

Genomische Aberrationen bei primären Lymphomen des Zentralnervensystems

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

Zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Heinrich Schwindt

aus Ulm

Köln, 2008

Berichterstatter/in: Prof. Dr. Thomas Wiehe

Prof. Dr. Martina Deckert

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Entwicklung von B-Lymphozyten.....	1
1.2 Genomische Aberrationen bei B-Zell Lymphomen.....	5
1.2.1 Mutationen und Translokationen in der BCL6 Region.....	5
1.2.1 Genomische Veränderungen in den Genregionen von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgen.....	7
1.3 Primäre Lymphome des Zentralen Nervensystems (PCNSL).....	8
1.3.1 Klassifikation, Morphologie und Immunphänotyp von PCNSL.....	8
1.3.2 Epidemiologie.....	10
1.3 Untersuchungsmethoden genomischer Veränderungen von Lymphomen.....	10
1.3.1 Zytogenetische Methoden.....	10
1.3.2 Long-Distance-Inverse PCR (LDI-PCR).....	12
1.3.3 DNA-Microarray-Technologien.....	14
1.4 Fragestellung.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material.....	17
2.1.1 Tumormaterial.....	17
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien.....	17
2.1.3 Kits und Enzyme.....	19
2.1.4 Antikörper.....	20
Primärantikörper.....	20
Sekundärantikörper.....	20
2.1.5 Primer für die LDI-PCR.....	21
2.1.6 Geräte & Arbeitsmaterialien.....	23
2.1.7 Software.....	25
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	26
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Vorbereitung des Probenmaterials.....	29
2.2.2 Histochemische Methoden.....	30
2.2.3. Microarray-Analysen.....	31
3 Ergebnisse	43
3.1 100K GeneChip® Mapping.....	43
3.1.1 Qualitätskontrolle der Hybridisierung.....	43
3.1.2. Genomweite Bestimmung von Imbalancen.....	44

3.1.3. Genomweite Bestimmung von pUPD	54
3.2. Identifizierung von Translokationspartnern durch LDI-PCR	57
3.2.1 Translokationspartner des BCL6 Gens	57
3.2.2 Translokationen im IgH Genlocus	58
4. Diskussion	63
4.1 Microarray Untersuchungen.....	63
4.1.1 Minimale Aberrante Regionen (MCR)	64
4.1.2 Größere detektierte Imbalancen	67
4.2 Chromosomale Translokationen	69
4.2.1 Translokationspartner von BCL6	70
4.2.2 Untersuchung von PCNSL mit IGH-Translokationen	71
5. Zusammenfassung.....	73
6. Literaturverzeichnis.....	75
Abstract.....	
Erklärung.....	
Lebenslauf von Heinrich Schwindt.....	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Umlagerungsvorgänge bei der B-Zell-Reifung und einige ihrer Fehlfunktionen.	2
Abbildung 2: Schema zur Reifung der B-Lymphozyten innerhalb des Keimzentrums.....	3
Abbildung 3: Zellulärer Ursprung der B-Zell Lymphome.....	5
Abbildung 4: Immunhistologische Färbung von PCNSL.....	9
Abbildung 5: Interphase Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung eines PCNSL Zellkerns mit BCL6 Markern.....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Long-Distance-Inverse PCR Methode zur Identifikation unbekannter Translokationspartner.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs einer 100K-GeneChip® Analyse	15
Abbildung 8: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome: Übersicht	45
Abbildung 9: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 3	46
Abbildung 10: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 4	46
Abbildung 11: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 6	47
Abbildung 12: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 7	47
Abbildung 13: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 8	48
Abbildung 14: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 9	48
Abbildung 15: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 10	49
Abbildung 16: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 12	49
Abbildung 17: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 14	50

Abbildung 18: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 18	50
Abbildung 19: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 19	51
Abbildung 20: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom X	51
Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung der pUPD in den 19 PCNSL	55
Abbildung 22: Heatmap von Chromosomenbande 6p.....	56
Abbildung 23: Heatmap von Chromosomenbande 9p.....	57
Abbildung 24: Ausschnitt aus dem Genlocus von <i>BCL6</i>	60
Abbildung 25: Schematische Darstellung und Nukleotidsequenz der <i>BCL6</i> Translokationen.....	61
Abbildung 26: Fotografie eines Agarosegels mit LDI-PCR Produkten.....	62

Abkürzungen

Ab	Antikörper (engl.: antibody)
ABC	aktivierte B-Zelle (engl.: activated B-cell)
aCGH	Microarray-basierte CGH
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom (engl.: acquired immunodeficiency syndrome)
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BCR	B-Zell Rezeptor (engl.: B-cell receptor)
BL	Burkitt Lymphom
bp	Basenpaar/e
BRLMM	Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier
CD	Cluster-Differenzierungsantigene (engl.: cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complimentary DNA)
CGH	vergleichende Genomhybridisierung (engl.: Comparative Genomic Hybridization)
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CNAG	Copy Number Analyser for GeneChip® (Software)
CNAT	Copy Number Analysis Tool (Software)
CNV	Copy Number Variation
CSR	Immunglobulin-Klassenwechsel (engl.: class switch recombination)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH₂O	destilliertes Wasser
DLBCL	Diffus-großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (engl.: diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom

GC	Keimzentrum (engl.: germinal center)
GCB	Keimzentrums-B-Zelle (engl.: germinal center B-cell)
h	Stunde(n)
H₂O	Wasser
HMM	Hidden Markov Model
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high pressure liquid chromatography)
iFISH	Interphase-FISH
Ig	Immunglobulin
IgH	Schwere Kette(n) des Immunglobulin
Igκ, Igλ	leichte Kette(n) des Immunglobulin
IgA, IgD,	Isotypen des Immunglobulins
IgG, IgM	
IGH, IGL	Gene der Kette(n) des Immunglobulin
IMISE	Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie
kb	Kilobasenpaare
LOH	Verlust der Heterozygotie (engl.: loss of heterozygosity)
MALT	Mucosa-associated Lymphoid Tissue
Mb	Megabasenpaare
min	Minute(n)
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nt	Nukleotide
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCNSL	Primäres ZNS-Lymphom (engl.: primary central nervous system lymphoma)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
pUPD	partielle uniparentale Disomie
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms

RE	Restriktionsenzym
REAL	Revised European American Lymphoma Classification
RefSeq	NCBI Referenz Sequenzen
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
s; sec	Sekunde(n)
SHM	somatische Hypermutation
TBE	Trisborat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: tris buffered saline)
TMACL	Tetramethylammoniumchlorid
TSG	Tumorsuppressorgen
UCSC	University of California, Santa Cruz
ün	über Nacht
URL	Uniformer Ressourcen-Lokator (für die Angabe einer Internetadresse)
V(D)J	V: Variable, D: Diversity, J: Joining (Genabschnitte bei der somatischen Rekombination)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: world health organization)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung von B-Lymphozyten

Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen¹. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr und werden in B-, T- und NK-Zellen unterteilt. Die B-Zellen oder B-Lymphozyten können bei Kontakt ihrer spezifischen Rezeptoren (BCR: B-Cell receptor) mit passenden Antigenen aktiviert werden. Hierdurch wird ein Proliferations- und Reifungsprozess in Gang gesetzt, an dessen Ende die massive Produktion spezifischer Antikörper steht, die bei der Antigenbekämpfung helfen. Die Reifung der B-Lymphozyten findet im Knochenmark, im peripheren Blut sowie in den lymphatischen Organen statt. Die Vielfalt unterschiedlicher antigenspezifischer BCR-Varianten ermöglicht die Erkennung einer großen Zahl verschiedener Antigene. Dabei besitzt jede aus dem Knochenmark freigesetzte B-Zelle eine für sie spezifische BCR-Variante. Diese Variabilität wird durch eine geregelte intrachromosomale Rekombination der variablen Regionen in den Immunglobulin-Genen erreicht. Die Immunglobuline (Ig), die aus zwei identischen schweren Ketten (IgH) und zwei identischen leichten Ketten (entweder Igk oder Igl) bestehen, werden beim Menschen durch die Gene *IGH* in Chromosomenbande 14q32, *IGK* in 2p12 und *IGL* in 22q11 kodiert. Das humane Keimbahn-*IGH*-Gen setzt sich aus über 40 funktionellen V- (variable), 25 D- (diversity), sechs J- (joining) und neun C-Segmenten (constant) zusammen². Ähnliches gilt auch für die *IGL* und *IGK* Leichtkettengene, denen allerdings die D- und C-Segmente fehlen. Im Knochenmark findet eine homologe Rekombination der V, D und J Regionen des *IGH*-Gens und der V und J Regionen von *IGK* und/oder *IGL* statt³, wobei die gesamte zwischen den umgelagerten Segmenten gelegene genomische DNA ausgeschnitten und entfernt wird (Abbildung 1A). Hierdurch kommt es zu einer hohen Variabilität der zunächst gebildeten und auf den Zelloberflächen präsentierten funktionellen Immunglobulinen des IgM- sowie des IgD-Isotypen in reifen naiven B-Zellen. Die Bezeichnung der Isotypen IgM und IgD bezieht sich auf die gebildeten konstanten Regionen der schweren Kette (C μ bzw. C δ), die durch alternatives Spleißen entstehen. Zellen, bei denen die Umlagerungen nicht zu funktionstüchtigen Immunglobulinen geführt haben, gehen in Apoptose⁴.

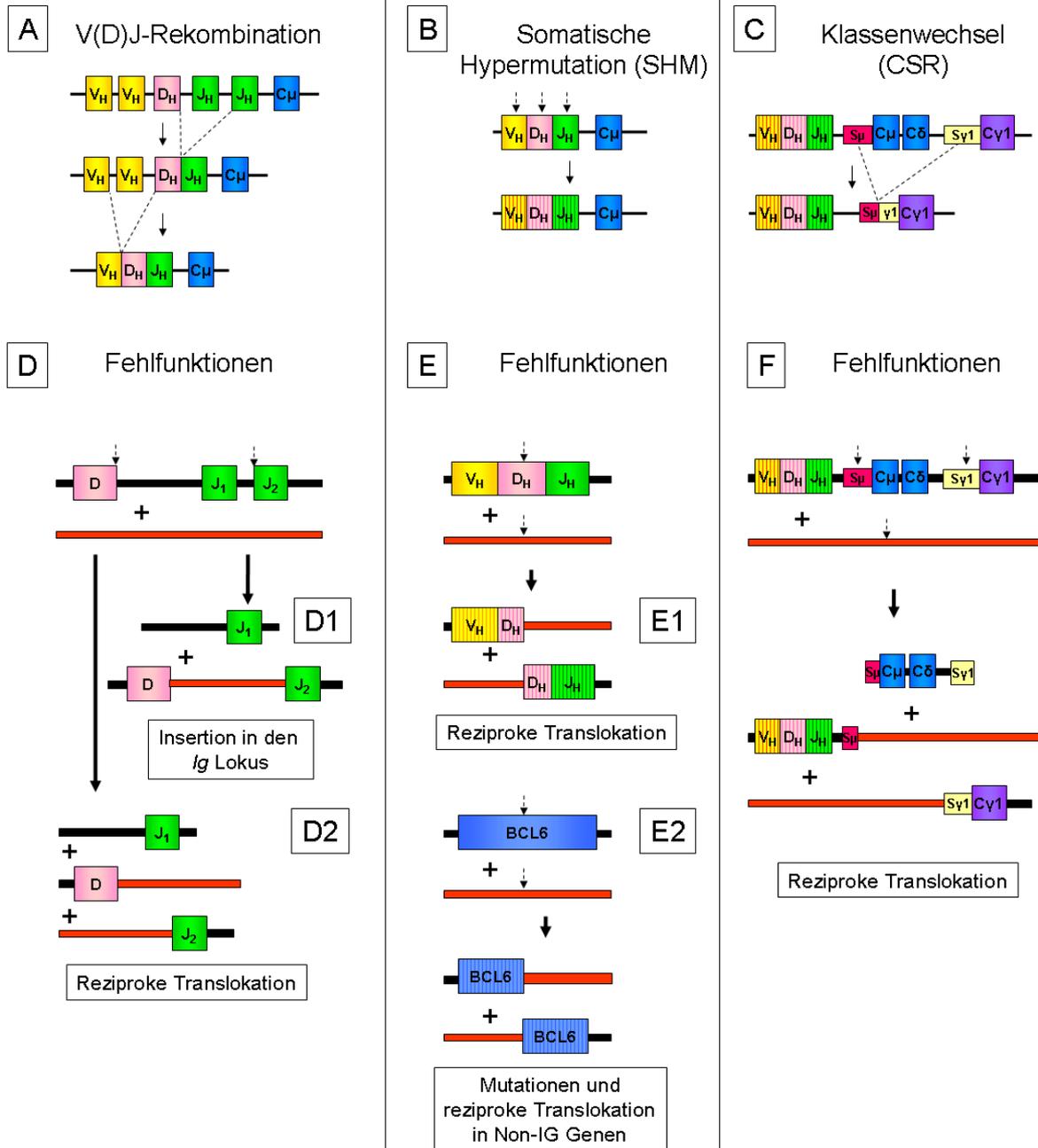


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Umlagerungsvorgänge bei der B-Zell-Reifung und einige ihrer Fehlfunktionen. A: V(D)J-Rekombination; B: Somatische Hypermutation; C: Klassenwechsel; D-F: Fehlfunktionen der jeweiligen Umlagerungsmechanismen. Gestrichelte Pfeile markieren Doppelstrangründe der DNA (modifiziert nach Küppers et al., 2001⁴).

Nach dem Verlassen des Knochenmarks zirkuliert die naive periphere B-Zelle zunächst im Blutkreislauf. Wird sie auf ihrem Weg durch ein passendes Antigen aktiviert, wandert die Zelle zu den sekundären lymphatischen Organen wie z.B. Lymphknoten oder Milz und beginnt zu proliferieren. In den dort gebildeten Keimzentren (GC: germinal center) finden die somatische Hypermutation (SHM: somatic hypermutation) und der Klassenwechsel (CSR: class switch recombination) der Immunglobuline statt⁵⁻⁷. Bei der SHM werden unter dem Einfluss des Enzyms „Activation Induced Cytine Deaminase“ (AID) Mutationen in die variablen Regionen der IGH und IGL Ketten eingeführt. Hierbei handelt es sich meist um Punktmutationen. Vereinzelt können jedoch auch Deletionen und Insertionen auftreten (Abbildung 1B). In den meisten Fällen bewirken die Mutationen eine Herabsetzung der Antigenaffinität des BCR. Bei einigen wenigen führt die Einführung der Mutationen jedoch zu einer Erhöhung der Antigenaffinität, welche zu einer Selektion dieser antigenspezifischen Zellen führt. B-Zellen, die kein oder nur ein sehr schwaches Signal von ihrem BCR erhalten, werden apoptotisch (Abbildung 2).

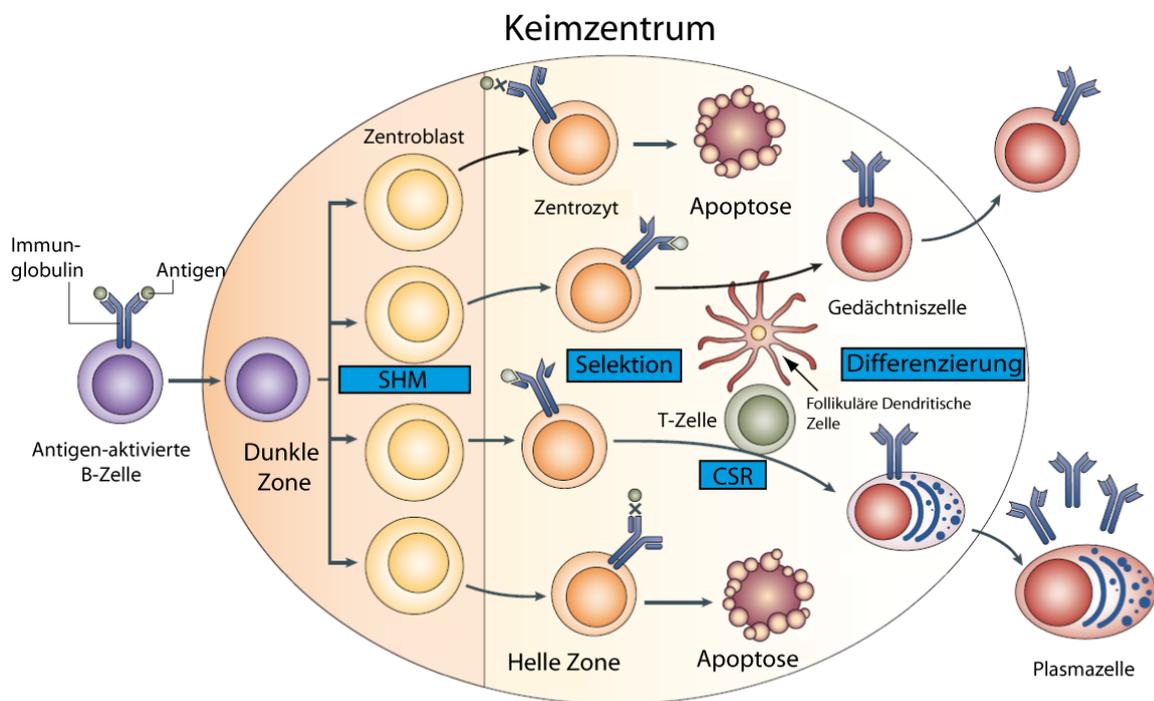


Abbildung 2: Schema zur Reifung der B-Lymphozyten innerhalb des Keimzentrums. SHM: Somatische Hypermutation; CSR: Klassenwechsel (modifiziert nach Klein et al. 2008⁸).

Beim Klassenwechsel wird durch Rekombination der C-Segmente des *IGH*-Locus die Zusammensetzung der schweren Kette verändert. Die Rekombination erfolgt hierbei über homologe Switch-Regionen (S_{μ} , S_{γ} , S_{α} oder S_{ϵ}) ebenfalls unter Einfluss von AID. Die genomische DNA zwischen den umgelagerten Switch-Regionen wird dabei entfernt, so dass nicht mehr die Isotypen IgM (C_{μ}) und IgD (C_{δ}) exprimiert werden, sondern IgG (C_{γ}), IgA (C_{α}) oder IgE (C_{ϵ}) (Abbildung 1C). Anschließend differenzieren die B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu langlebigen Gedächtniszellen und verlassen das Keimzentrum (Abbildung 2). B-Zellen können anhand der Expression so genannter Cluster-Differenzierungsantigene (CD) auf der Zelloberfläche ihrem Entwicklungsstadium zugeordnet werden. Die Zusammensetzung dieser Oberflächenmoleküle verändert sich im Laufe der Entwicklung und Reifung von der Stammzelle bis zur ausdifferenzierten Plasma- oder Gedächtniszelle kontinuierlich. Anhand einer Immunphänotypisierung lassen sich diese Zellen somit einem bestimmten Reife- bzw. Differenzierungsgrad zuordnen. Die Expression dieser CD Antigene bei malignen Neoplasien lymphatischer Zellen ermöglicht somit Rückschlüsse auf den möglichen Differenzierungsgrad dieser Tumorzellen. Humane B-Zell Lymphome werden jeweils einem angenommenen natürlichen Gegenpart der B-Zell-Entwicklung zugeordnet. Die meisten B-Zell-Lymphome leiten sich von Keimzentrums- oder post-Keimzentrums-B-Zellen ab, was die wichtige Rolle der Keimzentrumsreaktion bei der Pathogenese maligner Lymphome unterstreicht. Abbildung 3 zeigt einen Überblick über die angenommenen Ursprünge einzelner B-Zell Lymphomentitäten.⁹⁻¹³

Zellulärer Ursprung der B-Zell Lymphome

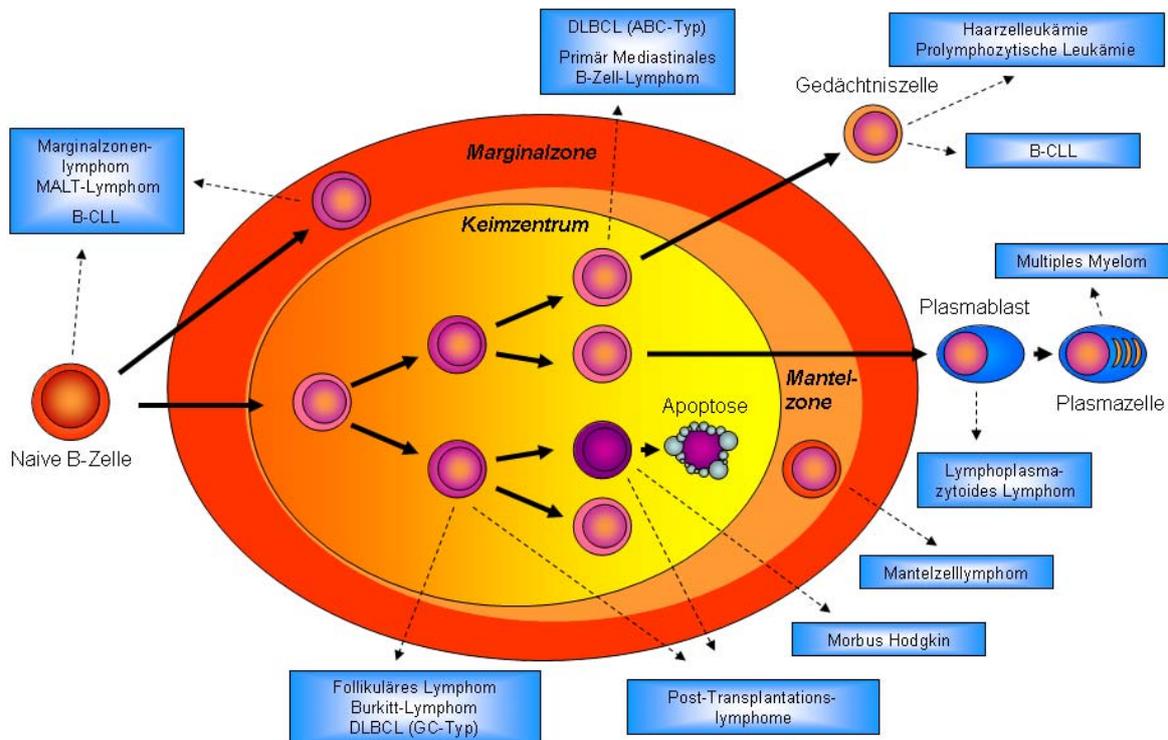


Abbildung 3: Zellulärer Ursprung der B-Zell Lymphome (Modifiziert nach Küppers, 2005²).

1.2 Genomische Aberrationen bei B-Zell Lymphomen

1.2.1 Mutationen und Translokationen in der BCL6 Region

In nahezu allen Lymphomentitäten lassen sich aberrante genomische Veränderungen nachweisen^{4,14}. In der Literatur werden sowohl Mutationen, Verluste und Zugewinne von genomischem Material¹⁵⁻²⁴, epigenetischen Veränderungen²⁵⁻³² als auch Translokationen⁴ beschrieben. Unter balancierten Translokationen versteht man genomische Umlagerungen bzw. den Austausch von Genmaterial zwischen nicht-homologen Chromosomen. Dabei kommt es häufig zu Aneinanderlagerungen von Teilen unterschiedlicher Gene. Dies kann sowohl zu einer Zerstörung oder Inaktivierung der betroffenen Gene als auch zu einer Deregulierung der Genexpression führen oder eine Expression von Fusionsprodukten verursachen, die aus Teilen beider betroffener Gene bestehen¹⁴. Daraus können sich unterschiedliche Konsequenzen auf die

Signaltransduktion der Zellen ergeben, die eine Tumorentstehung begünstigen oder diese verursachen: Zum einen kann die Expression von funktionsfähigen Tumorsuppressorgenen verhindert werden. Außerdem kann es zu einer Deregulierung der Expression von Proto-Onkogenen kommen. Eine weitere Konsequenz besteht in der Veränderung der Primärstruktur von Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen, wodurch deren Abbau verhindert oder deren Wirksamkeit beeinflusst werden kann. Translokationen können somit eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung spielen. Bei der ersten nachgewiesenen Translokation in Tumorzellen handelte es sich um das sogenannte Philadelphia-Chromosom.³³ Bei dieser typischerweise in chronisch myeloischen Leukämien auftretenden Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 23 kommt es zu einer Fusion der Gene *BCR* und *ABL1*. Die erste nachgewiesene Translokation in Lymphomzellen betrifft die t(8;14)(q24;q32) Translokation in Burkitt-Lymphomen, bei der es zu einer Aneinanderlagerung des Protooncogens *c-myc* und des Genlocus *IgH* kommt. Dabei gerät das *c-myc* Gen unter den Einfluss eines Enhancers im Bereich des *IgH* Genes, was unmittelbar zu einer deregulierten Expression von c-Myc, einem potenten Transkriptionsfaktor führt³⁴. Mittlerweile wurden rekurrente Translokationen in nahezu allen Tumorentitäten nachgewiesen. Die häufigsten Translokationen in B-Zell-Lymphomen involvieren die *Ig* Genloci. Ursächlich dafür sind fehlerhafte Prozesse bei der V(D)J-Rekombination, bei der SHM und beim CSR (Abbildung 1D-F)⁴. In diffus-großzelligen Lymphomen vom B-Zell-Typ (DLBCL: diffuse large B-Cell lymphoma), zu deren Entität die hier untersuchten primären Lymphome des Zentralnervensystems (PCNSL: primary central nervous system lymphoma) zugeordnet werden, kommt es neben der genannten häufigen Translokation der *Ig* Genloci in etwa 35-40% der Fälle zu einer Translokation, die den *BCL6* Locus in der q27 Bande des Chromosom 3 betrifft³⁵. Dabei können auch andere Partner als die *Ig* Genloci beteiligt sein. Ursächlich dafür ist die SHM, die auch bestimmte Bereiche des *BCL6* Locus verändern kann bzw. ein fehlerhafter CSR³⁶. Hierbei kommt es zu Mutationen und unter Umständen zu Doppelstrangbrüchen, die eine Rekombination mit anderen nicht-homologen Chromosomen zur Folge haben können. Neben *Ig* und *BCL6*, die physiologischerweise in Keimzentren dem Prozess der SHM unterliegen, sind in DLBCL auch noch Bereiche der Genloci der Proto-Oncogene *Fas* (CD95), *Pim-1*, *c-Myc*, *Pax-5*, und *RhoH/TTF* von Mutationen betroffen^{37, 38}. Das *BCL6* Gen umfasst 24.310 Basen und besteht aus 11 Exonen. Der kodierende Bereich beginnt in Exon 3. Die häufigsten Mutationen und Translokationen betreffen den sogenannten Major Translokation Cluster (MTC), der am 3' Ende von Exon 1 liegt³⁹. Translokationen in

dieser Region unterbrechen somit nicht den kodierenden Bereich von *BCL6*. Innerhalb des MTC gibt es eine besonders häufig von Mutationen betroffene Region, der Major Mutation Cluster (MMC). In dieser Region sind auch die zwei Dekamere eines *p53* Response Elementes angesiedelt. Beim Proto-Onkogen *BCL6* handelt es sich um einen wichtigen transkriptionalen Repressor, der bei der Formierung und Aufrechterhaltung der Keimzentrumsreaktionen eine entscheidende Rolle spielt. *BCL6* verhindert durch die Repression von *ATR*, *TP53*, *CHEK* und *CDKN1A* sowohl die Aktivierung von Reparaturmechanismen als auch von proapoptischen Prozessen, die normalerweise durch Genmutationen oder Genumlagerungen automatisch in Gang gesetzt würden. Innerhalb der B-Zell-Population beim gesunden Menschen wird *BCL6* ausschließlich in den Keimzentren exprimiert. Für die finale Differenzierung der selektionierten Keimzentrums-B-Zellen zu Gedächtnis- oder Plasmazellen ist eine Herunterregulierung der *BCL6* Expression erforderlich.

