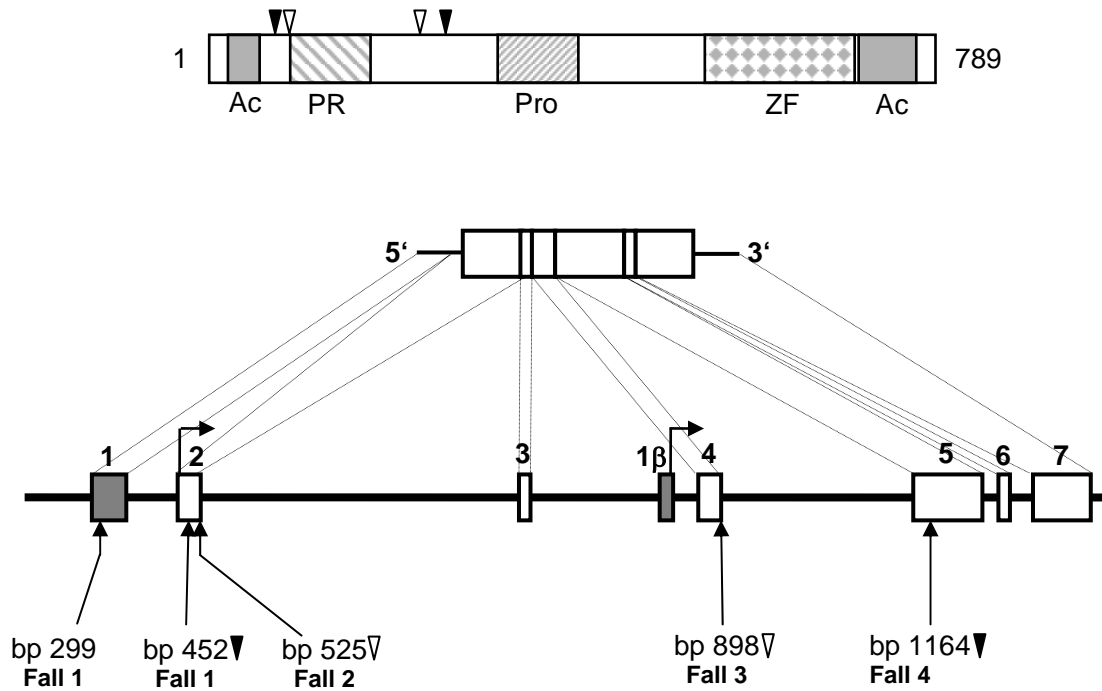


Abb. 3.3: Schematische Darstellung von PRDM1-Lokus und PRDM1-mRNA und des Blimp1-Proteins

Oben: Proteinsequenz der α -Isoform; N-Terminus links (AS1), C-Terminus rechts (AS789); Ac: saure Domäne; PR: „positive regulatory“-Domäne; Pro: prolinreiche Domäne; ZF: Region mit 6 Zinkfingern; schwarze Pfeilspitze: relative Lage einer Frameshift-Mutation; weiße Pfeilspitze: relative Lage einer Splicesite-Mutation.

Mitte: gesplittede mRNA der α -Isoform; entspricht der Referenzsequenz NM_001198.

Unten: PRDM1-Locus; Exone sind als Kästen dargestellt, schattierte Kästen sind untranslatierte Exone; abgewinkelte Pfeile zeigen Transkriptionsstartstellen an; die Lage der Mutationen aus Tab. 3.2 sind mit Pfeilen markiert, die Basenpaar-Angabe (bp) verweist auf die Referenzsequenz NM_001198; schwarze Pfeilspitze: Frameshift-Mutation; weiße Pfeilspitze: Splicesite-Mutation.

Bei Fall 3 bestand die Mutation in einer G/C-Transversion an der Exon 4/Intron 4-Grenze, welche das normale Splicing zwischen den Exonen 4 und 5 störte, so daß eine upstream gelegene Splicesite zur Verwendung kam, was eine Deletion von 68 bp und eine Verschiebung des Leserasters bewirkte, welche letztlich in einem vorgezogenen Stopcodon resultierte (Abb. 3.4 C und 3.5 B).

Bei den Fällen 1 und 4 wurde eine Nukleotidduplikation gefunden. Bei Fall 1 war Exon 2 an Position 452 betroffen, wo eine C/G-Transversion, gefolgt von einer Duplikation eines G, eine Verschiebung des Leserasters erzeugte und ein vorgezogenes Stopcodon generierte (Abb. 3.4 A). Bei Fall 4 war Exon 5 an Position 1164 betroffen, wo eine Duplikation eines C eine Verschiebung des Leserasters bewirkte und ein vorgezogenes Stopcodon erzeugte (Abb. 3.4 D).

Alle inaktivierenden Mutationen lagen homozygot vor, wie durch das Fehlen von Doppelpeaks in den Elektropherogrammen (Abb. 3.4) belegt wird.

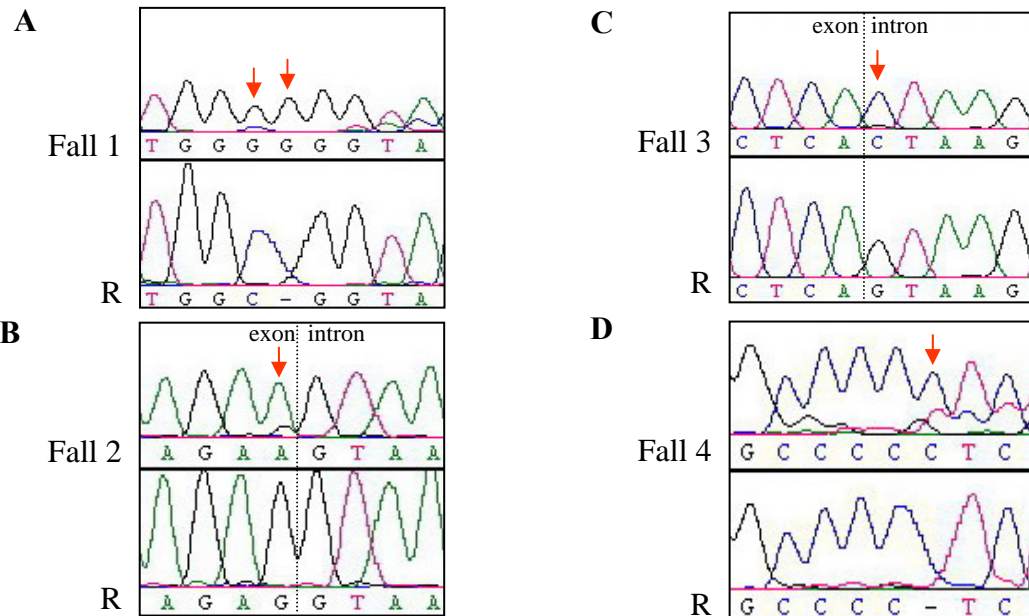


Abb. 3.4: Elektropherogramme von PRDM1-inaktivierenden Mutationen in PCNSL

R: Referenzsequenz; Pfeile zeigen die Position der mutierten Base an; in Fall 2 und 3 (B,C) ist die Exon-Intron-Grenze durch eine gestrichelte Linie dargestellt; (A) C/G-Transversion gefolgt von Frameshift durch Insertion von G; (B) Splicesite-Mutation durch G/A-Transition; (C) Splicesite-Mutation durch G/C-Transversion; (D) Frameshift durch Insertion von C.

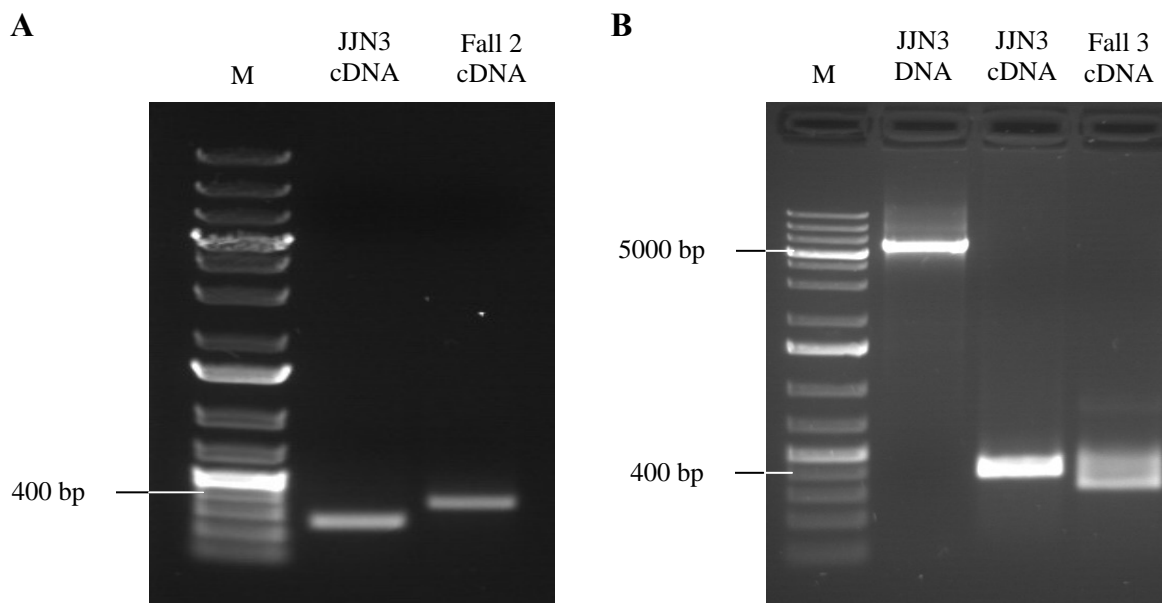


Abb. 3.5: Demonstration einer 100bp-Insertion und einer 68bp-Deletion in PRDM1-cDNA in zwei PCNSL-Fällen

(A) Das Primerpaar Blimp-SpliceE2/I2F und -R wurde verwendet um die Exon2/Intron2-Splicesite zu amplifizieren. JJN3-cDNA diente als Kontrolle und lieferte die erwartete 263 bp-Bande. Die cDNA von Fall 2 zeigt eine Insertion von 100 bp.

(B) Das Primerpaar Blimp-SpliceE4/I4-F und -R wurde verwendet, um die Exon4/Intron4-Splicesite zu amplifizieren. Genomische DNA und JJN3-cDNA diente als Kontrolle. Beide Kontrollen lieferten die erwarteten Banden von 5,6 kb (genomisch) und 395 bp (cDNA). Die cDNA von Fall 3 weist eine Deletion von 68bp auf.

Zusätzlich zu den pathogenen Mutationen wurden noch eine Reihe von Polymorphismen detektiert, darunter ein bislang nicht beschriebener Polymorphismus an Position 1295 in den

Fällen 5 und 7 (s. Tab. 3.3). Diese G/A-Transition wurde als Polymorphismus in 2 von 43 Kontrollen gefunden und somit bestätigt¹.

3.2.2 Expression von PRDM1-mRNA und Protein

Es wurde mittels quantitativer PCR und immunhistochemischer Analyse geprüft, ob die Mutationen des PRDM1-Gens einen Einfluß auf die Regulation der mRNA-Transkription der beiden PRDM1-Splicevarianten und/oder die Proteinexpression hatten.

In allen 21 wurden mRNA-Transkripte von zumindest einer PRDM1-Isoform detektiert, und in 20 von 21 allen Fällen war die PRDM1- α -Expression im Vergleich zu GC-B-Zellen heraufreguliert (s. Abb. 3.6). Es konnte keine Korrelation der Transkriptionsstärke mit dem Vorliegen von Mutationen des PRDM1-Locus' festgestellt werden. Der stark negative Wert für die β -Variante in Fall 3 ist durch eine gestörte Bindung der Fluoreszenzsonde zu erklären, da die Mutation an Position 898 genau in der Bindesequenz der Sonde liegt.

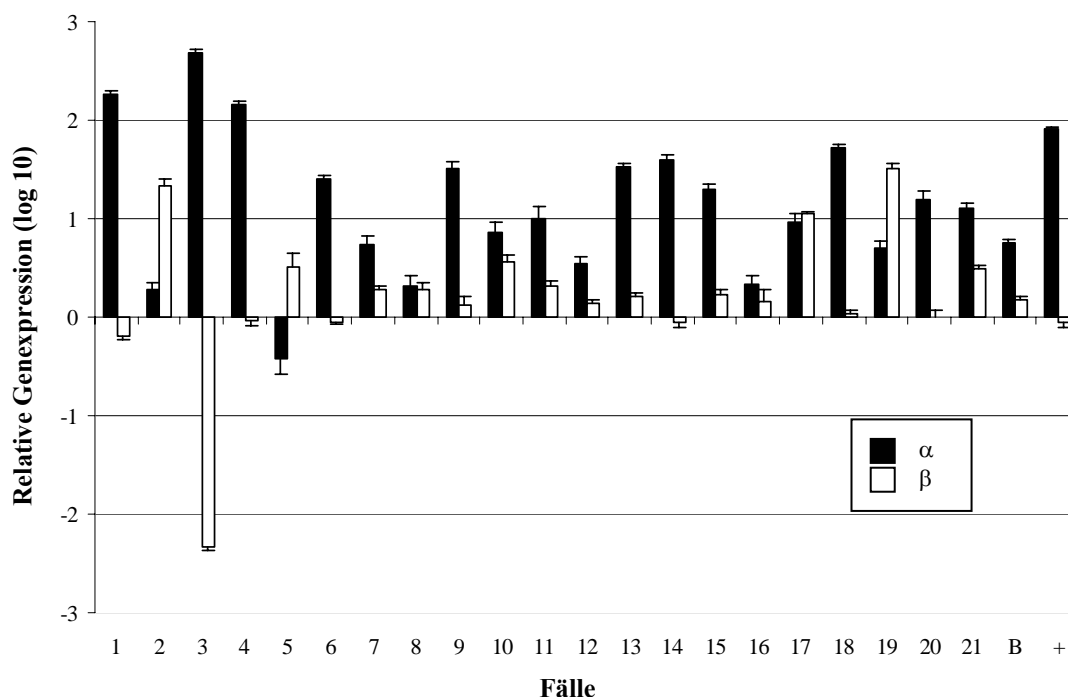


Abb. 3.6: Expression der PRDM1-Splicevarianten α und β in PCNSL (Vergleich zu Centroblasten)

B: CD19⁺/CD27⁺-B-Zellen; + : Positivkontrolle (J2N3-Zellen).

Die Expressionswerte sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle TBP normalisiert und in Relation zu den Expressionswerten der PRDM1-Splicevarianten in Centroblasten dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden. Die Werte für die Expression der beta-Splicevariante (weiße Balken) sind durch Subtraktion ($\alpha & \beta - \alpha$) berechnete Werte (s. Abschnitt 2.2.13); die Messungen wurden im Triplikat durchgeführt.

¹ Die Analyse an 43 DNA-Proben aus dem peripheren Blut von Probanden ohne pathologischen Befund wurde am Institut für Humangenetik der Universität Kiel (Direktor: Prof.Dr. R.Siebert) durchgeführt

Tabelle 3.3:

Fall	Genetische Alterationen					PRDM1-mRNA		Protein-expression
	Exon (bp)*	Nukleotid-austausch ¹	Aminosäure-austausch	Funktionelle Konsequenzen	SNP-ID ²	α	$\alpha + \beta$	
	Exon 7 (2376)	G→A	-	-	rs1010273	+++	+++	-
5	Exon 4 (843) Exon 5 (1295)	C→C/G G→G/A	Asp→Glu Ser→Asn	- -	rs811925 neu ³	-	0	n.a.
6	Exon 7 (2376)	G→G/A	-	-	rs1010273	++	++	++
7	Exon 4 (843) Exon 5 (1295)	C→C/G G→G/A	Asp→Glu Ser→Asn	- -	rs811925 neu ³	+	++	+
8	-	-	-	-	-	+	+	n.a.
9	Exon 4 (843)	C→C/G	Asp→Glu	-	rs811925	++	++	+
10	Exon 4 (843)	C→C/G	Asp→Glu	-	rs811925	+	++	++
11	-	-	-	-	-	+	++	-
12	-	-	-	-	-	+	+	+
13	Exon 4 (843)	C→C/G	Asp→Glu	-	rs811925	++	++	++
14	-	-	-	-	-	++	++	++
15	Exon 2 (454)	G→G/A	Gly→Ser	-	rs2185379	++	++	++
16	Exon 7 (2376)	G→A	-	-	rs1010273	+	+	n.a.
17	Exon 4 (843)	C→C/G	Asp→Glu	-	rs811925	+	+++	-
18	-	-	-	-	-	++	++	++
19	-	-	-	-	-	+	+++	-

Fortsetzung von Tabelle 3.3:

20	Exon 1 (225)	C→C/G	-	-	rs17486714	++	+	+
	Exon 4 (843)	C→C/G	Asp→Glu	-	rs811925			
21	-	-	-	-	-	++	++	+

Tab.3.3: Polymorphismen des PRDM1-Lokus¹, PRDM1-mRNA- und Proteinexpression in PCNSL

*Die Basenpaar-Angabe (bp) verweist auf die Referenzsequenz NM_001198; dup: Duplikation;

¹zwei Nukleotide nach dem Pfeil zeigen einen Doppelpeak im Elektropherogramm dar und weisen auf Heterozygotie hin²bezeichnet die offizielle ID für eingetragene Single-Nucleotide-Polymorphisms (SNP)³hierbei handelt es sich um einen neu entdeckten, noch nicht eingetragenen Polymorphismus, der in 2 von 43 Kontrollen gefunden und bestätigt wurde**PRDM1-mRNA-Expression:** gibt ein Rating der relativen, normalisierten PRDM1-Expression in PCNSL im Vergleich zu CB an; α: Expression der alpha-Splicevariante;

α+β: Expression von alpha & beta-Splicevariante: (-) : < CB; (0) : kein Unterschied zu CB ; (+) : >CB<10fach CB; (++) : >10fach CB<100fach CB; (+++) : >100fach CB

Proteinexpression: gibt ein Rating der Proteinexpression von Blimp-1 an: n.a.: kein Material verfügbar; (-) : keine Proteinexpression; (+) : <10% der immunreaktiven Zellen; (++) : 10-50 % der immunreaktiven Zellen; (+++) : > 50% der immunreaktiven Zellen

Die in Abbildung 3.6 gezeigten Werte sind relative Werte. Sie können den Eindruck einer starken absoluten Hochregulation von PRDM1-Transkripten in PCNSL erzeugen. Die Werte verstehen sich jedoch ausschließlich im Vergleich zu Centroblasten, in welchen PRDM1 nur schwach exprimiert wird. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb 3.7) zeigt sich, daß in den meisten Fällen trotz verstärkter PRDM1- α -Expression im Vergleich zu Centroblasten dennoch nur geringe absolute PRDM1- α -Werte vorherrschen. Die in fast allen Fällen beobachtete stärkere Expression von PRDM1- β ist auf die sehr schwache PRDM1- β -Expression in JIN3-Zellen zurückzuführen und ist wiederum kein Indiz für hohe absolute PRDM1- β -Werte in PCNSL.

