

Aus der Klinik für Hämatologie/Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Diagnostische und prognostische Marker
bei Lymphomen des zentralen Nervensystems**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felicitas Jasmin Christine Strehlow, geb. Lammer

aus Buchloe

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen	III
1. Zusammenfassung	1
1.1. Abstrakt	1
1.1.1. In deutscher Sprache	1
1.1.2. In englischer Sprache	2
1.2. Einführung.....	3
1.2.1. Lymphome des zentralen Nervensystems	3
1.2.2. Diagnostische Marker bei ZNSL.....	4
1.2.3. Prognostische Marker bei ZNSL.....	5
1.2.4. Zielstellung.....	6
1.3. Methodik	6
1.3.1. Diagnostischer und prognostischer Marker: Osteopontin im Liquor bei ZNSL (Publikation 1).....	6
1.3.2. Prognostischer Marker: Intraokuläre Lymphombeteiligung bei PZNSL (Publikation 2).....	7
1.3.3. Prognostischer Marker: B-cell lymphoma 6 bei PZNSL (Publikation 3)	8
1.3.4. Statistik.....	8
1.4. Ergebnisse	10
1.4.1. Diagnostischer und prognostischer Marker: Osteopontin im Liquor bei ZNSL (Publikation 1).....	10
1.4.2. Prognostischer Marker: Intraokuläre Lymphombeteiligung bei PZNSL (Publikation 2).....	12
1.4.3. Prognostischer Marker: B-cell lymphoma 6 bei PZNSL (Publikation 3)	13
1.5. Diskussion	14
1.6. Literaturverzeichnis.....	19
2. Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung.....	26
3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	28
4. Lebenslauf.....	50
5. Komplette Publikationsliste	52
6. Danksagung.....	53

Abkürzungen

AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL6	B-cell lymphoma 6
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
CNSL	Lymphoma of the central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid
CXCL13	Chemokine ligand 13
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DLBCL	Diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (diffuse large B-cell lymphoma)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GBM	Glioblastom
GCB	Keimzentrumsartig (germinal center B-cell like)
HDMTX	Hochdosistherapie Methotrexat
HR	Hazard ratio
IOL	Intraokulärer Lymphombefall
IOL ⁺	Patienten mit intraokulärem Lymphombefall
IOL ⁻	Patienten ohne intraokulären Lymphombefall
KI	Konfidenzintervall
KPS	Karnofsky-Index (Karnofsky performance status scale)
MS	Multiple Sklerose
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MUM1/IRF4	Multiple myeloma oncogene 1/Interferon regulatory factor 4
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
OPN	Osteopontin
OS	Gesamtüberleben (overall survival)
PCNSL	Primary lymphoma of the central nervous system
PFS	Progressionsfreies Überleben (progression-free survival)
PZNSL	Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems
ROC-Kurven	Receiver-Operating-Characteristic-Kurven
SZNSL	Sekundäre Lymphome des zentralen Nervensystems
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZNSL	Lymphome des zentralen Nervensystems

1. Zusammenfassung

1.1. Abstrakt

1.1.1. In deutscher Sprache

Einleitung

Lymphome des zentralen Nervensystems (ZNSL) sind eine seltene Form extranodaler Non-Hodgkin-Lymphome, welche sich zerebral, meningeal, okulär oder im Myelon manifestieren. Die Identifizierung diagnostischer Marker aus dem Liquor sowie eine bessere Prognoseeinschätzung sind für das Management von Patienten mit ZNSL von großem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde Osteopontin (OPN) im Liquor als diagnostisches und prognostisches Molekül untersucht. Im Weiteren wurden der intraokuläre Befall sowie die Expression von B-Zell-Differenzierungsmarkern im Lymphomgewebe als prognostischer Marker analysiert.

Methodik

Bezüglich der OPN-Konzentration wurden Liquorproben von 37 ZNSL-Patienten (29 mit primärem ZNSL [PZNSL] und 8 mit sekundärem ZNSL) mit 36 Kontrollpatienten (6 mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen, 8 mit multipler Sklerose [MS], 9 mit Glioblastom [GBM] und 13 Gesunde) verglichen. Die OPN-Konzentration wurde mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay bestimmt. Der Einfluss der okulären Mitbeteiligung bei Erstdiagnose eines PZNSL wurde durch die Analyse von 297 Patienten mit ophthalmologischer Untersuchung aus der G-PCNSL-SG1-Studie untersucht. Die immunhistochemische Charakterisierung der B-Zell-Differenzierungsmarker B-cell lymphoma 2 (BCL2), B-cell lymphoma 6 (BCL6), cluster of differentiation 10 (CD10) und multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF4) sowie die Analyse der prognostischen Bedeutung erfolgten anhand von 119 Patienten aus der G-PCNSL-SG1-Studie.