1.2.1 Genomische Veränderungen in den Genregionen von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen.

Weitere Ursachen der Lymphomentstehung können in Veränderungen oder Mutationen sogenannter Tumorsuppressorgene liegen. Proteine, die von Tumorsuppressorgenen kodiert werden, wirken unter anderem proapoptisch (*TP53*, *CD95*)⁴⁰, schützen vor DNA-Schäden (*ATM*)^{41, 42} oder regulieren den Zellzyklus (*CDKN2A/p16*)^{43, 44}. Tumorsuppressorgene können z.B. durch homozygote Deletionen, die den Verlust eines Tumorsuppressorgens zur Folge haben, oder durch Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, inaktiviert werden. Zur erfolgreichen Inaktivierung müssen allerdings entweder beide Allele des Gens mutiert sein (z.B. bei uniparentaler Disomie) oder es muss eine heterozygote Deletion im Bereich des mutierten Gens vorliegen⁴⁵. Außerdem können veränderte epigenetische Signaturen zur Unterdrückung der Genexpression des Tumorsuppressors führen^{25, 26, 28}. Viele der bekannten Tumorsuppressorgene, wie beispielsweise *CDKN2A/p16*, *RB1* und *PTEN*, wurden über die Detektion homozygoter Deletionen identifiziert⁴⁶⁻⁴⁸. Eine weitere Methode, um inaktivierte Tumorsuppressorgene zu identifizieren oder einzugrenzen, ist der Nachweis von Regionen mit partiellen uniparentalen Disomien (pUPD)⁴⁹. Diese entstehen, wenn nach Verlust eines der beiden elterlichen Chromosomen (oder eines Chromosomenabschnittes) die noch verbliebene Kopie dupliziert wird. Dieser Reparaturmechanismus der Zelle basiert wahrscheinlich auf

homologer Rekombination, ist aber bislang nicht im Detail verstanden. Der Vorgang hat dennoch wie eine hemizygote Deletion einen Verlust der Heterozygotie (LOH: loss of heterozygosity) zur Folge. In dem Fall, dass davon betroffene Gene rezessive Mutationen tragen oder durch epigenetische Veränderungen inaktiviert wurden, können sich diese durch die pUPD homozygot auswirken. In mehreren Studien konnten Tumorsuppressorgen-Inaktivierungen durch pUPD in hämatologischen Neoplasien wie akuter myeloischer Leukämie und soliden Tumoren wie Blasen- und Basalzellkarzinomen nachgewiesen werden^{50,51}.

1.3 Primäre Lymphome des Zentralen Nervensystems (PCNSL)

1.3.1 Klassifikation, Morphologie und Immunphänotyp von PCNSL

Gemäß WHO Klassifikation handelt es sich bei den PCNSL um extranodale, hochmaligne Lymphome⁵², die bei Erstmanifestation ausschließlich in Gehirnparenchym, Meningen und/oder Rückenmark auftreten. 92-98% aller PCNSL werden der Gruppe der DLBCL zugeordnet. PCNSL betreffen zwei voneinander verschiedene Fallgruppen: immunkompetente und immundefiziente Patienten. Zur letzteren Kategorie gehören Patienten, die von einer HIV-Infektion, medikamentösen Immunsupprimierung oder erblich bedingten Immunschwächen betroffen sind. Die Entstehung der PCNSL bei immundefizienten Personen ist in der Regel mit einem hohen Anteil (>95%) Epstein-Barr-Virus-positiver Tumoren assoziiert und unterscheidet sich diesbezüglich von den PCNSL immunkompetenter Patienten^{53,54}. Es wird davon ausgegangen, dass sich beide Gruppen in der Pathogenese der Erkrankung grundlegend voneinander unterscheiden. Gegenstand dieser Arbeit sind ausschließlich PCNSL immunkompetenter Patienten.

Das Lymphom kann unabhängig von der initialen klinischen Präsentation die gesamte craniospinale Achse betreffen. Es treten sowohl multifokale oder diffuse intracerebrale Tumoren als auch intramedulläre Lymphome auf. Histopathologisch wird das Gehirnparenchym durch große, blastäre Lymphomzellen diffus infiltriert. Die Lymphomzellen zeigen dabei ein auffälliges und charakteristisches angiozentrisches Wachstumsmuster mit Durchsetzung der Gefäßwände und Bildung sogenannter perivaskulärer Manschetten. Die Lymphomzellen befinden sich typischerweise innerhalb eines Infiltrates nicht maligner, reaktiver B-Lymphozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten sowie reaktiver residenter Zellen des ZNS. In der Regel

lassen sich eine reaktive astrozytäre Gliose sowie eine deutliche Aktivierung der Mikrogliazellen nachweisen. Als von B-Zellen abgeleitete, diffus großzellige Lymphome exprimieren PCNSL den Pan-B-Zellmarker CD19, CD20 und CD79a und zeichnen sich durch eine hohe Mitoseaktivität, einem hohen Proliferationsindex (in der Regel >50%) sowie Abwesenheit von Apoptose aus (Abbildung 4)⁵⁵. PCNSL weisen einen sogenannten „late germinal center exit“ Phänotyp^{56,57} auf: Während sich der Plasmazellmarker CD138 und der sehr frühe Keimzentrumsmarker CD 10 in der Mehrzahl der PCNSL nicht (mehr) nachweisen lassen, exprimiert die Mehrzahl der PCNSL den Differenzierungsmarker für GC-B-Zellen IRF4/MUM1 und den Keimzentrumsmarker BCL6, der im Rahmen dieser Arbeit noch näher untersucht wird.

Phänotypische Charakteristika von PCNSL

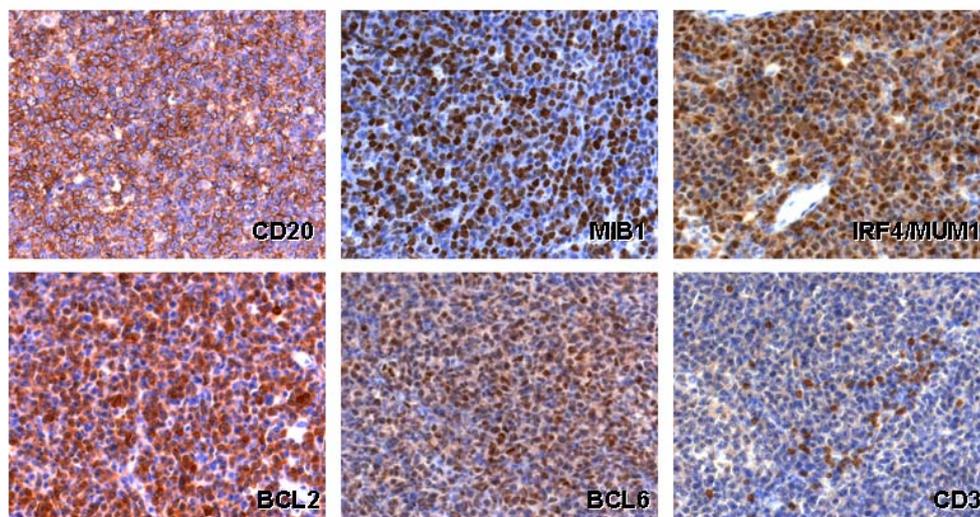


Abbildung 4: Immunhistologische Färbung von PCNSL. **CD20:** Cluster-Differenzierungsantigen, das von B-Zellen aller Entwicklungsstadien exprimiert wird, außer von Vorläufer B-Zellen und Plasmazellen; **MIB1:** Proliferationsmarker; **IRF4/MUM1:** Differenzierungsmarker für GC-B-Zellen; **BCL2:** Apoptoseinhibitor **BCL6:** Keimzentrumsmarker; **CD3:** Cluster-Differenzierungsantigen, das von allen T-Zellen exprimiert wird.

1.3.2 Epidemiologie

Die Inzidenzrate beläuft sich aktuell auf $4,6 \cdot 10^{-5}$ pro Jahr. Sie hat allerdings in den letzten drei Dekaden einen deutlichen Anstieg erfahren. Die alterskorrigierte Inzidenz verdreifachte sich im Zeitraum von 1973-1984 bis 1985-1997. PCNSL machen bis zu 6,6% aller primären malignen ZNS-Tumoren aus. Das Durchschnittsalter bei Diagnose liegt bei 60 Jahre. Die meisten Patienten sind zwischen 45 und 70 Jahre alt. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Prognose von PCNSL ist mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von im Mittel ein bis zwei Monaten ohne Therapie und einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 5% als äußerst schlecht einzustufen^{58, 59}.

1.3 Untersuchungsmethoden genomischer Veränderungen von Lymphomen

Die Untersuchung von PCNSL stellt die Forschung vor besondere Herausforderungen. Für diesen primären Hirntumor ist zum einen bisher noch kein Tiermodell bekannt. Zum anderen ist eine Proliferation der Zellen in Zellkultur bis heute noch nicht über einen Zeitraum gelungen, der wissenschaftliche Untersuchungen zulässt. Mögliche Ursachen hierfür könnten darin liegen, dass die PCNSL-Zellen auf direkte Zell-Zell Kontakte mit bestimmten Strukturen des ZNS oder auf bisher unbekannte oder noch nicht untersuchte Botenstoffe im ZNS angewiesen sind, um proliferieren zu können. Somit ist die Forschung auf die Untersuchung von Probenmaterial von Patienten beschränkt. Dabei handelt es sich in der Regel um stereotaktische Biopsien mit einer Gewebsmasse von nur wenigen Milligramm.

1.3.1 Zytogenetische Methoden

Als klassische zytogenetische Analyseverfahren haben sich bei der Untersuchung von Lymphomen die Karyotypisierung, die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder die vergleichende Genom-Hybridisierung (CGH: Comparative Genome Hybridization) bewährt⁶⁰. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, mit der bestimmte DNA-Sequenzen in Interphase-Kernen (iFISH) oder Metaphase-Kernen (mFISH) nachgewiesen werden können (da PCNSL nicht in Zellkultur genommen werden können, kommt hier nur das

iFISH Verfahren in Frage). Dazu wird eine komplementäre DNA-Sonde hergestellt, die heutzutage meist aus fluoreszenzmarkierten BAC/PAC-, Fosmid oder Cosmid-Klonen besteht. Nach Hybridisierung mit dem Zellkern können die Fluoreszenzsignale unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Durch zusätzliche Signale lassen sich chromosomale Zugewinne identifizieren, wohingegen das Fehlen von Signalen auf Verluste hinweist. Durch die Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe können unterschiedlich markierte Sonden gleichzeitig verschiedene Chromosomenregionen sichtbar machen. Neben chromosomalen Imbalancen können so auch strukturelle Rearrangements wie z.B. Translokationen nachgewiesen werden. Dazu werden zwei unterschiedlich markierte Sonden eingesetzt, die an Sequenzen binden, welche die potentielle Translokationsregion flankieren.

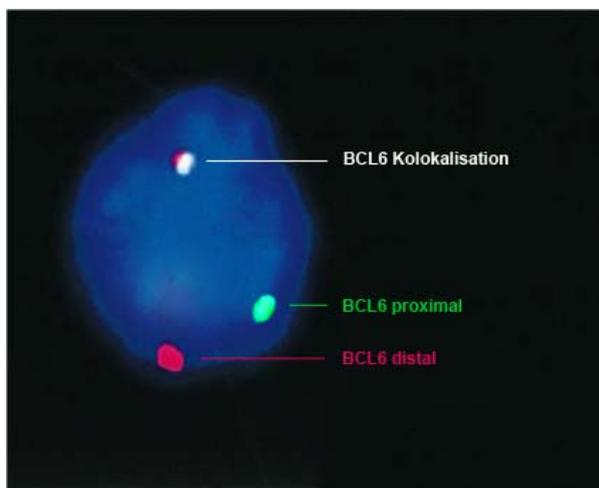


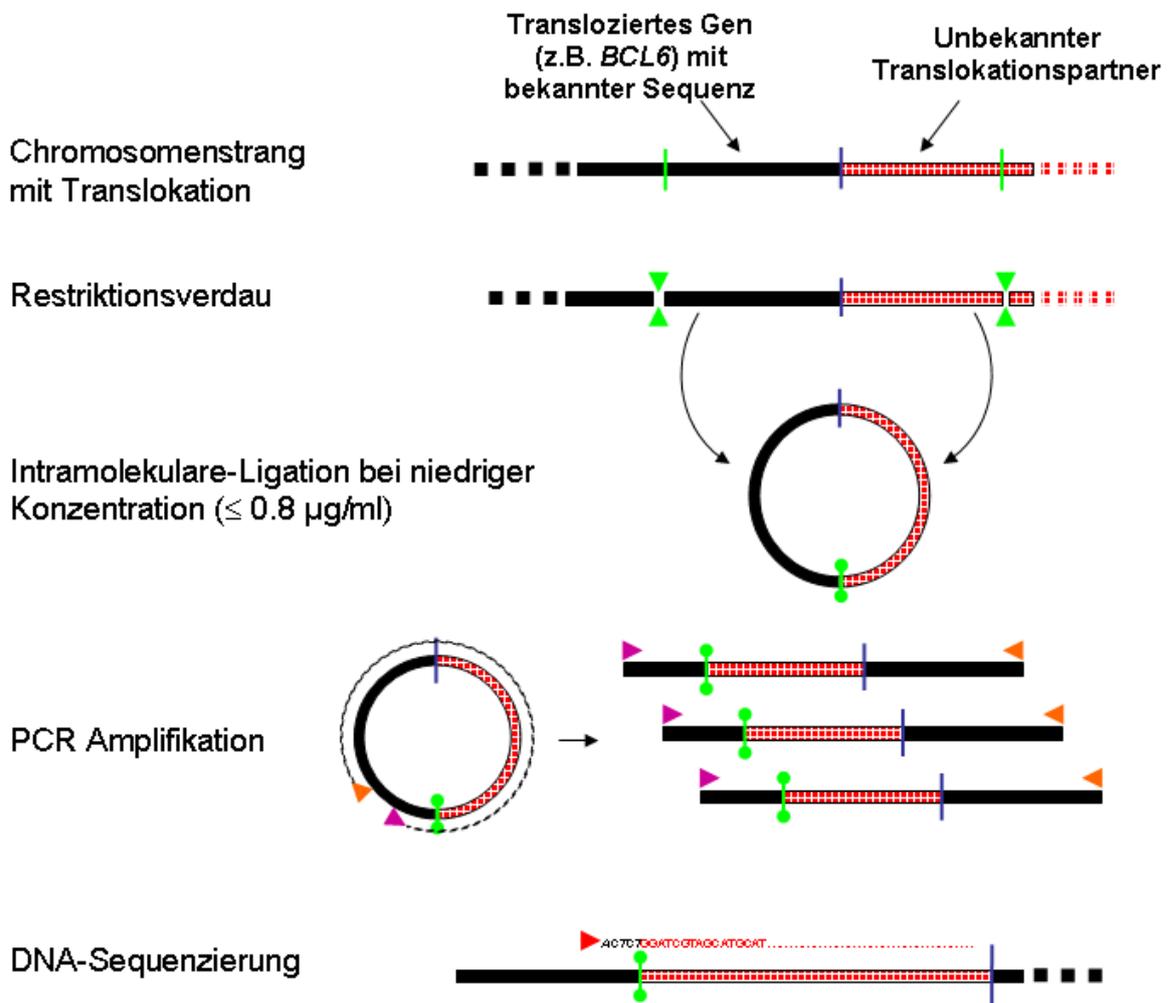
Abbildung 5: Interphase Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eines PCNSL Zellkerns mit BCL6 Markern. Der BCL6 Genlocus ist proximal grün und distal rot markiert. Die Kolokalisation markiert ein intaktes BCL6 Gen, die zwei einzelnen verschiedenfarbigen Punkte weisen einen Chromosomenbruch zwischen den Bindungsstellen der beiden unterschiedlich markierten Sonden nach. (Modifiziert nach Montesinos-Rongen et al. 2002⁶¹)

Liegt die DNA in natürlichem Zustand vor, lässt sich im Fluoreszenzmikroskop eine Colokalisation der beiden unterschiedlichen Sonden erkennen, die als ein doppelt fluoreszierender Fleck erscheint. Bei Vorliegen einer Translokation lassen sich dagegen zwei räumlich getrennte, unterschiedlich fluoreszierende Punkte ausmachen (Abbildung 2). Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen von BCL6-Translokationen wurden ausschließlich an Proben vorgenommen, bei denen zuvor das Vorliegen einer Translokation durch iFISH nachgewiesen worden war.

1.3.2 Long-Distance-Inverse PCR (LDI-PCR)

Während sich mit Hilfe von mFISH durch die Verwendung vieler unterschiedlich markierter Sonden beide von einer balancierten Translokation betroffenen Chromosome identifizieren lassen, ist bei der für PCNSL ausschließlich in Frage kommenden iFISH nur der Nachweis des Vorliegens einer Translokation innerhalb eines einzelnen untersuchten Gens möglich. Das unbekannte, an der Translokation beteiligte Chromosom bzw. Gen kann mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Zu deren Identifikation bedarf es weiterer molekularbiologischer Methoden. Hierfür eignet sich z.B. die Long-Distance-Inverse PCR (LDI-PCR). Bei dieser Methode wird zunächst die gesamte genomische DNA aus den Tumorzellen isoliert und anschließend mit einem einzelnen Restriktionsenzym fragmentiert, das in der Nähe der mutmaßlichen Bruchpunktregion die DNA schneidet (Abbildung 3)⁶²⁻⁶⁴. Nach Verdünnung der DNA-Fragmente werden diese anschließend wieder mit sich selbst ligiert, sodass ringförmige Plasmide entstehen, die eine Größe von mehreren Kilobasen aufweisen. Anschließend findet eine Nested-PCR statt. Die Primer werden dabei so gewählt, dass sie invers im Bereich zwischen der Bruchpunktregion und der ligierten Restriktionsschnittstelle liegen. Durch die inverse Anordnung der Primer wird nicht das kleinere Fragment amplifiziert, das sich zwischen den Primern befindet, sondern der große Bereich zwischen den Primern, der sowohl die Restriktionsschnittstelle als auch den Bruchpunkt des translocierten Gens enthält. Das amplifizierte PCR-Produkt wird anschließend gelelektrophoretisch überprüft und aufgereinigt. Liegt eine Translokation vor, so unterscheidet sich die Bandengröße in der Regel von der Größe des natürlichen Amplifikationsproduktes, da der Abstand zwischen den miteinander ligierten Restriktionsschnittstellen oberhalb und unterhalb der Bruchpunktregion variiert. Entsprechende Banden werden aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgt eine Sequenzierung des PCR-Produktes, die über die Restriktionsschnittstelle hinweg erfolgt. Die Sequenz kann dann mit Online-Datenbanken verglichen (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) und somit das andere translocierte Gen identifiziert werden.

Long-Distance-Inverse-PCR



- | | | | |
|---|------------------------------------|---|------------------------------|
| | Restriktionsschnittstellen | | Bruchpunkt der Translokation |
| ▲ | Restriktionsenzym | ▶ | PCR-Primer |
| ● | Ligierte Restriktionsschnittstelle | ▶ | Sequenzier-Primer |

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Long-Distance-Inverse PCR Methode zur Identifikation unbekannter Translokationspartner.

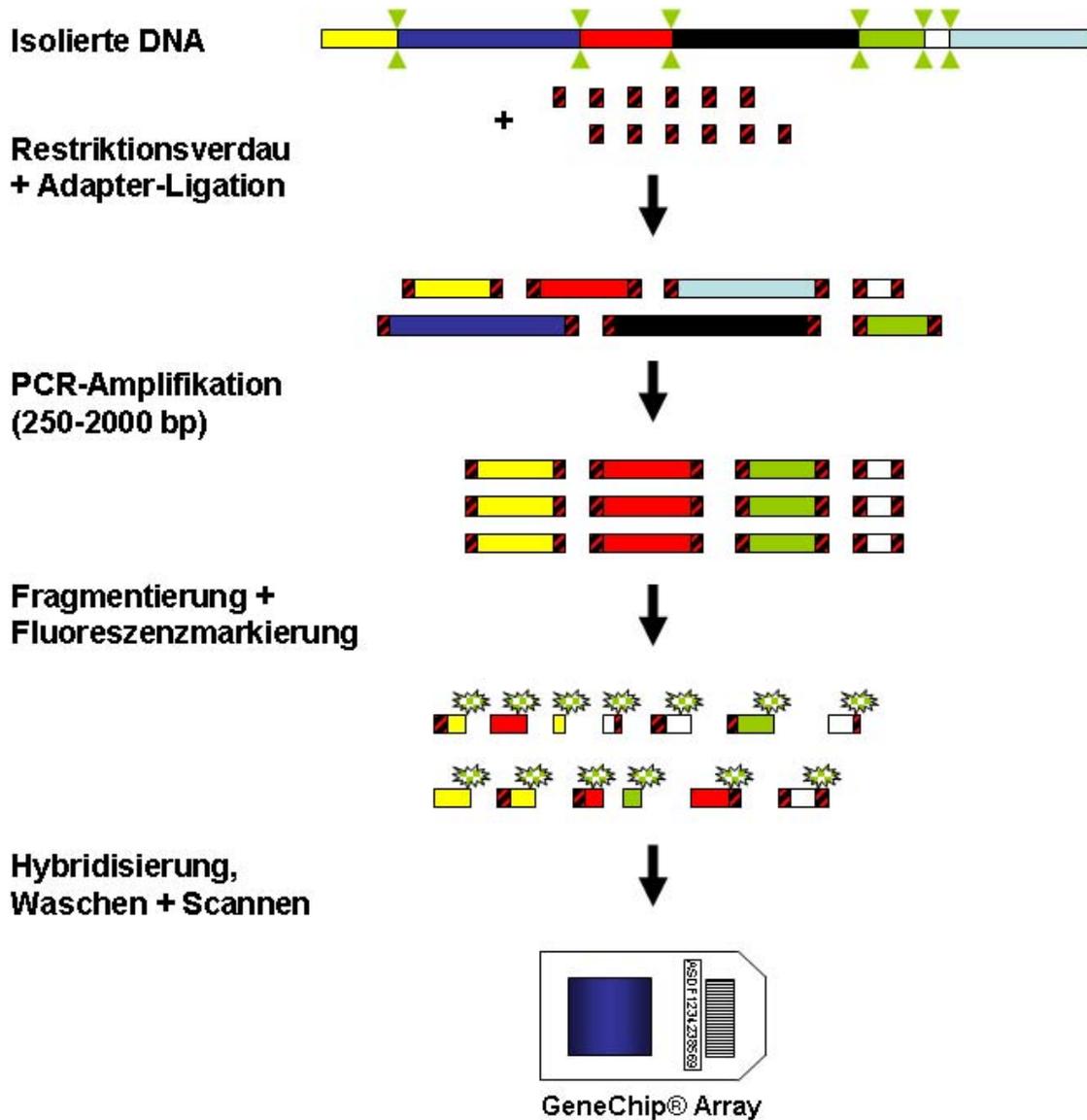
1.3.3 DNA-Microarray-Technologien

Microarrays sind miniaturisierte Proben-träger, auf denen Tausende in ihrer Identität bekannte Biomoleküle untergebracht werden können. Die spätere Identifizierung erfolgt dabei aufgrund der Position auf dem Microarray. Auf diese Weise können in einem einzigen Experiment mehrere tausend Einzelnachweise durchgeführt werden. DNA-Microarrays bestehen aus DNA-Fragmenten, synthetischen Oligonukleotiden oder cDNA-Molekülen und finden ihre Anwendung in der Genomforschung sowie in der Untersuchung differentieller Genexpression.

Affymetrix GeneChip® Mapping-Arrays

Bei der Herstellung von GeneChip®-Microarrays werden 25mer Oligonukleotide eingesetzt, die speziell für die Untersuchung bestimmter Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) entwickelt wurden. Die Oligonukleotide werden dabei in einem photolithographischen Verfahren direkt auf der Oberfläche der Arrays synthetisiert. Mit den in dieser Arbeit verwendeten 50K GeneChip® Human Mapping-Arrays können in einem einzigen Experiment mehr als 50.000 unterschiedliche SNPs analysiert werden. Für den 100K-Assay werden entsprechend zwei verschiedene 50K-Microarrays separat voneinander prozessiert und die generierten Daten der beiden Arrays anschließend digital vereint, um eine größere Auflösung zu erhalten. Die zu untersuchende Probe wird zunächst mit Hilfe eines Restriktionsenzym verdaut und die Fragmente anschließend mit entsprechenden Adapter-Nukleotiden ligiert (Abbildung 4). In der darauf folgenden PCR werden die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass selektiv nur Fragmente zwischen 250 bp und 2000 bp amplifiziert werden. Auf diese Weise kann die Komplexität des Genoms vor der Markierung von etwa 3 Gb auf ca. 60 Mb reduziert werden, wodurch die Effizienz der späteren Hybridisierung erhöht wird. Nach einer weiteren kontrollierten Fragmentierung durch DNase I erfolgt dann die Fluoreszenzmarkierung und die anschließende Hybridisierung auf dem Array. Bei dieser Methode wird keine Referenz-DNA benötigt, da die Daten bereits analysierter Normalkontrollen von der Firma Affymetrix zur Verfügung gestellt und in die Analysesoftware implementiert wurden^{65, 66}. Es empfiehlt sich jedoch die zusätzliche Implementierung laborinterner Kontrollen⁶⁷.