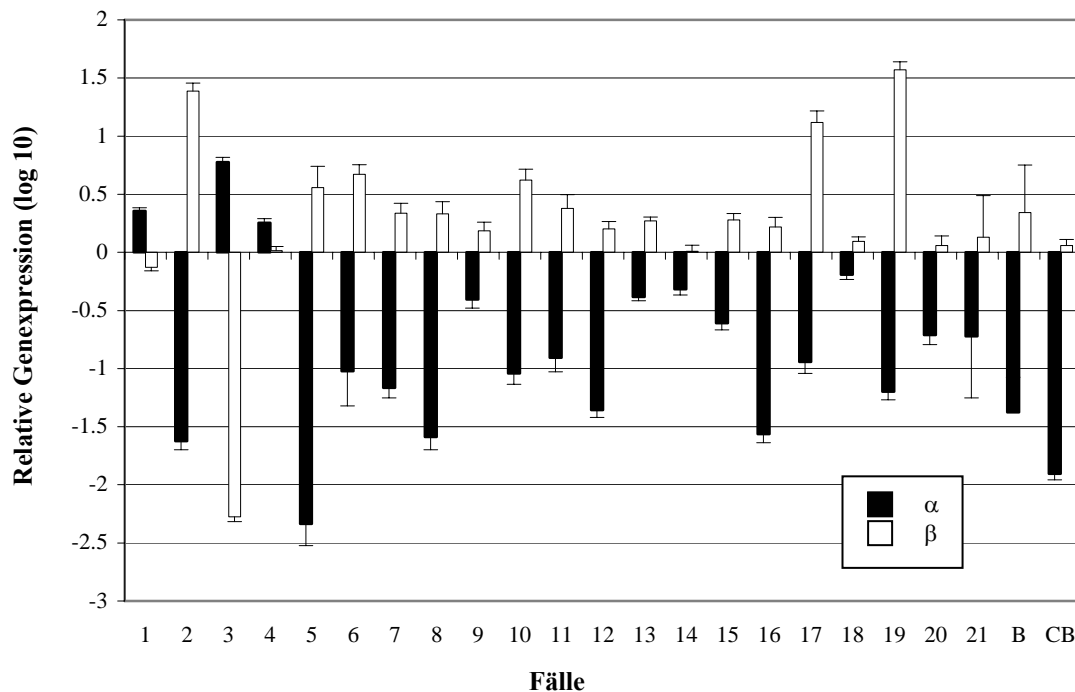


Abb. 3.7: Expression der PRDM1-Splicevarianten α und β in PCNSL (Vergleich zu Positivkontrolle, JIN3)

B: CD19⁺/CD27⁺-B-Zellen; CB: Centroblasten

Die Expressionswerte sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle TBP normalisiert und in Relation zu den Expressionswerten der PRDM1-Splicevarianten in Centroblasten dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden. Die Werte für die Expression der beta-Splicevariante (weiße Balken) sind durch Subtraktion ($\alpha & \beta - \alpha$) berechnete Werte (s. Abschnitt 2.2.13); die Messungen wurden im Triplikат durchgeführt.

Die immunhistochemische Analyse der PRDM1-Proteinexpression konnte bei 18 Fällen, für die genügend Material vorhanden war, durchgeführt werden. Das Protein wurde in 13 von 18 Fällen exprimiert (s. Tab. 3.2 und 3.3 und Abb. 3.8 A). In keinem der Fälle 1-4, die eine inaktivierende Mutation trugen, wurde das Protein gebildet (s. Abb. 3.8 B). Die Lokalisierung des Proteins beschränkte sich stets auf den Zellkern der Tumorzellen. Generell war die

Proteinexpression bei der Mehrzahl der Fälle eher schwach ausgeprägt, in 10 Fällen exprimierten weniger als 50% der Tumorzellen das Protein.

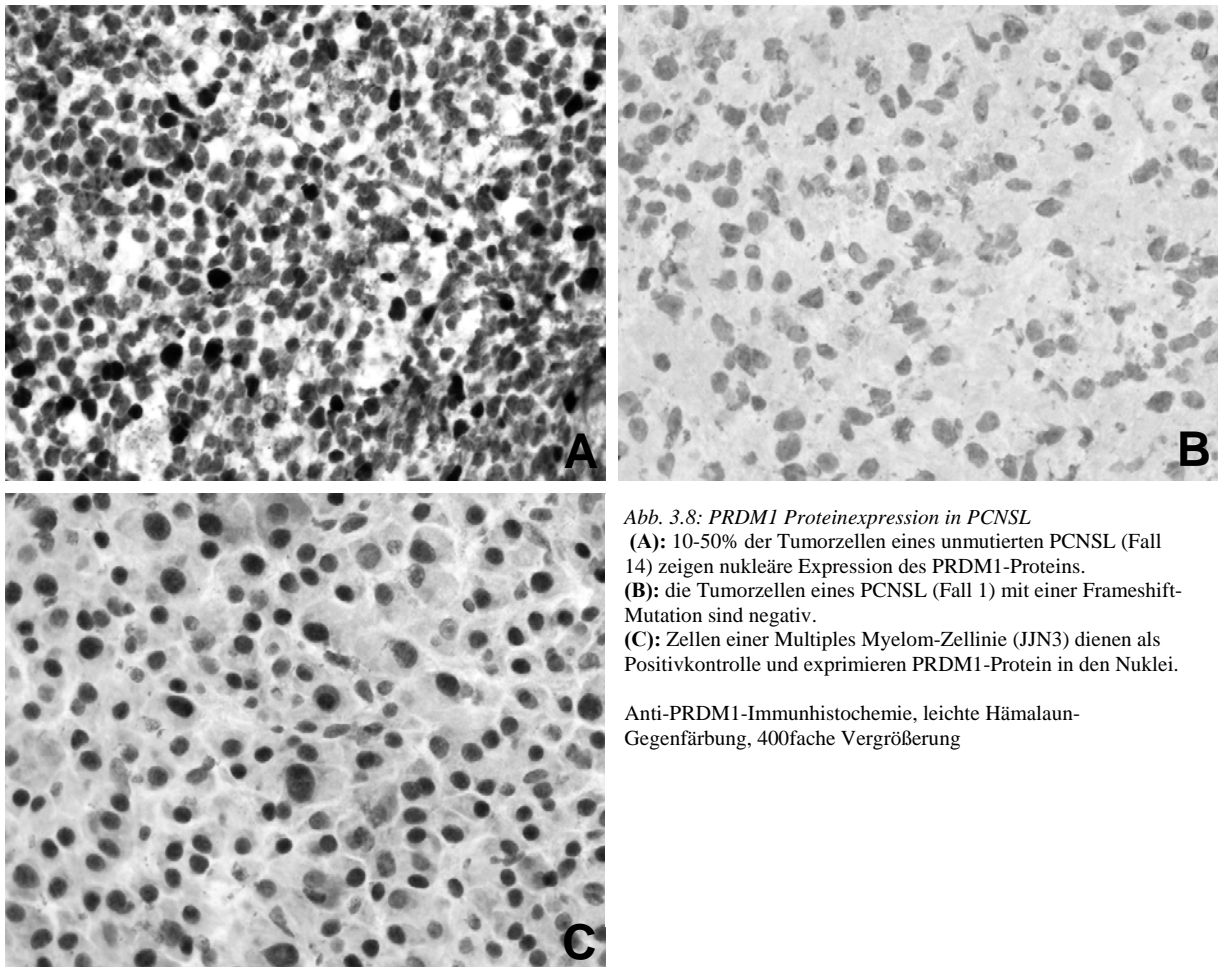


Abb. 3.8: *PRDM1* Proteinexpression in PCNSL
(A): 10-50% der Tumorzellen eines unmutierten PCNSL (Fall 14) zeigen nukleäre Expression des *PRDM1*-Proteins.
(B): die Tumorzellen eines PCNSL (Fall 1) mit einer Frameshift-Mutation sind negativ.
(C): Zellen einer Multiples Myelom-Zelllinie (JIN3) dienen als Positivkontrolle und exprimieren *PRDM1*-Protein in den Nuklei.

Anti-*PRDM1*-Immunhistochemie, leichte Hämalaun-Gegenfärbung, 400fache Vergrößerung

3.3 Genexpressionsprofil des NF κ B-Signalweges in PCNSL

Um zu untersuchen, ob eine Dysregulation des NF κ B-Signalweges vorliegt, wurde eine Serie von 32 Fällen von PCNSL, von denen für einen Fall (Nr. 27) nur eine Probe mit einem Tumorgehalt von weniger als 80% vorlag, ein Genexpressionsprofil der Hauptkomponenten des NF κ B-Signalweges, sowie sieben vorgeschalteter, an der Induktion beteiligter Elemente und neun NF κ B-Zielgenen mittels quantitativer PCR erstellt (alle Daten wurden im Quadruplikat erhoben). Die qPCR hat gegenüber dem Microarray den Vorteil, über eine wesentlich höhere dynamische Reichweite sowie eine höhere Sensitivität zu verfügen. Tabelle 3.2 enthält eine Übersicht über die analysierten Gene. Die Auswahl dieser Kandidatengene erfolgte unter Berücksichtigung der Genexpressionsdaten für PCNSL, welche durch eine Array-Analyse erhoben worden waren¹⁰.

Kürzel	Offizieller Genname	Funktion/Mechanismus
<i>NFκB-Induktoren/Modulatoren</i>		
BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10	pro-apoptotisch; Interaktion mit MALT1 und CARDs
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9	Apoptoseregulation; BCL10-Interaktion
CARD10	caspase recruitment domain family, member 10	Komponente eines "molecular scaffold" (für BCL10-Signaling)
CARD11	caspase recruitment domain family, member 11	Komponente eines "molecular scaffold"; BCL10-Interaktion
CARD14	caspase recruitment domain family, member 14	Komponente eines "molecular scaffold"; BCL10-Interaktion
MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	BCL10-Interaktion
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	Interaktion mit TRAF2; TNF α -vermitteltes Signaling
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	Interaktion mit TRAF1; TNF α -vermitteltes Signaling
<i>NFκB-Komponenten</i>		
REL A	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	NFκB-Familie; Transkriptionsfaktor
REL B	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	NFκB-Familie; Transkriptionsfaktor
REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog	NFκB-Familie; Transkriptionsfaktor
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFκB-Familie; Transkriptionsfaktor
NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	NFκB-Familie; Transkriptionsfaktor
<i>NFκB-Zielgene</i>		
BAX	BCL2-associated X Protein	pro-apoptotisch
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	anti-apoptotisch
BCL XL	BCL2-like 1	anti-apoptotisch
CCND2	cyclin D2	proliferationsfördernd (G1/S-Übergang)
cFLIP	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	anti-apoptotisch
IAP1	baculoviral IAP repeat-containing 2	anti-apoptotisch
IAP2	baculoviral IAP repeat-containing 3	anti-apoptotisch
IRF4	interferon regulatory factor 4	Immunmodulation, Apoptoseregulation

Tab. 3.4: Gene des NFκB-Genexpressionsprofils in PCNSL

Die Gene sind in drei Klassen aufgeteilt: Bestandteile des NFκB-Zentrums, NFκB-Induktoren bzw. -Modulatoren und NFκB-Zielgene. Die Genexpressions-Assay-ID-Nummern für alle Gene sind in Abschnitt 2.1.9 aufgelistet.

Abb. 3.9 gibt einen Überblick über das NF κ B-Transkriptionsprofil in PCNSL.

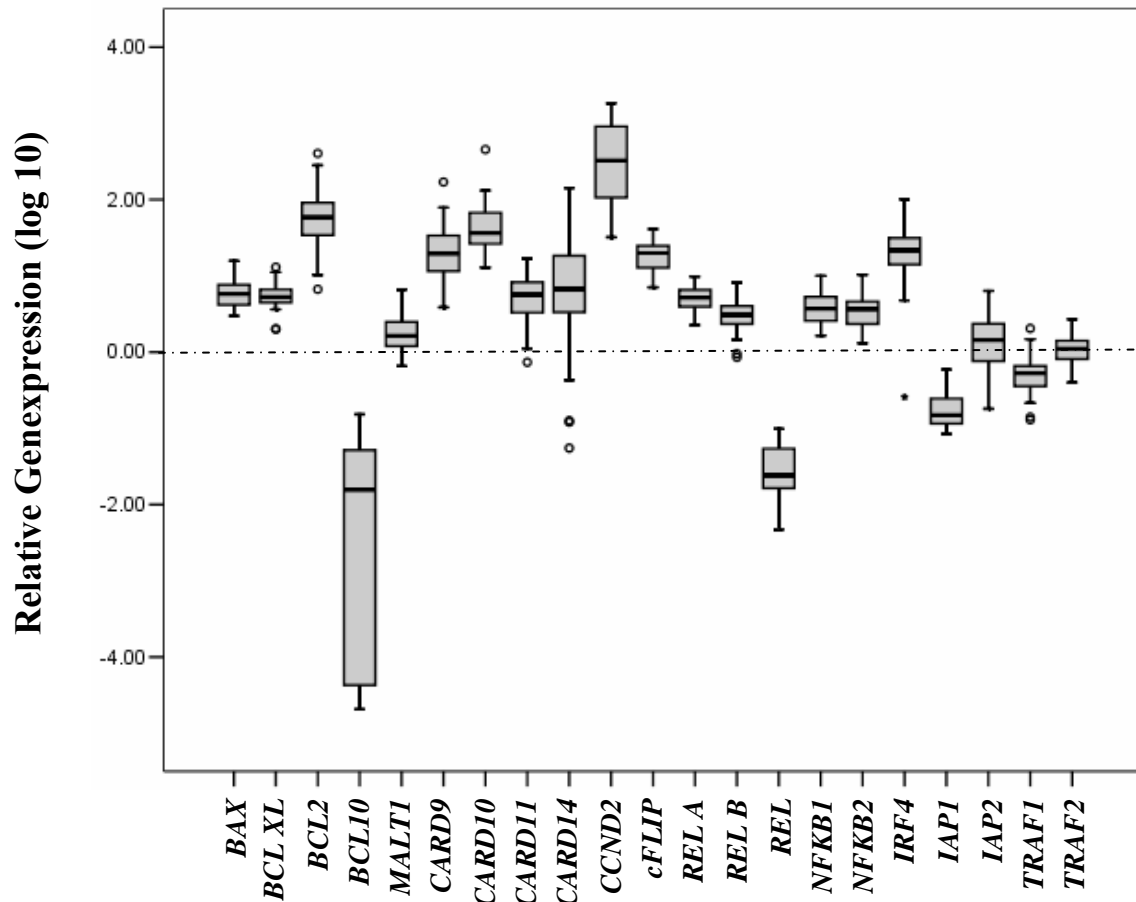


Abb. 3.9: Genexpressionsdaten-Übersicht als Box-Plot-Diagramm (nach: *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Mar;66(3):230-7.)

Die Expressionswerte sind log₁₀-transformiert, auf die interne Kontrolle TBP normalisiert und in Relation zu den Expressionswerten des jeweiligen Gens in Centroblasten dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden;

Die waagerechten Linien innerhalb der Boxen stellen den Mittelwert dar, der obere und untere Teil der Box bilden das dritte bzw. erste Quartil ab, die Fehlerbalken zeigen die Minimal- und Maximalwerte an, wobei Ausreißer als Punkte dargestellt und nicht mit eingerechnet wurden; die Messungen wurden im Quadruplikat durchgeführt.