Ergebnisse

Der mediane OPN-Spiegel im Liquor der ZNSL-Patienten lag mit 620 ng/ml signifikant höher als bei Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen (356 ng/ml; $P < ,05$), MS (163 ng/ml; $P < ,01$), GBM (41 ng/ml; $P < ,01$) oder gesunden Kontrollpersonen (319 ng/ml; $P < ,01$). In multivariater Analyse war ein hoher OPN-Spiegel mit kürzerem progressionsfreiem Überleben (PFS; Hazard ratio [HR] 1,61; 95% Konfidenzintervall [KI] 1,13-2,31; $P = ,009$) und Gesamtüberleben assoziiert (OS; HR 1,52; 95% KI 1,04-2,21; $P = ,029$). Die 19 der 297 Patienten (6%), die eine okuläre Mitbeteiligung hatten, unterschieden sich im Hinblick auf ihre Charakteristika nicht von den Patienten ohne okuläre Mitbeteiligung. Intraokulärer Lymphombefall war in uni- und mul-

tivariater Analyse mit einem kürzeren medianen PFS (3,5 vs. 8,3 Monate; $P = ,004$) und OS (13,2 vs. 20,5 Monate; $P = ,155$) assoziiert. Die Expression von BCL6, nicht jedoch der anderen Marker, war in univariater Analyse mit kürzerem PFS (HR 1,53; 95% KI 1,01-2,34; $P = ,047$) und OS (HR 1,66; 95% KI 1,04-2,65; $P = ,035$) verbunden. In multivariater Analyse konnte ein signifikanter Zusammenhang nur für das PFS gezeigt werden (HR 1,95; 95% KI 1,22-3,12; $P = ,005$).

Schlussfolgerung

OPN im Liquor stellt einen potentiellen diagnostischen und prognostischen Biomarker bei ZNSL dar. Weitere prognostische Faktoren sind der intraokuläre Befall bei Erstdiagnose eines PZNSL sowie die BCL6-Expression.

1.1.2. In englischer Sprache

Introduction

Lymphomas of the central nervous system (CNSL) are a rare kind of extranodal non-Hodgkin's lymphomas. They are usually localised in brain parenchyma but may also appear in the meningeal compartment, intraocular or intraspinal. The identification of reliable and easy to measure diagnostic biomarkers in cerebrospinal fluid (CSF) is desirable to facilitate the diagnosis; the identification of prognostic markers could be used to tailor therapy. We evaluated the value of CSF osteopontin (OPN) as diagnostic and prognostic biomarker for CNSL. Moreover, we analysed the prognostic role of intraocular involvement (IOL) and B-cell differentiation markers in primary CNSL (PCNSL).

Methods

OPN concentrations were measured in CSF from 37 patients with CNSL (29 with PCNSL and 8 with secondary CNSL) and from 36 controls (6 with inflammatory CNS disease, 8 with multiple sclerosis [MS], 9 with glioblastoma [GBM] and 13 healthy controls) using enzyme-linked immunosorbent assay. Data of 297 patients with initial ophthalmologic examination from the G-PCNSL-SG1 trial were analysed. In a post hoc analysis of 119 patients from the G-PCNSL-SG1 trial we evaluated the expression of B-cell differentiation markers B-cell lymphoma 2 (BCL2), B-cell lymphoma 6 (BCL6), cluster of differentiation 10 (CD10) and multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF4) by immunohistochemistry and their prognostic impact.

Results

Median CSF OPN level in CNSL was 620 ng/ml and higher than in patients with inflammatory CNS disease (356 ng/ml; $P < .05$), MS (163 ng/ml; $P < .01$), GBM (41 ng/ml; $P < .01$) and healthy controls (319 ng/ml; $P < .01$). In multivariate analysis, high CSF OPN level was associated with shorter progression-free (PFS; hazard ratio [HR] 1.61; 95% confidence interval [CI] 1.13-2.31; $P = .009$) and overall survival (OS; HR 1.52; 95% CI 1.04-2.21; $P = .029$). IOL was diagnosed in 19 of 297 patients (6%) in the G-PCNSL-SG1 trial. Clinical characteristics did not significantly differ between IOL⁺ and IOL⁻. IOL was associated with shorter median PFS (3.5 vs. 8.3 months; $P = .004$) and OS (13.2 vs. 20.5 months; $P = .155$) on both univariate and multivariate analysis. Expression of BCL6 but none of the other markers was associated with shorter PFS (HR 1.53; 95% CI 1.01-2.34; $P = .047$) and OS (HR 1.66; 95% CI 1.04-2.65; $P = .035$) on univariate analysis. On multivariate analysis a significant correlation could be shown only for PFS (HR 1.95; 95% CI 1.22-3.12; $P = .005$).

Conclusions

CSF OPN should be regarded as potential diagnostic and prognostic biomarker in CNSL. Ocular involvement at diagnosis and BCL6 expression of the tumour are unfavourable prognostic factors in PCNSL.