Affymetrix GeneChip® Array



 Restriktionsenzym  Adapter  Fluoreszenz-Farbstoff

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs einer 100K-GeneChip® Analyse

1.4 Fragestellung

Die Pathogenese, die zur Entstehung von PCNSL führt, ist noch weitgehend ungeklärt. Durch klassische zytogenetische Untersuchungen konnten bereits früher eine Reihe genetischer Aberrationen identifiziert und charakterisiert werden. Deren genaue Bedeutung sowie potentiell involvierte Tumorsuppressor- und Onkogene sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Die Verbesserung der Detektion und Kartierung sekundärer Aberrationen durch den Einsatz neuer Mikroarray-Techniken sowie die damit verbundene Eingrenzung potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene kann sowohl helfen, die Entwicklung und Progression dieser bösartigen Krankheit besser zu verstehen und auf dieser Grundlage neue Therapien zu entwickeln, als auch die prognostische Einordnung der Einzelfälle zu erleichtern.

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte:

Zum einen sollten anhand der Affymetrix 100K-GeneChip[®] Analyse neue Kandidatengene identifiziert werden, die möglicherweise in die Tumorgenese von PCNSL involviert sind. Dazu sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich durch diese Methode neue, bislang unbekannte, rekurrent deletierte oder zugewonnene Regionen in PCNSL identifizieren?
- Lassen sich durch die kombinierte Copy-Number und LOH-Analyse mittels Genotypisierung beim GeneChip[®]-Mapping in PCNSL Regionen identifizieren, in denen pUPD vorliegt? Wenn ja, gibt es rekurrent betroffene Regionen, und wie sind diese im Genom verteilt? Betreffen diese Aberrationen bekannte Tumorsuppressor- oder Proto-Onkogene.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die genauere Untersuchung und Charakterisierung bekannter Translokationen, die den *BCL6*- und den *IgH*-Locus betreffen.

Diesbezüglich sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich bisher unbekannte Translokationspartner nachweisen?
- Welche möglichen regulatorischen Auswirkungen können sich aus den Translokationen ergeben?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Tumormaterial

Zur Untersuchung kamen cryoasservierte Gewebeproben aus stereotaktischen Biopsien von PCNSL. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt, und es wurde sichergestellt, dass bei Arbeiten mit Patientenmaterial das informierte Einverständnis der Patienten gemäß der Erklärung von Helsinki eingeholt worden war.

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller und Ort
100 bp-DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma
Ameisensäure	Merck
Ammoniumchlorid	Sigma
APS Ammonium Persulfat	Amresco, Solon, OH, USA
Betain (5M)	Sigma
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Merck
DABCO	Sigma
DAPI	Merck
Denhardt's Solution 50x	Sigma
Desoxynucleosid-Triphosphat Set	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Dextransulfat	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNA-Ladepuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Eisessig	Merck
Elution Buffer (EB)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Eosin	Merck
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
ExoSAP-IT	USB Corporation, Cleveland, Ohio, US
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Glycerin	Sigma
Hämatoxylin	Merck
Heringssperma-DNA (10mg/ml)	Promega, Mannheim, Deutschland
Human Cot-1 DNA (1mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat	Merck
Kaliumkarbonat	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Milchpulver	Herler Cenovis GmbH, Radolfzell, Deutschland
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid	Sima
Natriumjodat	Merck
Natronlauge	Merck
NucleoFast® 96 PCR Plates	Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
Puregene DNA-Isolation Kit	Genra Systems, Minneapolis, MN, USA

Bezeichnung	Hersteller und Ort
RNase ZAP	Ambion
Salzsäure 37%, rauchend	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Amresco
Tris-Base [(Hydroxymethyl)Aminomethan]	Sigma
Tween-20 (Polyoxiethylensorbitanmonolaureat)	Bio-Rad
Wasser (HPLC-gereinigt)	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
Xylol p.a.	Roth
Zitronensäuremonohydrat	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma

2.1.3 Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Accuprime® Taq DNA Polymerase System	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Bioprime® DNA-Labeling System	Invitrogen
Clean & Concentrator Kits	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
ExoSAP-IT	USB Corporation, cleveland, Ohio, USA
Experion® RNA StdSens Analysis Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
GeneChip® Human Mapping 50K Hind Assay Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneChip® Human Mapping 50K Xba Assay Kit	Affymetrix
HotStart-IT Taq DNA Polymerase	USB, Cleveland, OH, USA
Puregene DNA-Isolation Kit	Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Restriktionsenzyme <i>Bgl</i> II, <i>Hind</i> III, <i>Mbo</i> I, <i>Mun</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Pae</i> I, <i>Taq</i> I, <i>VSPI</i> , <i>Xba</i> I	Fermentas
Qiaprep Spin, Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
TaKaRa LA- <i>Taq</i> Set	Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan
TOPO TA Cloning Kit mit pCR 2.1-TOPO Vector und One Shot TOP10 chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Promega

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Zielantigen	Organismus	Klon	Hersteller
BCL10	Maus	151	Zymed
BCL2	Maus	100/D5	DCS
BCL6	Maus	PG-B6p	Dako
CD20	Maus	L26	Dako
CD3	Kaninchen	SP7	DCS
CD45	Maus	2B11+PD7/26	Dako
Ki-67	Kaninchen	SP6	DCS
MUM/IRF4	Maus	MUM1p	Dako

Sekundärantikörper

Zielantigen	Organismus	Kopplung	Hersteller
Maus-Konstantregion	Ziege	Peroxidase (POD)	Jackson ImmunoResearch,

2.1.5 Primer für die LDI-PCR

Die HPLC-aufgereinigten Primer für die Amplifikation und anschließende Sequenzierung wurden mit Hilfe der online verfügbaren Primer 3-Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi) entworfen und von der Firma Sigma bezogen.

BCL6	Primer	Sequenz
	# 04	5'-TTCATACGACCCCAGACATGGAATCACTCTTTAGA-3'
	# 08	5'-CAGCTTGGGACTTTTCAGCACCTGGTTTGGGGTCAT-3'
	# 09	5'-TTCGCCAGGGTTCCAATAACACGGCATCATAAAGG-3'
	# 36	5'-CCTGGCAAAGCGGGGAGTGGGGAGTCGGGTATGG-3'
	# 37	5'-GGGGCCGTTCTGTTTCCACTGGGGCAAAGCGAA-3'
	# 38	5'-AGGAACGGCCCCCTCCAACCTCCCGATGTCCACT-3'
	# 39	5'-AAGACCATACCCGACTCCCCACTCCCCCGCTTTGC-3'
	# 44	5'-GGTGAGGGAGAATGGAAGGCAAAAAGAGGGAAAAA-3'
	#201	5'-AGACCTTGACCTTTGATCTCCAGCATTTCATAATC-3'
	#202	5'-ACATTCAAGGGAAGGAAGGGAGGGAGGGAGAGCAT-3'
	#203	5'-GGTGACAATTTTCCTCACCATTTCATTTCAGTTCAA-3'
	#204	5'-TTGCCAACGTAGGCGGAAGGGGCTTTCTGTTTAGT-3'
	L43aFD	5'-GTAGGCTGAACTGGGCTGAG-3'
	L80aFD	5'-GAGCCCTAAGGCAGTGTGAG-3'
	L82aFD	5'-GGCAGCAGACCTTTGTTCTC-3'
	L87aFD	5'-GGGCTGGGGCTCTGTTTCGTC-3'
IgH	Primer	Sequenz
	JXE	5'-CACTGGCATCGCCCTTTGTCTAA-3'
	JXI	5'-CCCATGCCTTCCAAAGCGATT-3'
	SAE	5'-ACATAAATGAGTCTCCTGCTCTTCATCAAG-3'
	SAI	5'-GCAATTAAGACCAGTTCCTTCTAGTG-3'
	UpSmu_f1	5'-TGGGGTATCAAGTAGAGGGAGACAAAAGATGGAAGC-3'
	UpSmu_f2	5'-GAACCTGGCAATGAGATGGCTTTAGCTGAGACAAG-3'

Material und Methoden

IgH	Primer	Sequenz
	Upsmu_Xbal_r1	5'-CACCTGGGTTTTGGTTCCAAAGCATTACCAATCAT-3'
	Upsmu_Xbal_r2	5'-TGAGAATGAGACCAAGAATTTAGGAGCCTGTGCTG-3'
	Upsmu_Xbal_seq	5'-TTTAGGAGCCTGTGCTGTGA-3'
	DownSmu_r2	5'-TATGTCCAACAAGATCATGAAGATTGGCCCAGTGC-3'
	DownSmu_r1	5'-CAGCTCAGTCACACTCCAGCTACCCTGAAGTCTCC-3'
	DownSmu_Xbal_f1	5'-ATACTGGTCCTGAGTGCACGATGCTCTGGCCTAC-3'
	DownSmu_Xbal_f2	5'-CCTCCCCTGCAGAACACCTTCCTCCACAGC-3'
	DownSmu_Xbal_Seq	5'-AGAACACCTTCCTCCACAGC-3'
	DownSmu_Pael_f1	5'-GAAGAGGAATGGAACACGGGGGAGACCTACAC-3'
	DownSmu_Pael_f2	5'-GGACAAGTCCACCGGTAAACCCACCCTGTACAAC-3'
	DownSmu_Pael_Seq	5'-ACCTGCTACTGACCCTGCTG-3'
	DownSmu_MunI_f1	5'-TGCATTAGATTTAAGGCTCAAGGCTCATCCTCCTG-3'
	DownSmu_MunI_f2	5'-CATCTTTGGCTCTGATCTCAAAGTCACCCTTCCTTC-3'
	DownSmu_MunI_Seq	5'-TTCTGGTCTTCTTTCCCTTC-3'
	DownS μ _HindIII_f1	5'-CCTCTGTGTGTGCTCCACATGCCTACAACCTGCC-3'
	DownS μ _HindIII_f2	5'-GGAAGTTGGAGCAAAAGTTTCAGGTGAACGAGTG-3'
	DownS μ _HindIII_Seq	5'-CAGGTGAACGAGTGTCTTAG-3'
	DownS μ _BgIII_f1	5'-AGGTCCCCTCGTTATTCTGACTCACAACACAGG-3'
	DownS μ _BgIII_f2	5'-GAACCTTCCTGAGATACAAAGACGGGACAGCTAC-3'
	DownS μ _BgIII_Seq	5'-ACCGCCAGCAAGAGTAAGAA-3'
	Sa_ex_r	5'-ATTCGTGTAGTGCTTCACGTGGCATG-3'
	Sa_int_r	5'-GTTTCTGAACATGCTCCTTAGATAGGG-3'
	Sa_Vsp_1_f	5'-GGATGGAGGATGGAAGATAGATGGAG-3'
	Sa_Vsp_2_f	5'-ATGGATGGATGGATAGATGGAAGAAGG-3'
	Sa_Nde_1_f	5'-TACTGATGGAGGGGTGGATATACGG-3'
	Sa_Nde_2_f	5'-AGGATAGAAAGACAGGTGAATGACTGG-3'
	Sa_Hind_1_f	5'-TGAGACCCTGAGGAAAATGAGGATGC-3'
	Sa_Hind_2_f	5'-TCAACCTTTGGCACACTGAGTGTGTCAG-3'
	IGH/201	5'-TTCACCCACTCCGACAGTTCTCTTTCCAGCCAATA-3'

IgH	Primer	Sequenz
	IGH/202	5'-TCAGGAAACCCACAGGCAGTAGCAGAAAACAAAG-3'
	Eμ/203	5'-CAGATTCTGTTCCGAATCACCGATGCGGCGTCAGC-3'
	Eμ/204	5'-GCCCCAGCCCTTGTTAATGGACTTGGAGGAATGAT-3'

2.1.6 Geräte & Arbeitsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller und Ort
8-strip 0,5 ml Reaktionsgefäße	Labomedic, Bonn, Deutschland
Array-Waschautomat GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Capillary Sequencer 3730	Applied Biosystems
DHPLC-Anlage Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System 4500	Transgenomic, Omaha, NE, USA
Geldokumentation BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammer Criterion® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelkammer Modell 41-2026	peqLab, Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
GenePix 4000B	Molecular Devices, Union City, CA, USA
Heizblock HB-1	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Hybridisierungsöfen GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix
Latexuntersuchungshandschuhe (puderfrei)	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Megafuge 1.0 – Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mehrkanalpipette (verschiedene Größen)	Biohit, Rosbach v. d. Höhe, Deutschland
Microfluidics-System Experion® Elektrophorese System	Bio-Rad
Mikropipetten „research“ und „research pro“ (verschiedene Größen)	Eppendorf

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Mikrowelle M500	Philips
Minisub Cell GT (Gelelektrophorese)	BioRad, Hercules, CA, USA
Nitriluntersuchungshandschuhe (puderfrei)	Meditrade
pH-Meter	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Pipetten „Cellstar“ (versch. Volumina)	Greiner Group, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Labomedic, Bonn, Deutschland
Pipettierhilfe	„Easypet“ Eppendorf
Plattenschüttler MS 3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1ml; 2ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Group
Scanner GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix
Sequenzierer Genetic Analyzer ABI PRISM 377	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Skalpell (Feather, Einweg)	pfm, Köln, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop®ND-1000 Spectrometer	peqLab
Taumelschüttler VWR Rocking Platform	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler DNA Engine Tetrad	MJ Research/Bio-Rad, München, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra
Thermomixer Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UV-Transilluminator mit CCD-Kamera	LTF-Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Vakuumpumpe MultiScreen HTS Vacuum Manifold	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Vortexer REAX2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Waschbehältnis Microarray Wash Tray	Applied Biosystems
Wasserbad	Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge 22R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge J-6B	Beckmann, München, Deutschland
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 1L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.7 Software

Bezeichnung	Hersteller und Ort / Quelle
Copy Number Analyser for GeneChip® (CNAG) Version 2.0	Affymetrix
Copy Number Analysis Tool (CNAT) Version 2.0	Affymetrix
DNASar,	GATC Biotech, Konstanz, Deutschland
Experion® Software 2.1	Bio-Rad
GeneChip® Operating Software (GCOS) Version 1.4	Affymetrix
NanoDrop® Software Version 3.2.1	peqLab
A7300 Sequence Detection Software	Applied Biosystems
ABI Prism 7900HT SequenceDetection Software	Applied Biosystems
MS-Office 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
Laser Gene Programmgruppe	DNASar, Madison, WI, USA
Mutation Surveyor	SoftGenetics LLC, State College, PA, USA
Netprimer	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html

Bezeichnung	Hersteller und Ort / Quelle
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
Human BLAT Search	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat

2.1.8 Puffer und Lösungen

100K GeneChip®-Färbelösung 1

495 µl 100K GeneChip®-Färbelösungspuffer
 5 µl Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) (1 mg/ml)

100K GeneChip®-Färbelösung 2

495 µl 100K GeneChip® Färbelösungspuffer
 5 µl 0,5 mg/ml Anti-Streptavidin-Antikörper (biotinyliert)

100K GeneChip®-Färbelösungspuffer

300 µl 20x SSPE
 3,3 µl Tween-20 (3%)
 20 µl Denhardt's Solution (50x)
 666,7 µl dH₂O

100K GeneChip®-Waschpuffer A

300 ml 20x SSPE
 1 ml Tween-20 (10%)
 wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm-Filter).

100K GeneChip®-Waschpuffer B

30 ml 20x SSPE

1 ml Tween-20 (10%)

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm-Filter).

10x PBS

80 g NaCl

2 kg KCl

6,1 g Na₂HPO₄

2 g KH₂HPO₄

wurden auf 100 ml mit dH₂O aufgefüllt und auf pH 7,3 eingestellt.

Eosin-Lösung

1 g Eosin

wurden in 100 ml dH₂O aufgelöst.

Gel-Loading-Puffer

0,125 g Bromphenolblau

28,7 g Glycerol

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Hämalaun-Lösung

1 g Hämatoxylin

0,2 g Natriumjodat

50 g Kaliumaluminiumsulfat

zu 800 ml dH₂O

darin lösen:

50g Chloralhydrat

1 g kristallines Zitronensäuremonohydrat

wurden mit dH₂O auf 1l aufgefüllt.

Holding-Puffer

8,3 ml 12x MES-Stammlösung

18,5 ml nukleasefreies NaCl (5 M)

0,1 ml Tween-20 (10%)

wurden mit dH₂O auf 100 ml aufgefüllt und lichtgeschützt gelagert.

Mastermix

2,5 ml deionisiertes Formamid

1,25 ml Dextransulfat (40%)

0,5 ml 20x SSC

wurden mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit 1x SSC auf 4,5 ml aufgefüllt.

MES-Stammlösung (12x)

70,4 g MES Hydrat

193,3 g MES Natriumsalz

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt, auf pH 6,5 eingestellt und steril filtriert (0,2 µm-Filter).

SSC (Standard Saline Citrate) (20x)

175,3 g NaCl

88,2 g Na₃Citrat

wurden in 1.000 ml dH₂O gelöst und mit HCL auf pH 7,0 eingestellt.

SSC-Lösung 1

2 ml 20x SSC

300 µl Igepal

wurden auf 100 ml mit dH₂O aufgefüllt.

SSC-Lösung 2

10 ml 20x SSC

100 µl Igepal

wurden auf 100 ml mit dH₂O aufgefüllt.

TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50X)

2,0 M Tris-Base

0,05 M Ameisensäure

0,05 M EDTA

TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer (10x)

108 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

wurden auf 1.000 ml mit dH₂O aufgefüllt.

TBS

29,24 g NaCl

2,4 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

wurden mit dH₂O auf 1.000 ml aufgefüllt und pH 7,5 eingestellt.

TE-Puffer

19 mM Tris

1 mM EDTA

mit HCl eingestellt auf pH 7,6

2.2. Methoden

2.2.1. Vorbereitung des Probenmaterials

DNA-Extraktion

Die DNA wurde unter Verwendung des Puregene DNA Isolation Kits nach Vorgabe des Herstellers isoliert. Das jeweils verwendete Protokoll wurde durch Art und Menge des Ausgangsmaterials bestimmt. Isolierte DNA wurde bei 4 °C oder längerfristig bei -20 °C in TE-Puffer gelagert.

DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop® ND-1000

Die DNA-Konzentration und -Qualität für die Microarray-Analysen wurde mit dem NanoDrop® ND-1000- Spektrophotometer und der NanoDrop® Software Version 3.2.1 nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die optische Dichte der Probe gegen dH₂O als Referenz bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die optische Dichte doppelsträngiger DNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml 1 beträgt. Um die Reinheit der DNA zu überprüfen, wurden das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Wert A₂₆₀/A₂₈₀ sollte dabei zwischen 1,8 und 2 liegen.

DNA-Quantifizierung mittels Qubit

Die DNA-Konzentration für die LDI-PCR wurde photometrisch oder fluorimetrisch mittels des Quant-IT DNA Assay Kits und de Qubit-Fluorometer bestimmt. Dabei wurde 1 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in ein 0,5 ml Qubit-assay-tube mit 199 µl frisch angesetzter Quant-IT working solution bei Raumtemperatur gegeben, gemischt und nach 2 min Inkubationszeit im Qubit-Fluorometer gemessen.

2.2.2 Histochemische Methoden

Färbung von Gewebeschnitten

Um Gewebe- und Zellstrukturen an Gewebeschnitten von Gefriermaterial (Schnittdicke 4 µm) sichtbar zu machen, wurden die Schnitte mit Hämalaun und Eosin (HE) angefärbt. Zunächst erfolgte eine zwanzigminütige Fixierung des Gewebeschnittes in Aceton. Nach einer anschließenden Inkubation mit Chloroform für 7 min wurden sie luftgetrocknet. Die so fixierten Schnitte wurden kurz unter warmem, fließendem Wasser gespült, dann in Hämalaun-Lösung für 2 min und dann für 5 bis 10 s in Eosin-Lösung inkubiert. Zur Entwässerung wurden die Schnitte in Ethanollösungen mit aufsteigender Konzentration (50%, 70%, 90% und 100%) jeweils für 1 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine einminütige Inkubation in Isopropanol. Die Entwässerung wurde mit drei Inkubationen in frischen Xylobädern für jeweils 5 min abgeschlossen.

Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen von 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 in geeigneter Verdünnung zugegeben und 60 min inkubiert wurde. Die Detektion des primären Antikörpers durch sekundäre Antikörper und der Nachweis durch Peroxidasereaktion wurden mit dem DCS-Detection-Line Nachweissystem nach Herstelleranleitung durchgeführt. Danach wurden die OT 3 - 5 s in Hämalaun-Lösung gehalten. Zur Entwässerung wurden die Schnitte in Ethanollösungen mit aufsteigender Konzentration (50%, 70%, 90% und 100%) jeweils für 1 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine einminütige Inkubation in Isopropanol. Die Entwässerung wurde mit drei Inkubationen in frischen Xylobädern für jeweils 5 min abgeschlossen.

2.2.3. Microarray-Analysen

Die Microarray-Analysen wurden im Institut für Humangenetik der Universität Kiel durchgeführt.

100K GeneChip® Human Mapping

Für die Analyse der PCNSL Proben wurden das GeneChip® Human Mapping 50K Xba Assay Kit und das GeneChip® Human Mapping 50K Hind Assay Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet.

1. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der genomischen DNA wurde in zwei parallelen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xba I angesetzt. Die Durchführung des Verdaus erfolgte in einem Thermocycler (DNA Engine Tetrad, MJ Research/Bio-Rad).

Reaktionsansatz:

10,5 µl nucleasefreies H₂O
5 µl DNA (50 ng/µl)
2 µl 10x BSA-Puffer
2 µl 10x BSA
0,5 µl Restriktionsenzym (20 U/µl)
20 µl gesamt

Bei der Leerkontrolle wurden statt der DNA 5 µl nucleasefreies H₂O zugegeben.

Thermocycler-Protokoll:

37 °C 120 min
70 °C 20 min
4 °C ∞

2. Ligation

Die Ligation der Restriktionsfragmente mit den Adaptern wurde auf Eis angesetzt:

Reaktionsansatz:

20 µl Restriktionsverdau
1,25 µl Adapternukleotide (5 µM)
2,5 µl 10x T4-Ligase-Puffer
0,625 µl T4-Ligase (400 U/µl)
0,625 µl nucleasefreies H₂O
25 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll:

16 °C 120 min
70 °C 20 min
4 °C ∞

3. Polymerase-Ketten-Reaktion

Zunächst wurde die Ligationsreaktion mit 75 µl nucleasefreiem H₂O verdünnt.

Pro Restriktionsenzym wurden drei PCR-Reaktionen angesetzt, um genug Produkt für die Microarray-Hybridisierung zu bekommen. Die Angaben gelten für einen PCR-Ansatz.

Reaktionsansatz:

10 µl verdünntes Ligationsprodukt

44 µl nucleasefreies H₂O

10 µl 10x Pfx-Amplification-Buffer

10 µl 10x PCR-Enhancer

2 µl MgSO₄ (50 mM)

12 µl dNTPs (je 2,5 mM)

10 µl PCR-Primer (10 µM)

2 µl Pfx-Polymerase (2,5 U/µl)

100 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll:

94 °C 3 min

94 °C 15 s

60 °C 30 s 30 Zyklen

68 °C 1 min

68 °C 7 min

4 °C ∞

Die PCR-Produkte wurden über ein 2%-Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard wurde der Hyperladder I-Längenstandard (Bioline) verwendet. Die PCR-Produkte lagen zwischen 250 bp und 2.000 bp. Die restlichen PCR-Produkte aus den drei Ansätzen wurden dann vereinigt, in ein Well einer 96er PCR-Aufreinigungsplatte gegeben (NucleoFast 96 PCR Plates, Macherey & Nagel) und die Flüssigkeit durch Anlegen eines Vakuums filtriert. Dabei blieben die PCR-Produkte im Well. Nach dreimaligem Waschen mit nucleasefreiem H₂O und Abfiltrieren durch Anlegen eines Vakuums wurden die Wells getrocknet. Nach Aufhebung des Vakuums erfolgte eine Zugabe von 40 µl Elutionspuffer (Qiagen) in jedes Well. Die Platte wurde mit einer

Klebefolie abgedeckt, auf einen Plattenschüttler (MS3 basic, IKA) gestellt und 10 min bei Raumtemperatur und 500 U/min geschüttelt. Danach konnte das Eluat aus dem Well in ein 0,2 ml-Gefäß überführt werden. 1 µl des Eluats wurde entnommen und mit 9 µl nucleasefreiem H₂O verdünnt. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte dann mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer.

4. Fragmentierung der PCR-Produkte

Für den Fragmentierungsansatz musste das Fragmentierungsreagenz zunächst auf eine Endkonzentration von 0,04 U/µl verdünnt werden. Das Ansetzen der Fragmentierungsreaktion erfolgte auf Eis.

Reaktionsansatz:

45 µl PCR-Eluat (40 µg DNA)

5 µl 10x Fragmentierungspuffer

5 µl verdünntes Fragmentierungsreagenz

55 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll:

(Der Thermocycler wurde auf 37 °C vorgeheizt)

37 °C 35 min

95 °C 15 min

4 °C ∞

4,5 µl des Fragmentierungsansatzes wurden danach auf 10 µl mit nucleasefreiem H₂O verdünnt, mit 3,5 µl Auftragspuffer versetzt und über ein 4% Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard diente die 100 bp-DNA-Leiter. Der Großteil der Fragmente hatte eine Größe zwischen 30 bp und 100 bp.

5. Labeling

Das Ansetzen der Labeling-Reaktion erfolgte auf Eis.

Reaktionsansatz:

50,5 µl Fragmentierungsreaktion

14 µl 5x TdT-Puffer

2 µl Labeling-Reagenz (7,5 mM)

3,5 µl TdT (30 U/µl)

70 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll:

37 °C 2 h

95 °C 15 min

4 °C ∞

6. Hybridisierung

Die Hybridisierungslösung wurde in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt.

Reaktionsansatz:

70 µl Labeling-Reaktion

12 µl 12x MES

13 µl DMSO

13 µl 50x Denhardt's Solution

3 µl EDTA (0,5 M)

3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml)

2 µl Oligonukleotid-Kontrollreagenz

3 µl Human Cot-1 DNA (1 mg/ml)

1 µl Tween-20 (3%)

140 µl TMACL (5 M)

260 µl gesamt

Die Hybridisierungslösung wurde 10 min bei 95 °C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert und danach für 10 s auf Eis gestellt. Der entstandene Niederschlag wurde dann durch rasches Auf- und Abpipettieren wieder gelöst. Nach zweiminütiger Inkubation bei 48 °C erfolgte die Befüllung des 50K-Microarrays mit 200 µl Hybridisierungslösung. Die Microarrays wurden

anschließend 16-18 h im vorgeheizten Hybridisierungssofen (Hybridization Oven 640, Affymetrix) bei 48 °C und 60 U/min im inkubiert.