Die Expression der Mehrzahl der analysierten Gene in PCNSL unterscheidet sich signifikant von derjenigen in Centroblasten. Die Expression von BCL10, REL, IAP1 und TRAF1 ist niedriger, die Expression von BAX, BCL-XL, BCL2, MALT1, CARD9, CARD10, CARD11, CARD14, CCND2, cFLIP, REL A, REL B, NF κ B1, NF κ B2 und IRF4 ist höher als in Centroblasten. IAP2 und TRAF2 wiesen keine signifikant von CB verschiedenen Expressionswerte auf.

Vier von fünf NF κ B-Genen werden in PCNSL signifikant stärker als in Centroblasten exprimiert. Die REL-Expression ist hingegen stark herabreguliert. Dies läßt auf eine selektive Aktivierung des NF κ -Signalweges schließen, bei der REL als Transkriptionsfaktor eine untergeordnete Rolle spielen könnte.

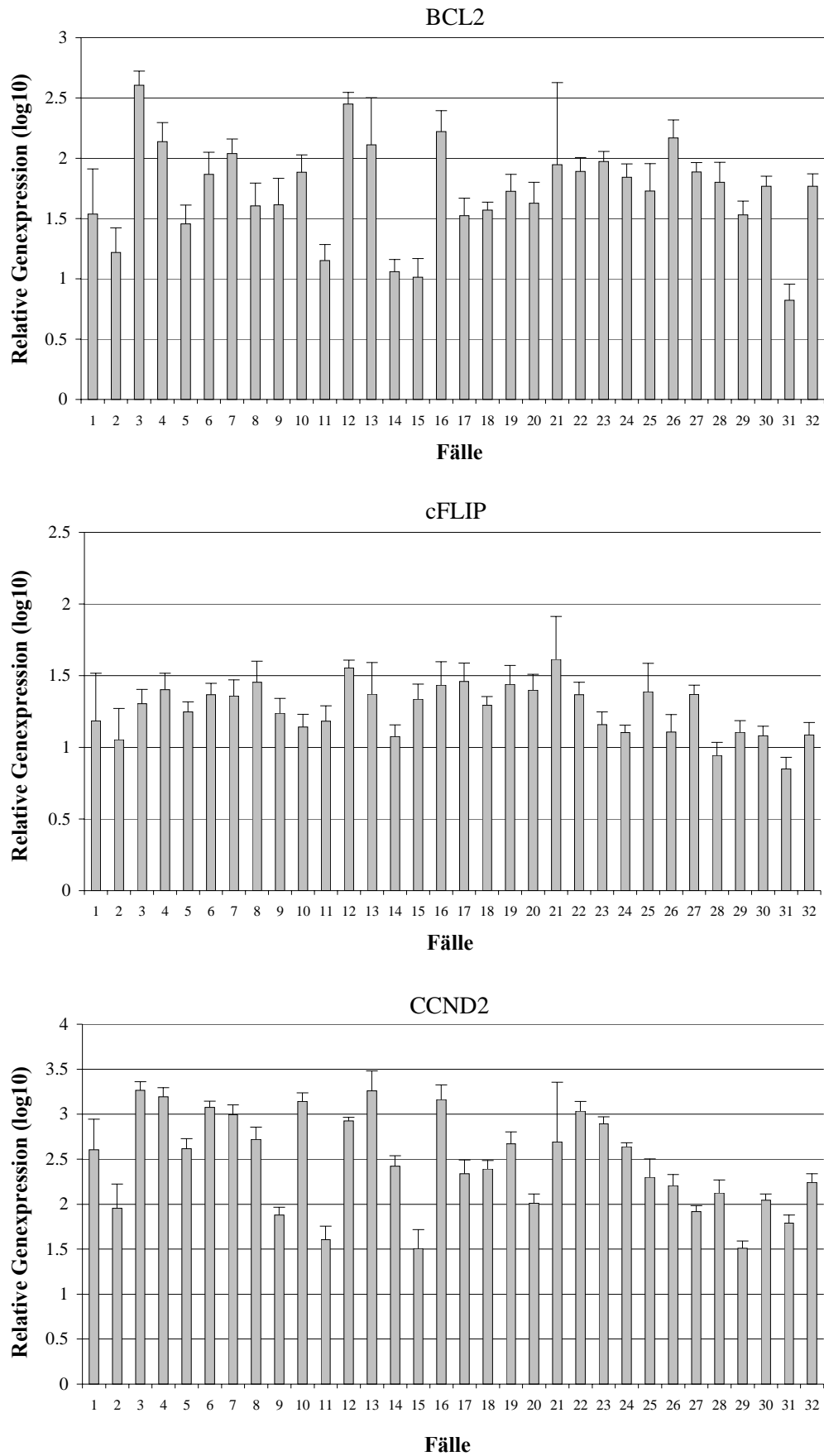


Abb. 3.10: Relatives Expressionsniveau von BCL2, CCND2 und cFLIP in PCNSL

Die Expressionswerte sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle TBP normalisiert und in Relation zu den Expressionswerten des jeweiligen Gens in Centroblasten dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden.

Insbesondere verstärkt ist die Expression der antiapoptotischen NF κ B-Zielgene BCL2 (im Mittel über 54-fach) und cFLIP (im Mittel über 18-fach) sowie des proliferationsinduzierenden NF κ B-Zielgens CCND2 (im Mittel über 296-fach) homogen bei allen PCNSL der Serie (s. Abb. 3.10, vorherige Seite).

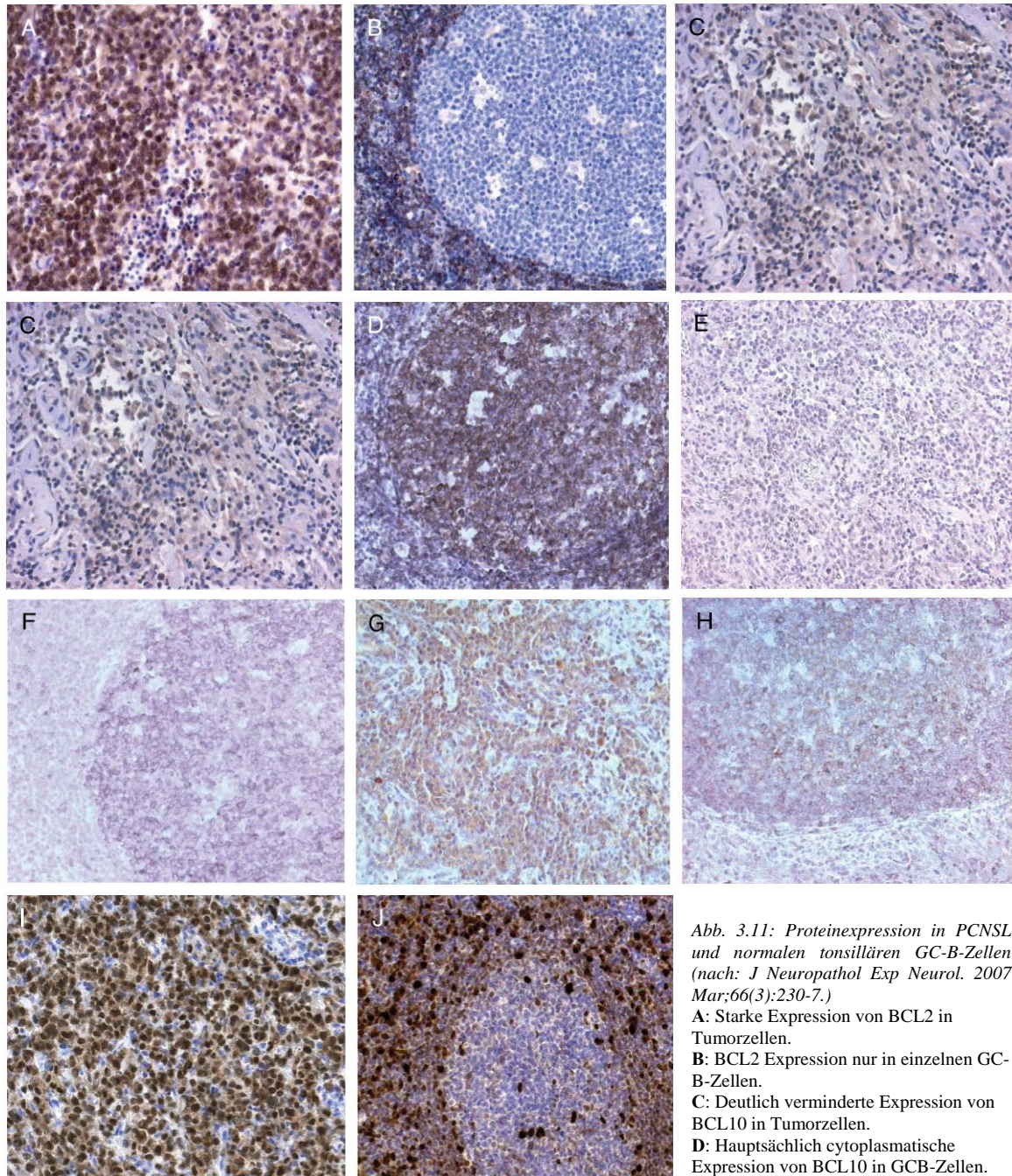


Abb. 3.11: Proteinexpression in PCNSL und normalen tonsillären GC-B-Zellen (nach: *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Mar;66(3):230-7.)

A: Starke Expression von BCL2 in Tumorzellen.
B: BCL2 Expression nur in einzelnen GC-B-Zellen.
C: Deutlich verminderte Expression von BCL10 in Tumorzellen.
D: Hauptsächlich cytoplasmatische Expression von BCL10 in GCB-Zellen.
E: Einzelne Tumorzellen zeigen schwache, nukleäre Expression von REL.

F: REL-Expression ist kräftig und universell, vornehmlich im Cytoplasma und zum Teil nukleär ausgeprägt bei tonsillären B-Zellen.
G: Mehr als 90% der Tumorzellen exprimieren RELA nukleär. **H:** GC-B-Zellen zeigen nur schwache, cytoplasmatische RELA-Expression. **I:** Mehr als 90% der Tumorzellen weisen distinkte, nukleäre IRF4-Expression auf. **J:** Nur einzelne GC-B-Zellen sind IRF4-positiv. Die Immunhistochemie wurde mit den entsprechenden Antikörpern (s. Abschnitt 2.1.7) durchgeführt. Die Schnitte wurden leicht mit Hämalaun gegengefärbt. Originalvergrößerung: 200-fach.

In Fällen, von denen ausreichend Gewebe für immunhistochemische Analysen zur Verfügung stand, wurde die Korrelation von mRNA- und Proteinexpression für die Gene BCL10, REL, RELA, BCL2 und IRF4 untersucht. Die Proteinexpression wurde mit GC-B-Zellen menschlicher Tonsillen verglichen (s. Abb. 3.11, vorherige Seite)

Für alle fünf Gene wurde eine gute Korrelation festgestellt: Im Vergleich zu GC-B-Zellen wiesen BCL10 (Abb. 3.11 C, D) und REL (Abb. 3.11 E, F) eine verringerte Proteinexpression auf, wohingegen die Expression bei BCL2 (Abb. 3.11 A, B), RELA (G, H) und IRF4 (Abb. 3.11 I, J) deutlich erhöht ist.

3.3.1 Hierarchisches Clustering und Analyse des Überlebens

BCL10 wies ein hochgradig differentielles Genexpressionsmuster innerhalb der Fälle dieser Serie von PCNSL auf (s. Abb. 3.12).

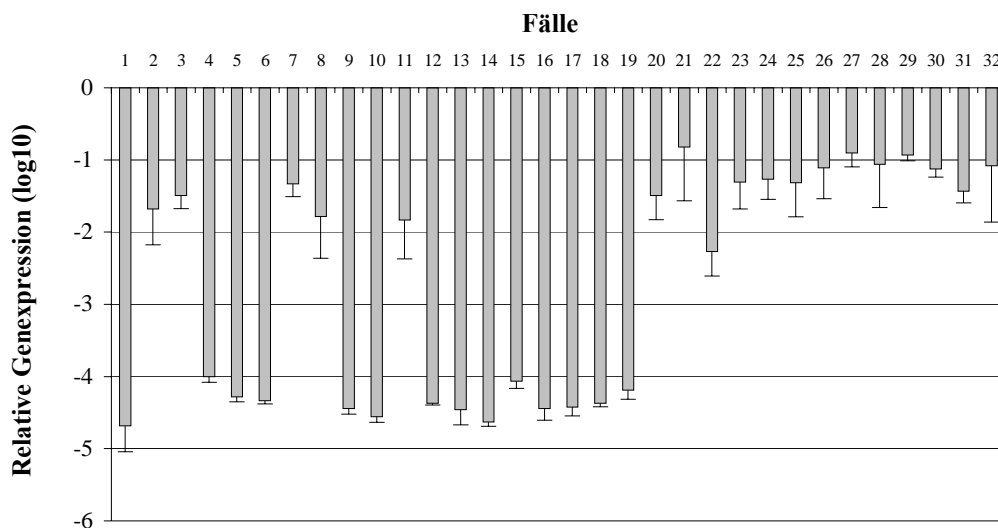


Abb. 3.12: Differentielle Expression von BCL10 in PCNSL

Die Expressionswerte sind log₁₀-transformiert, auf die interne Kontrolle TBP normalisiert und in Relation zum Expressionswert von BCL10 in Centroblasten dargestellt, der jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurde.

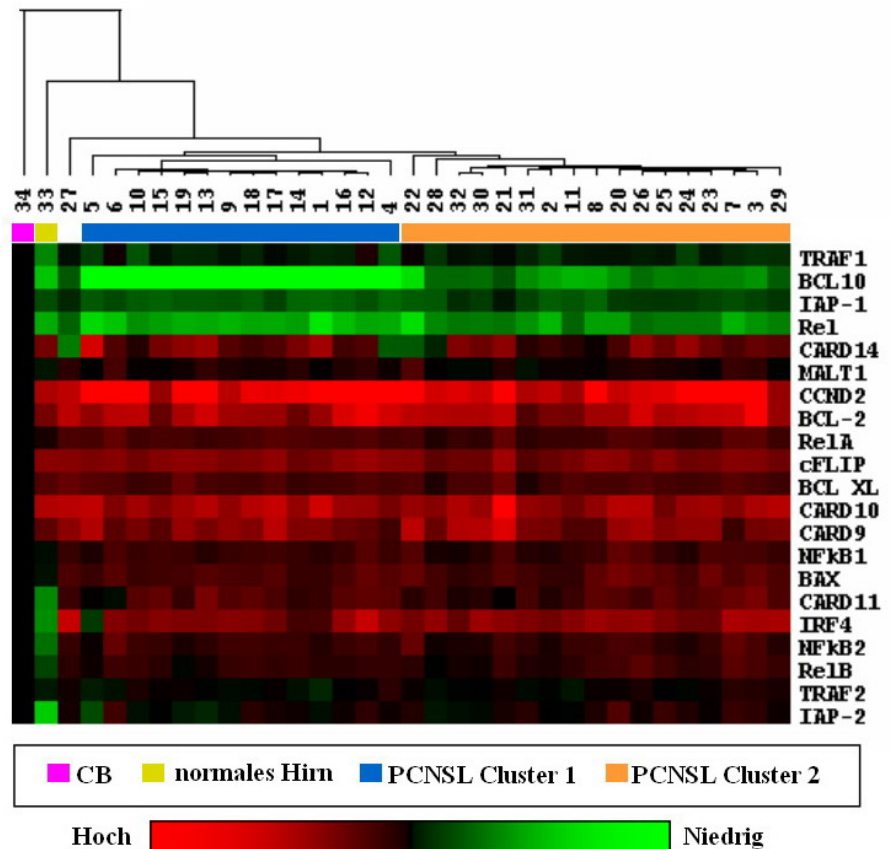
Die 32 PCNSL wurden daher auf der Basis der relativen, normalisierten Expressionswerte der 21 Gene einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen. Diese Analyse differenzierte zwei distinkte Subgruppen von PCNSL, die vornehmlich durch ihre differentiellen BCL10-Expressionswerte gekennzeichnet waren ($p = 7,5 \cdot 10^{-9}$) (s. Abb. 3.13, folgende Seite). Der Fall (Nr. 27), dessen Probe weniger als 80% Tumorgehalt aufwies, und eine Kontrolle von normalem Hirngewebe clusterten getrennt von den anderen Lymphomen. Diese Beobachtung zeigt, daß das erstellte Genexpressionsmuster tatsächlich das Transkriptionsprofil

neoplastischer Lymphozyten von PCNSL repräsentiert und nicht das von normalem ZNS-Gewebe.

Die Clusteranalyse zeigte auch, daß neben BCL10 auch die Expression von REL ($p = 9,9 \cdot 10^{-5}$) und IAP1 ($p = 1,2 \cdot 10^{-3}$) in beiden PCNSL-Subgruppen signifikant verschieden war.

Abb.3.13: Cluster-Analyse (unsupervised) der Expression von 21 Genen des NF κ B Signalwegs in PCNSL (mod. nach: *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Mar;66(3):230-7)

Die einzelnen PCNSL Fälle und normale Gewebeproben sind in den Spalten aufgeführt. Die Gensymbole (rechts) kennzeichnen die Zeilen.