1.2. Einführung

1.2.1. Lymphome des zentralen Nervensystems

Lymphome des zentralen Nervensystems (ZNSL) sind eine seltene Erkrankung, welche sich zerebral, meningeal, okulär oder im Myelon manifestieren können^{1,2}. Histologisch handelt es sich zumeist um diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL), seltener um T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) oder andere B-Zell-NHL^{3,4}. ZNSL können als primäre ZNSL (PZNSL), definiert als Lymphome, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auf das zentrale Nervensystem (ZNS) begrenzt sind, oder als sekundärer ZNS-Befall von systemischen Lymphomen (SZNSL) auftreten^{2,5}. Die bisher größte prospektive Studie über PZNSL, die G-PCNSL-SG1-Studie der Deutschen Studiengruppe für ZNS-Lymphome (G-PCNSL-SG), umfasste 526 Patienten und untersuchte die Rolle der Ganzhirnbestrahlung in der Primärtherapie von PZNSL³. Zur besseren Charakterisierung der SZNSL wird von der G-PCNSL-SG seit 2011 das SZNSL-Register geführt. Hierbei werden sowohl die Patienten mit gleichzeitigem systemischen und ZNS-Befall bei der Erstdiagnose des Lymphoms als auch diejenigen mit ZNS-Befall im Rezidiv eines systemischen Lymphoms erfasst^{6,7}.

1.2.2. Diagnostische Marker bei ZNSL

Die Diagnose der ZNSL wird in der Regel auf Basis kontrastmittelgestützter kranialer Magnetresonanztomographie und histopathologischer Analyse des durch eine Biopsie gewonnen Tumormaterials gestellt⁸. Die Biopsie ist eine invasive Maßnahme, die nur an spezialisierten Zentren mit einer neurochirurgischen Klinik durchgeführt werden kann. Insbesondere bei einer Tumorlokalisation in vulnerablen Gehirnregionen kann die Biopsie mit Risiken verbunden sein; bei manchen Lokalisationen ist sie nicht möglich. Nach Vorbehandlung mit Steroiden sind die histologischen Ergebnisse meist inkonklusiv und die Biopsie muss, möglichst nach Absetzen der Steroide, wiederholt werden. Die diagnostische Bedeutung von Liquor zur Tumorzellidentifizierung mittels konventioneller Liquorzytomorphologie, Durchflusszytometrie oder durch Nachweis der Monoklonalität mit der Polymerase-Kettenreaktion ist auf Patienten mit meningealem Lymphombefall beschränkt^{9,10}. PZNSL weisen allerdings in weniger als 20% der Fälle eine meningeale Beteiligung auf, SZNSL in etwa 40-50% der Fälle^{11,12}. Als Ergänzung oder Alternative zur operativen Diagnostik ist die Identifizierung valider diagnostischer Marker im Liquor als ein relativ leicht zugängliches Kompartiment des ZNS daher bei Patienten mit ZNSL von hohem klinischen Interesse. Auf der Suche nach diagnostischen und prognostischen Biomarkern für ZNSL wurden bisher spezifische Mikro-Ribonukleinsäure-Expressionsmuster, Interleukin-10, Neopterin und chemokine ligand 13 (CXCL13) als potentielle Marker identifiziert¹³⁻¹⁷. Mit Ausnahme von CXCL13 wurden sie jedoch bisher nicht an unabhängigen Kollektiven validiert. Zum Teil fehlte in diesen Studien auch der Vergleich mit anderen Gehirntumoren. Ein umfassender Überblick potentieller Biomarker für die Diagnostik von PZNSL ist von Viacoz et al. publiziert worden, wobei Osteopontin (OPN) allerdings noch keine Erwähnung fand¹⁵.

OPN, kodiert durch das Gen *secreted phosphoprotein 1 (SPP1)*, ist ein proinflammatorisches Zytokin und Zell-Matrix-Glykoprotein mit zahlreichen Zellfunktionen wie Immunzellaktivierung, B-Zell-Migration und -Proliferation, Chemotaxis, Zellkommunikation, fokale Adhäsion und Unterdrückung von Antitumorimmunität¹⁸. Studien zu unterschiedlichen malignen hämatologischen Erkrankungen konnten den Zusammenhang einer hohen OPN-Expression mit Tumorprogress, Metastasenbildung und schlechter Prognose zeigen. Bei verschiedenen humanen Malignomen wurde OPN als diagnostischer und prognostischer Biomarker beschrieben¹⁹⁻²¹. Bei PZNSL ist OPN im Vergleich zu nodalen und extranodalen DLBCL ohne ZNS-Beteiligung eines der am stärksten differenziell exprimierten Gene^{22,23}. Immunhistochemische Analysen an formalinfixierten, paraffineingebetteten Tumorgewebe bestätigten eine hohe Expression von OPN bei PZNSL-Patienten^{22,24,25}. Zielstellung der Publikation 1 war es, die Rolle von OPN im Liquor als ein diagnostischer und auch als prognostischer Marker bei ZNSL zu evaluieren.