7. Waschen, Färben und Scannen

Die Hybridisierungslösung wurde nach der erfolgten Hybridisierung abgezogen und der Microarray mit 250 µl Holding-Puffer befüllt. Anschließend erfolgte die Überführung der Microarrays in der Fluidics Station 450 (Affymetrix) und das Starten des automatischen Wasch- und Färbeprotokolls nach Anweisung des Herstellers. Dafür mussten Färbelösung 1, Färbelösung 2, Waschpuffer A und Waschpuffer B angesetzt werden. Die Steuerung der Fluidics Station 450 erfolgte mit der GeneChip® Operating Software (GCOS) Version 1.4 (Affymetrix). Es wurde das Protokoll „Mapping 100Kv1_450“ durchgeführt. Das Scannen der Microarrays erfolgte an einem GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix). Die Scannergebnisse wurden mit Hilfe der GCOS-Software analysiert.

Auswertung der 100K GeneChip®-Daten

Mit Unterstützung durch Markus Kreuz am Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig wurde eine umfassende bioinformatische Analyse der 100K GeneChip®-Daten der PCNSL durchgeführt. Referenz und Tumor Arrays wurden gemeinsam mit dem BRLMM Algorithmus genotypisiert (http://www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/brlmm_whitepaper.pdf). Dabei wurden die Standard-Parameter (Score Threshold = 0,5, Prior Size = 10.000, DM Threshold = 0,17) verwendet. Als Referenz für Copy Number und LOH-Analysen wurden die 100K GeneChip®- Daten von 90 HapMap-DNAs (30 CEPH Trios; http://www.affymetrix.com/support/technical/sample_data/hapmap_trio_data.affx), sowie von 7 Normal-DNA Proben aus dem Kieler Labor verwendet.

Copy Number Analyse

Die Copy Number Analyse wurde mit Hilfe der CNAG Software V2.0 durchgeführt⁶⁸. Xba I- und Hind III-Arrays wurden für die Analyse kombiniert. Die Segmentierung der Rohdaten erfolgte nach dem in der Software implementierten Hidden Markov Model (HMM) bei individueller Justierung der HMM-Parameter in Abhängigkeit von der jeweiligen Hybridisierungsqualität der Arrays. Mit Rücksicht auf Ausreißer und technische Artefakte wurden für die weitere Analyse

nur aberrante Segmente berücksichtigt, die mindestens 10 zusammenhängende SNP-Marker umfassten. Die ermittelten Regionen wurden anschließend mit der „Database of Genomic Variants“ (<http://projects.tcag.ca/variation/>) abgeglichen. In den 100K GeneChip®-Daten detektierte Regionen, die von einer bekannten Copy Number Variation zu $\geq 50\%$ überdeckt waren, wurden als CNV klassifiziert.

LOH-Analyse und Identifikation von pUPDs

LOH-Regionen wurden mit Hilfe einer auf Hidden-Markov-Modellen (HMM) basierenden Methode bestimmt, die in der dChip-Software^{69, 70} implementiert ist. Es wurde die HMM considering haplotype (LD-HMM) Methode verwendet, um die Abhängigkeit benachbarter SNP-Marker zu berücksichtigen. Der LOH Call Schwellenwert⁷¹ wurde auf den Standardwert 0,5 gesetzt. Zusätzlich wurde eine empirische Haplotypkorrektur angewendet. Dadurch wurden putative LOH-Regionen in den Tumoren zurückgewiesen, wenn einige euploide Referenzfälle eine große Übereinstimmung mit dem Tumorfall bezüglich der Genotypen in der entsprechenden Region zeigten. LOH-Regionen wurden als pUPD bezeichnet, wenn keine Copy Number Aberrationen in der entsprechenden Region auftraten. Wenn in einer LOH-Region Teilbereiche Copy Number Veränderungen zeigten, so wurden diploide Teilbereiche der LOH-Region als pUPD bezeichnet, wenn sie mindestens 50 zusammenhängende SNP-Marker umfassten.

LDI-PCR

1. Fragmentierung der genomischen DNA:

Die Fragmentierung erfolgte entweder mit *XbaI* oder *BamHI*.

Es wurden je 2 Fragmentierungsansätze in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt.

Reaktionsansatz:

40 µl DNA in TE buffer 200 (5 ng/µl)
5 µl 10x Restriktions Puffer
0,5 µl BSA
0,5 µl Restriktionsenzym
4 µl nucleasefreies H₂O
50 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll:

37 °C 120 min
70 °C 20 min
4 °C ∞

Fällung:

50 µl Restriktionsverdau-Lösung
150 µl nucleasefreies H₂O
200 µl PCIAA
400 µl gesamt

Nach der Zugabe von PCIAA wurden die Reaktionsgefäße einige Sekunden gemischt und anschließend 3 min bei 18.000 g abzentrifugiert. Die obere Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgten die Zugaben von 2,5 µl Pellet Paint, 1/10 des abpipettierten Volumens an 3M Natrium Acetat (pH 5,2) und 2,5x dem abpipettierten Volumen an 100% Ethanol. Das Reaktionsgefäß wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei 4 °C und 18.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, wobei darauf zu achten war, dass das Pellet nicht verletzt wurde. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und das Reaktionsgefäß erneut 5 min bei 4 °C und 18.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die Reaktionsgefäße wurden danach umgekehrt auf ein Papiertuch gestellt und das Pellet angetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 449µl H₂O resuspendiert.

2. Ligation:

Die Ligation wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt. Bei diesem Schritt sollte möglichst darauf geachtet werden, dass das Reaktionsgemisch nicht zu warm wird, da es dabei leicht zu unerwünschten Ligationen unterschiedlicher Fragmente kommen kann.

Reaktionsansatz:

449 µl Restriktionsverdau Lösung

50 µl 10x Ligationspuffer

1 µl T4 DNA Ligase

500 µl gesamt

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Fällung:

Reaktionsansatz:

50 µl Restriktionsverdau-Lösung

150 µl nucleasefreies H₂O

200 µl PCIAA

400 µl gesamt

Die Fällung erfolgte analog zur Fällung im Fragmentierungsschritt. Das Pellet wurde nach Trocknung in 16µl TE resuspendiert.

3. LDI-PCR

Die LDI-PCR erfolgte als nested PCR unter Verwendung spezieller Hot-Start Tubes.

Zunächst wurde die untere Schicht unter den Rand des Wachs-Pfropfens befüllt:

Reaktionsansatz:

5 µl 10x PCR Buffer (Mg²⁺ free)
2 µl Primer I (5 pmol/µl)
2 µl Primer II (5 pmol/µl)
8 µl dNTP-Mix (2,5 mM)
8 µl nucleasefreies H₂O
25 µl gesamt

Anschließend wurden die Hot-Start Tubes vorsichtig herunterzentrifugiert und in einem Thermocycler für 30 s auf 95 °C erhitzt und danach auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Erkalten der Wachsschicht wurde die obere Schicht auf das Wachs pipettiert:

Reaktionsansatz:

18,5 µl nucleasefreies H₂O
5 µl MgCl₂ (25 mM)
1 µl ligierte DNA-Lösung
0,5 µl LATAq (5 U/µl)
25 µl gesamt

Thermocycler-Protokoll (T3, Biometra):

94 °C 2 min
98 °C 20 s ↵
72 °C 6 min ↗ 5 Zyklen
98 °C 20 s ↵
70 °C 6 min ↗ 5 Zyklen
98 °C 20 s ↵
68 °C 6 min ↗ 4 Zyklen
98 °C 20 s ↵
68 °C 6 min +15sec / Zyklus; ↗ 16 Zyklen
72 °C 10 min
4 °C ∞

Danach wird 1 µl aus dem Produkt der 1. PCR entnommen und mit diesem die 2. PCR analog zur 1. PCR angesetzt, allerdings mit den Primerlösungen für die 2. PCR.

Auswertung und Dokumentation von PCR-Produkten

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate kam je nach Größe der Fragmente ein 0,8-1,5 prozentiges Agarosegel zur Verwendung. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose auf 150 ml mit TAE-Puffer aufgefüllt, in einer Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf Handwärme abgekühlt. Nach Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel zum Erstarren in eine Gelkammer gegossen und mit einem Taschenkamm versehen. Zum Probenauftrag wurden 10 µl PCR-Produkt mit 3,5 µl Gel-Loading-Puffer versetzt. Die Auftrennung des Gels erfolgte in einer Kammer mit 1x TAE bei einer angelegten Spannung von 8V pro 1 cm Laufstrecke.

Aufreinigung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel

Erschienen mehrere Banden auf dem Gel, wurde ein präparatives Gel angesetzt, indem je drei Taschen des Kamms durch einen Klebestreifen verbunden wurden. In die somit größeren Taschen wurde das gesamte restliche PCR-Produkt eingefüllt, das mit einer entsprechenden Menge an Gel-Loading-Puffer gemischt wurde. Um in einem Gel aufgetrennte Banden einzeln sequenzieren zu können, wurden die Banden zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA anschließend mit dem Qiaquick Gel-Extraction Kit gemäß Herstellerprotokoll isoliert.

Zur Aufbereitung für die Sequenzierung wurde im Falle einer einzelnen, diskreten Bande der ExoSAP-IT Kit gemäß Protokoll zugegeben, um überschüssige Primer und Nukleotide zu inaktivieren.

Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das „TopoTA cloning for Sequencing“ Kit verwendet, wobei die Durchführung gemäß den Herstellerangaben erfolgte.

DNA-Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach dem Sanger-Verfahren sequenziert. Dieses Verfahren beruht auf dem Einbau markierter Didesoxynukleotide in den neu synthetisierten DNA-Strang, was zu einem Kettenabbruch führt. Die Sequenzierung wurde mit dem Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt, bei dem vier verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide eingesetzt werden. Der Vorwärts- und der Rückwärtsstrang eines PCR-Fragments wurden in zwei Sequenzierungsansätzen getrennt voneinander analysiert.

Ansetzen einer Sequenzierungsreaktion:

1 µl Big Dye Terminator
2 µl 10x Puffer
2 µl Primer (20 pmol/µl)
1 µl gereinigtes Amplifikat
14 µl dH₂O
20 µl total

Thermocycler-Protokoll (T3, Biometra):

96 °C 5 min
96 °C 10 s
50 °C 5 s 25 Zyklen
60 °C 4 min
4 °C ∞

Breakpointspanning PCR

Zur Verifizierung des LDI-PCR Ergebnisses wurden anhand der ermittelten Sequenz des Translokationspartners Primer bestimmt, die auf der anderen Seite des Bruchpunktes liegen. Anschließend wurde mit der unveränderten genomischen DNA eine Bruchpunkt umspannende Nested-PCR mit Primerpaaren durchgeführt, die jeweils auf den unterschiedlichen Seiten des Bruchpunktes lagen. Das PCR-Produkt wurde zur genauen Lokalisation des Bruchpunktes sequenziert.

Auswertung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden anhand des Online-Alignment-Programms „Human BLAT Search“ (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 100K GeneChip® Mapping

Durch die Verwendung der 100K GeneChip® Array Plattform konnten neue, rekurrent deletierte bzw. zugewonnene Regionen sowie Regionen mit partieller uniparentaler Disomie in PCNSL nachgewiesen werden. Bekannte chromosomale Aberrationen konnten bestätigt und regional genauer eingegrenzt werden. Zur Untersuchung kamen 20 PCNSL-Fälle, von denen 19 (11 von weiblichen Patienten, 8 von männlichen Patienten) auswertbar waren. In einem der 20 Fälle war der Gehalt an Tumorgewebe nicht gesichert, weil hier lediglich DNA, jedoch kein Gewebekblock für histopathologische Untersuchungen vorlag. Bei allen anderen Proben umfasste der Tumoranteil mindestens 80% des Gesamtgewebes.

3.1.1 Qualitätskontrolle der Hybridisierung

Die Qualität der Hybridisierung wurde anhand der erreichten Call Rate überprüft. Die Call Rate entspricht der proportionalen Anzahl an SNPs, die durch die Hybridisierung eindeutig

genotypisiert werden konnten. Bei der 100K GeneChip®-Analyse von Proben mit einem normalen Chromosomensatz sollte dieser Wert erfahrungsgemäß > 95% betragen. Da in der vorliegenden Arbeit Tumorgewebe mit einer Vielzahl von chromosomalen Imbalancen das Ausgangsmaterial für die Analysen darstellte, wurden auch geringfügig kleinere Werte akzeptiert. Dies ist dadurch begründet, dass in Regionen, die homozygote Deletionen zeigen, eine Genotypisierung völlig ausgeschlossen ist, und dass zudem chromosomale Zugewinne in den betroffenen Regionen eine zuverlässige Bestimmung erschweren. Die Call Rates der hier analysierten PCNSL lagen zwischen 96,21% und 99,63% (Median = 98,23%), bei den Xba I Arrays und zwischen 94,79% und 99,48% (Median = 97,71%) bei den Hind III-Arrays.

3.1.2. Genomweite Bestimmung von Imbalancen

Zunächst wurde mit den erhobenen 100K GeneChip®-Daten der primären ZNS-Lymphome eine Copy Number Analyse durchgeführt, um genomweit chromosomale Imbalancen bestimmen zu können. In den 19 PCNSL wurden insgesamt 127 Regionen detektiert, die in den 100K GeneChip® Daten Zugewinne genetischen Materials zeigten. Das entspricht einem Mittelwert von etwa 6 zugewonnenen Regionen je PCNSL, wobei der absolute Wert zwischen 1 und 13 in den 19 untersuchten Proben variierte. Außerdem zeigten 188 Regionen chromosomale Verluste, was einem Mittelwert von etwa sieben Deletionen je PCNSL entspricht. Der Absolutwert variierte von 0-32. Abbildung 8 zeigt einen genomweiten Überblick über die Häufigkeit der zugewonnenen (grün) und deletierten (rot) Bereiche. Es konnten zahlreiche minimale aberrante Regionen (MCR: minimal common regions) anhand von Überlappungen rekurrent deletierter oder zugewonnener chromosomaler Regionen bestimmt werden. Außerdem wurden bisher unbekannte rekurrente Deletionen und Amplifikationen größerer Chromosomenabschnitte oder sogar ganzer Chromosomen gefunden. Rekurrent deletierte minimal aberrante Regionen konnten in 3p14.2 (Abbildung 9, MCR 1), 4q12, 4q13.1, 4q35.2 (Abbildung 10, MCR 2-4), 6p21.32, 6q21 (Abbildung 11, MCR 5-6), 8q12.1-q12.2 (Abbildung 13, MCR 9), 9p21.3 (Abbildung 14, MCR 11), 10q23.21 (Abbildung 15, MCR 13) und 12p13.2 (Abbildung 16, MCR 14) nachgewiesen werden. Rekurrente minimal aberrante Regionen mit Zugewinnen an genetischem Material lagen in den Bereichen der Chromosomenbanden 7q21.3-q22.1 (Abbildung 12, MCR 7), 7q31.33 (Abbildung 12, CNV 8), 9p24.3 (Abbildung 14, CNV 10), 9p21.1-p21.3 (Abbildung 14, MCR 12), 14q11.2 (Abbildung 17, CNV 15), 19q13.31 (Abbildung 19, MCR 16), 19q13.43

(Abbildung 19, MCR 17) und Xq27.1-q27.2 (Abbildung 20, CNV 18). MCR mit einer Größe von unter 7 Mb, die in mehr als vier der 19 untersuchten Fälle ($> 20\%$) auftraten, sind außerdem in Tabelle 1 aufgelistet. Neben den bereits bekannten rekurrenten Aberrationen in PCNSL konnten mit Hilfe der 100K GeneChip®-Analysen vier bislang unbekannte Regionen mit häufigen Zugewinnen und drei bislang unbekannte Regionen mit rekurrenten Deletionen identifiziert werden. Außerdem konnten die minimalen rekurrenten Bereiche innerhalb der bereits früher durch klassische CGH identifizierten aberranten Regionen auf wenige Megabasen eingegrenzt werden. In einigen dieser Regionen liegen Kandidatengene mit typischen Eigenschaften von Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen wie beispielsweise PRDM1 in 6q21 oder CDKN2A und CDKN2B in 9p21.3. Die gesamte Liste bekannter Kandidatengene lässt sich ebenfalls der Tabelle 1 entnehmen. Einige davon sind bisher lediglich tumorassoziiert, ohne dass die genaue Funktion bei der Tumorentstehung bekannt ist.

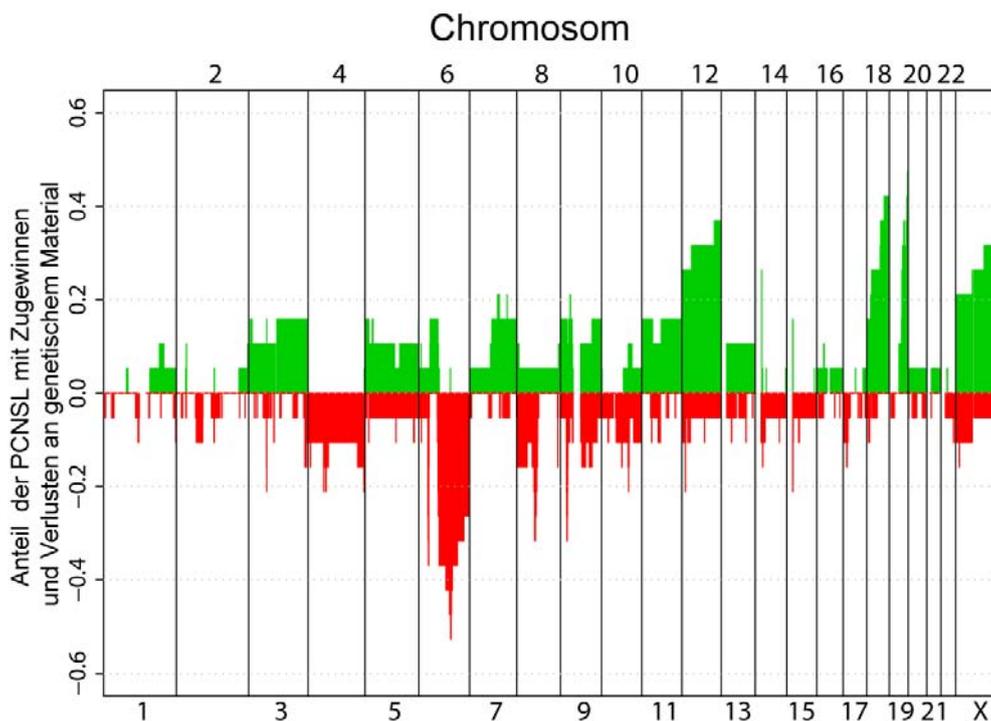


Abbildung 8: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials.

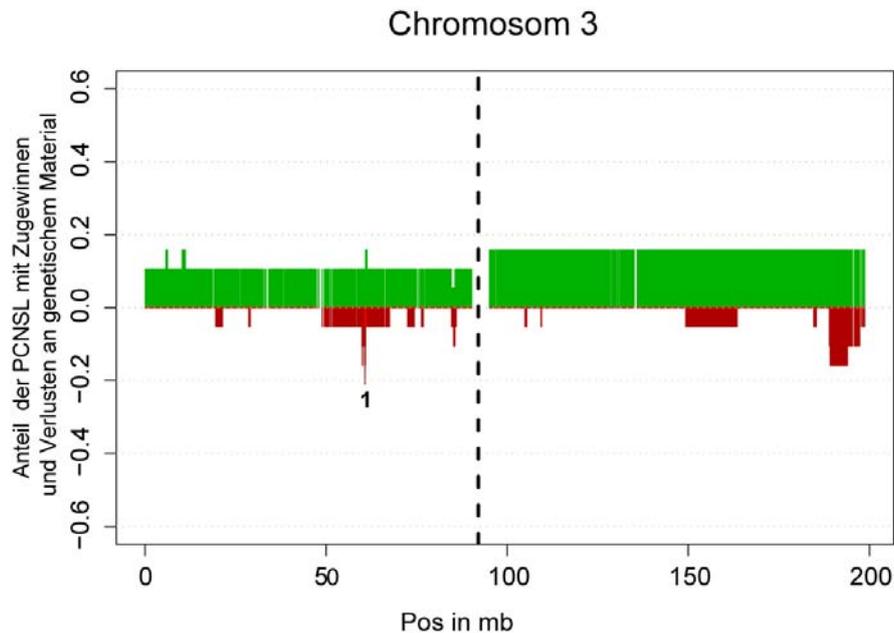


Abbildung 9: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 3 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **1:** MCR in 3p14.2 in 4/19 Fällen (21%).

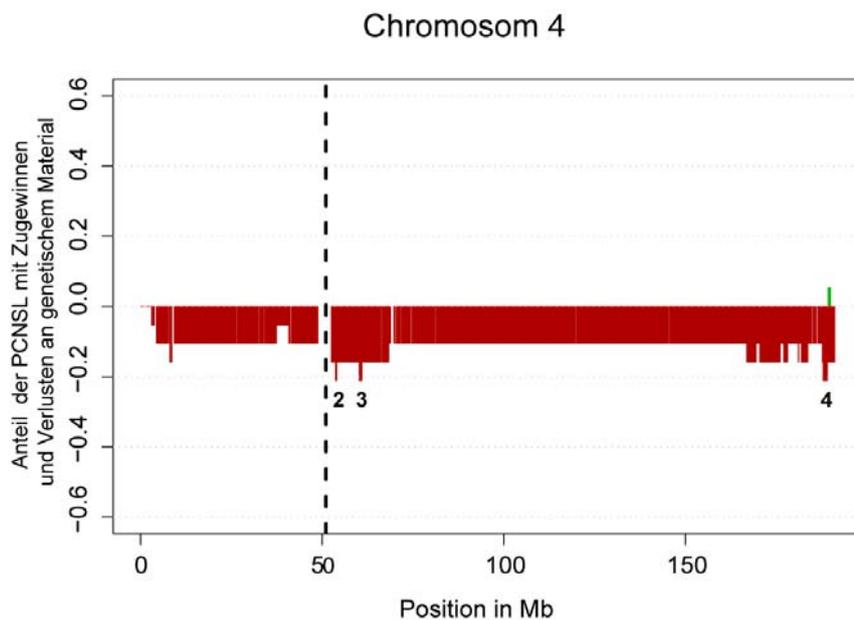


Abbildung 10: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 4 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **2:** MCR in 4q12 in 4/19 Fällen (21%); **3:** MCR in 4q31.1 in 4/19 Fällen (21%); **4:** MCR in 4q35.2 in 4/19 Fällen (21%).

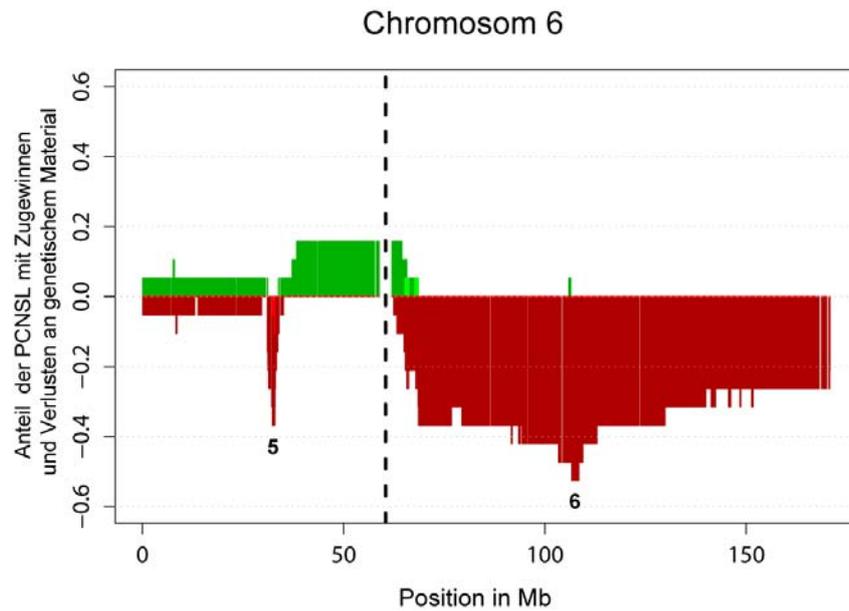


Abbildung 11: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 6 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. Homozygote Deletionen sind hellrot und HL-Amplifikationen hellgrün dargestellt **5:** MCR in 6p21.32 in 7/19 Fällen (37%), davon in zwei Fällen homozygot deletiert; **6:** MCR in 6q21 in 10/19 Fällen (52%).

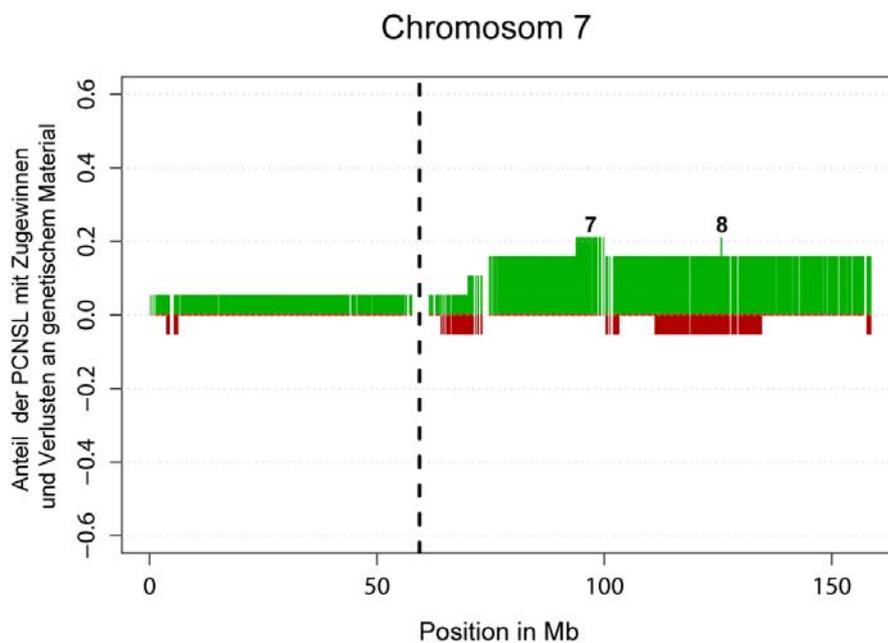


Abbildung 12: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 7 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **7:** MCR in 7q21.3-q22.1 in 4/19 Fällen (21%); **8:** CNV in 7q31.33 in 4/19 Fällen (21%).