Der PCNSL Cluster 1 (enthält 14 Fälle) zeichnet sich durch besonders deutliche Herabregulation der BCL10-Expression im Vergleich zu Cluster 2 (enthält 17 Fälle) aus. Für eine Analyse der Überlebenszeit der Patienten standen nur für 21 Fälle klinische Daten zur Verfügung. Basierend auf diesen Daten ergab die Analyse für die beiden Cluster einen ähnlichen klinischen Verlauf ($p = 0,85$) s. Abb. 3.14).

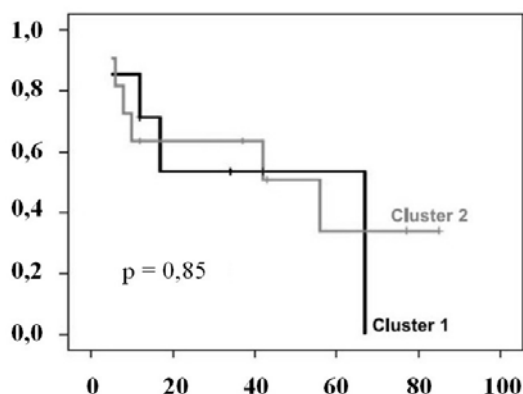


Abb. 3.14: Analyse des Überlebens für PCNSL-Cluster
Kaplan-Meier Graphen des Gesamtüberlebens von Patienten mit PCNSL, die Cluster 1 (schwarz) und Cluster 2 (grau) zugeordnet sind.

3.4 FOXP1-Regulation in PCNSL

Für diese Arbeit sollte die Expression der ungekürzten FOXP1-Isoform sowie der mit B-Zell-Aktivierung assoziierten Isoformen 3 und 9 in PCNSL analysiert werden. Dazu wurden unter Berücksichtigung der Exonvarianten Primerpaare gewählt, die die jeweiligen Isoformen spezifisch amplifizieren (s. Abb. 3.15).

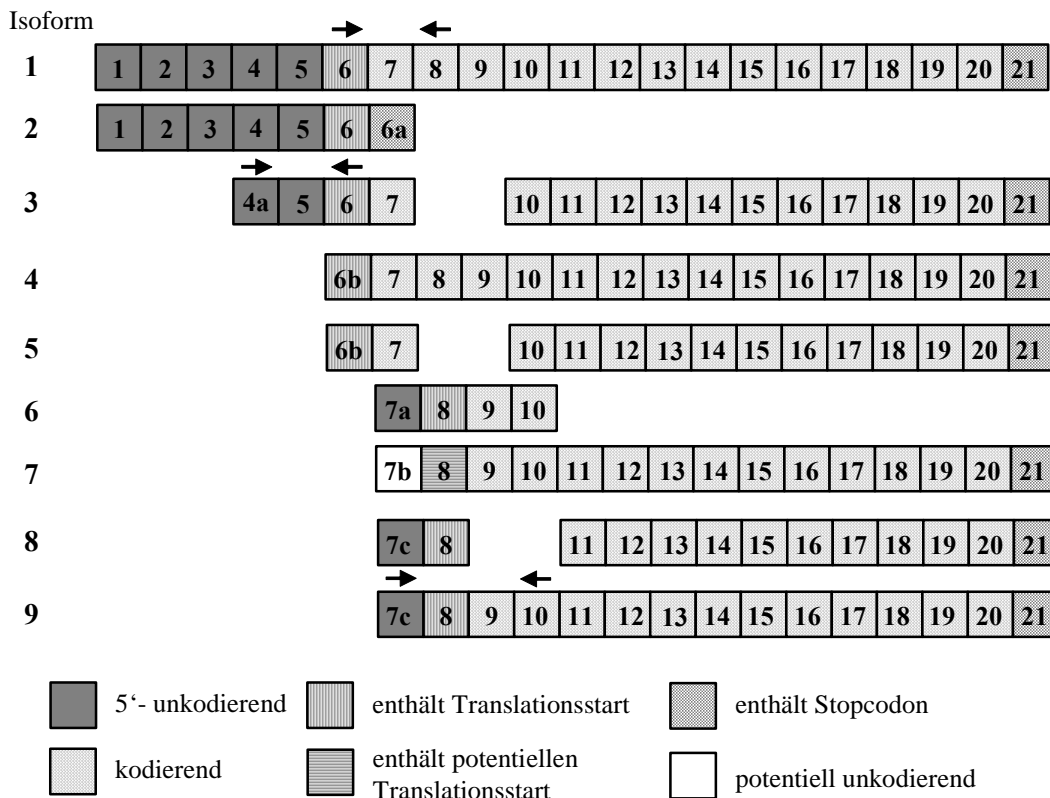


Abb. 3.15: Schematische Darstellung der Exonstruktur der alternativen FOXP1-Isoformen mit spezifischen Primerpaaren (mod. nach Blood. 2008 Mar 1;111(5):2816-24.)

Die Pfeilspitzen zeigen jeweils Lage und Orientierung verwendeter Primer an: Primerpaar FOXP1_E6Falt./FOXP1_E8R amplifiziert Isoform 1; Primerpaar FOXP1_E4aF/FOXP1_E6R amplifiziert Isoform 3; Primerpaar FOXP1_E7cF/FOXP1_E10R amplifiziert Isoform 9.

Zunächst wurde die Expression dieser beiden Isoformen im Vergleich zur normalen, ungekürzten Isoform 1 in einer humanen GCB-DLBCL-Zelllinie (Karpas422) und einer ABC-DLBCL-Zelllinie (OCI-Ly3) quantitativ bestimmt und verglichen. Abb. 3.16 (folgende Seite) zeigt, daß, im Vergleich zu Karpas422, in OCI-Ly3-Zellen die Expression der Isoform 1 schwächer ausgeprägt ist, wohingegen die Isoformen 3 und 9 deutlich stärker exprimiert werden.

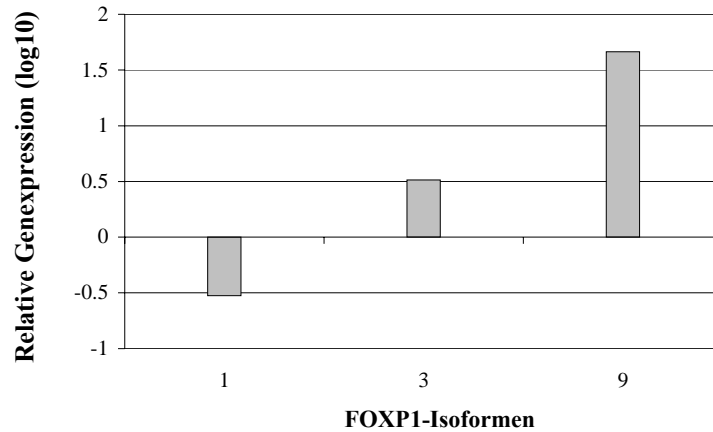


Abb. 3.16: *Differentielle Transkription von FOXP1-Isoformen in GCB- und ABC-Zellen*
Die Expressionswerte der FOXP1-Isoformen in OCI-Ly3-Zellen (ABC) sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle beta-Aktin normalisiert und in Relation zum Expressionswert Karpas422-Zellen (GCB) dargestellt, der jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurde.

Eine Untersuchung auf Proteinebene bestätigt diesen molekularbiologischen Befund der mRNA-Ebene (Abb. 3.17): OCI-Ly3-Zellen weisen nur eine sehr schwache Expression der Isoform 1 (75 kDa) und eine deutlich stärkere Expression der trunkierten Formen auf. Karpas422-Zellen hingegen exprimieren ausschließlich die ungekürzte Isoform 1.

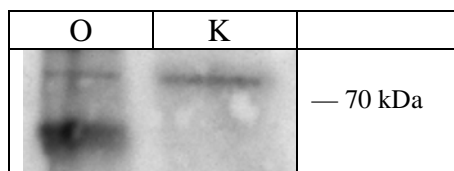


Abb. 3.17: *Differentielle Proteinexpression von FOXP1-Isoformen in GCB- und ABC-Zellen*

O: OCI-Ly3-Zelllinie; **K:** Karpas422-Zelllinie

Western Blot der ABC-DLBCL-Zelllinie OCI-Ly3 und der GCB-DLBCL-Zelllinie Karpas422 mit dem monoklonalen Antikörper JC12 zeigt Vorherrschen kleinerer FOXP1-Isoformen bei OCI-Ly3-Zellen.

Um den Status von FOXP1 in PCNSL zu untersuchen, wurde an einer Gruppe von 19 PCNSL mittels qPCR ein quantitatives Expressionsprofil der drei genannten FOXP1-Isoformen erstellt. Abbildung 3.18 zeigt die relative Expression der Isoformen 1 und 3.

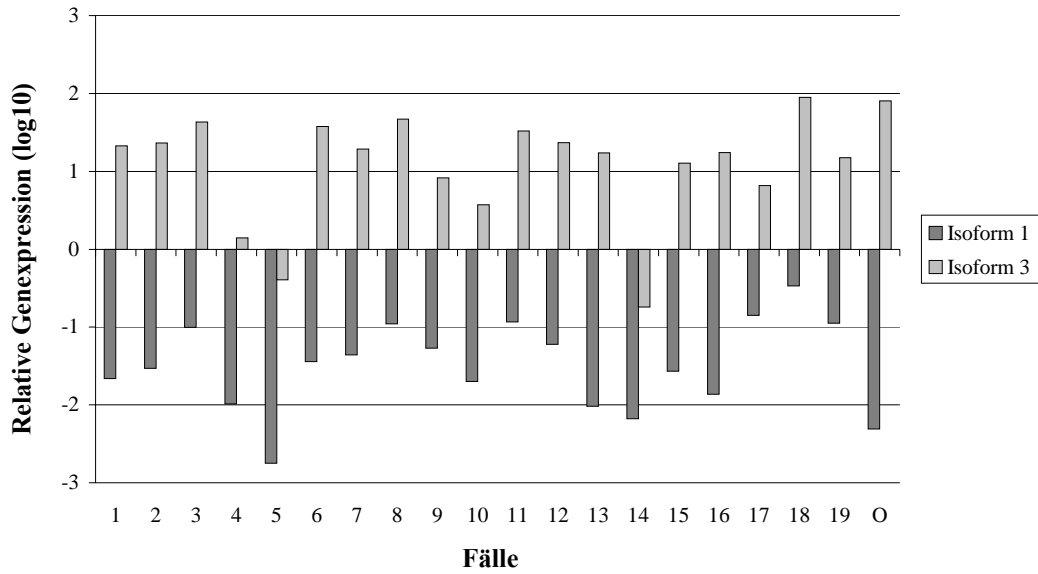
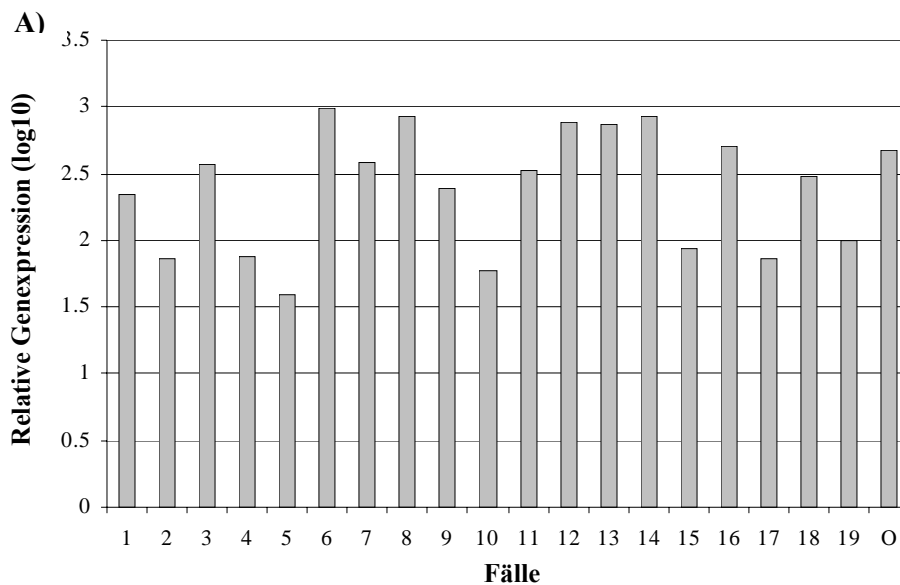


Abb. 3.18: Relative Expression der FOXP1-Isoformen 1 und 3

O: OCI-Ly3-Zelllinie;

Die Expressionswerte sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle β -Aktin normalisiert und in Relation zu den Expressionswerten des jeweiligen Gens in Karpas422-Zellen dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden.

Die Expression von FOXP1-Isoform 9 (s. Abb. 3.15) lag in Karpas422-Zellen unterhalb der Detektionsschwelle. Aus diesem Grund wurde zur Darstellung der Expression von Isoform 9 nicht gegen Karpas422 sondern gegen OCI-Ly3 bzw. normale tonsilläre Centroblasten kalibriert (s. Abb. 3.19 A, B).



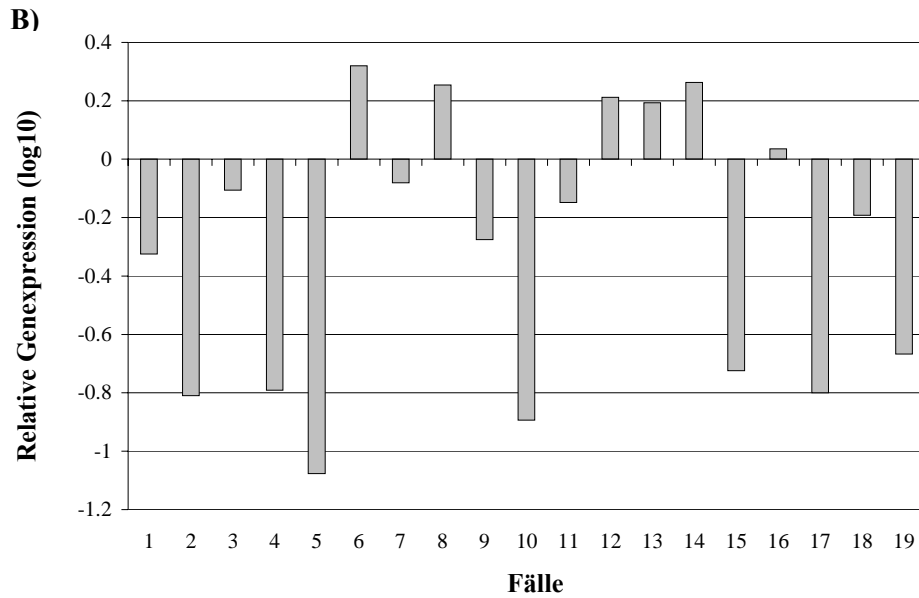


Abb. 3.19: Relative Expression der FOXP1-Isoform 9

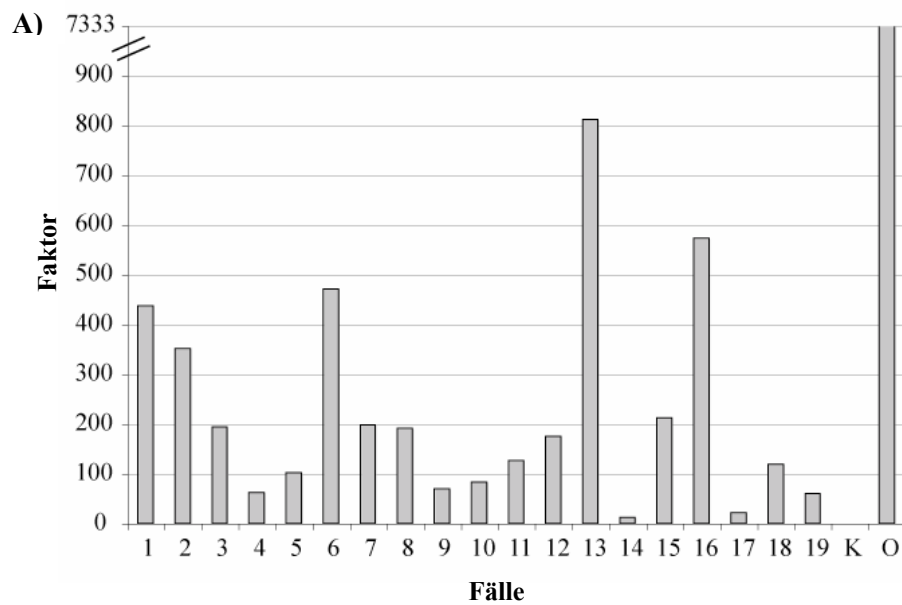
O: OCI-Ly3-Zelllinie

Die Expressionswerte sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle beta-Aktin normalisiert.

A) Werte in Relation zu den Expressionswerten in normalen Centroblasten dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden.

B) Werte in Relation zu den Expressionswerten in OCI-L3-Zellen dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden.

Um die präferentielle Expression der trunkierten Isoformen in PCNSL darzustellen, wurden die normalisierten und gegen Centroblasten kalibrierten Expressionswerte der trunkierten Isoformen 3 und 9 ins Verhältnis gesetzt zur ungekürzten Isoform 1 (s. Abb. 3.20 A, B).