1.2.3. Prognostische Marker bei ZNSL

Die ungünstige Prognose der PZNSL hat sich nach Einführung der Hochdosistherapie Methotrexat- (HDMTX) basierten Therapie und nach Hinzunahme weiterer ZNS-gängiger Zytostatika wie Cytarabin, Ifosfamid und Thiotepa deutlich verbessert²⁶⁻²⁹. Bei den PZNSL ist das Ansprechen auf eine HDMTX-basierte Chemotherapie allerdings sehr heterogen. Daher bleibt die Gesamtprognose aktuell mit einem medianen progressionsfreien Überleben (PFS) von ca. 12-24 Monaten und einem medianen Gesamtüberleben (OS) von ca. 3-5 Jahren relativ ungünstig – verglichen mit systemischen DLBCL³⁰⁻³². Die Therapie ist insbesondere für ältere Patienten im Vergleich zu jüngeren Patienten toxischer, wobei neben der akuten Toxizität speziell die verzögerte ZNS-Toxizität gefürchtet wird²⁶. Es wäre demzufolge wünschenswert, prognostische Biomarker zu identifizieren, um risikostratifizierte Therapieentscheidungen treffen zu können.

Alter und Allgemeinzustand (Karnofsky-Index [KPS]) des Patienten sind die wichtigsten klinischen Prognosefaktoren bei PZNSL³³. Darüber hinaus wurde über den prognostischen Wert von Lactatdehydrogenase im Serum, Eiweißkonzentration im Liquor und Lymphomlokalisierung in tiefen Hirnregionen berichtet³⁴. Der prognostische Einfluss eines meningealen Befalls bei PZNSL konnte bisher nicht belegt werden¹¹. Über die Assoziation der Prognose mit dem okulären Mitbefall beim PZNSL ist bisher nichts bekannt. Diese vitreoretinale Beteiligung (intraokulärer Lymphombefall [IOL]) wird bei ca. 10% der ZNSL-Patienten diagnostiziert und kann nicht nur gleichzeitig mit dem ZNS-Befall, sondern auch vor dem Auftreten zerebraler Läsionen oder auch im Rezidiv auftreten³⁵⁻³⁸. Klinisch zeigen sich bis zu 40% der Patienten asymptomatisch, wohingegen bei anderen Symptome der chronischen Uveitis wie verschwommenes Sehen, das „Mouches volantes“-Phänomen, konjunktivale Rötung, Photophobie oder Schmerzen auftreten^{35,39-41}. Die Diagnosestellung ist häufig schwierig. Bei der ophthalmologischen Untersuchung werden Uveitis-Zeichen oder gelbe subretinale Infiltrate gesehen. Die pathologische Diagnosestellung aus dem Glaskörper ist häufig durch zahlreiche reaktive Zellen, Zelldetritus und Fibrinablagerungen erschwert. Im Falle einer negativen Zytologie aus dem Glaskörper kann eine chorioretinale Biopsie durchgeführt werden, die allerdings spezialisierten Zentren vorbehalten ist und auch inkonklusiv sein kann⁴². Fragestellung der Publikation 2 dieser Dissertation war, die prognostische Bedeutung des IOL als Begleitmanifestation des PZNSL bei Erstdiagnose zu erforschen.

Bei systemischen DLBCL ist die prognostische Bedeutung verschiedener Biomarker in zahlreichen Studien untersucht worden. Insbesondere wurden auf der Basis von Genexpressionsanalysen zwei prognostisch wichtige Untergruppen – der keimzentrumsartige Typ (GCB) und der aktivierten B-Zellen ähnliche Typ beschrieben^{43,44}. Zudem wurden vor dem

Hintergrund der besseren Verfügbarkeit verschiedene immunhistologische Algorithmen zur Subidentifizierung entwickelt⁴⁵⁻⁴⁷. Die verbreitetste Methode ist der Hans-Algorithmus unter Einschluss von cluster of differentiation (CD) 10, B-cell lymphoma 6 (BCL6) und multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF4)⁴⁸. Hierbei werden DLBCL in die Subgruppen GCB und nicht-GCB eingeteilt. Bei ZNSL wurde die prognostische Rolle der einzelnen in den Hans-Algorithmus hineinfließenden Moleküle als auch des Hans-Algorithmus' selbst in bisher nur kleinen, meist retrospektiven Studien evaluiert, wobei die Ergebnisse widersprüchlich waren⁴⁹⁻⁵². Ziel der Publikation 3 war es, die prognostische Bedeutung der Expression von B-Zell-Differenzierungsmarker bei PZNSL zu evaluieren.

1.2.4. Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit werden drei Publikationen präsentiert, die sich mit der Identifizierung diagnostischer und prognostischer Marker bei ZNSL beschäftigen. In der ersten Publikation wird der diagnostische und prognostische Wert von OPN im Liquor untersucht. Die zweite Publikation beschäftigt sich mit dem prognostischen Einfluss der intraokulären Beteiligung bei PZNSL, die dritte mit dem prognostischen Einfluss verschiedener B-Zell-Differenzierungsmarker.