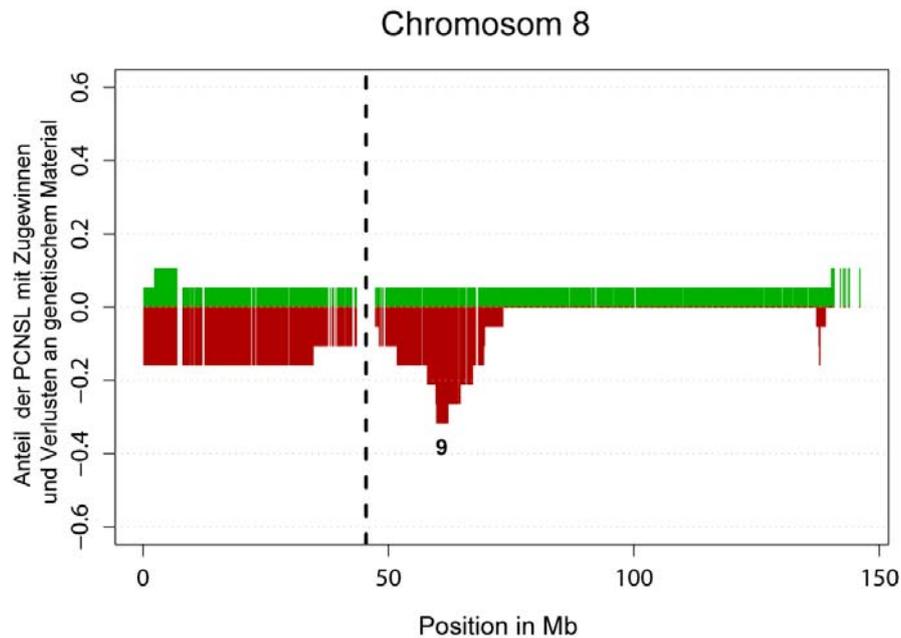


Abbildung 13: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 8 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **9:** MCR in 8q12.1-q12.2 in 6/19 Fällen (32%).

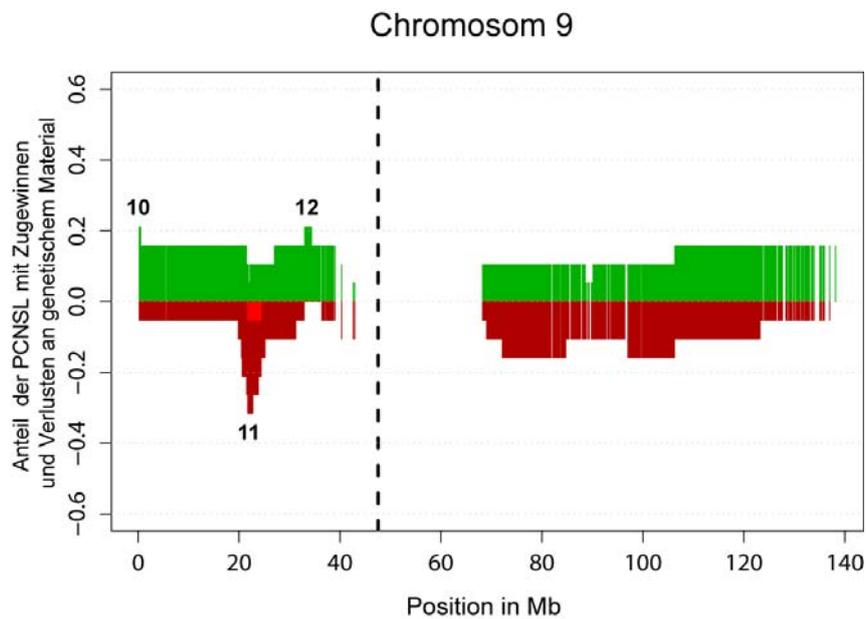


Abbildung 14: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 9 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. Homozygote Deletionen sind hellrot dargestellt. **10:** MCR in 9p21.1-p13.3 in 4/19 Fällen (21%); **11:** MCR in 9p21.3 in 6/19 Fällen (32%), davon in einem Fall homozygot deletiert; **12:** CNV in 9p24.3 in 4/19 Fällen (21%).

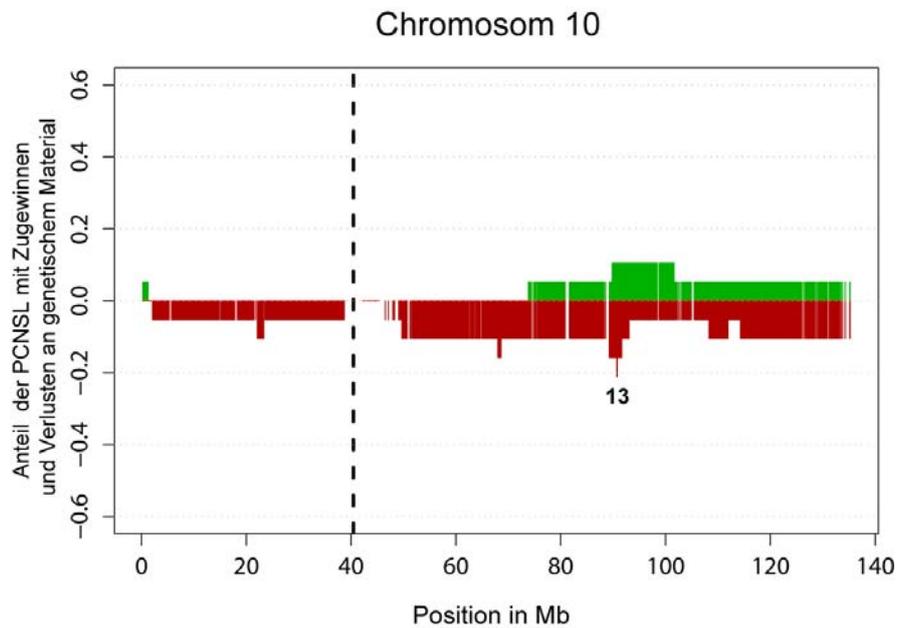


Abbildung 15: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 10 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **13:** MCR in 10q23.21 4/19 Fällen (21%).

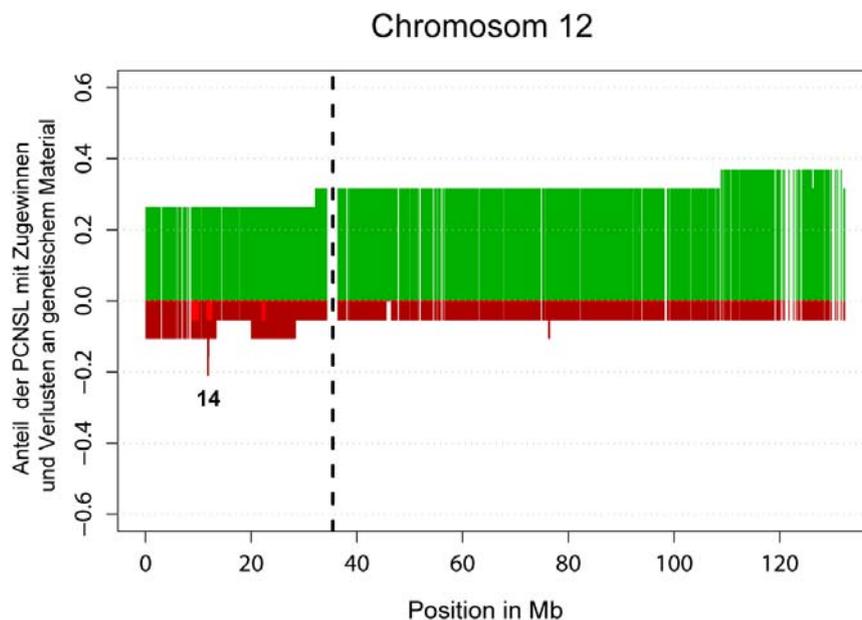


Abbildung 16: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 12 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. Homozygote Deletionen sind hellrot dargestellt. **14:** MCR in 12p13.2 in 4/19 Fällen (21%), davon in einem Fall homozygot deletiert; In 5/19 Fällen (26%) liegt das gesamte Chromosom 12 in erhöhter Kopienzahl vor.

Chromosom 14

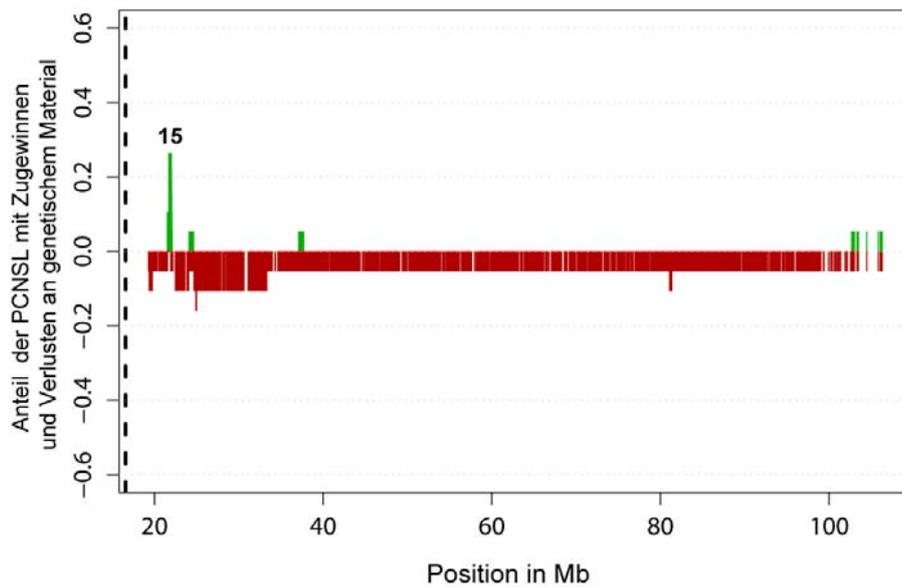


Abbildung 17: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 14 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **15:** CNV in 14q11.2 in 6/19 Fällen (32%).

Chromosom 18

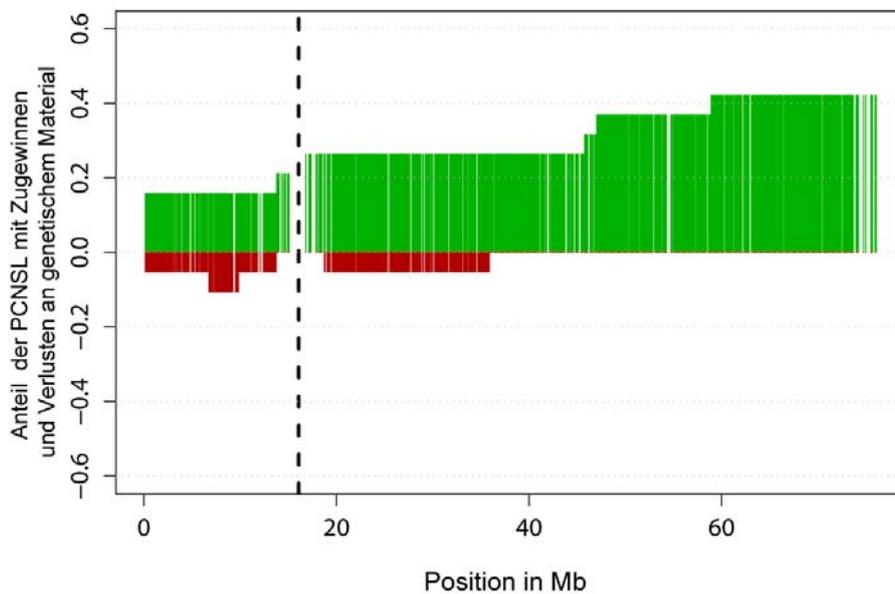


Abbildung 18: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 18 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. In 3/19 Fällen (16%) liegt das gesamte Chromosom 18 in erhöhter Kopienzahl vor. 18q11.1-q23 ist in 5/19 Fällen (26%) und 18q21.33-q23 in 8/19 (43%) amplifiziert.

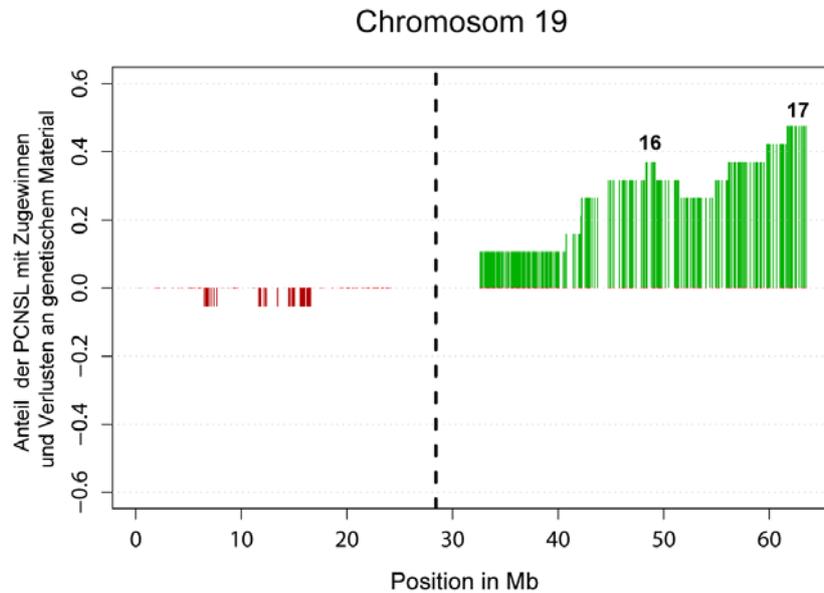


Abbildung 19: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom 19 dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **16:** MCR in 19q13.31 in 7/19 Fällen (37%), davon in einem Fall homozygot deletiert; **17:** MCR in 19q13.43 in 9/19 Fällen (47%).

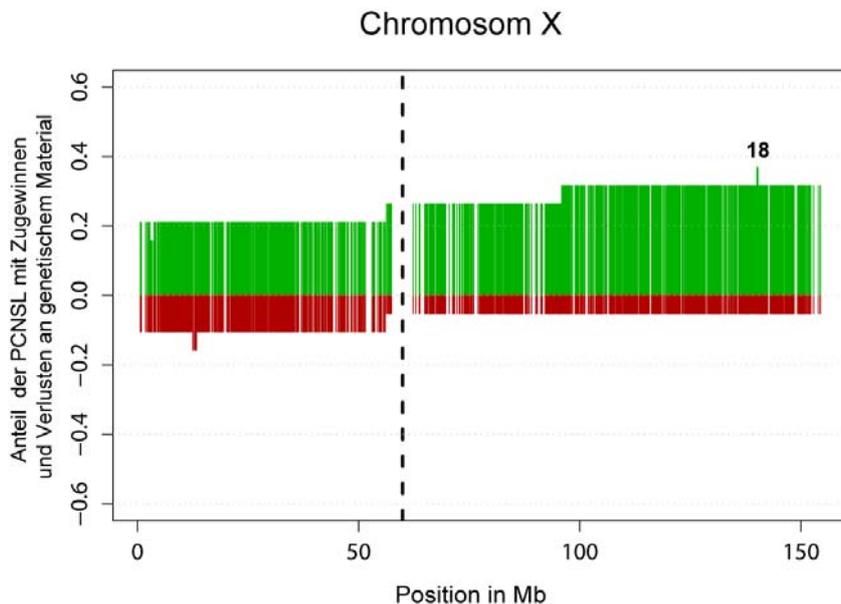


Abbildung 20: Chromosomale Zugewinne und Verluste der untersuchten Lymphome auf Chromosom X dargestellt in einem Summations-Plot. Grüne Säulen entsprechen dabei dem Anteil mit Zugewinnen, rote Säulen dem Anteil mit Verlusten genetischen Materials. **18:** CNV in Xq27.1-q27.2 In 4/19 Fällen (21%) liegt das gesamte Chromosom X in erhöhter Kopienzahl vor. In 6/19 Fällen ist Xq21.33-q28 amplifiziert.

Ergebnisse

Tabelle 1: Minimale aberrante Regionen (MCR; < 7 Mb) in 19 PCNSL.

MCR¹ /CNV⁴	Chromosomen -bande	Region [bp]	Anzahl der betroffenen Fälle (n=19)	neu	Kandidatengene
Deletionen:					
1	3p14.2	60 666 231 -60 897 928	4 (21%)	*	<i>FHIT</i>
2	4q12	53 645 596 -54 055 456	4 (21%)		<i>SCFD2</i>
3	4q13.1	60 202 529 -60 983 104	4 (21%)		Unbekannt
4	4q35.2	187 390 301 -189 302 971	4 (21%)		<i>FAT</i> , (7 weitere RefSeq Gene)
5	6p21.32	32 521 437 -33 009 329	7 (37%); 2 HZD ² , + 7 (37%) pUPD ³		<i>HLA-D</i> , <i>TAP</i>
6	6q21	106 416 370 -108 446 020	10 (52%)		<i>PRDM1</i> , (11 weitere RefSeq Gene)
9	8q12.1-q12.2	59 774 262 -62 165 144	6 (32%)	*	<i>TOX</i> , <i>CAB</i> , <i>RAB2A</i>
11	9p21.3	21 701 815 -22 730 232	6 (32%); 1HZD ² + 3 (16%) pUPD ³		<i>MTAP</i> , <i>CDKN2a/b</i>
13	10q23.21	90 657 964 -90 799 826	4 (21%)	*	<i>FAS</i>
14	12p13.2	11 724 002 -11 940 929	4 (21%); 1HZD ²	*	<i>ETV6</i>
Zugewinne:					
7	7q21.3-q22.1	93 751 300 -100 360 038	4 (21%)	*	Unbekannt (> 50 RefSeq Gene)
8	7q31.33	125 623 554 -125 756 623	4 (21%)		(CNV ⁴)
10	9p24.3	1 -507 715	4 (21%)		(CNV ⁴)
12	9p21.1-p21.3	32 984 500 -34 494 634	4 (21%)	*	<i>NFX1</i> , <i>BAG1</i> (> 20 weitere RefSeq Gene)
15	14q11.2	21 621 829 -22 010 682	6 (32%)		(CNV ⁴)

Ergebnisse

MCR ¹ /CNV ⁴	Chromosomen- bande	Region [bp]	Anzahl der betroffenen Fälle (n=19)	neu	Kandidatengene
16	19q13.31	48 163 405 -49 325 926	7 (37%)	*	Unbekannt, (> 30 RefSeq Gene)
17	19q13.43	61 555 118 -63 811 651	9 (47%)	*	Unbekannt, (> 50 RefSeq Gene)
18	Xq27.1-q27.2	139989786 - 140460001	7 (37%)		(CNV ⁴)

¹: MCR: minimale rekurrente Regionen siehe Abbildungen 9-20

²: HZD: homozygote Deletionen

³: pUPD: partielle uniparentale Disomien

⁴: CNV: Copy Number Variationen

Als einziger größerer Chromosomenabschnitt war 6q12-q27 in fünf von 19 Fällen deletiert (Abbildung 11). In fünf von 19 Fällen (26%) lag praktisch das gesamte Chromosom 12 in erhöhter Kopienzahl vor (Abbildung 16). Ebenfalls in fünf von 19 Fällen (26%) lag ein etwa 60 Mb großer Teilbereich des Chromosom 18 zwischen 18q11.1 und 18q23 in erhöhter Kopienzahl vor (Abbildung 18). Zugewinne eines 17,3 Mb großen Fragments zwischen 18q21.33 und 18q23 wurden sogar in acht von 19 Fällen (43%) gemessen. In weiteren fünf von 19 Fällen (26%) gab es eine Zunahme an genetischem Material im Bereich 19q13.12-q13.43 (Abbildung 19). Auch das X-Chromosom war von rekurrenten Zugewinnen an genetischem Material betroffen: in vier von 19 Fällen (21%) vollständig und in sechs von 19 Fällen zumindest im Bereich Xq21.33-q28 (Abbildung 20). In Tabelle 2 sind rekurrente Copy number Aberrationen aufgelistet, die in mehr als vier der 19 untersuchten Fälle (> 20%) auftraten und Bereiche größer als 15 Mb betreffen.

Tabelle 2: Größere Regionen (>15 Mb) mit Veränderungen der Copy Number und mit partiellen Uniparentalen Disomien (pUPD) 1n 19 PCNSL.

Chromosomenbande	Region [Mbp]	Anzahl der betroffenen Fälle (n=19)
Deletionen:		
6q12-q27	68,5-171,0	5 (26%)
pUPD		
6p25.3-p21.32	1,0-32,8	6 (32%)
9p24.3-p13.2	0-36,8	3 (16%)
Zugewinne:		
12p13.33-q24.33	0-132,4	5 (26%)
12p11.21-q24.33	32,2-132,1	6 (32%)
12q24.11-q24.33	108,6-132,1	7 (37%)
18q11.1-q23	15,1-76,1	5 (26%)
18q21.33-q23	58,8-76,1	8 (43%)
19q13.12-q13.43	42,2-63,8	5 (26%)
Xp22.33-q28	3,7-154,8	4 (21%)
Xq21.33-q28	95,8-154,8	6 (32%)

3.1.3. Genomweite Bestimmung von pUPD

Gegenüber der klassischen ArrayCGH bietet die GeneChip® Array Technologie den großen Vorteil, über die Genotypisierung eine LOH Berechnung zu ermöglichen. Auf diese Weise können neben chromosomalen Imbalancen auch pUPDs identifiziert werden. In den untersuchten 19 PCNSL wurden anhand der beschriebenen Methode insgesamt 78 Regionen mit pUPD berechnet. Das entspricht einem Mittelwert von vier, wobei die Zahl der berechneten pUPD Regionen pro PCNSL zwischen null und 12 variierte. Abbildung 21 zeigt einen genomweiten Überblick über die Häufigkeitsverteilung der pUPD in den untersuchten Proben. Auffällig ist dabei das häufige Auftreten in den Chromosomen 6 und 9.

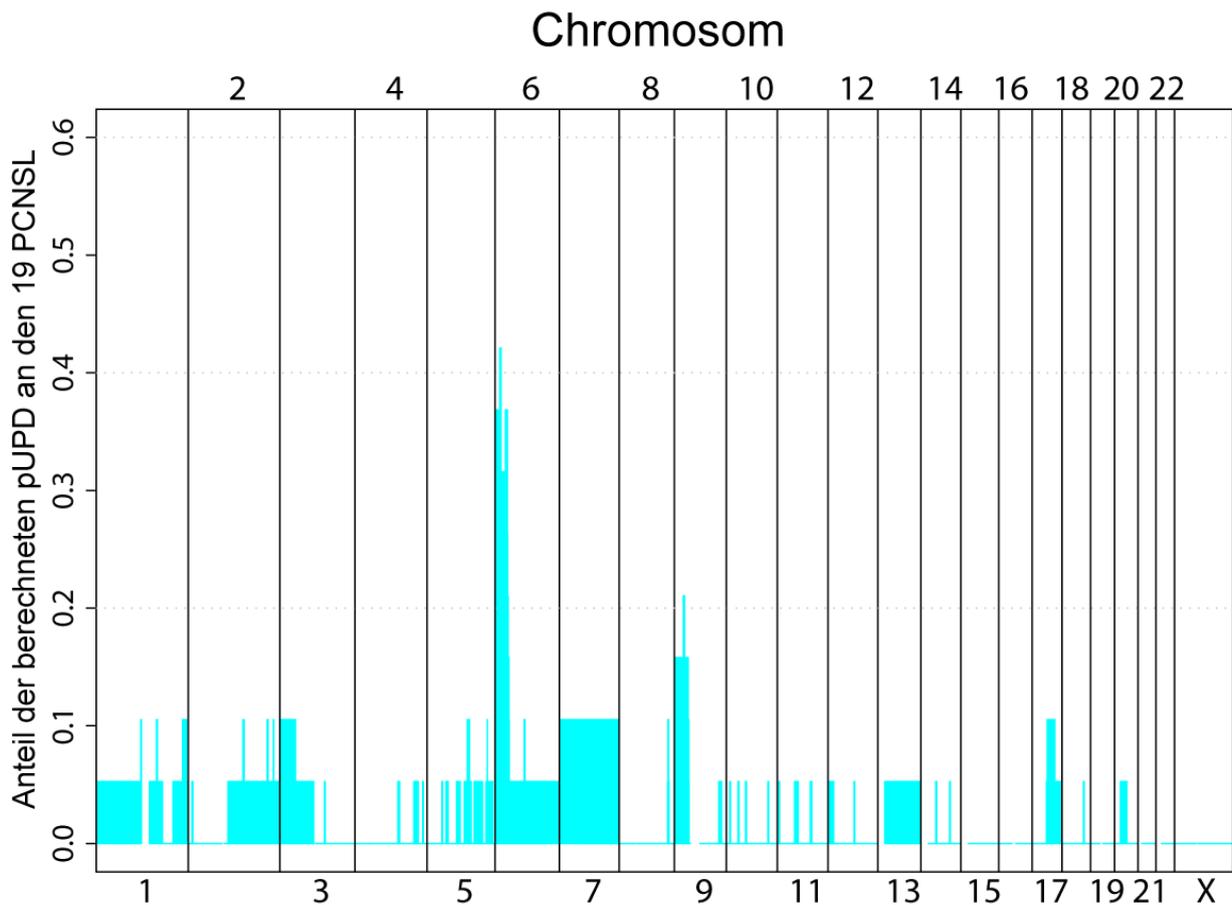


Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung der pUPD in den 19 PCNSL. Besonders Häufig sind Chromosom 6 und Chromosom 9 betroffen.

Verknüpft man die Ergebnisse der Copy Number Untersuchung mit den Ergebnissen der pUPD Analyse, so ergibt sich folgendes Bild: Der MCR5 in 6p21.32 ist in insgesamt 14/19 (74%) der PCNSL von einem Verlust der Heterozygotität oder des gesamten genomischen Materials betroffen. Dies wird in Abbildung 22 nochmals genau ersichtlich, die die 6p Region in Form einer „Heatmap“ darstellt. Hierbei handelt es sich somit um die am häufigsten betroffene Region in den untersuchten Fällen. In dieser Region liegen unter anderem Gene des Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II sowie die Gene *TAP1* und *TAP2*.