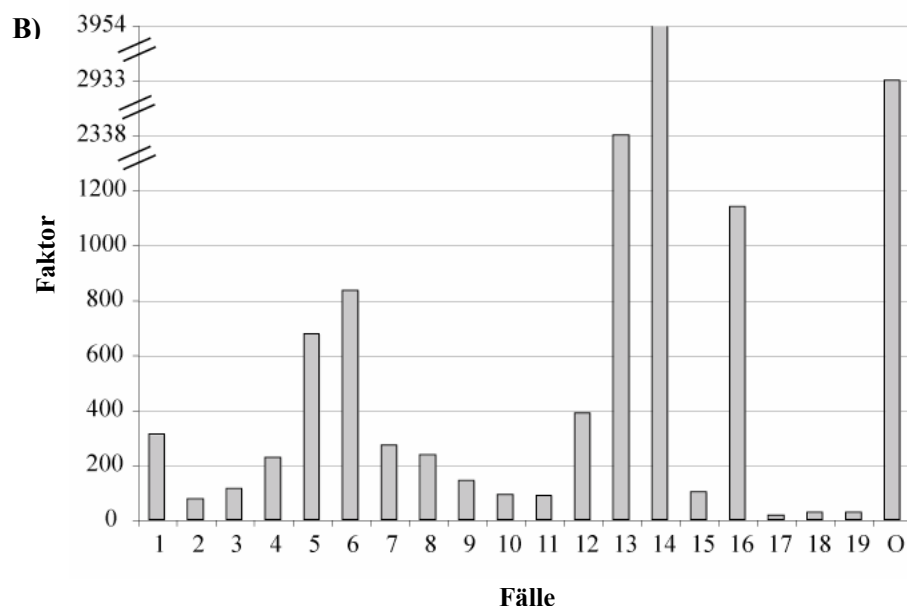


Abb. 3.20: Verhältnis der normalisierten und gegen Centroblasten kalibrierten Expression der FOXP1-Isoformen

K: Karpas422-Zelllinie; O: OCI-Ly3-Zelllinie

A) Verhältnis der Isoform 3 zu Isoform 1;

B) Verhältnis der Isoform 9 zu Isoform 1; Karpas422 ist nicht eingeschlossen, da die Expression der Isoform unterhalb der Detektionsschwelle lag.

Alle PCNSL dieser Serie zeigen, verglichen mit Centroblasten, eine präferentielle Expression der trunkierten FOXP1-Isoformen und eine im Vergleich zur GCB-Zelllinie Karpas422 niedrigere Expression der ungekürzten Isoform 1. 17 von 19 PCNSL (89%) exprimieren die Isoform 3 stärker als Karpas422-Zellen, bei 14 von 19 PCNSL (73%) liegt eine mehr als 10-fache Überexpression vor. Für die Isoform 9 war ein direkter Vergleich mit Karpas422-Zellen nicht möglich, im Vergleich zu Centroblasten liegen jedoch die Expressionswerte für die Isoform 9 in allen PCNSL dieser Serie zwischen 30 bis zu knapp 1000-fach höher. In 6 von 19 (32%) PCNSL ist die Expression von Isoform 9 auch stärker als in OCI-Ly3-Zellen, in einem Fall ist sie mehr als 10-fach schwächer als in OCI-Ly3-Zellen.

3.5 Micro-RNA-Expression in PCNSL

In einem Pilotexperiment sollte durch ein Array-basiertes Screening des Expressionsstatus' aller aktuell bekannten miRNAs* an sieben PCNSL geprüft werden, ob PCNSL eine Aktivierung von miRNAs aufweisen, die potentiell Einfluß auf die Pathogenese dieser Lymphome ausüben können. Durch Vergleich der normalisierten Werte mit einem normalisierten Kontrollwert (s. Abschnitt 2.2.15) konnte eine Reihe aktivierter miRNAs detektiert werden (s. Tab. 3.6).

* Stand: August 2007; miRBase Sequence Database (Version 8.0)

miRNA-ID ¹	aktiviert in % Fälle ²	Sequenz / Accession-No.	qPCR validiert?
ambi_miR_10133	70 (5 von 7)	CUCGGGGAGGAGCUGAACACGG	nein
ambi_miR_10594	100 (7 von 7)	AGUGUGGGGGGCCCAAGGCUGC	nein
ambi_miR_13143	100 (7 von 7)	GUGGUUGUAGUCCGUGCGAGAAUA	nein
ambi_miR_13232	100 (7 von 7)	GGCGGCGGCGGCGACUCUG	nein
ambi_miR_693	70 (5 von 7)	CACCAGCCUGAUCAUCAAAAGCA	nein
ambi_miR_7425	57 (4 von 7)	UGGAGAAGACUGGAGAGGGUUAU	nein
ambi_miR_8488	100 (7 von 7)	AACUGGGGCGGGAAGGGGGAAG	nein
ambi_miR_9451	70 (5 von 7)	UGCAGCUGGUGGAGUCUGGGGG	nein
hsa_let_7b	57 (4 von 7)	MIMAT0000063	ja
hsa_miR_155	57 (4 von 7)	MIMAT0000646	ja
hsa_miR_16	70 (5 von 7)	MIMAT0000069	ja
hsa_miR_187	57 (4 von 7)	MIMAT0000262	ja
hsa_miR_191	57 (4 von 7)	MIMAT0000440	ja
hsa_miR_194	57 (4 von 7)	MIMAT0000460	ja
hsa_miR_198	57 (4 von 7)	MIMAT0000228	nein
hsa_miR_202	57 (4 von 7)	MIMAT0002811	nein
hsa_miR_21	70 (5 von 7)	MIMAT0000076	ja
hsa_miR_26a	70 (5 von 7)	MIMAT0000082	ja
hsa_miR_29a	57 (4 von 7)	MIMAT0000086	nein
hsa_miR_30d	70 (5 von 7)	MIMAT0000245	ja
hsa_miR_320	100 (7 von 7)	MIMAT0000510	ja
hsa_miR_342	57 (4 von 7)	MIMAT0000753	ja
hsa_miR_494	100 (7 von 7)	MIMAT0002816	nein
hsa_miR_589 ³	70 (5 von 7)	MI0003599	nein

Tab. 3.5: Aktivierte miRNAs in PCNSL

¹ ambi_miRs sind von der Fa. Ambion bioinformatisch vorhergesagte miRNAs, deren Sequenzen zum Zeitpunkt der Verwendung der Arrays noch nicht validiert und in der miRBase eingetragen waren. Für diese miRNAs wird die Nukleotidsequenz angegeben. Für eingetragene miRNAs ist die Sanger-Accession-No. angegeben.

² Die Arrays wurden für 7 Fälle von PCNSL durchgeführt; 70% entspricht 5 Fällen, 57% entspricht 4 Fällen. MiRNAs, die nicht in mindestens 4 Fällen aktiviert waren, wurden nicht berücksichtigt.

³ ursprünglich als ambi-miR_7089 bezeichnet; diese miRNA wurde inzwischen experimentell validiert und unter der Bezeichnung hsa_miR_589 in der miRBase notiert.

Die für die miRNA-Arrays verwendeten Gewebeproben wurden vollständig aufgebraucht. Daher wurde an einer anderen Gruppe von neun PCNSL 11 der aktivierten miRNAs aus Tab. 3.6 mittels qPCR vergleichend quantifiziert. Tabelle 3.7 gibt einen Überblick:

miRNA-ID	durchschnittliche Hoch-Regulation ¹	10-fach hochreguliert in %Fälle ²
hsa_let_7b	43-fach	88 (8 von 9)
hsa_miR_155	15-fach	55 (5 von 9)
hsa_miR_16	4-fach	33 (3 von 9)
hsa_miR_187	7-fach	33 (3 von 9)
hsa_miR_191	1-fach	0 (0 von 9)
hsa_miR_194	8 -fach	22 (2 von 9)
hsa_miR_21	62-fach	77 (7 von 9)
hsa_miR_26a	20-fach	77 (7 von 9)
hsa_miR_30d	8-fach	22 (2 von 9)
hsa_miR_320	7-fach	22 (2 von 9)
hsa_miR_342	1-fach	11 (1 von 9)

Tab. 3.6 Aktivierte miRNAs in PCNSL (qPCR-Validierung)

¹ Regulation: gibt das durchschnittliche Vielfache an, um die die miRNA-Expression in PCNSL die miRNA-Expression in CBs übertrifft;

² %Fälle: Gibt den prozentualen Anteil der Fälle an, in denen die miRNA-Expression diejenige in CB um Faktor 10 oder mehr übertrifft.

Bei 9 von 11 miRNAs wurde in der zweiten Gruppe von PCNSL, die durch die Array-Untersuchung als aktiviert befunden wurden, eine im Vergleich zu CBs im Durchschnitt heraufregulierte Expression festgestellt (s. Abb. 3.21), darunter auch die mit DLBCL assoziierte miRNA 155 und die mit Glioblastom, Mamma-Karzinom und anderen Tumoren assoziierte miRNA 21.

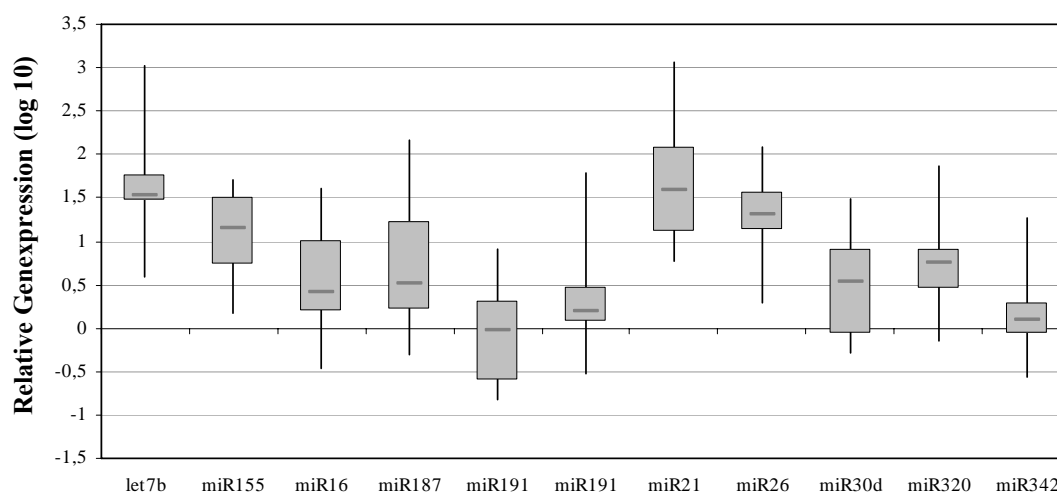


Abb. 3.21 Boxplotdiagramm der Expressionswerte aktivierter miRNAs in PCNSL

Die Expressionswerte sind log10-transformiert, auf die interne Kontrolle let-7a normalisiert und in Relation zu den Expressionswerten der jeweiligen miRNA in Centroblasten dargestellt, die jeweils willkürlich gleich 0 gesetzt wurden. Die waagrechten Linien innerhalb der Boxen stellen den Median dar, der obere bzw. untere Teil der Box bildet das dritte bzw. erste Quartil ab, die Fehlerbalken zeigen die Minimal- und Maximalwerte an.

4. Diskussion

Diese Arbeit befaßt sich mit der Analyse mehrerer molekularer Mechanismen, die mit der Lymphomagenese in Zusammenhang stehen und untersucht ihre Rolle bei der Pathogenese der PCNSL. Sie soll das Verständnis des Entstehungsprozesses dieser Lymphome durch die Aufklärung molekularpathologischer Details und die Entdeckung noch unbekannter Zusammenhänge erweitern.

Ein wichtiger Schritt für die Einschätzung der PCNSL ist die Einordnung der direkten Vorläufer der Tumorzellen in das Kontinuum der B-Zell-Entwicklung. Montesinos-Rongen et al. konnten zeigen, daß sich PCNSL von späten Keimzentrums-B-Zellen ableiten^{10,11}, die eine anhaltende und hoch aktive SHM aufweisen¹²⁴. Im normalen Verlauf der B-Zellentwicklung erfolgen die Prozesse der SHM und des CSR in den Keimzentren der sekundären, lymphoiden Organe. PCNSL werden zwar von SHM betroffen, vollziehen jedoch keinen Ig-Isotypenwechsel, d.h. der Reifungsprozeß des CSR unterbleibt. Es wurde mittels RT-PCR ein stabilisierter IgM/IgD-Phänotyp nachgewiesen, der einen Isotypenwechsel ausschließt, was durch den ausschließlichen Nachweis von IgM auf der Zelloberfläche der Tumorzellen bestätigt wurde. Die Cytidin-Deaminase AID spielt dabei sowohl bei SHM als auch CSR eine entscheidende Rolle, da sie für beide Prozesse unerlässlich ist^{31,125}. AID-mRNA wurde jedoch nur in 40% der PCNSL gleich stark oder stärker als in CB exprimiert. Untersuchungen auf Proteinebene zeigten eine klare Korrelation zwischen mRNA-Transkription und Proteinexpression. Die durch gemeinsame Abhängigkeit von AID-Aktivität assoziierten Prozesse der SHM und des CSR erfahren in PCNSL offenbar eine Dissoziation.

In extrazerebralen DLBCL ist AID-Expression nicht mit anhaltender SHM assoziiert, obwohl teilweise eine starke AID-Expression meßbar ist. Außerdem gibt es keine Korrelation zwischen AID-Proteinwerten und der Mutationsfrequenz in extrazerebralen DLBCL die von aberranter SHM in den Genen für PIM1, PAX5, RhoH/TTF und cMYC betroffen sind¹²⁶. Das Vorhandensein von AID ist also eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung für SHM. Es ist daher fraglich, ob geringe AID-Spiegel bereits ausreichend sind, um SHM zu ermöglichen, für CSR jedoch nicht genügen. Zwei Arbeiten, die gezeigt haben, daß SHM und CSR durch jeweils unterschiedliche AID-Domänen vermittelt werden^{127,128}, implizieren ferner die Möglichkeit, daß selektiv mutierte AID-Isoformen existieren, die zwar SHM, nicht aber die CSR ermöglichen können oder daß für beide Prozesse unterschiedliche Kofaktoren mit AID interagieren müssen, deren Regulation selektiv gestört sein könnte. Eine andere Möglichkeit wäre eine zeitliche Trennung der beiden Prozesse dergestalt, daß die Tumoren

während einer früheren klonalen Expansionsphase, in welcher SHM ablief, AID exprimierten, welches dann in folgenden Entwicklungsphasen herunterreguliert würde. In jedem Fall ist die AID-Aktivität unerlässlich für die Lymphomentstehung im Keimzentrum³⁰. Neben einer aberranten AID-Aktivität ist das Ausbleiben der CSR aber auch als mögliche Reaktion auf Interaktionen mit der Mikroumgebung der Tumorzellen zu erklären. Keimzentrums-B-Zellen wechseln in Abhängigkeit von der Lokalisierung des Keimzentrums unterschiedliche Ig-Klassen ein, da das umgebende Milieu von Cytokinen, v.a. IL-4, IL-10 und TGF β , entscheidend für die Kontrolle der CSR sein kann¹²⁹⁻¹³². Unter normalen Umständen ist im ZNS jedoch kaum IL10 und gar kein IL-4 messbar¹³³. PCNSL könnten daher aus Keimzentren stammen, deren Cytokinmilieu SHM, aber keine CSR ermöglicht.

Denkbar wäre darüber hinaus, daß PCNSL-B-Zellen zu einem Kompartiment von somatisch mutierten B-Zellen gehören, für die gar kein Klassenwechsel vorgesehen ist¹³⁴, die aber dennoch Memory-B-Zellen hervorbringen können. Bevorzugte IgM/IgD-Expression wurde ganz ähnlich auch bei anderen Lymphom-Entitäten wie Burkitt-Lymphomen, MALT-Lymphomen und extrazerebralen DLBCL beobachtet¹³⁴.

Neben AID sind bestimmte cis-aktive Elemente in der DNA, die jeweils upstream von den konstanten Regionen gelegenen Switch-Regionen liegen, notwendig, um die CSR zu ermöglichen. Wenn interne Deletionen deren Integrität beeinträchtigen, kann dies zu einer Blockierung der CSR und Stabilisierung des Ig-Isotypen führen^{29,135,136}. Um den Status der vor der C μ -Region gelegenen Switch- μ -Region (S μ) in PCNSL zu klären, wurde die entsprechende Region mittels LDI-PCR bei einer Reihe von PCNSL amplifiziert. In 63% der Fälle wurden interne Deletionen nachgewiesen. In nur einem Fall traten zwei kürzere Fragmente auf, die auf deletierte S μ -Regionen auf beiden IgH-Allelen schließen ließen. In den anderen Fällen wurden neben den kürzeren Fragmenten, die eine Deletion anzeigten, jeweils auch die Vollängenprodukte detektiert. Aufgrund dieser Befunde konnte nicht ausgeschlossen werden, daß in diesen Fällen das nicht-produktive IgH-Allel die S μ -Deletion trägt, allerdings wurden interne S μ -Deletionen auch bei IgM-arretierten B-CLL und FL-Fällen gefunden und dort betreffen sie bevorzugt das produktiv rearrangierte IgH-Allel^{135,136}, so daß wahrscheinlich ist, daß auch bei PCNSL die S μ -Deletionen das jeweils exprimierte IgH-Allel betreffen und in diesen Fällen eine erfolgreiche CSR verhindern.