1.3. Methodik

Im Folgenden wird auf die Patientenkollektive und -charakteristika, das jeweilige Untersuchungsmaterial sowie die jeweiligen Untersuchungsmethoden separat eingegangen. Die statistische Auswertung wird für alle Projekte zusammenfassend dargestellt. Alle Analysen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und den Vorgaben der Ethikkommission durchgeführt; alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen wird verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten für beide Geschlechter bzw. sind geschlechtsneutral zu verstehen.

1.3.1. Diagnostischer und prognostischer Marker: Osteopontin im Liquor bei ZNSL (Publikation 1)

Patienten und Proben

Liquorproben wurden von 37 immunkompetenten Patienten mit neu diagnostiziertem ZNSL vor Therapiebeginn durch lumbale Punktion entnommen. Es handelte sich um 29 Patienten mit PZNSL und 8 mit SZNSL. Eine Vorbehandlung mit Steroiden war erlaubt. Des Weiteren wurden 4 Kontrollgruppen analysiert: 1) 6 Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen (zerebrale

Toxoplasmose, zerebrale Sarkoidose und unspezifische nichtinfektiöse Enzephalitis), 2) 8 Patienten mit multipler Sklerose (MS), 3) 9 Patienten mit Glioblastom (GBM) und 4) 13 gesunde Kontrollpersonen (Personen ohne ZNS-Erkrankung, die einer diagnostischen Liquorpunktion bei Kopfschmerzen zum Ausschluss einer Meningitis oder Arachnoidalblutung unterzogen wurden). Alle Liquorproben wurden unverzüglich bei Raumtemperatur für vier Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Von 17 PZNSL-Patienten, sämtlichen Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen und allen gesunden Kontrollen wurden zugehörige Serum-Proben zum Zeitpunkt der Liquorpunktion akquiriert und ebenfalls bei -80°C asserviert. Liquorzellzahl und Proteingehalt im Liquor wurden bei 26 ZNSL-Patienten, allen Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen sowie allen gesunden Kontrollpersonen analysiert.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

OPN-Konzentrationen wurden im Liquor und Serum mit Hilfe des ELISA von R&D (Quantikine ELISA Human Osteopontin Immunoassay, DOST00; R&D Systems Europe, Ltd., Abindon, UK) bestimmt.

1.3.2. Prognostischer Marker: Intraokuläre Lymphombeteiligung bei PZNSL (Publikation 2)

Patienten und Behandlung

Das Patientenkollektiv der G-PCNSL-SG1-Studie bestehend aus 526 auswertbaren Patienten mit PZNSL wurde im Hinblick auf das Ergebnis der ophthalmologischen Untersuchung (okulärer Befall: ja oder nein) bei der Erstdiagnose analysiert. Im Rahmen der Studie wurden erwachsene immunkompetente Patienten randomisiert der HDMTX-basierten Erstlinientherapie mit oder ohne nachfolgende Ganzhirnbestrahlung (45 Gy in 1,5-Gy-Fraktionen) mit Stratifizierung nach Alter (<60 vs. ≥60 Jahre) und Institution (Berlin vs. Tübingen vs. alle anderen Standorte) zugeteilt.

Eine ophthalmologische Untersuchung war als eine der Staginguntersuchungen vorgesehen, allerdings nicht bei allen Patienten durchgeführt worden. Patienten ohne initiale Spaltlampenuntersuchung wurden nicht aus der Studie ausgeschlossen.

Bei Patienten mit intraokulärem Befall bei Studieneinschluss, die in den Ganzhirnbestrahlungs-Arm randomisiert waren, sollte zusätzlich zur Ganzhirnbestrahlung eine Mitbestrahlung beider Orbitae bis zu 30 Gy durchgeführt werden³.

1.3.3. Prognostischer Marker: B-cell lymphoma 6 bei PZNSL (Publikation 3)

Patienten und Behandlung

In der Analyse wurden Tumorproben von Patienten mit neudiagnostiziertem PZNSL aus der G-PCNSL-SG1-Studie³ untersucht, die in ausreichender Größe einem der Referenzpathologen vorlagen.

Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen zur Darstellung der Protein-Expression an dem in Paraffin eingebettetem Tumormaterial wurden an den referenzpathologischen Instituten der G-PCNSL-SG1-Studie für CD10 (clone 56C6, Leica Biosystems), BCL6 (clone LN22, Leica Biosystems; clone PG-B6p, Dako), B-cell lymphoma 2 (BCL2, clone100/D5, Leica Biosystems; clone 124, Dako) und MUM1/IRF4 (clone MUM1p, Dako) mit Hilfe eines automatischen Immunfärbegerätes (BondMax, Leica Biosystems; Benchmark XT, Roche-Ventana) durchgeführt. Gebundene Antikörper wurden durch die Nutzung von Bond Polymer Refine 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) oder Ultra-View Universal DAB Detection Kit (Roche-Ventana) sichtbar gemacht, entwickelt und mit Hilfe der Hersteller-Protokolle und Reagenzien kontrastgefärbt. Die Analyse der Moleküle wurde anhand der Publikation von Horn et al. durchgeführt⁵³. Für die Färbung von BCL6 wurden Tumore mit mehr als 30% positiv gefärbten Zellen als positiv gewertet. Weiterhin wurden die Tumore in GCB und nicht-GCB-Subgruppen gemäß deren Expression von CD10, BCL6 und MUM1/IRF4 entsprechend der publizierten Methoden und cut-off-Werte (>30%) von Hans et al. klassifiziert⁴⁸. Dabei wurden Tumore mit CD10- oder BCL6-Expression ohne MUM1/IRF4-Expression als GCB definiert. Die verbleibenden Tumore fielen in die Subgruppe der nicht-GCB.