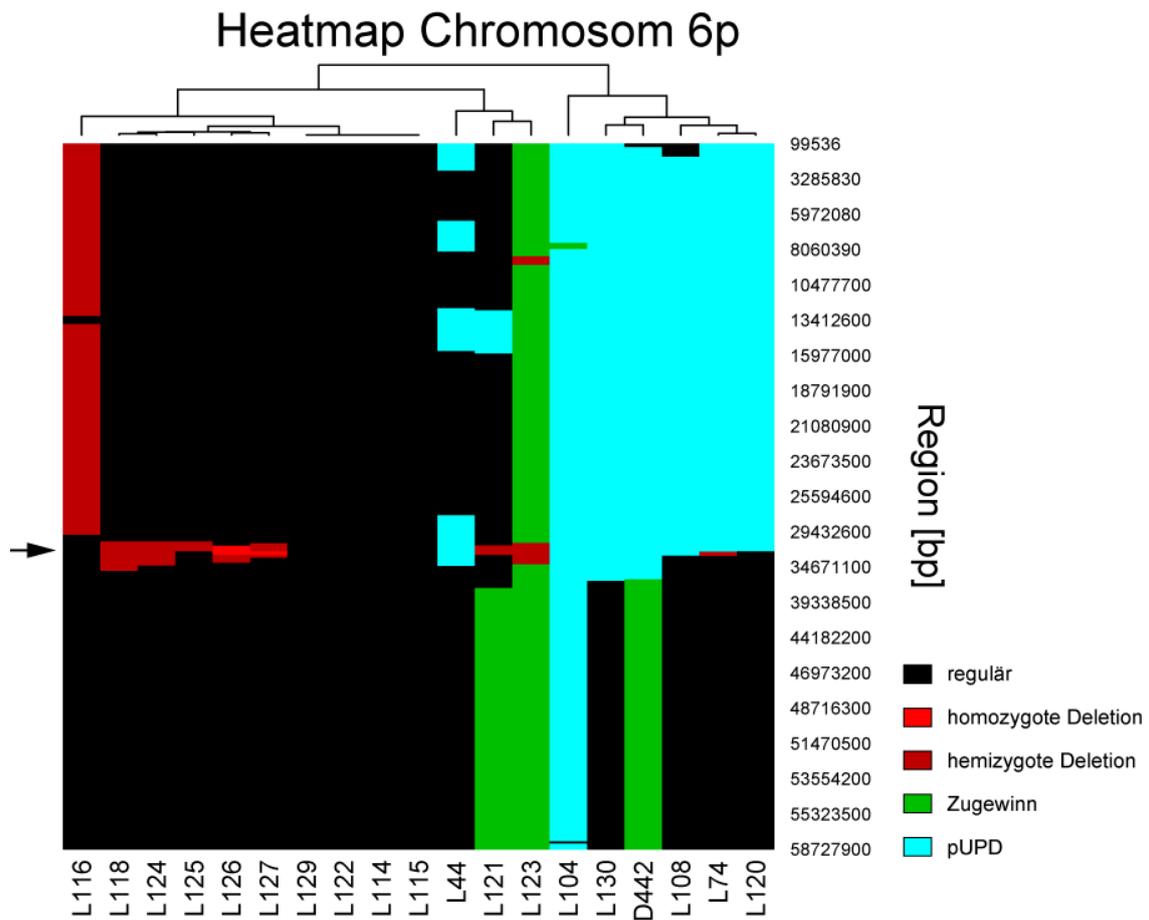


Abbildung 22: Heatmap von Chromosomenbande 6p. Der Pfeil markiert den Bereich rekurrenter Deletionen und pUPD in 6p21.32.

Eine ähnliche Häufung von Deletionen und pUPD betrifft die MCR 11 in 9 p21.3 (Abbildung 14). In dieser Region liegen die Tumorsuppressorgene CDKN2A und CDKN2B.

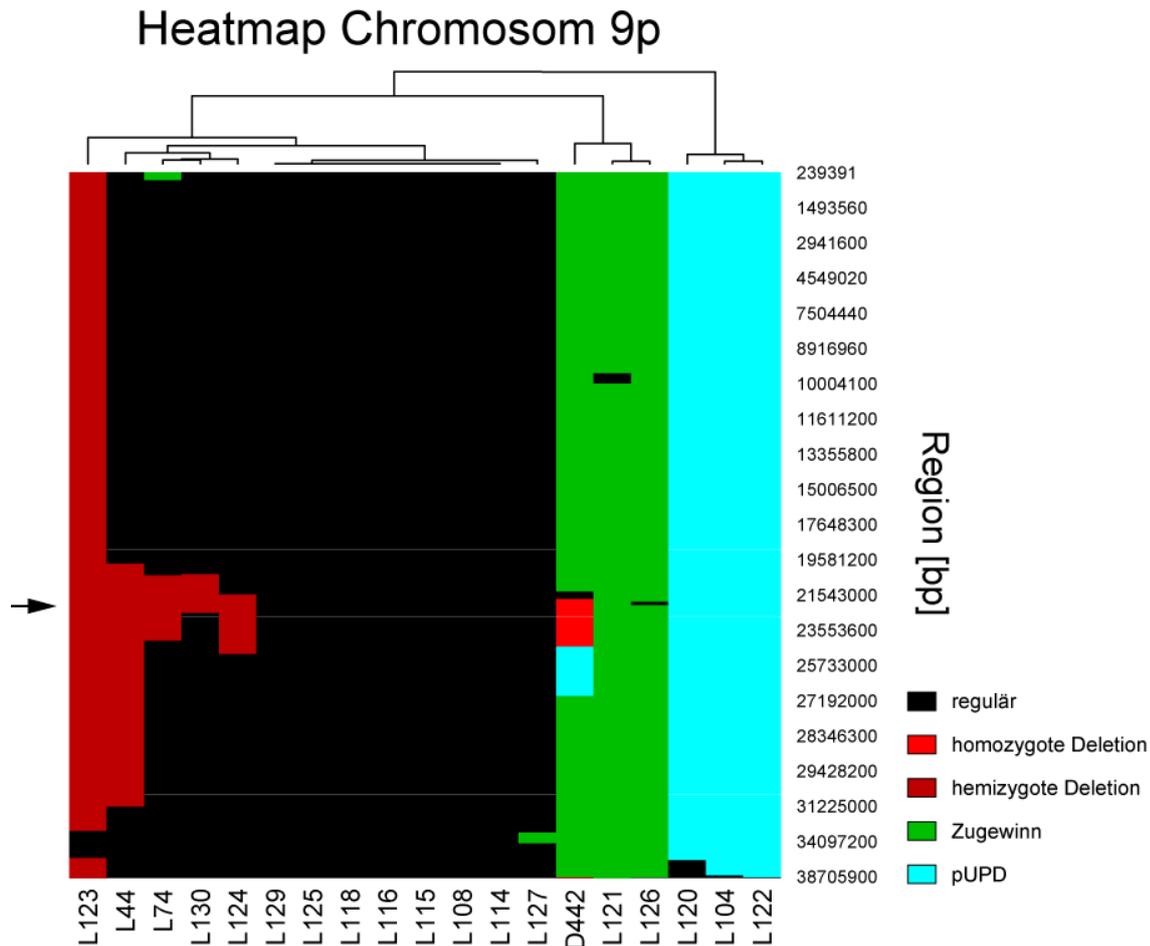


Abbildung 23: Heatmap von Chromosomenbande 9p. Der Pfeil markiert den Bereich rekurrenter Deletionen und pUPD in 9p21.3.

3.2. Identifizierung von Translokationspartnern durch LDI-PCR

3.2.1 Translokationspartner des *BCL6* Gens

Um den Mechanismus zu verstehen, der in PCNSL zu einer möglichen Deregulierung und Überexpression des *BCL6* Gens führt, und um andere potentielle Auswirkungen von Translokationen zu klären, die den *BCL6* Genlocus betreffen, ist es essentiell, die jeweiligen Translokationspartner zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA von sechs PCNSL Fällen kloniert. Das Vorhandensein eines Bruchpunktes innerhalb des *BCL6* Gens bzw.

einer Translokation in diesem Bereich war in allen sechs Fällen durch iFISH verifiziert, wobei die Nachweisrate in den sechs PCNSL zwischen 32% und 73% der Nuclei variierte. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass bei allen untersuchten Fällen mindestens 30%, in den meisten Fällen über 50% der Tumorzellen das BCL6 Protein exprimierten. Dies ist vergleichbar mit normalen, nicht malignen GCB-Zellen in Tonsillen. Bei vier der sechs untersuchten PCNSL konnten mittels LDI-PCR nach Restriktionsverdau mit XbaI bzw. BamHI spezifische klonierte Fragmente amplifiziert werden. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte und einem anschließenden Vergleich mit einer Online-Datenbank mit genomischen Sequenzen konnte in drei Fällen der Translokationspartner identifiziert und in einem Fall eine 837 kb Deletion nachgewiesen werden. Die jeweiligen Bruchpunkte innerhalb des MTC bzw. MMC sind in Abbildung 24 dargestellt. In PCNSL L43 lag eine T(3;14)(q27;q32) Translokation vor, die zu einer Fusion des *IgH* und des *BCL6* Genlocus führte (Abbildung 25A). Der Bruchpunkt in Chromosom 14 lag in der *switch* μ Region des *IgH* Genlocus. In der Bruchpunktregion des *IgH* locus lagen mehrere Punktmutationen sowie eine 373 bp lange Deletion vor. In PCNSL L80 lag eine T(3;22)(q27;q11) Translokation vor (Abbildung 25B). Dabei lag der Bruchpunkt im Chromosom 22 im Bereich des $V\lambda$ 3-1 Segments des *IgL* Genlocus. Durch die Sequenzierung des Produktes der Bruchpunkt überspannenden PCR konnten zwei Punktmutationen nachgewiesen werden, wobei jeweils eine im Bereich des *BCL6* Genlocus und des *IgL* Genlocus lokalisiert war. PCNSL L82 zeigte eine T(3;6)(q27;p22) Translokation, die das Histon 1 *H4I* Gen in der Chromosomenbande 6p22.1 involvierte (Abbildung 25C). In einem Tumor (PCNSL L87) wurde keine Translokation, sondern eine 837 kb große Deletion zwischen den Chromosomenbanden 3q27 und 3q28 nachgewiesen (Abbildung 25D). Dies führte zu einer Fusion des *BCL6* Genlocus mit einem Chromosomenbereich, der sowohl die Gene *LPP* als auch den Genlocus einer microRNA *hsa-miR-28* beherbergt. Letzteres Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der iFISH Untersuchung, bei der nur der Verlust des Signals der Sonde nachgewiesen wurde, die an den telomerischen Bereich des *BCL6* Genlocus bindet.

3.2.2 Translokationen im *IgH* Genlocus

Neben den genannten häufigen Translokationen, die den *BCL6* Genlocus betreffen, kommt es auch in 40-50% der B-Zell NHL zu chromosomalen Translokationen, in die der *Ig* Genlocus involviert ist. Anhand von iFISH wurde in 38% (5/13) der PCNSL ein Bruchpunkt im *IgH*

Genlocus identifiziert. Diese Fälle wurden einer weiteren Untersuchung zur Identifizierung der Translokationspartner mittels LDI-PCR zugeführt. Als Restriktionsenzyme wurden *Bgl2*, *HindIII*, *MunI*, *PaeI*, *TaqI* und *XbaI* verwendet. Somit wurde jeder Fall mit sechs unterschiedlichen Klonierungsansätzen untersucht, um sicher zu gehen, dass ein Restriktionsschnittpunkt im translocierten Partnerchromosom in relativer Nähe zum Bruchpunkt vorhanden ist und die klonierten Fragmente aus dem Restriktionsverdau nicht zu groß werden. Die LDI-PCR ergab in etwa 70% der Fälle Amplifikationsprodukte unterschiedlicher Größe (Abbildung 26), die über ein Agarosegel aufgetrennt, isoliert, gereinigt und anschließend sequenziert wurden. Alle Sequenzen ergaben lediglich Umlagerungen innerhalb des *IgH* Genlocus bzw. Artefakte. Im Fall L49 konnte durch die LDI-PCR des *MunI* Klonierungsproduktes eine T(14;10)(q32;q24) Translokation nachgewiesen werden, das Ergebnis war jedoch weder durch einen neuen Klonierungsansatz unter Verwendung desselben Restriktionsenzym reproduzierbar noch konnte die Translokation durch eine Bruchpunkt umspannende PCR verifiziert werden. Somit muss auch in diesem Fall von einem Klonierungsartefakt ausgegangen werden. Auch die Verwendung der Primer und des Protokolls, das von Sonoki et al.¹¹⁹ beschrieben wurde, führte zu keinem anderen Ergebnis.

Bruchpunktregion von *BCL6*

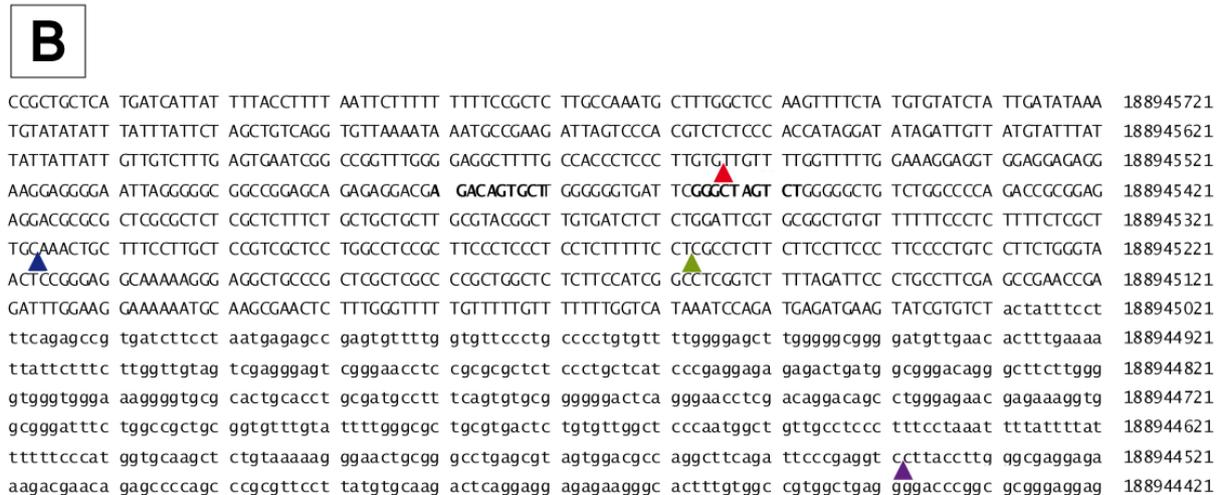
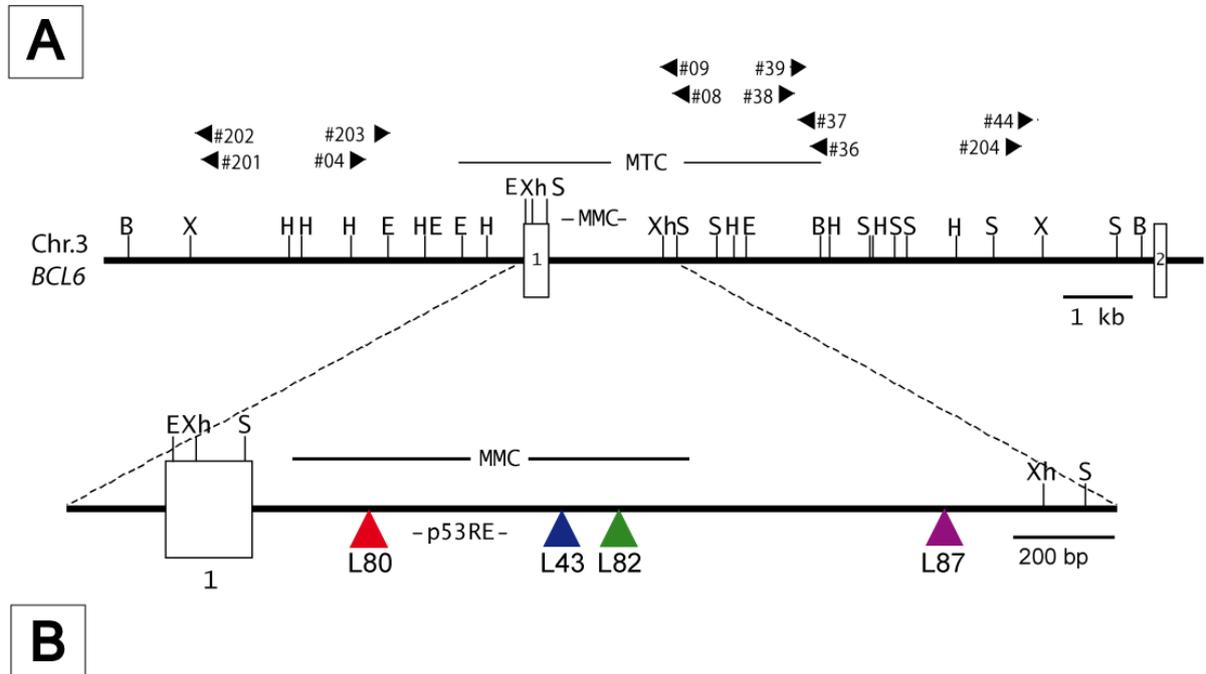


Abbildung 24: Ausschnitt aus dem Genlocus von *BCL6*. A: Lokalisation der Restriktionsschnittstellen. Die ersten zwei nicht-kodierenden Exone von *BCL6* sind als weiße Kästen dargestellt. Die schwarzen Pfeile markieren die Position und Ausrichtung der verwendeten Primer für die LDI-PCR. Restriktionsschnittstellen: E: EcoRI; B: BamHI; H: HindIII; X: XbaI; S: SacI; Xh: XhoI. Die bunten Pfeile in der unteren vergrößerten Darstellung eines Teils des Major Translocation Clusters (MTC) markieren die gefundenen Bruchpunkte der verschiedenen untersuchten PCNSL. B: Sequenz des Ausschnitts aus dem MTC: Der von somatischer Hypermutation besonders betroffene, sogenannte Major Mutational Cluster (MMC) ist in Großbuchstaben dargestellt. Die zwei Dekamere des p53 Response Elements (p53RE) sind fettgedruckt dargestellt. Die Bruchpunkte der einzelnen PCNSL sind wie in Abbildung A mit den bunten Pfeilen markiert.

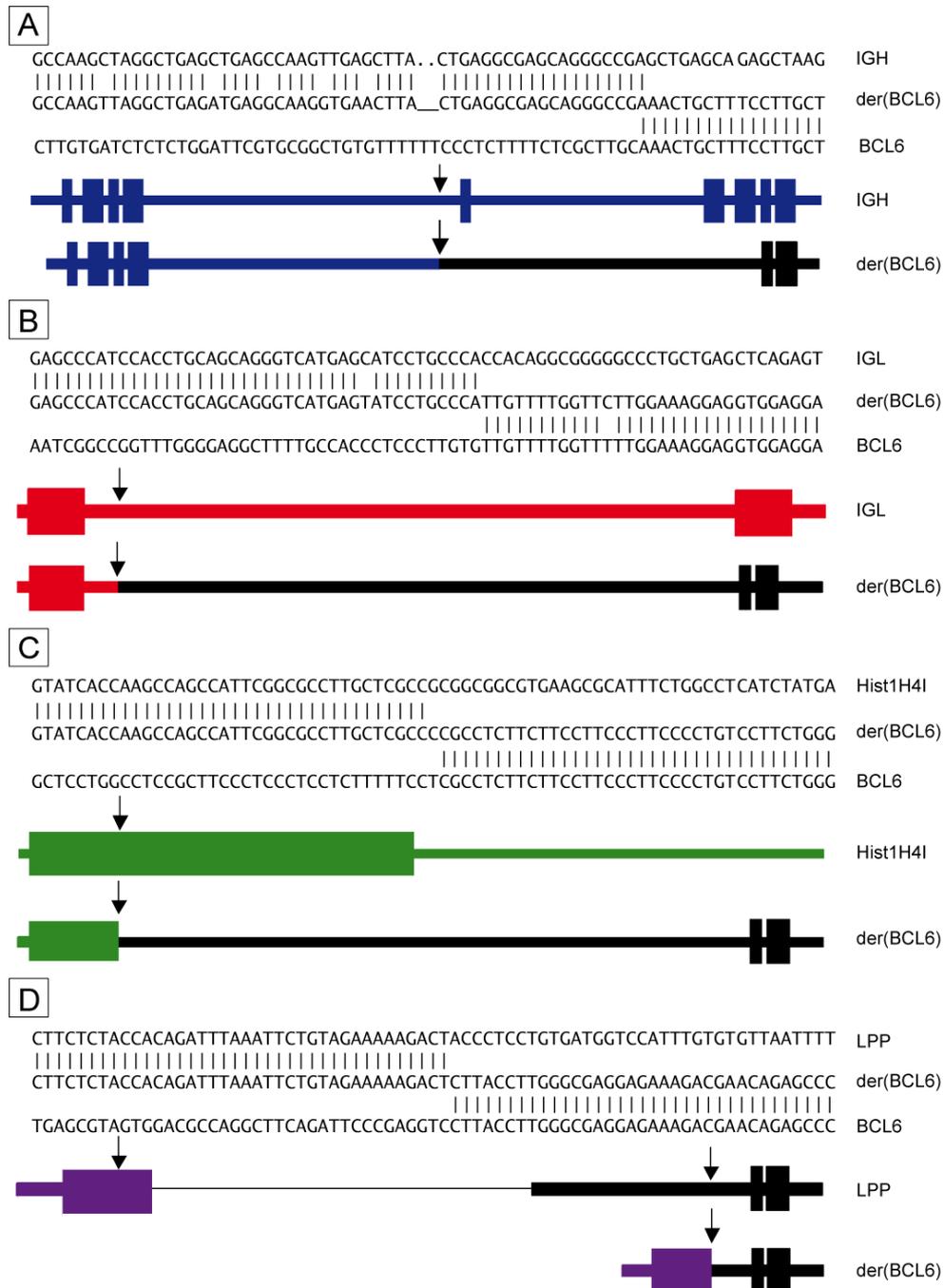


Abbildung 25: Schematische Darstellung und Nukleotidsequenz der *BCL6* Translokationen.

Die Boxen markieren Exone der betroffenen Gene. Die Pfeile markieren den Bruchpunkt. Bei den oberen und unteren Sequenzen handelt es sich jeweils um die Wildtypsequenzen der betroffenen Gene. Bei den mittleren Sequenzen der (*BCL6*) handelt es sich um die Sequenz der Translokation. Senkrechte Striche zwischen den Sequenzen markieren Übereinstimmungen. **A:** PCNSL L43. Die Punkte innerhalb des IgH Genlocus markieren den deletierten Bereich in der Translokation. **B:** PCNSL L80. **C:** PCNSL L82. **D:** PCNSL L87. Die dünne schwarze Linie in der schematischen Darstellung markiert den deletierten Bereich.

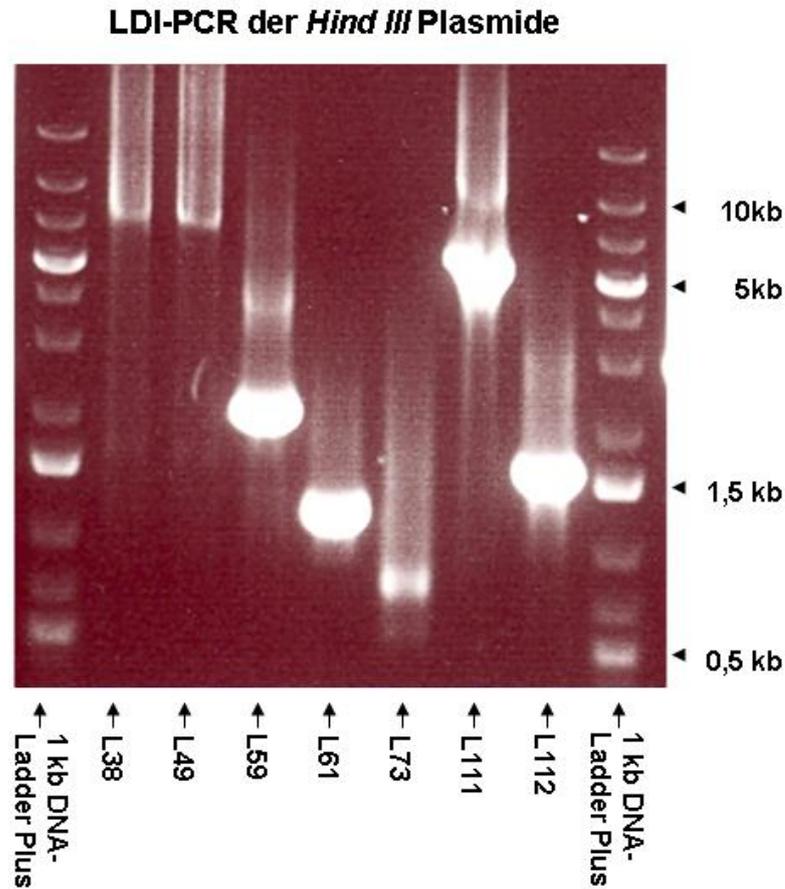


Abbildung 26: Fotografie eines Agarosegels mit LDI-PCR Produkten. Als Template wurden die jeweiligen Ligationsprodukte aus dem Restriktionsverdau mit *Hind* III verwendet. Die verwendeten Primer binden stromaufwärts der *switch μ* Region des IgH Genlocus. Ohne genomische Umlagerungen oder Translokationen im IgH Genlocus müsste sich hier ein LDI-PCR Produkt von knapp 10 kb ergeben. Produkte dieser Größe können hier als entsprechende Banden bei L38, L49 und L111 nachgewiesen werden. Bei L73 handelt es sich hier um ein Artefakt der LDI-PCR. Durch Sequenzierung der extrahierten Banden von L59, L61, L111 und L112 konnten allerdings lediglich Umlagerungen bzw. Deletionen innerhalb des IgH Genlocus nachgewiesen werden. Translokationspartner wurden nicht identifiziert.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation und Charakterisierung genomischer Veränderungen bei primären Lymphomen des Zentralnervensystems mit Hilfe von Microarray-Technologien und komplexer PCR-Methoden. Dabei muss die begrenzte Menge an zur Verfügung stehendem Tumormaterial aus stereotaktischen Biopsien berücksichtigt werden. Methoden, die den Einsatz großer Mengen an DNA oder RNA erfordern, sind daher nicht anwendbar. Die Anwendung der 100K GeneChip® Mapping-Analyse ermöglichte eine hochauflösende Detektion und Kartierung von Regionen mit chromosomalen Imbalancen und partiellen uniparentalen Disomien selbst bei Einsatz von nur 250 ng genomischer DNA pro Microarray. Balancierte Translokationen wurden am Beispiel des *BCL6* Genlocus durch Applikation der Long-Distance-Inverse PCR genauer charakterisiert.