Insgesamt ergibt sich ein komplexes Bild, da trotz meist schwacher AID-Expression in PCNSL anhaltende SHM auftritt, jedoch keine CSR, selbst in den Fällen nicht, die AID stärker exprimieren. Ein Grund dafür sind die deletierten S μ -Regionen, die in vielen Fällen auftreten, aber es ist nicht auszuschließen, daß der unterdrückten CSR mehrere Ursachen

zugrunde liegen. Nachfolgende Experimente sollten PCNSL auf mutierte AID-Varianten untersuchen, die zwar SHM, nicht jedoch CSR ermöglichen.

Der sich an die Prozesse der SHM und CSR im Keimzentrum anschließende Reifungsschritt der B-Zellen ist die terminale Differenzierung zur Plasma-B-Zelle oder zur Memory-B-Zelle. Dieser letzte Reifungsschritt beendet normalerweise das durch keimzentrumsspezifische genetische Programme ermöglichte Stadium erhöhter Proliferation gekoppelt mit Toleranz von DNA-Schäden. Unterbleibt die terminale Differenzierung, so erhalten die B-Zellen diesen problematischen Phänotyp aufrecht, was zu einem erhöhten Risiko einer malignen Transformation führt. Von zentraler Bedeutung für die Entwicklung zur Plasmazelle ist dabei das Produkt des PRDM1-Gens, das Protein Blimp-1. Bei PCNSL wurde rekurrente Inaktivierung von PRDM1 durch klonale Mutationen festgestellt. Dies deckt sich mit den Befunden bei extrazerebralen DLBCL, für welche PRDM1 als Tumorsuppressorgen charakterisiert wurde^{44,45}. Bei PCNSL traten PRDM1-inaktivierende Mutationen in 19% der Fälle auf, damit ist PRDM1 nach aktuellem Wissensstand das Gen, welches bei PCNSL am häufigsten von „loss-of-function“-Mutationen betroffen wird. Die Mutationen betrafen Splice-Stellen und/oder führten zu Verschiebungen des Leserasters, wodurch schließlich vorgezogene Stop-Codons generiert wurden. In allen von solchen Mutationen betroffenen Fällen trat keine Proteinexpression mehr auf.

Die beobachtete Häufigkeit der PRDM1-Inaktivierung erscheint erhöht gegenüber systemischen DLBCL, bei denen sie in 24% aber ausschließlich der ABC-DLBCL-Fälle auftraten⁴⁵. PCNSL weisen in 24% der Fälle ein Genexpressionsprofil wie ABC-DLBCL auf, so daß die PRDM1-Mutationsfrequenz bei PCNSL diejenige übersteigt, die sich ergibt, wenn man die Gesamtheit der DLBCL betrachtet und die bei 9% liegt⁴⁵. Dies wird durch eine weitere Arbeit bestätigt, in der PRDM1-Mutationen in 8% der Fälle einer Reihe von systemischen DLBCL beschrieben werden¹³⁷. Die vorliegende Arbeit ist die bisher einzige, die PRDM1 bei PCNSL analysiert hat, einschränkend ist jedoch zu sagen, daß bei diesen Überlegungen die derzeit noch begrenzte Zahl der PCNSL-Fälle, die untersucht wurden, bedacht werden muß.

Von den inaktivierenden Mutationen waren die Exone 2, 4 und 5 betroffen. Eine Mutation (Fall 2), ein Nukleotidaustausch an der Splice-Stelle zwischen Exon 2 und Intron 2, betraf eine Stelle (bp 525), die bereits in anderen unabhängigen Studien beschrieben und als "Hotspot" für Mutationen erkannt worden war^{44,45}. Mutationen an dieser Stelle und auch die anderen Mutationen, die bei PCNSL festgestellt wurden, erzeugen ein trunkiertes Blimp-1-

Protein, dem für seine physiologische Funktion unerlässliche Domänen fehlen³⁵. Immunhistochemisch wurde jedoch ein vollständiges Fehlen des Proteins in diesen Fällen festgestellt, was auch die Möglichkeit zulässt, daß die Proteine durch Nonsense-vermittelten Zerfall entfernt werden oder daß die Trunkierung die Antikörperbindestelle zerstört und so den Nachweis verhindert.

Auch bei systemischen DLBCL wiesen Fälle, die von inaktivierenden PRDM1-Mutationen betroffen waren, keine Proteinexpression auf⁴⁵. Eine weitere Parallele zu DLBCL ist der Immunphänotyp: PRDM1-inaktivierende Mutationen traten bei allen untersuchten PCNSL ausschließlich bei BCL6+CD10-MUM1+-Fällen auf. Diesen Phänotyp wiesen auch DLBCL in allen Fällen mit mutiertem PRDM1 auf. Es besteht jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Anteilen der Fälle, die keine PRDM1-Mutationen trugen und das Blimp1-Protein exprimierten. 78% der PRDM1-mutationsfreien PCNSL exprimierten das Protein, wohingegen bei systemischen DLBCL verschiedene, stark voneinander abweichende Befunde erhoben wurden. Dort wurden Anteile von 43% bzw. 5% Blimp1-positiver Fälle gemessen^{138,139}. Garcia et al. konnten außerdem feststellen, daß die Blimp1-Expression signifikant mit einem kürzeren Zeitraum bis zum Therapieversagen, nicht aber mit dem Gesamtüberleben oder dem krankheitsfreien Überleben korreliert ist¹³⁹. Dies deutet auf ein aggressiveres Verhalten von Blimp1-positiven Zellen hin und wirft die Frage auf, ob Blimp1-Expression als prognostischer Marker, dessen Expression immunhistochemisch zuverlässig nachgewiesen werden kann, geeignet sein kann. Um dies zu klären, müssen die Korrelationen an größeren Fallzahlen bestätigt werden.

Die Sequenzanalyse der PRDM1-mutierten PCNSL zeigte in allen Fällen homozygote Mutationen. Zusammen mit der fehlenden Expression von Blimp1 läßt dies auf Isodisomie oder wahrscheinlicher auf die Deletion des zweiten Allels durch LOH schließen (two-hit Mechanismus¹⁴⁰), was dadurch unterstützt wird, daß die entsprechende chromosomale Region 6q21 häufig von cytogenetischen Defekten betroffen ist⁴⁶. Damit käme PRDM1 auch in PCNSL die Funktion eines Tumorsuppressorgens zu und eine durch PRDM1-Inaktivierung blockierte terminale B-Zell-Differenzierung als pathogener Mechanismus für einen Teil der PCNSL in Frage. In normalen Keimzentrums-B-Zellen agieren BCL6 und Blimp1 als Gegenspieler, die sich gegenseitig ausschließen. PCNSL weisen jedoch in einer beträchtlichen Anzahl von Fällen BCL6-Translokationen auf¹³, und es wurde eine gleichzeitige BCL6- und Blimp1-Expression festgestellt. Es besteht daher die Möglichkeit, daß BCL6 und Blimp1 in PCNSL zusammenwirken und daß beide gemeinsam zur Pathogenese beitragen. Ob sich

durch PRDM1-Analyse prognostische Subgruppen bestimmen lassen, ist eine derzeit noch offene, interessante Frage.

Ein wichtiger Schritt zu einer genaueren Prognose für PCNSL-Patienten wäre eine Einteilung der PCNSL-Fälle in prognostisch bedeutsame Subkategorien. Mittels Gensignatur lassen sich etwa 57% der Lymphome in die prognostisch unterschiedlichen Kategorien ABC-DLBCL und GCB-DLBCL einteilen¹⁰, wobei noch ungeklärt ist, ob diese Subgruppen auch tatsächlich einen ähnlichen Verlauf zeigen wie die DLBCL-Subgruppen. Unabhängig von ihrer durch Gensignatur ermittelten Kategorie weisen PCNSL stets auch Merkmale auf, die mit der jeweils anderen Kategorie assoziiert sind (s. Abschnitt 1.1), was die Frage aufwirft, ob PCNSL möglicherweise eine eigene, distinkte Subentität der DLBCL bilden. Ein zentraler zellulärer Signalweg, dessen konstitutive Aktivierung, sowohl mit der ABC-Gensignatur als auch in vielen Arbeiten mit dem Überleben von Tumorzellen assoziiert wurde^{20,141-143}, ist der NFκB-Signalweg. Die Charakterisierung des NFκB-Status' erscheint daher sinnvoll für die Generierung spezifischer Therapie-Strategien. Mittels quantitativer PCR wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit ein Transkriptionsprofil der NFκB-Hauptkomponenten sowie einer Reihe von Mediatoren und Zielgenen an einer Gruppe von PCNSL-Fällen durchgeführt und die Expression einiger dieser Genprodukte immunhistochemisch untersucht. Diese Arbeiten zeigen, daß PCNSL durch einen selektiv aktivierten NFκB-Signalweg charakterisiert sind. In normalen Keimzentren ist eine aktive NFκB-Signaltransduktion auf Zellen in der lichten Zone („light zone“) des Keimzentrums beschränkt, wohingegen der Großteil der normalen Zellen im Keimzentrum zwar NFκB-Komponenten exprimiert, in denen diese jedoch cytoplasmatisch und damit in unwirksamer Form vorliegen¹⁴⁴, wie gezeigt wurde (s. Abb. 3.11 F und H). Die starke nukleäre Expression von RelA und die schwache nukleäre Expression von cRel korrelieren mit den gemessenen Transkriptionswerten und legen eine funktionelle Aktivität dieser NFκB-Komponenten nahe.

Der aktivierte NFκB-Signalweg führt zu einer verstärkten Expression von spezifischen NFκB-Zielgenen. Entsprechend wurde bei allen PCNSL eine starke Hochregulation von BCL2 (bis zu 320-fach), CCND2 (bis zu 1800-fach), cFLIP (bis zu 40-fach) und IRF4 (bis zu 100-fach) gemessen. Diese Signatur, die stark antiapoptotische und proliferationsinduzierende Gene enthält, ist charakteristisch für systemische DLBCL vom ABC-Typ¹⁴⁵ und enthält zwei der drei Gene, die bei systemischen DLBCL mit besonders schlechter Prognose korrelieren¹⁴⁶. Mit dieser Signatur, welche zu gesteigerter Proliferation und Apoptoseresistenz der Lymphome beitragen kann, weisen PCNSL ein weiteres Charakteristikum systemischer ABC-

DLBCL auf. Ein interessanter Befund ist die stark differentielle BCL10-Expression bei PCNSL. Eine hierarchische Cluster-Analyse, basierend auf den Expressionswerten von PCNSL relativ zu CB, ergab, daß sich PCNSL anhand ihres BCL10-Expressionsniveaus hochsignifikant in zwei Cluster aufteilen, welche sich außerdem in der Expression von cRel und IAP1 signifikant unterscheiden. BCL10 kodiert für ein Protein, das zusammen mit MALT1 und einem CARD-Protein einen Komplex bildet, der z.B. nach Induktion des Antigenrezeptors NFκB aktivieren kann^{147,148}. Die essentielle Rolle von BCL10, MALT1 und CARD11 für das Überleben von ABC-DLBCL wurde in einer „loss-of-function“-Studie beschrieben¹⁴⁹. Über die Bedeutung von BCL10 als Tumorsuppressorgen gibt es widersprüchliche Daten. Willis et al.¹⁴⁸ beschreiben BCL10 als häufiges Ziel von Mutationen, sogar von aberranter SHM mit pro-apoptotischer Funktion und fanden trunkierte Isoformen, die die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion verloren haben, aber noch NFκB aktivieren können und "gain-of-function" transformierende Aktivität aufwiesen. Sie schließen, daß BCL10 das Ziel von Chromosom 1q22-Deletionen ist, die bei MALT- und folliculären Lymphomen, Keimzelltumoren und anderen malignen Neoplasien auftreten. Fakruddin et al.¹⁵⁰ führten in der Folge Mutationsanalysen an MALT-Lymphomen und folliculären Lymphomen sowie Keimzelltumoren durch und konnten die Daten von Willis et al.¹⁴⁸ nicht bestätigen. Sie schlossen daher BCL10 als Zielgen und Tumorsuppressorgen an 1p22 aus.

Dennoch bleibt die Rolle von BCL10 für die Apoptose und NFκB-Aktivierung unbestritten und Folgeuntersuchungen an PCNSL sollten deshalb prüfen, ob in diesen Lymphomen die trunkierte, onkogene Isoform von BCL10 vorliegt und an der Pathogenese beteiligt sein kann. Die starke BCL10-Dysregulation, die bei allen PCNSL dieser Gruppe festgestellt wurde, legt eine solche Rolle für BCL10 nahe. Die Patientengruppen der beiden BCL10-Cluster in PCNSL unterschieden sich bei dieser Reihe von PCNSL dennoch nicht signifikant beim Gesamtüberleben, doch muß dies erst in Folgearbeiten mit größeren Fallzahlen und homogen therapierten Patienten im Rahmen einer klinischen Studie bestätigt werden.

In dieser Arbeit sollte der Regulationsstatus des Transkriptionsfaktors FOXP1 und eine mögliche differentielle Expression trunkierter FOXP1-Isoformen in PCNSL aufgeklärt werden. PCNSL weisen stark erhöhte Expression von IRF4 und BCL2 (in Abwesenheit der t(14;18)-Translokation) auf und sind generell durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet. FOXP1 ist in den letzten Jahren als unabhängiger prognostischer Marker in systemischen DLBCL, die nicht dem GCB-Typ angehören, beschrieben worden^{58,60}, wobei eine erhöhte FOXP1-Expression, gepaart mit IRF4- und BCL2-Expression (ohne t(14;18)) ein Indikator

für eine besonders schlechte Prognose⁵⁸ darstellte. Eine aktuelle Arbeit beschreibt die präferentielle und mit einer B-Zell-Aktivierung assoziierte Expression von gekürzten FOXP1-Isoformen anstelle der normalen Isoform als möglichen FOXP1-vermittelten onkogenen Mechanismus⁴⁹.

In einer Gruppe von 19 PCNSL ergab die quantitative Expressionsanalyse der ungekürzten FOXP1-Isoform (1) sowie zweier trunkierter Formen (3 und 9), welchen der FOXP1-N-Terminus fehlt, eine im Vergleich zu Centroblasten, aber auch zu einer GCB-DLBCL-Zelllinie deutlich verminderte Expression der normalen FOXP1-Variante und eine stark erhöhte, teils stärker als in einer ABC-DLBCL-Zelllinie ausgeprägte Expression der Isoformen 3 und 9. Diese FOXP1-„Signatur“ wird bei Brown et al.⁴⁹ als spezifisch für DLBCL-Zellen vom ABC-Typ beschrieben. Das Fehlen des FOXP1-N-Terminus wurde bereits in einer Arbeit mit Tumorenstehung in Verbindung gebracht¹⁵¹. Pajer et al. konnten an einem avianen Nephroblastommodell zeigen, daß *foxP1* das zweithäufigste Ziel retroviraler Integration darstellte (in 5% der Tumorklone), welche stets innerhalb des zweiten kodierenden Exons stattfand und vermutlich eine NH₂-terminale Deletion generierte. Diese Insertionen hatten jedoch keinen Einfluß auf die mRNA-Werte. Pajer et al.¹⁵¹ schlossen daraus, daß die deletierten *foxP1*-Varianten in negativ-dominanter Weise mit der normalen Genfunktion interferieren und zur malignen Transformation beitragen könnten. Diese Beobachtungen liefern funktionelle Evidenz, daß ein N-terminal trunkiertes FOXP1-Protein einen onkogenen Effekt haben kann. Es ist bisher noch ungeklärt, wie die bevorzugte Expression kürzerer FOXP1-Isoformen reguliert wird, denn obwohl FOXP1 in systemischen DLBCL wiederkehrend von genomischen Aberrationen betroffen ist¹⁵², kann eine Deregulation von FOXP1 in diesen Lymphomen auch in Abwesenheit solcher Aberrationen auftreten¹⁵³. Die in PCNSL gemessene, zu ABC-DLBCL-Zellen analoge präferentielle Expression N-terminal trunkierter FOXP1-Isoformen ist daher ein möglicher onkogener Mechanismus in der Pathogenese dieser Lymphome. An einer größeren, homogen therapierten Patientengruppe sollte in Folgestudien die therapeutische Relevanz der Expressionswerte dieser FOXP1-Isoformen geprüft werden.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich als erste mit der möglichen Rolle, die der miRNA-vermittelten Regulation in der Pathogenese von PCNSL zukommen kann. Die Entdeckung der miRNAs und ihrer Bedeutung für die Tumorentstehung stellt einen alternativen Ansatzpunkt für die klinische Anwendung differentieller Genexpression dar, der heute nicht mehr außer Acht gelassen werden sollte. In einer Pilotstudie sollte geprüft werden, ob miRNAs in PCNSL

differentielle Expression aufweisen, welche für Folgearbeiten als Anhaltspunkt für mögliche an der Pathogenese beteiligte Kandidaten dienen können. Dazu wurden von sieben PCNSL-Fällen miRNA-Expressionsprofile mittels eines miRNA-Arrays erstellt. MiRNA-Arrays sind eine noch nicht allgemein etablierte Methode, für die sich bislang kein „Goldstandard“ durchgesetzt hat, so daß verschiedene Ansätze in Verwendung sind, deren Vergleichbarkeit noch nicht formal gezeigt werden konnte¹⁵⁴⁻¹⁶¹. Grundsätzlich stellen Microarrays eine ideale Methode für miRNA-Genexpressionsanalysen mit hohem Durchsatz in Zellen und Geweben dar. Einige Eigenschaften der miRNAs geraten für solche Analysen jedoch zum Hindernis, wodurch sie schwieriger zu untersuchen sind, als mRNAs: Die geringe Größe der miRNAs bedingt, daß nur eine sehr kurze Sequenz zur Verfügung steht, um diese zu markieren oder dafür spezifische Sonden herzustellen. Zudem machen miRNAs nur einen sehr geringen Teil (ca. 0,01%) der Gesamtmenge der RNAs aus, was eine hochsensitive und –spezifische Markierung dieser Moleküle notwendig macht. Außerdem existieren miRNAs in drei verschiedenen Formen (s. Abschnitt 1.5): reife miRNA, pre-miRNA und pri-miRNA. Lediglich die reife miRNA ist jedoch biologisch aktiv, wodurch geboten ist, Arraysignale der anderen miRNA-Arten zu eliminieren. Die in dieser Arbeit verwendete miRNA-Array-Methode¹¹⁷ hat den Vorteil, daß durch eine spezielle vorgeschaltete elektrophoretische Fraktionierung hochgradig konzentrierte miRNAs für die Arrays verwendet werden konnten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode stellt das homogene Labelingverfahren dar, welches auf direktem enzymatischen „tailing“ beruht und das Potential der miRNAs, mit spezifischen Sonden auf einem planaren Array zu hybridisieren, nicht beeinträchtigt. Nach Hintergrundkorrektur und Normalisierung wurden bei PCNSL eine Reihe aktivierter miRNAs detektiert. Neun davon, die auch mittels qPCR validiert wurden, sind in der Literatur bereits in Verbindung mit Tumoren beschrieben (s. Tab. 4.1).