1.3.4. Statistik

Software

Für die statistische Auswertung der diagnostischen und prognostischen Marker wurde die kommerziell verfügbare IBM SPSS Software für Windows, Versionen 18.0, 21.0 bzw. 22.0, und für die Publikation 1 zusätzlich GraphPad Prism Software, Version 6.0, verwendet.

Deskriptive Statistik

Entsprechend des Skalenniveaus der Variablen wurden in den Publikationen Mittelwerte, Mediane und absolute sowie relative Häufigkeiten angegeben. Die Verteilung der Patientencharakteristika wurde mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert.

Gruppenvergleiche

Ebenso wurden statistische Gruppenvergleiche je nach Skalenniveau und der Normalverteilung der Variablen durchgeführt. Bei kategorialen oder nicht normalverteilten metrischen Variablen wurden der Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben sowie der Wilcoxon bei abhängigen Stichproben umgesetzt. In der Publikation 1 wurde der Mann-Whitney-U-Test mit adjustierten P-Werten gemäß der Bonferroni-Korrektur (Faktor 10 bei paarweisen Vergleichen zwischen 5 Gruppen, Faktor 15 bei paarweisen Vergleichen zwischen 6 Gruppen und Faktor 3 bei paarweisen Vergleichen zwischen 3 Gruppen) durchgeführt. Bei metrischen Variablen mit ausreichender Normalverteilung fand der Students t-Test für unabhängige Stichproben Anwendung. Das Signifikanzniveau betrug in allen Publikationen ,05.

Receiver-Operating-Characteristic (ROC) Kurven

Die Güte eines diagnostischen Tests lässt sich mit ROC-Kurven beschreiben. In Publikation 1 wurden sie angewendet, um OPN im Liquor als diagnostischen Test zu evaluieren. Zum Vergleich der jeweiligen Testgüte wurde die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) sowie das 95%ige Konfidenzintervall (KI) angegeben. Es wurde für jeden potentiellen cut-off-Wert des diagnostischen Moleküls ein Paar von Sensitivität und 1-Spezifität bestimmt. Die Auswahl der cut-off-Werte als optimale theoretische Schwellenwerte wurde nach dem Kriterium desjenigen OPN-Spiegels gewählt, bei welchem sich Sensitivität und Spezifität am ähnlichsten waren.

Kaplan-Meier-Methode

Das OS und PFS wurde in allen drei Publikationen mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Dabei wurde das OS als Zeit zwischen Studieneinschluss bzw. Therapiebeginn und Tod definiert. Das PFS wurde als Zeit zwischen Studieneinschluss bzw. Therapiebeginn und dem ersten Progress, Rezidiv oder Tod unabhängig von der Todesursache erfasst.

Korrelationsanalysen

In Publikation 1 wurde zur Bestimmung der Korrelationen zwischen der Anzahl zerebraler Lymphommanifestationen und dem OPN-Spiegel im Liquor der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman`s rho, r) als ein parameterfreies Maß genutzt.

Regressionsmodelle

Um in Publikation 1 den prognostischen Wert von OPN im Liquor zu bewerten, wurden einfache und multiple Cox-Regressionsanalysen durchgeführt. Die Variablenselektion erfolgte mittels

schrittweisem Einschluss von Variablen ins Modell im Sinne einer Vorwärtsselektion. Alle Hazard Ratios (HR) beziehen sich auf eine Veränderung von 100 Einheiten des OPN-Spiegels im Liquor. In der multivariaten Analyse des prognostischen Wertes des okulären Lymphombefalls in Publikation 2 wurde eine Rückwärtsselektion der Variablen angewendet. Dabei wurden aus einem Modell mit den interessierenden unabhängigen Variablen schrittweise Variablen entfernt. In der Untersuchung des prognostischen Moleküls BCL6 in Publikation 3 wurden die Variablen, die in die multiplen Cox-Modelle eingeschlossen wurden, mit Hilfe von Vorwärts- und Rückwärtsselektion der Variablen bestimmt.