4.1 Microarray Untersuchungen

Mit Hilfe der 100K GeneChip® Mapping-Analyse konnten chromosomale Imbalancen wesentlich genauer charakterisiert werden als durch bisherige Untersuchungen anhand konventioneller komparativer Genomhybrisierung (CGH). Diese Methode ermöglichte es sogar, solche deletierten MCR nachzuweisen, die nur einzelne Gene betrafen, wie *FHIT* (in 3p14.2), *SCFD2* (in 4q12), *FAS* (in 10q23.21), und *ETV6* (in 12p13.2). Mit den beiden verwendeten 50K GeneChip® Microarrays (Xba I und Hind III) wurden insgesamt je 116.204 SNPs untersucht, was einer theoretischen Auflösung von etwa 24 kb entspricht. Desweiteren konnten anhand dieser Technologie bisher in PCNSL nicht beschriebene rekurrente Regionen mit pUPD nachgewiesen werden, die am häufigsten die Region 6p25.3-p21.32 betrafen. In dieser Region liegt unter anderem der Genlocus für den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I und II (MHC: Major Histocompatibility Complex), wobei letzterer auch besonders häufig von Deletionen betroffen ist. Eine weitere rekurrent von pUPD betroffene Region liegt in 9p24.3-p13.2. In dieser Region sind unter anderem die ebenfalls häufig deletierten Genloci der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* und *CDKN2B*⁴⁶ lokalisiert. Dies erhärtet den Verdacht, dass ein Vorliegen von pUPD hier zur Schaffung der Voraussetzungen beitragen kann, die für die Tumorentstehung bzw. Tumorprogression essentiell sind. Auffällig an den Ergebnissen dieser Studie ist, dass die untersuchten Fälle deutlich stärker von Deletionen betroffen sind, als frühere Studien erwarten ließen^{19, 46, 72}. Allerdings handelt es sich bei den meisten Deletionen um relativ kleine

chromosomale Bereiche, die mit früheren Methoden kaum nachzuweisen waren. Zugewinne an genetischem Material betrafen dagegen hauptsächlich größere chromosomale Regionen.

Somit zeichnen sich PCNSL durch einen komplexen Karyotyp aus mit zahlreichen numerischen Abnormitäten.

4.1.1 Minimale Aberrante Regionen (MCR)

Fasst man die Ergebnisse der Copy Number Analyse und der LOH Analyse zusammen, so treten die häufigsten Aberrationen in einem ca. 500 kb großen Abschnitt im Bereich 6p21.32 auf. 14 von 19 PCNSL zeigen eine Aberration in diesem Bereich, darunter zwei homozygote Deletionen, fünf hemizygoten Deletionen und sieben pUPD. Dies legt die Vermutung nahe, dass Gene des betroffenen Bereichs in die Pathogenese von PCNSL involviert sind. Hierzu zählen die Gene des MHC Klasse II Locus, aber auch die Gene *TAP1* und *TAP2*. Letztere spielen eine Rolle beim intrazellulären Transport von Antigenen und der korrekten Zusammensetzung des MHC Klasse I Antigens auf der Zelloberfläche⁷³. Eine fehlerhafte Antigen- und MHC Expression auf der Zelloberfläche könnte dazu führen, dass die betroffenen Zellen in immunprivilegierten Regionen wie dem ZNS und den Hoden, in denen physiologischerweise der immunologische Phänotyp herunterreguliert ist, einer Immunantwort durch T-Lymphozyten entkommen⁷⁴⁻⁷⁸. Normalerweise werden Zellen, die kein MHC Klasse I Antigen exprimieren, durch natürliche Killerzellen abgetötet, aber ob dies im ZNS überhaupt möglich ist, ist bisher nicht bekannt. In extracerebralen DLBCL führt die Abwesenheit einer MHC Klasse II Antigen Expression zu einer signifikant verminderten Zahl CD8 positiver T-Zellen im Tumorgewebe⁷⁹. Außerdem korreliert die Abwesenheit der MHC Klasse II Antigen Expression mit einer schlechteren Prognose bei extracerebralen DLBCL⁸⁰. Die Annahme, dass die fehlerhafte oder fehlregulierte Expression von MHC Klasse II eine Rolle bei der Pathogenese der PCNSL spielt, wird auch durch das Vorhandensein eines rekurrenten Zugewinns an genomischem Material im Bereich der Zytobande 9p21.1-p21.3 unterstützt. In diesem Bereich liegt das Gen für den transkriptionalen Repressor *NFX1*⁸¹, der zumindest in vitro in der Lage ist, die Transkription von *HLA-DRA* und anderer MHC-II Gene zu inhibieren.

Die zweithäufigste Deletion in den untersuchten Fällen betraf eine 2 Mb große MCR in der Zytobande 6q21, die auch häufig in verschiedenen B-Zell Lymphomen und Leukämien wie DLBCL, Mantelzelllymphom (MCL), akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und

immunoblastischem Lymphom deletiert ist^{19, 82-85}. Im betroffenen Bereich liegt (neben 11 weiteren RefSeq Genen) das Gen *PRDM1* (PRDM1: positive regulatory domain I protein, with ZNF domain), das den Tumorsuppressor Blimp-1 (Blimp-1: B-lymphocyte induced maturation protein 1) kodiert. PRDM1 ist der zentrale Regulator der B-Zell-Differenzierung zur Plasmazelle^{56, 84, 86}. Blimp-1 aktiviert die Plasmazelldifferenzierung der Keimzentrums-B-Zellen, 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 wichtiges Zielgen von Blimp-1 ist BCL-6, dessen Expression durch Blimp-1 reprimiert wird. Eine BCL-6-Überexpression wiederum reprimiert PRDM1 und unterdrückt somit die Plasmazelldifferenzierung. Eine vollständige Sequenzierung aller acht Exone im Rahmen dieser Arbeit ergab für die Fälle mit 6q21 Deletionen jedoch keine auffälligen Mutationen, während im Rahmen einer anderen Studie inaktivierende rekurrente Mutationen des *PRDM1* Genlocus in vier von 21 PCNSL (19%) nachgewiesen wurden⁵⁶.

In neun der untersuchten 19 Fälle (47%) wurde eine etwa 2,3 Mb große MCR mit Zugewinn an genetischem Material identifiziert, die eine Region in der Zytobande 19q13.43 betraf. In dieser Region sind viele Gene von Zinkfingerproteinen lokalisiert, die über eine potentielle transkriptionale Regulation an der Pathogenese beteiligt sein können.

Ebenfalls in neun der 19 Fälle wurden rekurrente Aberrationen nachgewiesen, die eine 1 Mb große Region in 9p21.3 betreffen. Hierbei handelt es sich um eine homozygote Deletion in einem Fall, hemizygoten Deletionen in fünf Fällen und pUPD in drei Fällen. Die Aberrationen betreffen die Tumorsuppressorgene *MTAP*, *CDKN2A* und *CDKN2B*, die an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt sind. Deletionen in dieser Region findet man sehr häufig in unterschiedlichen Tumoren und Lymphomen wie DLBCL, MALT-Lymphom, ALL, Mamma- und Leberkarzinom⁸⁷⁻⁹². Eine Analyse des Methylierungsstatus durch Pyrosequenzierung ergab eine erhöhte Methylierung des *CDKN2A* (*p16*, *p16INK4a*) Genlocus bei den untersuchten Fällen mit Deletionen in der Region verglichen mit PCNSL ohne Deletionen in der Region. Somit kann diese Methylierung zur Inaktivierung des Tumorsuppressors p16 führen. p16 inhibiert spezifisch die Formierung von CyclinD/CDK4- und CyclinD/CDK6-Komplexen und verhindert damit die G1 Zellzyklusprogression und das Erreichen des Restriktionspunktes was zu einem Arrest der Zelle im G1/G0 Stadium führt⁹³. Eine fehlerhafte Zellzykluskontrolle gilt als ein Schlüsselmechanismus der Tumorgenese. Die Inaktivierung von p16 in systemischen DLBCL

resultiert in einer schlechteren Prognose. Dies mag auch zur schlechten Prognose bei PCNSL beitragen⁹⁴.

In sieben der 19 untersuchten Fälle (37%) wurde eine etwa 1,2 Mb große MCR mit Zugewinn an genetischem Material identifiziert, die eine Region in der Zytobande 19q13.13 betraf. In dieser Region sind ebenfalls über 30 Gene lokalisiert, darunter mehrere Gene von Zinkfingerproteinen. Außerdem wurden in sechs der 19 untersuchten Fälle (32%) bisher unbekannte Deletionen mit einer 2,2 Mb MCR zwischen 8q12.1 und 8q12.2 nachgewiesen. Diese Deletionen betrafen den Genlocus des nukleären Faktors *TOX*(*KIAA0808*), der eine essentielle Rolle bei der CD4 T-Zell Entwicklung spielt⁹⁵. Untersuchungen an *TOX*-defizienten Mäusen ergaben eine reduzierte Population IgG-positiver B-Zellen in der Milz, während die Population unreiferer B-Zellen offensichtlich normal war. Ob *TOX* auch an der fehlenden Weiterdifferenzierung und der Abwesenheit eines Ig-Klassenwechsels von PCNSL beteiligt ist, ist bisher noch unbekannt. Bislang sind Deletionen von *TOX* lediglich in 4% (8/205) juveniler ALL-Patienten bekannt⁹⁶. Ein weiteres Kandidatengen in dieser Region ist das Onkogen *CA8*, welches Wachstum und Proliferation von Colonkarzinomzellen sowie die Invasion von gastrointestinalen Tumoren und Adenokarzinomen der Lunge fördert⁹⁷⁻⁹⁹. Die Auswirkungen einer Deletion dieses Gens sind bisher nicht untersucht. Ebenfalls von den Deletionen betroffen ist das Ras-assoziierte *rab2* Gen in dieser Region. Die Rolle dieser Gene in der Pathogenese der PCNSL ist bisher noch nicht bekannt.

Mit der 100K GeneChip® Mapping-Analyse wurden auch mehrere Aberrationen erkannt, die lediglich vier der 19 Fälle (21%) betrafen. Sie sind dennoch besonders erwähnenswert, weil davon oft nur jeweils einzelne oder sehr wenige Gene betroffen waren. Eine dieser selteneren kleinen Aberrationen betrifft eine ca. 230 kb große Region in 3p14.2, die den Tumorsuppressor *FHIT* beinhaltet. *FHIT*, das vermutlich eine wichtige Rolle bei der Supression systemischer Tumore spielt^{100, 101}, ist in 33% (19/57) der systemischen DLBCL entweder mutiert oder deletiert. Eine verminderte *FHIT*-Expression korreliert dabei mit einer schlechteren Prognose.

Eine weitere, 140 kb große MCR mit Deletionen betrifft das Tumorsuppressorgen *FAS*, welches das CD95 Antigen kodiert. CD95 ist ein Transmembranrezeptor der TNF-Rezeptorfamilie, einem sogenannten Todesrezeptor, der bei der extrinsisch vermittelten Apoptose eine entscheidende Rolle spielt. Deletionen oder Mutationen, die *FAS* betreffen, können daher die extrinsische Einleitung der Apoptose durch z.B. T-Lymphozyten oder Liganden vom Typ des

Tumornekrosefaktors erschweren. In früheren Studien wurden Mutationen, die Exon 9 des *FAS* Gens betrafen, in 20% der untersuchten PCNSL (2/10) nachgewiesen¹⁰².

In 12p13.2 wurde eine weitere, 216 kb große MCR mit Deletionen gefunden. Diese Region liefert ein besonders interessantes Aberrationsbild, da hier zum einen eine homozygote Deletion vorliegt. Zum anderen wurde diese Deletion in einem Fall auch innerhalb eines Bereichs mit Zugewinn an genetischem Material gefunden. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der Deletion um die primäre Aberration handelt, während der Zugewinn erst später erfolgte. Von den Deletionen ist hier ein Teil des *ETV6* Gens betroffen, ein Transkriptionsfaktor der ETS-Familie, der bei der akuten lymphoblastischen und myeloischen Leukämie sowie im Myelodysplastischen Syndrom häufig an Translokationen beteiligt ist¹⁰³. Die geringen Ausmaße des deletierten Bereiches könnten sich auch durch Vorliegen einer Translokation erklären lassen, bei der ein Stück der Bruchpunktregion verloren gegangen ist. Diese Annahme ließ sich bisher jedoch noch nicht durch iFISH Analysen verifizieren.

Weitere MCR in vier der 19 Fälle mit copy number Abberationen betreffen Deletionen in 4q35.2 mit dem Tumorsuppressor *FAT1*, das bisher noch wenig charakterisiert wurde und ein putatives Zelladhäsionsmolekül kodiert.

Ebenfalls in vier der 19 Fälle ist eine 800 kb große Region in 4q35.2 deletiert, in der noch keine Kandidatengene beschrieben wurden.

Außerdem weisen vier der 19 Fälle einen Zugewinn von 8,3 Mb in 7q21.3-q22.1 auf. Davon sind etwa 50 Gene betroffen, unter denen noch kein Kandidatengen identifiziert werden konnte.

In weiteren vier der 19 Fälle konnte eine MCR mit Zugewinn in 9p21.1-p21.3 nachgewiesen werden. In diesem Bereich ist das bereits erwähnte *NFX1* lokalisiert, sowie das BCL2 assoziierte Anthanogen *BAG1*, das den antiapoptotischen Effekt von BCL2 verstärkt¹⁰⁴.

4.1.2 Größere detektierte Imbalancen

Die meisten der größeren detektierten Imbalancen bestätigen frühere Ergebnisse, die man z.B. mit konventioneller CGH oder mit iFISH erhalten hat.

Am häufigsten ist der Bereich 18q21.33-q23 betroffen. Mit 43% (8/19) liegt der ermittelte Wert leicht über den Daten früherer Studien über iFISH und CGH Untersuchungen^{19, 105}, die Zugewinne in 18q in 38-39% der PCNSL fanden. Das genaue Zielgen in diesem Bereich ist allerdings noch nicht sicher identifiziert. Mittels Realtime-PCR und immunhistochemischer

Untersuchungen wurde eine deutlich erhöhte Expression von BCL2 in PCNSL nachgewiesen¹⁰⁶. Außerdem spricht die Tatsache, dass *BAG1* in über 20% der untersuchten PCNSL in erhöhter Kopienzahl vorliegt, ebenfalls dafür, dass *BCL2* hier an der Pathogenese beteiligt ist. BAG1 interagiert mit BCL2 und verstärkt dessen antiapoptotische Wirkung. Ein weiteres Kandidatengen in der von Zugewinnen betroffenen Region ist *MALT1*. Dieses Gen kodiert eine Parakaspace, die an der NF- κ B-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist¹⁰⁷. Der NF- κ B-vermittelte Signalweg spielt bei der Pathogenese zahlreicher Tumore eine entscheidende Rolle und ist mit einer hohen Malignität und Apoptoseresistenz assoziiert¹⁰⁸. Kürzlich zeigten Courts *et al.*¹⁰⁶, dass in PCNSL die NF- κ B-vermittelte Signaltransduktion im Vergleich zu nicht-malignen Keimzentrums-B-Zellen aktiviert ist. Chromosom 12, bei dem in fünf von 19 Fällen (26%) eine Trisomie vorliegt, enthält eine Vielzahl möglicher Kandidatengene. Hierzu zählen z.B. *MDM2*, das das Tumorsuppressorgen *p53* reguliert und damit antiapoptotisch wirken kann, *CDK4*, ein Zielgen des bereits genannten Tumorsuppressors *p16*, das bei der Regulierung des Zellzyklus und dem Erreichen des Restriktionspunktes beteiligt ist, *GLI*, ein Proto-Onkogen und Transkriptionsfaktor des SHH/Patched Signalweges, der bei der Pathogenese des Basalzellkarzinoms und bei malignen Gliomen eine entscheidende Rolle spielt⁵⁸, sowie Frizzled Rezeptoren des Wnt/ β -Catenin Signalweges.

Mit dem hier ermittelten Gesamtmuster chromosomaler Imbalancen bei PCNSL lassen sich diese durch Vergleich mit den veröffentlichten Daten anderer Studien definierten Untergruppen von DLBCL zuordnen. Von Alizadeh *et al.* konnten die systemischen DLBCL anhand unterschiedlicher Genexpressionsprofile in verschiedene Subtypen unterteilt werden¹⁰⁹, die sich in der Prognose, der Proliferationsgeschwindigkeit und im Differenzierungsgrad der Tumorzellen unterscheiden. Von einem Subtyp werden dabei vornehmlich Gene exprimiert, die charakteristisch für Keimzentrums-B-Zellen sind (GCB-DLBCL; GCB: germinal center B-cell), während ein anderer Subtyp mit schlechterer Prognose vornehmlich Gene exprimiert, die auch während der *in vitro* Aktivierung in periphere Blutzellen exprimiert werden (ABC-DLBCL; ABC: activated B-cell). Kürzlich wurde z.B. durch aCGH bei DLBCL gezeigt, dass Zugewinne an genetischem Material in Chromosom 19 in 26% der ABC-DLBCL aber nur in 3% der GCB-DLBCL vorkommen¹¹⁰. Bei den hier untersuchten PCNSL wurden Zugewinne in Chromosom 19 sogar in 47% (9/19) der Fälle nachgewiesen. Weitere nachgewiesene Imbalancen, die eher für eine Zuordnung zu den DLBCL vom ABC-Typ sprechen, sind der häufige Verlust des Chromosomenarmes 6q, die Deletion in 9p21.3, die *CDKN2A* und *CDKN2B* betrifft und

Zugewinne großer Bereiche des 18q Arms. Dagegen konnte eine Trisomie von Chromosom 3, die sich in über 25% der ABC-DLBCL zeigt und dabei unter anderem das Gen *FOXP1* betrifft, im Rahmen dieser Studie nur in zwei von 19 Fällen (11%) nachgewiesen werden. Andererseits treten in PCNSL auch häufig Zugewinne bzw. Trisomien von Chromosom 12 auf, die nur in DLBCL vom GCB-, aber nicht vom ABC-Typ auftreten. In 16% der Fälle (3/19) kommt es zusätzlich zu einer Deletion, die den Genlocus von *PTEN* betrifft, ein Gen, das bisher ebenfalls nur in einigen Fällen von GCB-DLBCL nachgewiesen wurde. Vergleicht man die Muster chromosomaler Imbalancen der einzelnen Fälle, so fällt auf, dass bei den PCNSL häufig gemeinsame Imbalancen vorliegen, die bei systemischen DLBCL nur explizit in einer der beiden Untergruppen vorkommen. So liegt beispielsweise bei PCNSL L118 ein Zugewinn in 19q vor, was für die Zuordnung zu den ABC-DLBCL spricht. Gleichzeitig konnte im selben Fall aber auch eine Trisomie in Chromosom 12 und eine Deletion in Chromosom 10q23, die *PTEN* betrifft, nachgewiesen werden. Diese sind innerhalb der systemischen DLBCL nur in der Untergruppe der GCB-DLBCL vorzufinden¹¹⁰. Insgesamt lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass genomische Aberrationen in PCNSL eine Vielzahl verschiedener Gene betreffen, die sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Pathogenese haben können. Eine klare, eindeutige Zuordnung zu den klassifizierten Subgruppen systemischer DLBCL anhand der vorliegenden Microarray Daten ist nicht ohne weiteres möglich.

4.2 Chromosomale Translokationen

PCNSL sind durch rekurrente Translokationen gekennzeichnet, die sowohl den Genlocus von *BCL6* als auch von *IGH* betreffen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der Beantwortung der Frage, welche möglichen Konsequenzen sich aus den häufigen Translokationen in PCNSL ergeben können, die die Genloci von *BCL6* und *IGH* betreffen⁶¹. Dazu sollten Translokationspartner dieser Gene in den davon betroffenen Fällen identifiziert werden. Da PCNSL bisher nicht erfolgreich in Zellkultur genommen werden können, sind bei PCNSL Methoden, die z.B. eine Präparation von Metaphasechromosomen erfordern, nicht anwendbar. Außerdem handelt es sich bei den zur Verfügung stehenden Proben nur um sehr kleine stereotaktische Biopsate, die lediglich eine Isolation von teilweise unter einem Mikrogramm an genomischer DNA erlauben. Als einzige zur Zeit zugängliche, erfolgversprechende Methode konnte hier daher nur iFISH zur Identifikation von Bruchpunkten

im Bereich einzelner Kandidatengene in Kombination mit LDI-PCR zur Identifizierung von Translokationspartnern bei den ermittelten Proben mit Bruchpunkten angewendet werden.

4.2.1 Translokationspartner von *BCL6*

Chromosomale Aberrationen mit einem Bruchpunkt in Chromosomenbande 3q27, die den Genlocus von *BCL6* betreffen, kommen in 38% (14/37) der PCNSL vor⁶¹ und sind auch in anderen systemischen DLBCL ähnlich häufig, während sie z.B. in Follikulären Lymphomen nur in einer Häufigkeit von 15% auftauchen^{62, 111, 112}. In einigen Studien wurden *BCL6*-Translokationen sowohl für systemische DLBCL als auch für PCNSL als prognostisch relevant eingestuft¹¹³. Die häufigen Translokationen in diesem Bereich sind vermutlich auf eine fortdauernde SHM zurückzuführen, die auch den *BCL6* Locus betrifft. PCNSL sind auch durch aberrante somatische Hypermutationen gekennzeichnet, die neben den natürlichen Zielen *IGH* und *BCL6* auch viele Proto-Onkogene wie *PAX5*, *RhoH/TTF*, und *PIMI* betreffen³⁷.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier bisher in PCNSL nicht beschriebene Translokationspartner identifiziert werden, welche die aus früheren Studien bekannten Translokationspartner *GAPD* und *HSP90A* ergänzen⁶⁴; ein beachtlicher Erfolg in Hinblick auf die geringe Menge an DNA, die für die entsprechenden Untersuchungen zur Verfügung stand. In allen untersuchten PCNSL mit *BCL6*-Translokationen wurde *BCL6* exprimiert, was den Verdacht nahelegt, dass die Translokationen zu einer Deregulierung der *BCL*-Transkription führten. Tatsächlich handelt es sich bei *Hist1H4I* um ein Gen, dessen Expression stark an die DNA Replikation gebunden ist. Eine solche Translokation wurde von Akasaka et al. bereits 1997 bei anderen NHL beschrieben¹¹⁴. Bei dieser Translokation, die in einem PCNSL (L82) nachgewiesen wurde, kommt es zu einem Austausch der regulatorischen Elemente am 5' Ende des *BCL6* Gens durch die regulatorischen Elemente des *Hist1H4I* Gens, das in gleicher Orientierung vorliegt. Auch die damaligen Autoren hatten die Vermutung, dass es dadurch zu einer deregulierten Expression von *BCL6* kommt. Studien an COS-7 Zelllinien, die mit *H4/BCL6* Fusionsplasmiden transfiziert wurden, zeigten eine starke *BCL6* Expression der transfizierten Zellen.

Auch bei den Translokationen, die zwei weitere PCNSL (L43 und L80) betrafen, kommt es zu einem Austausch der regulatorischen Elemente von *BCL6* durch Teile der Gene *IgH* bzw. *IGL*. Diese liegen ebenfalls in derselben Orientierung wie *BCL6* vor, was zu einer deregulierten *BCL6*-Transkription und -Expression führt. Sowohl im translocierten *IgH* als auch *IGL* Bereich konnten

Punktmutationen nachgewiesen werden. Im *IgH* Bereich waren diese Mutationen allerdings deutlich häufiger. Außerdem wurde hier auch ein größerer deletierter Bereich nachgewiesen. Da der Bruchpunkt in der *switch* μ Region liegt, könnte in diesem Fall ein aberranter Versuch des Klassenwechsels an der Translokation beteiligt gewesen sein. Dies kann ursächlich für die Beobachtung sein, dass PCNSL lediglich IgM und IgD exprimieren und somit keinen Ig-Klassenwechsel vollziehen. Translokationen, welche die Gene der Immunglobuline betreffen, treten relativ häufig in B-Zell Lymphomen auf.

In einem PCNSL (L87) kam es allerdings zu keiner wirklichen Translokation sondern zu einer intrachromosomalen Deletion, die ein 837 kb großes Fragment im telomerischen Bereich von *BCL6* und dessen regulatorischen Elementen betrifft. Darau Aneinanderlagerung des Genlocus vom Proto-Onkogen *LPP* und von *BCL6*. Außerdem liegt in dem angelagerten Bereich noch der Genlocus für die microRNA *hsa-miR-28*¹¹⁵. Da jedoch sowohl *LPP* und *hsa-miR-28* einerseits und *BCL6* andererseits in umgekehrter Orientierung vorliegen, kann durch die Aneinanderlagerung dieser Gene eine Deregulierung von *BCL6* durch Promotorsubstitution nicht ohne weiteres erklärt werden. Leider war hier für weitergehende Untersuchungen kein Material/Gewebe mehr vorhanden. *LPP* selbst liegt häufig in mesenchymalen Tumoren translociert vor^{116,117}. In Lipomen kommt es dabei häufig zur *HMGIC/LPP* Fusionsproteinen¹¹⁸.

4.2.2 Untersuchung von PCNSL mit *IGH*-Translokationen

Neben *BCL6* ist der *IGH* Genlocus in PCNSL sehr häufig an Translokationen beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, weitere Translokationspartner von *IgH* außer der bereits genannten *IGH/BCL6* Translokation zu identifizieren, obwohl durch die Klonierung vieler verschiedener Restriktionsprodukte mit anschließender LDI-PCR eine Vielzahl unterschiedlich großer Fragmente isoliert wurde. Dabei wurden sowohl mehrere veröffentlichte Protokolle^{62, 63, 119-121} erprobt als auch eigene Protokolle erstellt. Allerdings liefern die Ergebnisse der Bruchpunkt-überspannenden PCR von L43 und der Sequenzierungen der LDI-PCR Produkte Erklärungen für die Nichtidentifikation der Translokationspartner:

1. Durch eine Vielzahl von Mutationen und Deletionen in PCNSL in der *switch* μ Region und teilweise auch in den anderen Bereichen des *IgH* Genlocus kommt es zwangsläufig zu PCR-Produkten mit unerwarteten Produktgrößen.
2. Es wurden häufig Umlagerungen innerhalb des *IgH* Locus nachgewiesen.

3. Sowohl die Häufigkeit von Mutationen und Deletionen als auch von hochrepetitiven Bereichen im *IgH* Genlocus machen die Wahl geeigneter Primer für die LDI-PCR bei PCNSL nahezu unmöglich und sorgen für eine Vielzahl von Artefakten.
4. Eine LDI-PCR kann nur dann erfolgreich sein, wenn das Keimbahnprodukt unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht deutlich besser amplifiziert wird als das Produkt der translozierten Sequenz.

Somit muss leider festgestellt werden, dass LDI-PCR, vor allem in Hinblick auf die starke Mengenlimitierung der verfügbaren DANN, nur eingeschränkt dazu geeignet ist, Translokationspartner in PCNSL zu identifizieren. Eine Identifizierung von Translokationspartnern des *IGH*-Locus in PCNSL ist bislang auch noch keiner anderen Arbeitsgruppe gelungen.