miRNA-ID	Assoziierter Tumor	Referenzen
hsa_let_7b	Lungenkarzinom	99
hsa_miR_155	DLBCL	103,162,163
	Burkitt-Lymphom	104,164,165
hsa_miR_16	CLL	101,166,167
hsa_miR_187	CLL	168
hsa_miR_21	Glioblastom	169

miRNA-ID	Assoziierter Tumor	Referenzen
	Mamma-Karzinom	100
	versch. solide Tumoren	170,171
hsa_miR_26a	Lungenkarzinom	99
hsa_miR_30d	versch. solide Tumoren	170
hsa_miR_320	Colonkarzinom	172
hsa_miR_342	Colonkarzinom	173

Tab. 4.1.: In PCNSL aktivierte miRNAs mit Assoziation zu Tumorerkrankungen.

MiR-155 ist die erste miRNA, für die in Zusammenhang mit Tumoren eine Überexpression nachgewiesen wurde¹⁰³. Erhöhte miR-155-Expression wurde auch bereits bei diversen Lymphomentitäten beschrieben^{102,103,174}. Eine neuere Studie beschreibt miR-155 als Regulator der T-Zell-abhängigen Keimzentrumsreaktion¹⁷⁵ durch Regulation der Synthese von TNF und LT- α , wodurch miR-155 die Entstehung von von Keimzentrums-B-Zellen abgeleiteten Lymphomen beeinflussen kann.

MiR-155 gilt heute als onco-miR¹⁷⁶, und eine erhöhte Menge an miR-155 hemmt wahrscheinlich direkt oder indirekt die Synthese eines Tumorsuppressors oder proapoptotischen Proteins. Ein mögliches Ziel für miR-155 ist der Transkriptionsfaktor PU.1¹⁷⁷, der für die späte B-Zell-Differenzierung benötigt wird. Es wurden in klinischen Biopsaten von systemischen DLBCL sowie auch in etablierten Zelllinien signifikant höhere Werte von miR-155 in Zellen gemessen, die dem ABC-DLBCL-Typ entsprechen, als in solchen, die dem GCB-Typ entsprechen¹⁰³. MiR-155 war dabei in 55% (5 von 9) der Fälle aus der Gruppe von PCNSL in ähnlichem Maße (durchschnittlich 15-fach) überexprimiert, wie in DLBCL (10- bis 30-fach). Folgearbeiten an größeren Fallgruppen mit PCNSL, deren Gensignatur (ABC oder GCB) bestimmt wurde, könnten den prognostischen Wert der miR-155 Level, sowie die Korrelation mit der Gensignatur für PCNSL bestimmen.

MiR-21 wird in Mammakarzinomgewebe überexprimiert, und man konnte zeigen, daß anti-miR-21 sowohl Zellwachstum in vitro also auch das Tumorwachstum in vivo hemmt¹⁷¹. Die Blockierung von miR-21 führt zu verstärkter Apoptose durch Herunterregulierung von BCL-2. Wahrscheinlich hemmt miR-21 die Translation eines Proteins, welches die Herabregulation von BCL-2 steuert. Eine Überexpression von miR-21 stört also empfindlich die Fähigkeit einer Zelle, ihre Apoptosetoleranz zu regulieren. Dieser Zusammenhang ist für PCNSL interessant, da diese Lymphome sehr apoptoseresistent sind und eine starke Dysregulation von BCL-2 zeigen.

PCNSL weisen keine Herabregulation von miR-16 auf, wie von Eis et al.¹⁰³ auch für andere Lymphome beschrieben wurde, sondern ein eher inkonsistentes Muster von schwacher Überexpression in 33% der Fälle, was andeutet, daß die miR-16-Expression in PCNSL nicht wesentlich verändert ist. In CLL hingegen wurde miR-16 als Tumorsuppressorgen beschrieben, weil die Expression dieser miRNA mit BCL-2-Repression und Apoptoseinduktion assoziiert ist⁸⁷.

Neun weitere aktivierte miRNAs in PCNSL waren vom Arrayhersteller bioinformatisch vorhergesagte Moleküle, sogenannte „ambi-miRs“. Diese waren zum Zeitpunkt der Arrayversuche noch nicht experimentell bestätigt und in der miRBase annotiert. Dennoch handelt es sich bei diesen berechneten Sequenzen wahrscheinlich um reale miRNAs, da durch den hohen Aufreinigungsgrad der PCNSL-miRNAs und die Detektion bei stets mindestens 57% der Fälle eine zufällige oder unspezifische Hybridisierung unwahrscheinlich ist. Zudem ist eine der „ambi-miRs“ (ehemals als „ambi_miR_7089“ bezeichnet) inzwischen als reale miRNA bestätigt und wird nun als *hsa_miR_589* in der miRBase geführt. Wenn die übrigen in PCNSL aktivierten „ambi-miRs“ im Rahmen kommender Experimente als reale miRNAs identifiziert und ihre Funktionen aufgeklärt werden, sollte geprüft werden, ob diese miRNAs eine Rolle bei der PCNSL-Pathogenese spielen können.

Wenn Folgeuntersuchungen die dysregulierte Expression von miR-155 und miR-21 bei größeren Fallzahlen von PCNSL bestätigen oder weitere dysregulierte miRNAs detektieren und ein funktioneller Zusammenhang zur Pathogenese gezeigt werden kann, stellt eine spezifische Hemmung dieser oder anderer miRNAs mittels anti-miRNA-Oligonukleotiden, deren Stabilität in tierischen Zellen bereits beschrieben wurde¹⁷⁸, eine interessante therapeutische Option dar.

Die Unterteilung von Patienten mit PCNSL in diagnostisch oder therapeutisch relevante Untergruppen gelingt auf Basis der vorliegenden Daten derzeit noch nicht. PCNSL können zwar anhand ihrer Gensignatur gemäß der Wright-Klassifizierung¹⁴ zum Teil dem ABC- bzw. dem GCB-Typ von DLBCL zugeordnet werden¹⁰, jedoch ist noch nicht geklärt, ob sich diese Unterteilung für eine verbesserte Prognostik nutzen läßt. Hinzu kommt, daß die sonstigen biologischen Charakteristika dieser Lymphome der Klassifizierung via Gensignatur widersprechen, da sie einen heterogenen Phänotyp mit Merkmalen sowohl der GCB- als auch der ABC-DLBCL aufweisen. Diese Beobachtungen zeigen, daß die Zuordnung von PCNSL zur Gruppe der DLBCL für eine exakte Klassifizierung zu grob ist und nicht auf molekularer

Grundlage basiert. So stellt sich die Notwendigkeit heraus, die Pathomechanismen, die dieser Erkrankung zugrunde liegen, auf molekularer Ebene zu charakterisieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen eine sehr präzise Einordnung der PCNSL-Vorläuferzellen innerhalb der Keimzentrumsphase der B-Zell-Entwicklung, sowie die Abgrenzung von anderen Lymphomentitäten und beschreibt die Störung der terminalen B-Zell-Differenzierung als einen möglichen Mechanismus der PCNSL-Pathogenese. Die konstitutive Aktivierung des NFκB-Signalwegs und die starke Dysregulation antiapoptotischer und proliferationsinduzierender NFκB-Zielgene in PCNSL können, den Erkenntnissen der Arbeit zufolge, die molekulare Grundlage für die Apoptoseresistenz, die stark erhöhte Proliferation und die hohe Malignität dieser Lymphome bilden.

Einen weiteren möglichen Pathomechanismus bei PCNSL stellt die hier für PCNSL beschriebene präferentielle Expression N-terminal trunkierter FOXP1-Isoformen da. Schließlich zeigt diese Arbeit erstmalig, daß miRNA-Aktivierung und-Dysregulation in PCNSL auftritt und möglicherweise deren Pathogenese beeinflussen kann.

Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, das Verständnis der molekularen Ursachen dieser Lymphome zu vertiefen, neue molekulare Aspekte aufzudecken und Möglichkeiten für eine diagnostisch und/oder therapeutisch nutzbringende Subklassifizierung aufzuzeigen.

5. Zusammenfassung

Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems (PCNSL) sind diffus-großzellige Lymphome vom B-Zell-Typ im ZNS ohne systemischen Befall mit seit Jahren steigender Inzidenz und einer sehr schlechten Prognose. PCNSL-Zellen weisen einen „late germinal center exit“-Phänotyp mit aktiver somatischer Hypermutation auf.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse molekularer Funktionszusammenhänge im Hinblick auf ihre Beteiligung an der Pathogenese von PCNSL.

Um den Reifezustand, den PCNSL-Vorläuferzellen im Keimzentrum erreichen, exakt beschreiben zu können, wurde untersucht, ob PCNSL als nächsten Reifungsschritt einen Immunglobulin-Klassenwechsel vollziehen können. Als Ursache des ausbleibenden Immunglobulin-Klassenwechsels konnten eine Herabregulation der „activation-induced cytidine deaminase“ sowie interne Deletionen der Switch- μ -Region in der Mehrzahl (6 von 11) der untersuchten PCNSL identifiziert werden. Um zu prüfen, ob auch weitere Entwicklungsschritte, die für die Differenzierung der Tumorzellen wichtig sind, blockiert sind, wurde untersucht, ob in PCNSL durch Inaktivierung des „positive regulatory domain I protein, with ZNF domain“ (PRDM1), welches eine zentrale Regulationsstelle in der terminalen B-Zellentwicklung bildet, die terminale Entwicklung zur Plasmazelle gestört ist. Eine umfassende Mutations- und Expressionsanalyse von PRDM1 ergab, daß bei 4 von 21 PCNSL PRDM1 durch Mutationen inaktiviert ist und so die Möglichkeit zur Enddifferenzierung in reife Plasmazellen verstellt wird. Dadurch wird in diesen Lymphomen ein hochproliferativer und apoptosereduzierter Phänotyp stabilisiert. PCNSL zeichnen sich grundsätzlich durch hochaktive Proliferation und verminderte Apoptose aus. Daher sollten in dieser Arbeit die molekularen Bedingungen dieser Eigenschaften geklärt werden. Genexpressionsanalysen mittels quantitativer PCR zeigten bei PCNSL eine konstitutive Aktivierung des NF κ B-Signalweges. Dies ist für die Entstehung zahlreicher Tumoren wichtig und ist mit einer hohen Malignität und Apoptoseresistenz assoziiert. PCNSL zeigten eine starke Dysregulation der antiapoptotischen und proliferationsinduzierenden NF κ B-Zielgene BCL2, cFLIP sowie CCND2.

Um die besonders schlechte Prognose von PCNSL-Patienten zu erklären, wurde die Expression des „Forkhead box protein 1“ (FOXP1) in PCNSL analysiert. Eine FOXP1-Überexpression wurde kürzlich bei systemischen DLBCL mit sogar innerhalb prognostisch ungünstiger Subgruppen mit einem schlechteren Verlauf assoziiert. Alle untersuchten PCNSL weisen eine bevorzugte Expression trunkierter FOXP1-Isoformen und eine Herabregulation

der ungekürzten Isoform auf. Dies könnte ein möglicher Grund für die durchweg schlechte Prognose dieser Lymphome sein.

Darüber hinaus spielen posttranskriptionale Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Micro-RNAs (miRNA) stellen eine bedeutende posttranskriptionale Regulationsinstanz dar. In Pilotexperimenten konnte hier erstmalig gezeigt werden, daß eine Dysregulation von miRNA auch bei PCNSL auftritt. Darüber könnte die Pathogenese dieser Lymphomentität beeinflußt werden.

Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, das Verständnis der molekularen Ursachen primärer Lymphome des ZNS zu vertiefen, neue molekulare Aspekte aufzudecken und Möglichkeiten für eine diagnostisch und/oder therapeutisch nutzbringende Subklassifizierung aufzuzeigen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Deckert M, Paulus W. WHO Classification of Tumors Pathology & Genetics of Tumours of the Nervous System. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. Malignant Lymphomas. Lyon: IRAC; 2007:188-192.
- (2) Deckert-Schluter M, Rang A, Wiestler OD. Apoptosis and apoptosis-related gene products in primary non-Hodgkin's lymphoma of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1998;96:157-162.
- (3) DeAngelis LM, Gutin P.H., Leibel S.A. Intracranial Tumors. Diagnosis and Treatment. 1 ed. London: 2002.
- (4) Schabet M. Epidemiology of primary CNS lymphoma. *J Neurooncol*. 1999;43:199-201.
- (5) Omuro AM, Ben Porat LS, Panageas KS et al. Delayed neurotoxicity in primary central nervous system lymphoma. *Arch Neurol*. 2005;62:1595-1600.
- (6) Olson JE, Janney CA, Rao RD et al. The continuing increase in the incidence of primary central nervous system non-Hodgkin lymphoma: a surveillance, epidemiology, and end results analysis. *Cancer*. 2002;95:1504-1510.
- (7) Corn BW, Marcus SM, Topham A, Hauck W, Curran WJ, Jr. Will primary central nervous system lymphoma be the most frequent brain tumor diagnosed in the year 2000? *Cancer*. 1997;79:2409-2413.
- (8) Kadan-Lottick NS, Skluzacek MC, Gurney JG. Decreasing incidence rates of primary central nervous system lymphoma. *Cancer*. 2002;95:193-202.
- (9) Hao D, DiFrancesco LM, Brasher PM et al. Is primary CNS lymphoma really becoming more common? A population-based study of incidence, clinicopathological features and outcomes in Alberta from 1975 to 1996. *Ann Oncol*. 1999;10:65-70.
- (10) Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S et al. Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia*. 2008;22:400-405.
- (11) Montesinos-Rongen M, Kuppers R, Schluter D et al. Primary central nervous system lymphomas are derived from germinal-center B cells and show a preferential usage of the V4-34 gene segment. *Am J Pathol*. 1999;155:2077-2086.
- (12) Montesinos-Rongen M, Zuhlke-Jenisch R, Gesk S et al. Interphase cytogenetic analysis of lymphoma-associated chromosomal breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61:926-933.
- (13) Schwindt H, Akasaka T, Zuhlke-Jenisch R et al. Chromosomal translocations fusing the BCL6 gene to different partner loci are recurrent in primary central nervous system lymphoma and may be associated with aberrant somatic hypermutation or defective class switch recombination. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006;65:776-782.

- (14) Wright G, Tan B, Rosenwald A et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:9991-9996.
- (15) Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46:705-716.
- (16) Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-6866.
- (17) Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-683.
- (18) Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 1999;18:6867-6874.
- (19) Gilmore TD. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene*. 1999;18:6842-6844.
- (20) Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:297-309.
- (21) Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996;274:782-784.
- (22) Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 1996;87:565-576.
- (23) Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*. 1996;274:787-789.
- (24) Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*. 1996;274:784-787.
- (25) Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001;194:1861-1874.
- (26) Lam LT, Davis RE, Pierce J et al. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2005;11:28-40.
- (27) Murphy K, Travers P, Walport M, . *The Development and Survival of Lymphocytes*. Janeway's Immunobiology. New York: Garland Science; 2007:241-318.
- (28) Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*. 2004;432:635-639.
- (29) Zhang K, Cheah HK, Saxon A. Secondary deletional recombination of rearranged switch region in Ig isotype-switched B cells. A mechanism for isotype stabilization. *J Immunol*. 1995;154:2237-2247.