1.4. Ergebnisse

1.4.1. Diagnostischer und prognostischer Marker: Osteopontin im Liquor bei ZNSL (Publikation 1)

Patientencharakteristika

Das Alter bei Erstdiagnose der PZNSL-Patienten lag im Median bei 65 Jahren (Bereich 43-84 Jahre), bei SZNSL-Patienten bei 66 Jahren (Bereich 47-75 Jahre). Die PZNSL-Patienten waren zu 45%, die SZNSL-Patienten zu 50% männlichen Geschlechts. Histopathologisch stellten DLBCL die Mehrheit dar (PZNSL 93%, SZNSL 63%). Die Lokalisation des Lymphombefalls erwies sich in den meisten Fällen als rein parenchymal (PZNSL 93%, SZNSL 63%). Sowohl die Zellzahl als auch der Proteingehalt im Liquor waren bei den untersuchten ZNSL-Patienten mehrheitlich erhöht (Zellzahl bei PZNSL 59%, bei SZNSL 75%; Proteingehalt bei PZNSL 73%, bei SZNSL 100%). Die Kontrollgruppe der entzündlichen ZNS-Erkrankungen wies bei 17% der Patienten eine erhöhte Liquor-Zellzahl und bei 50% der Patienten einen erhöhten Proteingehalt auf. Von den gesunden Kontrollpersonen war bei keinem die Zellzahl im Liquor und nur bei 8% der Proteingehalt erhöht. Die Liquor-Zellzahl zeigte sich bei Patienten mit ZNSL im Gegensatz zu den Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen sowie im Unterschied zu den Gesunden signifikant erhöht (jeweils $P < ,01$). Der Proteingehalt im Liquor der ZNSL-Patienten unterschied sich signifikant von den gesunden Kontrollen ($P < ,01$), jedoch nicht von den Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen⁵⁴.

OPN-Werte bei ZNSL-Patienten und Kontrollgruppen

Die höchsten OPN-Werte konnten bei den PZNSL (Median 620 ng/ml) und SZNSL (Median 608 ng/ml) gemessen werden, die niedrigsten waren bei den GBM (Median 41 ng/ml) und MS (Median 163 ng/ml) zu finden. Bei den Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen (Median 356 ng/ml) und gesunden Kontrollen (Median 319 ng/ml) lagen die Werte im mittleren Bereich.

Die Liquor-OPN-Werte unterschieden sich nicht zwischen PZNSL und SZNSL ($P = 1,00$). Es fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Liquor-OPN-Werten der ZNSL-Patienten und allen Kontrollgruppen ($P < ,001$). Im Gegensatz zu den Liquor-OPN-Werten waren die medianen OPN-Werte im Serum niedrig (PZNSL 52 ng/ml, entzündliche ZNS-Erkrankungen 99 ng/ml, gesunde Kontrollen 59 ng/ml) und wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen auf⁵⁴.

Diagnostische Bedeutung von OPN im Liquor

Mit Hilfe von ROC-Kurven konnte die Güte von OPN im Liquor als diagnostischer Test beschrieben werden. Die AUC ergab zur Unterscheidung zwischen ZNSL und entzündlichen ZNS-Erkrankungen ,87 (95% KI ,75-,99; cut-off-Wert 438 ng/ml; Sensitivität 84%; Spezifität 83%), zwischen ZNSL und MS ,96 (95% KI ,90-1,00; cut-off-Wert 362 ng/ml; Sensitivität 89%; Spezifität 88%), zwischen ZNSL und GBM ,99 (95% KI ,96-1,00; cut-off-Wert 240 ng/ml; Sensitivität 95%; Spezifität 100%) und zwischen ZNSL und den gesunden Kontrollen ,92 (95% KI ,83-1,00; cut-off-Wert 419 ng/ml; Sensitivität 87%; Spezifität 85%)⁵⁴.

Prognostische Bedeutung von OPN im Liquor bei PZNSL-Patienten

Es konnten Überlebensdaten von 25 PZNSL-Patienten, bei welchen OPN im Liquor zum Zeitpunkt der Erstdiagnose gemessen wurde, analysiert werden. Die Nachbeobachtungszeit (Follow-Up) lag im Median bei 21,4 Monaten. PFS und OS betrugen entsprechend 26,5 Monate im Median (95% KI 14,4-38,5 Monate) und 32,5 Monate im Median (95% KI 19,2-45,7 Monate). In der univariaten Analyse zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohen Liquor-OPN-Werten und einem kürzeren PFS (HR 1,47; 95% KI 1,02-2,1; $P = ,037$), jedoch kein signifikanter Zusammenhang mit OS (HR 1,28; 95% KI 0,89-1,84; $P = ,187$). Die multivariate Analyse unter Einschluss der klinischen Charakteristika Alter und Geschlecht ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen hohem OPN im Liquor und einem kürzeren PFS (HR 1,61; 95% KI 1,13-2,31; $P = ,009$) sowie OS (HR 1,52; 95% KI 1,04-2,21; $P = ,029$). Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte eine signifikante mittelstarke Korrelation zwischen OPN im Liquor und multifokalen Gehirnläsionen ($r = ,46$; $P = ,021$)⁵⁴.