5. Zusammenfassung

Bei den primären Lymphomen des Zentralnervensystems (PCNSL) handelt es sich um diffus-großzellige Lymphome vom B-Zell Typ mit ausschließlicher Manifestation im ZNS ohne systemischen Befall. Die Tumore sind durch anhaltende aktive somatische Hypermutation und durch Abwesenheit eines Immunglobulin-Klassenwechsels gekennzeichnet. Sie weisen einen „late germinal center exit“ Phänotyp auf.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Charakterisierung genomischer Aberrationen bei PCNSL. Eine Reihe von 19 PCNSL wurde hierfür mit dem hochauflösenden GeneChip® Human Mapping 100k Assay Kit von Affymetrix untersucht. Mittels dieser Methode konnten eine Vielzahl genomischer Imbalancen und Bereiche mit Verlust an Heterozygotität nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigen zum einen frühere Ergebnisse, die mit weniger sensitiven Methoden erzielt wurden, wie häufige, umfangreiche Verluste in den Chromosomenarmen 6q, 4q, 6p und 9p oder Zugewinne in Chromosom 12, 18q, 19q und X. Darüber hinaus wurden auch neue Regionen mit Imbalancen identifiziert, die in PCNSL bisher nicht bekannt waren, darunter kleine ca. 200 kb umfassende Regionen mit Deletionen in 3p14.2, 8q12.1-q12.2, 10q23.1 und 12p13.2, sowie Zugewinne in 7q21.3-22.1 und 9p21.1-p21.3. Außerdem ermöglichte diese Methode die Identifizierung von Regionen mit partieller uniparentaler Disomie, die vor allem Teile der kurzen Arme von Chromosom 6 und Chromosom 9 betrafen. Besonders häufig fallen die gefundenen Aberrationen der untersuchten PCNSL in die Genloci von Genen, die für eine korrekte T- und NK-Zell-vermittelte Immunantwort von essentieller Bedeutung sind. Hier handelt es sich einerseits um Teilbereiche der Gene der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC Klasse I und II) selbst. Andererseits sind mit *TAP1* und *TAP2* auch Gene betroffen, die für den korrekten Zusammenbau und der Präsentation von MHC Klasse I notwendig sind. Das von Zugewinn betroffene *NFX1* reprimiert wiederum die Expression von Genen des MHC Klasse II Komplexes. Eine weitere Untergruppe der von Aberrationen betroffenen Gene ist an der Steuerung der Apoptose beteiligt: Deletionen, die *FAS*(CD95) betreffen, können die extrinsisch vermittelte Apoptose durch T-Lymphozyten erschweren. Die Apoptose selbst kann durch Hemmung von p53 durch z.B. MDM2 oder BCL6 ebenso wie durch eine erhöhte Expression von *BCL2* und *BAG1* unterbunden werden. Ein weiterer, häufig beeinträchtigter Mechanismus, der bei der anhaltenden Proliferation eine Rolle spielt, ist der Wegfall der p15/p16-vermittelten Kontrolle des Zellzyklus durch Deletion bzw.

Inaktivierung dieser Gene. Als letztes Ergebnis von zentraler Bedeutung ist die häufige Deletion in 6q21 zu nennen, die unter anderem *PRDM1* betrifft, welches eine zentrale Rolle in der Steuerung der Ausdifferenzierung der B-Zellen in den Keimzentren und beim Beenden der Keimzentrumsreaktion spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem die häufigen Translokationen, die den *BCL6* und den *IgH*-Locus betreffen, genauer untersucht. Durch LDI-PCR konnten vier bisher bei PCNSL nicht beschriebene Translokationspartner identifiziert werden. Eine Deletion, die zu einer Aneinanderlagerung von *BCL6* und *LPP* führt, wurde bisher auch in anderen Tumorentitäten noch nicht beschrieben. Bei den Translokationen kommt es zu einer Substitution der Promotor-Region von *BCL6* durch Promotoren bzw. Enhancer von in PCNSL hochregulierten Genen wie *IgH*, *IgL* oder *Histon1H4I*.

Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, neue molekulare Aspekte der Pathogenese aufzudecken, welche langfristig auch für die Entwicklung neuer diagnostischer oder therapeutischer Verfahren von Bedeutung werden könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. Murphy KM, T. P., Walport W. Janeway's Immunobiology (Taylor & Francis, New York, 2008).
2. Kuppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-62 (2005).
3. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-8 (1996).
4. Kuppers, R. & Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-94 (2001).
5. Liu, Y. J. et al. Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 4, 241-50 (1996).
6. Maizels, N. Immunoglobulin class switch recombination: will genetics provide new clues to mechanism? *Am J Hum Genet* 64, 1270-5 (1999).
7. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* 4, 541-52 (2004).
8. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 8, 22-33 (2008).
9. Drouet, M. & Lees, O. Clinical applications of flow cytometry in hematology and immunology. *Biol Cell* 78, 73-8 (1993).
10. Jennings, C. D. & Foon, K. A. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 90, 2863-92 (1997).
11. Knapp, W. et al. CD antigens 1989. *Int J Cancer* 44, 190-1 (1989).
12. Knapp, W. et al. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today* 10, 253-8 (1989).
13. Szczepanski, T., van der Velden, V. H. & van Dongen, J. J. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes. *Clin Chem Lab Med* 44, 775-96 (2006).
14. Frohling, S. & Dohner, H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 359, 722-34 (2008).
15. Bentz, M. et al. High incidence of chromosomal imbalances and gene amplifications in the classical follicular variant of follicle center lymphoma. *Blood* 88, 1437-44 (1996).
16. Bea, S. et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93, 4365-74 (1999).
17. Rickert, C. H., Dockhorn-Dworniczak, B., Simon, R. & Paulus, W. Chromosomal imbalances in primary lymphomas of the central nervous system. *Am J Pathol* 155, 1445-51 (1999).
18. Scarpa, A. et al. Nonrandom chromosomal imbalances in primary mediastinal B-cell lymphoma detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. *Genes Chromosomes Cancer* 26, 203-9 (1999).
19. Weber, T. et al. Characteristic chromosomal imbalances in primary central nervous system lymphomas of the diffuse large B-cell type. *Brain Pathol* 10, 73-84 (2000).
20. Berglund, M. et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* 15, 807-16 (2002).
21. Cai, W. W. et al. Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nat Biotechnol* 20, 393-6 (2002).

22. Karnan, S. et al. Analysis of chromosomal imbalances in de novo CD5-positive diffuse large-B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 39, 77-81 (2004).
23. Schraders, M. et al. Novel chromosomal imbalances in mantle cell lymphoma detected by genome-wide array-based comparative genomic hybridization. *Blood* 105, 1686-93 (2005).
24. Pezzolo, A. et al. Chromosomal imbalances in pediatric Burkitt-like lymphoma and review of the literature in relation to other germinal center derived B-cell tumors. *Leuk Lymphoma* 47, 2359-64 (2006).
25. Lindstrom, M. S. & Wiman, K. G. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 12, 381-7 (2002).
26. Ushmorov, A. et al. Epigenetic silencing of the immunoglobulin heavy-chain gene in classical Hodgkin lymphoma-derived cell lines contributes to the loss of immunoglobulin expression. *Blood* 104, 3326-34 (2004).
27. Chu, L. C., Eberhart, C. G., Grossman, S. A. & Herman, J. G. Epigenetic silencing of multiple genes in primary CNS lymphoma. *Int J Cancer* 119, 2487-91 (2006).
28. Hutter, G. et al. Differential effect of epigenetic alterations and genomic deletions of CDK inhibitors [p16(INK4a), p15(INK4b), p14(ARF)] in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 203-10 (2006).
29. Chim, C. S., Wong, K. Y., Loong, F., Lam, W. W. & Srivastava, G. Frequent epigenetic inactivation of Rb1 in addition to p15 and p16 in mantle cell and follicular lymphoma. *Hum Pathol* 38, 1849-57 (2007).
30. Shi, H. et al. Discovery of novel epigenetic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Carcinogenesis* 28, 60-70 (2007).
31. Kastrup, I. B. et al. Genetic and epigenetic alterations of the reduced folate carrier in untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 80, 61-6 (2008).
32. Fraga, M. F. et al. Epigenetic inactivation of the Groucho homologue gene TLE1 in hematologic malignancies. *Cancer Res* 68, 4116-22 (2008).
33. Rowley, J. D. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 112, 2183-9 (2008).
34. Rosenwald, A. & Ott, G. Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 19 Suppl 4, iv67-9 (2008).
35. Dalla-Favera, R. et al. BCL-6 in diffuse large-cell lymphomas. *Important Adv Oncol*, 139-48 (1996).
36. Wu, X. et al. Immunoglobulin somatic hypermutation: double-strand DNA breaks, AID and error-prone DNA repair. *J Clin Immunol* 23, 235-46 (2003).
37. Pasqualucci, L. et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11816-21 (1998).
38. Dalla-Favera, R. et al. Molecular pathogenesis of B cell malignancy: the role of BCL-6. *Curr Top Microbiol Immunol* 246, 257-63; discussion 263-5 (1999).
39. Kawamata, N., Miki, T., Fukuda, T., Hirotsawa, S. & Aoki, N. The organization of the BCL6 gene. *Leukemia* 8, 1327-30 (1994).
40. Greiner, T. C. et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 87, 4302-10 (1996).
41. Stilgenbauer, S. et al. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood* 94, 3262-4 (1999).

42. Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G. A., Dohner, H. & Lichter, P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 748-53 (1999).
43. Koduru, P. R. et al. Deletion of cyclin-dependent kinase 4 inhibitor genes P15 and P16 in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 86, 2900-5 (1995).
44. Dreyling, M. H. et al. Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 57, 4608-14 (1997).
45. Knudson, A. G. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 157-62 (2001).
46. Kamb, A. et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-40 (1994).
47. Li, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-7 (1997).
48. Friend, S. H. et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-6 (1986).
49. Bruce, S. et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. *J Med Genet* 42, 847-51 (2005).
50. Adams, J., Williams, S. V., Aveyard, J. S. & Knowles, M. A. Loss of heterozygosity analysis and DNA copy number measurement on 8p in bladder cancer reveals two mechanisms of allelic loss. *Cancer Res* 65, 66-75 (2005).
51. Teh, M. T. et al. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res* 65, 8597-603 (2005).
52. Deckert M, P. W. in *Malignant Lymphomas* (eds. Louis DN, O. H., Wiestler OD, Cavenee & WK) 188-192 (Lyon:IRAC, 2007).
53. Paulus, W., Jellinger, K., Hallas, C., Ott, G. & Muller-Hermelink, H. K. Human herpesvirus-6 and Epstein-Barr virus genome in primary cerebral lymphomas. *Neurology* 43, 1591-3 (1993).
54. Larocca, L. M. et al. The molecular and phenotypic profile of primary central nervous system lymphoma identifies distinct categories of the disease and is consistent with histogenetic derivation from germinal center-related B cells. *Blood* 92, 1011-9 (1998).
55. Deckert-Schluter, M., Rang, A. & Wiestler, O. D. Apoptosis and apoptosis-related gene products in primary non-Hodgkin's lymphoma of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 96, 157-62 (1998).
56. Courts, C. et al. Recurrent Inactivation of the PRDM1 Gene in Primary Central Nervous System Lymphoma. *J Neuropathol Exp Neurol* (2008).
57. Courts, C. *Molekularbiologische Analyse der Pathogenese Primärer Lymphome des Zentralen Nervensystems*, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät 80 (University of Cologne, Cologne, 2008).
58. Olson, J. E. et al. The continuing increase in the incidence of primary central nervous system non-Hodgkin lymphoma: a surveillance, epidemiology, and end results analysis. *Cancer* 95, 1504-10 (2002).
59. Schabet, M. Epidemiology of primary CNS lymphoma. *J Neurooncol* 43, 199-201 (1999).
60. Kallioniemi, A. et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-21 (1992).
61. Montesinos-Rongen, M. 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* 61, 926-33 (2002).

62. Akasaka, T., Ohno, H., Mori, T. & Okuma, M. Long distance polymerase chain reaction for detection of chromosome translocations in B-cell lymphoma/leukemia. *Leukemia* 11 Suppl 3, 316-7 (1997).
63. Akasaka, T. et al. Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood* 88, 985-94 (1996).
64. Montesinos-Rongen, M. et al. Molecular characterization of BCL6 breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system identifies GAPD as novel translocation partner. *Brain Pathol* 13, 534-8 (2003).
65. Slater, H. R. et al. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. *Am J Hum Genet* 77, 709-26 (2005).
66. Nicolae, D. L., Wen, X., Voight, B. F. & Cox, N. J. Coverage and characteristics of the Affymetrix GeneChip Human Mapping 100K SNP set. *PLoS Genet* 2, e67 (2006).
67. Vater, I. Genomweite Identifizierung und molekulare Charakterisierung sekundärer genetischer Veränderungen bei Mantelzell-Lymphomen, Dissertation, mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät 179 (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, 2008).
68. Nannya, Y. et al. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* 65, 6071-9 (2005).
69. Zhao, X. et al. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 64, 3060-71 (2004).
70. Lin, M. et al. dChipSNP: significance curve and clustering of SNP-array-based loss-of-heterozygosity data. *Bioinformatics* 20, 1233-40 (2004).
71. Beroukhi, R. et al. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol* 2, e41 (2006).
72. Harada, K. et al. Distinct primary central nervous system lymphoma defined by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry. *Cancer Genet Cytogenet* 125, 147-50 (2001).
73. Zhao, D. H. et al. Aberrant expression and function of TCF4 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *Cell Res* 14, 74-80 (2004).
74. Riemersma, S. A. et al. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. *Blood* 96, 3569-77 (2000).
75. Booman, M. et al. Genomic alterations and gene expression in primary diffuse large B-cell lymphomas of immune-privileged sites: the importance of apoptosis and immunomodulatory pathways. *J Pathol* 216, 209-17 (2008).
76. Booman, M. et al. From brain to testis: immune escape and clonal selection in a B cell lymphoma with selective outgrowth in two immune sanctuaries [correction of sanctuaries]. *Haematologica* 92, e69-71 (2007).
77. Booman, M. et al. Mechanisms and effects of loss of human leukocyte antigen class II expression in immune-privileged site-associated B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 12, 2698-705 (2006).
78. Jordanova, E. S. et al. Hemizygous deletions in the HLA region account for loss of heterozygosity in the majority of diffuse large B-cell lymphomas of the testis and the central nervous system. *Genes Chromosomes Cancer* 35, 38-48 (2002).
79. Rimsza, L. M. et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient

- survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 103, 4251-8 (2004).
80. List, A. F., Spier, C. M., Miller, T. P. & Grogan, T. M. Deficient tumor-infiltrating T-lymphocyte response in malignant lymphoma: relationship to HLA expression and host immunocompetence. *Leukemia* 7, 398-403 (1993).
 81. Song, Z., Krishna, S., Thanos, D., Strominger, J. L. & Ono, S. J. A novel cysteine-rich sequence-specific DNA-binding protein interacts with the conserved X-box motif of the human major histocompatibility complex class II genes via a repeated Cys-His domain and functions as a transcriptional repressor. *J Exp Med* 180, 1763-74 (1994).
 82. Boonstra, R., Koning, A., Mastik, M., van den Berg, A. & Poppema, S. Analysis of chromosomal copy number changes and oncoprotein expression in primary central nervous system lymphomas: frequent loss of chromosome arm 6q. *Virchows Arch* 443, 164-9 (2003).
 83. Bosga-Bouwer, A. G. et al. Array comparative genomic hybridization reveals a very high frequency of deletions of the long arm of chromosome 6 in testicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 976-81 (2006).
 84. Pasqualucci, L. et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203, 311-7 (2006).
 85. Thelander, E. F. et al. Characterization of 6q deletions in mature B cell lymphomas and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 49, 477-87 (2008).
 86. Tam, W. et al. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 107, 4090-4100 (2006).
 87. Dreyling, M. H., Roulston, D., Bohlander, S. K., Vardiman, J. & Olopade, O. I. Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 72-8 (1998).
 88. Hustinx, S. R. et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 18, 959-63 (2005).
 89. Illei, P. B., Rusch, V. W., Zakowski, M. F. & Ladanyi, M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res* 9, 2108-13 (2003).
 90. Ladanyi, M. Implications of P16/CDKN2A deletion in pleural mesotheliomas. *Lung Cancer* 49 Suppl 1, S95-8 (2005).
 91. M'Soka T, J. et al. Detection of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) and p16 gene deletion in T cell acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR assay. *Leukemia* 14, 935-40 (2000).
 92. Powell, E. L. et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in gastroesophageal carcinogenesis: evidence of homozygous deletion in esophageal noninvasive precursor lesions and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol* 29, 1497-504 (2005).
 93. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-7 (1993).
 94. Nakamura, M. et al. Frequent alterations of the p14(ARF) and p16(INK4a) genes in primary central nervous system lymphomas. *Cancer Res* 61, 6335-9 (2001).
 95. Aliahmad, P. & Kaye, J. Development of all CD4 T lineages requires nuclear factor TOX. *J Exp Med* 205, 245-56 (2008).

96. Bardet, V. et al. Molecular analysis of nonrandom 8q12 deletions in acute lymphoblastic leukemia: identification of two candidate genes. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 178-87 (2002).
97. Lu, S. H. et al. Effect of carbonic anhydrase-related protein VIII expression on lung adenocarcinoma cell growth. *Lung Cancer* 44, 273-80 (2004).
98. Morimoto, K. et al. Overexpression of carbonic anhydrase-related protein XI promotes proliferation and invasion of gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch* 447, 66-73 (2005).
99. Nishikata, M. et al. Carbonic anhydrase-related protein VIII promotes colon cancer cell growth. *Mol Carcinog* 46, 208-14 (2007).
100. Fujishita, T. et al. Development of spontaneous tumours and intestinal lesions in Fhit gene knockout mice. *Br J Cancer* 91, 1571-4 (2004).
101. Kameoka, Y. et al. Contig array CGH at 3p14.2 points to the FRA3B/FHIT common fragile region as the target gene in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 23, 9148-54 (2004).
102. Montesinos-Rongen, M., Van Roost, D., Schaller, C., Wiestler, O. D. & Deckert, M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood* 103, 1869-75 (2004).
103. Wlodarska, I., Mecucci, C., Baens, M., Marynen, P. & van den Berghe, H. ETV6 gene rearrangements in hematopoietic malignant disorders. *Leuk Lymphoma* 23, 287-95 (1996).
104. Takayama, S. et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-84 (1995).
105. Harada, K., Nishizaki, T., Kubota, H., Suzuki, M. & Sasaki, K. Distinct primary central nervous system lymphoma defined by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry. *Cancer Genet Cytogenet* 125, 147-50 (2001).
106. Courts, C. 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* 66, 230-7 (2007).
107. Ferch, U. et al. MALT1 directs B cell receptor-induced canonical nuclear factor-kappaB signaling selectively to the c-Rel subunit. *Nat Immunol* 8, 984-91 (2007).
108. Gilmore, T. D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18, 6842-4 (1999).
109. Alizadeh, A. A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-11 (2000).
110. Lenz, G. et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13520-5 (2008).
111. Ohno, H. & Fukuhara, S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphoma* 27, 53-63 (1997).
112. Muramatsu, M. et al. Rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leukemia* 11 Suppl 3, 318-20 (1997).
113. Ohno, H. Pathogenetic role of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Histol Histopathol* 19, 637-50 (2004).
114. Akasaka, T. et al. A recurring translocation, t(3;6)(q27;p21), in non-Hodgkin's lymphoma results in replacement of the 5' regulatory region of BCL6 with a novel H4 histone gene. *Cancer Res* 57, 7-12 (1997).
115. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-8 (2001).

116. Dahlen, A. et al. Fusion, disruption, and expression of HMGA2 in bone and soft tissue chondromas. *Mod Pathol* 16, 1132-40 (2003).
117. Rogalla, P., Lemke, I., Kazmierczak, B. & Bullerdiek, J. An identical HMGIC-LPP fusion transcript is consistently expressed in pulmonary chondroid hamartomas with t(3;12)(q27-28;q14-15). *Genes Chromosomes Cancer* 29, 363-6 (2000).
118. Petit, M. M., Mols, R., Schoenmakers, E. F., Mandahl, N. & Van de Ven, W. J. LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* 36, 118-29 (1996).
119. Sonoki, T. et al. Rapid amplification of immunoglobulin heavy chain switch (IGHS) translocation breakpoints using long-distance inverse PCR. *Leukemia* 18, 2026-31 (2004).
120. Willis, T. G. et al. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* 90, 2456-64 (1997).
121. Akasaka, H. et al. Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res* 60, 2335-41 (2000).

Abstract

Primary central nervous system lymphomas (PCNSLs) are highly malignant non-Hodgkin's lymphomas of the diffuse large B cell type (DLBCL) confined to the brain. PCNSL are targeted by ongoing somatic hypermutation and show molecular features of the late germinal center exit B-cell phenotype. However, PCNSL are impaired in their terminal differentiation as indicated by a lack of immunoglobulin class switching.

The aim of the present study was to characterize genetic alterations in PCNSL. Therefore, a series of 19 PCNSL was analyzed by use of the high-resolution 100K GeneChip® mapping assay. These identified frequent novel gains and losses in addition to previously described imbalances in PCNSL. Moreover, this platform allowed the simultaneous genotyping to detect loss of heterozygosity without changes in DNA copy number. Here, we confirmed chromosomal imbalances such as a recurrent loss of chromosomal arm 6q and parts of 4q, 6p, and 9p, trisomy 12, gains of 18q, 19q and chromosome X. Furthermore, we identified novel regions of chromosomal imbalances, which have not yet been described in PCNSL. The newly detected minimally aberrant regions involved deletions of 3p14.2, 8q12.1-q12.2, 10q23.1, 12p13.2, as well as gains of 7q21.3-22.1, and 9p21.1-p21.3. Some of the detected imbalances affected regions smaller than 200 bp. We also demonstrated for the first time regions with recurrent partial uniparental disomy (pUPD) in 6p and 9p. Various recurrent alterations affect genes, which are involved in the immune response, including *HLA* expression and regulation. Deletions in 6p21.32 compromised genes of the major histocompatibility complex (MHC) class 2 as well as the *TAP1* and *TAP2* genes, which are involved in assembling of MHC Class I antigens. The nuclear factor *NFX1* in the region of gain of 9p21.1-p21.3 represses expression of *HLA-DR* and other genes of the MHC class II complex. These alterations may interfere with the immune response to tumor cells, which may be involved in the pathogenesis of PCNSL. Another set of aberrations affected genes, which are involved in the regulation of apoptosis. Deletion of the *FAS*(CD95) harbouring 10q23.21 can comprise the apoptosis induced by Fas ligands. Gains of the gene loci harbouring *BCL2*, *MDM2*, and *BAG1* as well as a deregulation of *BCL6* expression due to translocations leading to a promoter substitution of *BCL6* may inhibit p53 mediated pro-apoptotic pathways. Recurrent deletions and pUPD affecting 9p21.3 potentially leading to inactivation of the tumor suppressor genes p15 and p16 may result in a deregulation of the cell cycle leading to ongoing mitosis.

Remarkably, more than 50% of the PCNSL harboured a deletion in 6q21, where the BLIMP1 coding *PRDMI* is located. BLIMP1 is one of the central regulators for terminal B cell differentiation. Thus, impaired BLIMP-1 function may block terminal differentiation of the tumor cells of PCNSL resulting in an arrest of the state of the highly proliferative GC phenotype.

Furthermore, the frequent translocations involving the *BCL6* and the *IGH* gene loci by long distance inverse PCR. Here, we identified four novel partner genes of *BCL6*. The translocations lead to a juxtaposition of the *BCL6* with regulatory elements of *IGH*, *IGL*, and *Histone1H4I*, leading to a promoter substitution and deregulation of *BCL6* expression. In one case, a deletion within 3q leads to a juxtaposition of *BCL6* and *LPP*, which has not been described before, neither for PCNSL nor for other tumour entities.

In conclusion, the present work contributes to the comprehension of new molecular aspects of the pathogenesis of PCNSL and suggests a potential for diagnostically and/or therapeutically relevant applications.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt 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 Geduld, Zeit und Mühe.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Wiehe meinen allerherzlichsten Dank aussprechen, der kurzfristig die Betreuung dieser Arbeit an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln übernommen hat.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Guenter Schwarz für die Übernahme des Vorsitz der Prüfungskommission und Herrn Prof. Dr. Peter Nürnberg, der sich dazu bereit erklärt hat, die Funktion des Beisitzers bei der Prüfung zu übernehmen.

Für die gute Zusammenarbeit, den wissenschaftlichen Austausch, die zahlreichen Hilfestellungen, Unterstützungen und Gespräche möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe ausdrücklich bedanken.

Besonderer Dank gebührt Herr Prof. Dr. Reiner Siebert und Frau Dr. Inga Vater sowie der gesamten Arbeitsgruppe in Kiel (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Kiel). In gleicher Weise möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Dyer und Herrn Dr. Takashi Akasaka (MRC Toxicology Unit, University of Leicester, UK) bedanken. Beide Einrichtungen ermöglichten mir einen regen fachlichen Austausch und stellten mir freundlicherweise die dortigen Laboreinrichtungen für einen Teil meiner Arbeit zur Verfügung.

Herrn Markus Kreuz möchte ich für die fachliche bioinformatische Unterstützung bei der Auswertung der Microarraydaten herzlichst danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Ursula Walter-Lutz und Heinrich Schwindt, sowie bei meinen Großeltern, Maria und Wilhelm Häfele, für die immerwährende Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Meiner Frau, Satiness Schwindt, danke ich für ihr Vertrauen, ihre unendliche Geduld und ihren Ansporn, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

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. Thomas Wiehe betreut worden.

Köln, 01.11.2008

Heinrich Schwindt

Teilpublikationen:

(1) **Schwindt H, Akasaka T, Zühlke-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(8):776-82.

Lebenslauf von Heinrich Schwindt

Persönliche Information

Geburtsdatum: 12.01.1972

Geburtsort: Ulm

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Ursula Walter-Lutz, geb. 26.09.1954; selbständig
Heinrich Schwindt, geb. 03.07.1952; Grundschullehrer

Kinder: Lukas Martin Brannath, geb. 04.05.1995

Familienstand: verheiratet mit Satiness Schwindt, geb. Eisele

Adresse

Höninger Weg 107

50969 Köln

Tel.: 0221-7190267

e-mail: heinrich.schwindt@uni-koeln.de

Berufliche Tätigkeit

01/2005 - dato Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abteilung für Neuropathologie der Universität zu Köln

10/2003 -12/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln

Hochschulausbildung

10/2003 - dato Universität zu Köln, Promotionsstudium Biologie,

03/2003 - 09/2003 Universität Ulm, Abt. f. Biochemie, AG Kühl, Diplomarbeit

10/1994 - 09/2003 E.-K.- Universität Tübingen, Biochemie Diplom,

04/1996 - 09/2003 E.-K.- Universität Tübingen, Humanmedizin

Zivildienst:

07/2003 - 09/2004 im Hämatologischen Routinelabor der Uni-Klinik Ulm

Schulausbildung:

1993 Valckenburgschule Ulm, Abitur