- (30) Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet.* 2008;40:108-112.
- (31) Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000;102:553-563.
- (32) Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 2002;17:51-62.
- (33) Mock BA, Liu L, LePaslier D, Huang S. The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics.* 1996;37:24-28.
- (34) Keller AD, Maniatis T. Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression. *Genes Dev.* 1991;5:868-879.
- (35) Gyory I, Fejer G, Ghosh N, Seto E, Wright KL. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J Immunol.* 2003;170:3125-3133.
- (36) Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol.* 2000;165:5462-5471.
- (37) Shapiro-Shelef M, Lin KI, Savitsky D, Liao J, Calame K. Blimp-1 is required for maintenance of long-lived plasma cells in the bone marrow. *J Exp Med.* 2005;202:1471-1476.
- (38) Knodel M, Kuss AW, Berberich I, Schimpl A. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur J Immunol.* 2001;31:1972-1980.
- (39) Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22:4771-4780.
- (40) Piskurich JF, Lin KI, Lin Y et al. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol.* 2000;1:526-532.
- (41) Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science.* 1997;276:596-599.
- (42) Reljic R, Wagner SD, Peakman LJ, Fearon DT. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med.* 2000;192:1841-1848.
- (43) Shaffer AL, Yu X, He Y et al. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 2000;13:199-212.

- (44) Tam W, Gomez M, Chadburn A et al. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2006;107:4090-4100.
- (45) Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006;203:311-317.
- (46) Offit K, Jhanwar SC, Ladanyi M, Filippa DA, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosomes Cancer*. 1991;3:189-201.
- (47) Wang B, Lin D, Li C, Tucker P. Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 forkhead transcriptional repressors. *J Biol Chem*. 2003;278:24259-24268.
- (48) Banham AH, Beasley N, Campo E et al. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res*. 2001;61:8820-8829.
- (49) Brown PJ, Ashe SL, Leich E et al. Potentially oncogenic B-cell activation induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B-cell-like subtype of DLBCL. *Blood*. 2007.
- (50) Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:889-899.
- (51) Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol*. 2004;25:1495-1500.
- (52) Borkhardt A, Repp R, Haas OA et al. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene*. 1997;14:195-202.
- (53) Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood*. 1997;90:3714-3719.
- (54) Parry P, Wei Y, Evans G. Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;11:79-84.
- (55) Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ et al. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet*. 1993;5:230-235.
- (56) Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res*. 1997;71:27-92.
- (57) Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:920-932.

- (58) Barrans SL, Fenton JA, Banham A, Owen RG, Jack AS. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood*. 2004;104:2933-2935.
- (59) Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275-282.
- (60) Banham AH, Connors JM, Brown PJ et al. Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1065-1072.
- (61) Kodama K, Massone C, Chott A et al. Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. *Blood*. 2005;106:2491-2497.
- (62) Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J Clin Oncol*. 2007;25:1581-1587.
- (63) Fox SB, Brown P, Han C et al. Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3521-3527.
- (64) Wang B, Weidenfeld J, Lu MM et al. Foxp1 regulates cardiac outflow tract, endocardial cushion morphogenesis and myocyte proliferation and maturation. *Development*. 2004;131:4477-4487.
- (65) Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:858-862.
- (66) Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:862-864.
- (67) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854.
- (68) Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett*. 2005;579:5830-5840.
- (69) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>; 2007.
- (70) Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10:1957-1966.
- (71) Lee Y, Kim M, Han J et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23:4051-4060.
- (72) Lee Y, Ahn C, Han J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415-419.

- (73) Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 2005;24:138-148.
- (74) Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17:3011-3016.
- (75) Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15:2654-2659.
- (76) Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science.* 2002;297:2056-2060.
- (77) Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294:853-858.
- (78) Olsen PH, Ambros V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 1999;216:671-680.
- (79) Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell.* 2002;9:1327-1333.
- (80) Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318:1931-1934.
- (81) Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B et al. RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell.* 2007;131:1273-1286.
- (82) Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S et al. The microRNA miR-196 acts upstream of *Hoxb8* and *Shh* in limb development. *Nature.* 2005;438:671-674.
- (83) Lu J, Qian J, Chen F et al. Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:319-323.
- (84) Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403:901-906.
- (85) Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 2003;113:25-36.
- (86) Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:1290-1297.
- (87) Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting *BCL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:13944-13949.
- (88) Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *Mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol.* 2003;13:790-795.

- (89) Gauthier BR, Wollheim CB. MicroRNAs: 'ribo-regulators' of glucose homeostasis. *Nat Med.* 2006;12:36-38.
- (90) Chang S, Johnston RJ, Jr., Frokjaer-Jensen C, Lockery S, Hobert O. MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature.* 2004;430:785-789.
- (91) Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA.* 2003;9:180-186.
- (92) Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet.* 2006;38:356-362.
- (93) Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C et al. microRNA-155 Regulates the Generation of Immunoglobulin Class-Switched Plasma Cells. *Immunity.* 2007;27:847-859.
- (94) Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA.* 2003;9:1274-1281.
- (95) Smirnova L, Grafe A, Seiler A et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* 2005;21:1469-1477.
- (96) Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2999-3004.
- (97) Michael MZ, O' Connor SM, Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1:882-891.
- (98) Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64:3753-3756.
- (99) Yanaihara N, Caplen N, Bowman E et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9:189-198.
- (100) Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65:7065-7070.
- (101) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15524-15529.
- (102) Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;39:167-169.
- (103) Eis PS, Tam W, Sun L et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3627-3632.

- (104) van den BA, Kroesen BJ, Kooistra K et al. High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37:20-28.
- (105) He L, Thomson JM, Hemann MT et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-833.
- (106) Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*. 2007;67:8433-8438.
- (107) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- (108) Dalmay T, Edwards DR. MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2006;25:6170-6175.
- (109) Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435:834-838.
- (110) Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:5394-5403.
- (111) Ross DT, Scherf U, Eisen MB et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. 2000;24:227-235.
- (112) Guo Y, Chen Z, Zhang L et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2008;68:26-33.
- (113) Yu SL, Chen HY, Chang GC et al. MicroRNA Signature Predicts Survival and Relapse in Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2008;13:48-57.
- (114) Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res*. 2006;66:7390-7394.
- (115) Helen J.Skaletsky, Steve Rozen. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press; 2000:365-386.
- (116) Declaration of Helsinki. <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; 2004.
- (117) Shingara J, Keiger K, Shelton J et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA*. 2005;11:1461-1470.
- (118) Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94:441-448.
- (119) Meijerink J, Mandigers C, van de LL et al. A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn*. 2001;3:55-61.
- (120) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.

- (121) Xi Y, Nakajima G, Gavin E et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007;13:1668-1674.
- (122) Thompsett AR, Ellison DW, Stevenson FK, Zhu D. V(H) gene sequences from primary central nervous system lymphomas indicate derivation from highly mutated germinal center B cells with ongoing mutational activity. *Blood*. 1999;94:1738-1746.
- (123) Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Courts C et al. Absence of immunoglobulin class switch in primary lymphomas of the central nervous system. *Am J Pathol*. 2005;166:1773-1779.
- (124) Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood*. 2004;103:1869-1875.
- (125) Revy P, Muto T, Levy Y et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 2000;102:565-575.
- (126) Pasqualucci L, Guglielmino R, Houldsworth J et al. Expression of the AID Protein in normal and neoplastic B-cells. *Blood*. 2004.
- (127) Ta VT, Nagaoka H, Catalan N et al. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol*. 2003;4:843-848.
- (128) Shinkura R, Ito S, Begum NA et al. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2004;5:707-712.
- (129) Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*. 1998;160:3555-3561.
- (130) Cerutti A, Zan H, Schaffer A et al. CD40 ligand and appropriate cytokines induce switching to IgG, IgA, and IgE and coordinated germinal center and plasmacytoid phenotypic differentiation in a human monoclonal IgM+IgD+ B cell line. *J Immunol*. 1998;160:2145-2157.
- (131) Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Casali P. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *J Immunol*. 1998;161:5217-5225.
- (132) Fujieda S, Saxon A, Zhang K. Direct evidence that gamma 1 and gamma 3 switching in human B cells is interleukin-10 dependent. *Mol Immunol*. 1996;33:1335-1343.
- (133) Schluter D, Kaefer N, Hof H, Wiestler OD, Deckert-Schluter M. Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain. *Am J Pathol*. 1997;150:1021-1035.

- (134) Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*. 1997;89:1288-1298.
- (135) Vaandrager JW, Schuurig E, Kluin-Nelemans HC et al. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood*. 1998;92:2871-2878.
- (136) Nardini E, Rizzi S, Capello D et al. Most immunoglobulin heavy chain switch mu rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia are internal deletions. *FEBS Lett*. 2002;518:119-123.
- (137) Tate G, Hirayama-Ohashi Y, Kishimoto K, Mitsuya T. Novel BLIMP1/PRDM1 gene mutations in B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;172:151-153.
- (138) Cattoretti G, Angelin-Duclos C, Shaknovich R et al. PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage. *J Pathol*. 2005;206:76-86.
- (139) Garcia JF, Roncador G, Garcia JF et al. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91:467-474.
- (140) Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet*. 2000;34:1-19.
- (141) Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lin-Lee YC, Ford RJ. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood*. 2005;106:3940-3947.
- (142) Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221-227.
- (143) Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*. 1999;18:6938-6947.
- (144) Basso K, Klein U, Niu H et al. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*. 2004;104:4088-4096.
- (145) Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM et al. Signatures of the immune response. *Immunity*. 2001;15:375-385.
- (146) Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*. 2004;350:1828-1837.
- (147) Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:348-359.
- (148) Willis TG, Jadayel DM, Du MQ et al. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*. 1999;96:35-45.
- (149) Ngo VN, Davis RE, Lamy L et al. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*. 2006;441:106-110.

- (150) Fakruddin JM, Chaganti RS, Murty VV. Lack of BCL10 mutations in germ cell tumors and B cell lymphomas. *Cell*. 1999;97:683-684.
- (151) Pajer P, Pecenka V, Kralova J et al. Identification of potential human oncogenes by mapping the common viral integration sites in avian nephroblastoma. *Cancer Res*. 2006;66:78-86.
- (152) Wlodarska I, Veyt E, De Paepe P et al. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. *Leukemia*. 2005;19:1299-1305.
- (153) Barrans SL, Fenton JA, Ventura R et al. Deregulated over expression of FOXP1 protein in diffuse large B-cell lymphoma does not occur as a result of gene rearrangement. *Haematologica*. 2007;92:863-864.
- (154) Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA*. 2004;10:1813-1819.
- (155) Barad O, Meiri E, Avniel A et al. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res*. 2004;14:2486-2494.
- (156) Liu CG, Calin GA, Meloon B et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9740-9744.
- (157) Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*. 2004;5:R68.
- (158) Nelson PT, Baldwin DA, Scearce LM et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods*. 2004;1:155-161.
- (159) Sun Y, Koo S, White N et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:e188.
- (160) Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods*. 2004;1:47-53.
- (161) Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005;11:241-247.
- (162) Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008.
- (163) Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PL, Aguiar RC. Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;181:8-15.
- (164) Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den BA. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia*. 2006;20:1931-1936.

- (165) Kluiver J, van den BA, de Jong D et al. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene*. 2007;26:3769-3776.
- (166) Wang M, Tan L, Dijkstra M et al. miRNA analysis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: proliferation centres characterized by low miR-150 and high BIC/miR-155 expression. *J Pathol*. 2008;215:13-20.
- (167) Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;109:4944-4951.
- (168) Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353:1793-1801.
- (169) Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005;65:6029-6033.
- (170) Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2257-2261.
- (171) Si ML, Zhu S, Wu H et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26:2799-2803.
- (172) Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, Pilpel Y, Ju J. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2014-2024.
- (173) Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS et al. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008.
- (174) Kluiver J, Poppema S, de Jong D et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. 2005;207:243-249.
- (175) Thai TH, Calado DP, Casola S et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*. 2007;316:604-608.
- (176) Tam W, Dahlberg JE. miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:211-212.
- (177) John B, Enright AJ, Aravin A et al. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004;2:e363.
- (178) Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438:685-689.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. Martina Deckert für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung anzufertigen, für die freundliche Bereitstellung einer produktiven Arbeitsumgebung und für die von ihr aufgewendete Zeit und Mühe für dieses Projekt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jens Brüning, der freundlicherweise die nominelle "Vaterschaft" dieser Arbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln übernommen hat und Herrn Prof. Dr. Eric von Elert, für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Bei meinen Mitdoktoranden und der gesamten AG Deckert möchte ich mich für gute Zusammenarbeit, wissenschaftlichen Austausch, zahlreiche Hilfestellungen und Gespräche ausdrücklich bedanken.

Besonders bedanke ich mich bei Prof. Dr. Reiner Siebert und Dr. Iñaki Subero (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Kiel) für die gute Kooperation, die freundliche Unterstützung und die Möglichkeit der Labornutzung für einen Teil dieser Arbeit.

Zum Schluß möchte ich mich bei meinen Eltern für ihr immerwährendes Interesse, die Unterstützung während der Doktorandenjahre und meines gesamten Studiums und die vielen Ermutigungen und bei Eva "Schevchen" Blonien für ihre Geduld mit mir, ihren unerschöpflichen Optimismus und ihr Vertrauen in mich ganz herzlich bedanken!

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Jens Brüning betreut worden.

.....
Datum Unterschrift

Teilpublikationen:

- (1) Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Courts C et al. *Absence of immunoglobulin class switch in primary lymphomas of the central nervous system.* Am J Pathol. 2005;166:1773-1779.
- (2) Courts C, Montesinos-Rongen M, Martin-Subero JI et al. *Transcriptional profiling of the nuclear factor-kappaB pathway identifies a subgroup of primary lymphoma of the central nervous system with low BCL10 expression.* J Neuropathol Exp Neurol. 2007;66:230-237.

eingereicht zur Veröffentlichung:

- (3) Courts C, Montesinos-Rongen M, Brunn A et al. *Recurrent inactivation of the PRDM1 gene in primary central nervous system lymphoma.* in press bei: J Neuropathol Exp Neurol. 2008;

Abstract

Primary lymphomas of the central nervous system (PCNSL) are diffuse-large B-cell lymphoma confined to the CNS in the absence of systemic disease with rising incidence. They are associated with a very poor prognosis. PCNSL cells harbour a “late germinal center exit” phenotype with active somatic hypermutation.

The aim of the present study was to analyze molecular mechanisms potentially involved in the pathogenesis of PCNSL.

For a precise description of the maturation state of the tumor cells of PCNSL we examined whether PCNSL perform immune globulin class switch recombination (CSR) as subsequent step of maturation. Remarkably, immune globulin class switching was absent from PCNSL in all analyzed cases. Downregulation of activation-induced cytidine deaminase and internal deletions of the switch- μ -region were identified in 6 of 10 and 6 of 11 cases, respectively and may account for the impaired CSR.

To investigate whether further steps important for differentiation are blocked we examined whether terminal B-cell differentiation is disturbed in PCNSL by inactivated positive regulatory domain I protein (PRDM1). PRDM1 is the central regulator for terminal B-cell differentiation. A comprehensive analysis of the mutational and expression status of PRDM1 showed that PRDM1 was targeted by inactivating mutations thereby abrogating terminal differentiation in 4 of 21 PCNSL resulting in the stabilization of a highly proliferative phenotype with reduced apoptosis. In general, highly active proliferation and reduced apoptosis are hallmarks of PCNSL. Thus, the present work aimed to elucidate the molecular conditions underlying these properties. Gene expression analysis performed by quantitative PCR revealed a constitutive activation of the NF κ B pathway in PCNSL. This important prerequisite for the pathogenesis of several tumors is associated with high malignancy and reduced apoptosis. PCNSL showed strong dysregulation of the antiapoptotic and proliferation inducing NF κ B targets BCL2, cFLIP, and CCND2, respectively.

To explain the particularly poor prognosis associated with PCNSL the present work analyzed the expression status of forkhead box protein 1 (FOXP1) in PCNSL. Recently, overexpression of FOXP1 was reported to be associated with adverse prognosis even within the non-GCB subgroup of systemic DLBCL carrying a poor prognosis. All PCNSL analyzed exhibited a preferential expression of truncated FOXP1 isoforms as well as a downregulation of the normal isoform. This could possibly explain the generally poor prognosis associated with this lymphoma entity.

In addition, posttranscriptional mechanisms of regulation play an important role in tumorigenesis. Micro-RNAs (miRNA) are important agents in posttranscriptional modification of gene expression. Herein, we are first to show that dysregulation of miRNA expression also occurs in PCNSL and may influence its pathogenesis.

In conclusion, the present work contributes to the comprehension of the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of PCNSL and suggests potentialities for diagnostically and/or therapeutically relevant subclassifications.

Lebenslauf von Cornelius Courts

Geburtsdatum und -ort: 10. September 1977; Kleve
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Akademischer Grad: Diplom-Biologe

Schulbildung und Abschluß

- 1985 - 1989 Gemeinschaftsgrundschule Dansweiler
- 1989 - 1997 Abteigymnasium Brauweiler
- 1997 Erlangung der allg. Hochschulreife

Zivildienst

- 1997 - 1998 Zivildienst im Sana-Klinikum in Hürth

Diplomstudium und Abschluß

- 1998 - 2003 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
- 01/2003 - 09/2003 Diplomarbeit in der AG Kochanek am ZMMK Köln, Universität zu Köln
- 09/2003 Diplom in Biologie nach 10 Fachsemestern

Promotionsstudium

- 04/2004 - 07/2008 Promotionsstudium an der Abteilung für Neuropathologie, Uniklinikum Köln