1.4.2. Prognostischer Marker: Intraokuläre Lymphombeteiligung bei PZNSL (Publikation 2)

Patientencharakteristika

Von den 526 Patienten der G-PCNSL-SG1-Studie erhielten 297 (57%) eine ophthalmologische Untersuchung im Rahmen des initialen Stagings: 19 Patienten (6%) hatten eine okuläre Beteiligung (bei 8 dieser Patienten fanden sich Lymphomzellen in der zytomorphologischen Untersuchung des Glaskörperaspirates und bei einem war die Zytologie inkonklusiv). Bei Betrachtung der Patientencharakteristika wie Geschlecht, KPS, Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC)-Score, Lokalisation des Lymphoms im Gehirn und Anzahl zerebraler Läsionen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit intraokulärem Lymphombefall (IOL⁺) und der Gruppe ohne intraokulären Lymphombefall (IOL⁻)⁵⁵.

Therapie und Ansprechen

Im Hinblick auf die erste Therapie und das anschließende Ansprechen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den IOL⁺- und IOL⁻-Patienten. Insgesamt erreichten von den 19 IOL⁺-Patienten 8 (42%) ein objektives Ansprechen nach der gesamten Ersttherapie, davon 7 (37%) Patienten eine komplette Remission.

In den Fällen eines Progresses bzw. eines Rezidivs waren bei 12 Patienten (63%) das Gehirn und jeweils bei einem (je 5%) die Augen, Gehirn und Augen oder Meningen betroffen. Bei 4 Patienten (21%) konnte die Lokalisation nicht genau bestimmt werden. Beide okulären Rezidive traten innerhalb von 2 Monaten nach Beendigung der HDMTX-basierten Therapie auf. Ein Patient zeigte ein isoliertes intraokuläres Rezidiv nach initialer kompletter Remission, der zweite Patient war nach einer partiellen Remission rasch progredient mit gleichzeitigem intrazerebralem und intraokulärem Befall. In der IOL⁻-Gruppe rezidierten 8 (3%) Patienten mit IOL⁵⁵.

Prognostische Bedeutung des IOL bei PZNSL

Das Follow-Up aller Patienten mit ophthalmologischem Assessment betrug im Median 78,4 Monate. Das mediane PFS in der IOL⁺-Gruppe lag bei 3,5 Monaten (95% KI 0,0-7,07 Monate) im Vergleich zu 8,3 Monaten (95% KI 4,78-11,78 Monate) in der IOL⁻-Gruppe (P = ,004). Das OS im IOL⁺-Kollektiv betrug im Median 13,2 Monate (95% KI 0,86-25,62 Monate) versus 20,5 Monate (95% KI 15,56-25,5 Monate) im IOL⁻-Kollektiv (P = ,155). In der multivariaten Analyse, nach Adjustierung an Alter und KPS als wichtigste Prognosefaktoren, war der okuläre Befall signifikant mit kürzerem PFS (HR 2,18; P = ,003) und OS (HR 2,17; P = ,004) assoziiert⁵⁵.

1.4.3. Prognostischer Marker: B-cell lymphoma 6 bei PZNSL (Publikation 3)

Patientencharakteristika, Therapie und Ansprechen

Es konnten Tumorproben von 119 Patienten analysiert werden. Im Hinblick auf Patientencharakteristika, Behandlung und Ansprechen waren diese Patienten mit den restlichen Studienpatienten, die nicht in diese Analyse eingeschlossen wurden, vergleichbar mit Ausnahme der Häufigkeit des multifokalen Befalls und des Operationstyps. In der vorliegenden Analyse gab es signifikant mehr Patienten mit weniger als 2 Tumorerläsionen sowie signifikant mehr Patienten mit subtotaler oder totaler Tumoresektion. Das Follow-Up aller der immunhistochemisch untersuchten Patienten lag im Median bei 67,5 Monaten. Das mediane PFS betrug 10,6 Monate (95% KI 4,2-17,0 Monate), das mediane OS 28,9 Monate (95% KI 18,0-39,7 Monate). Das PFS und OS der immunhistochemisch untersuchten Patienten war nicht signifikant länger ($P = ,057$ bzw. $,056$) als das der übrigen Patienten aus der G-PCNSL-SG1-Studie⁵⁶.

Immunhistochemische Profile

Bei 89 von 96 (93%) diesbezüglich untersuchten Tumoren fand sich die BCL2-Expression und bei 24 von 117 (21%) CD10-Expression. BCL6 und MUM1/IRF4 waren in 60 von 111 (54%) und 87 von 110 (79%) Tumoren positiv. Von den BCL6-positiven Tumoren zeigten 53 (88%) eine Koexpression von MUM1/IRF4. Darauf basierend wurden 29 (27%) Tumore als GCB und 80 (73%) als nicht-GCB klassifiziert⁵⁶.

Prognostische Bedeutung von BCL6-Expression

Von den untersuchten Biomarkern korrelierte nur die Expression von BCL6 mit einem kürzeren PFS und OS. In univariater Analyse zeigte sich eine signifikante Assoziation von BCL6 sowohl mit dem PFS (HR 1,53; 95% KI 1,01-2,34; $P = ,047$) als auch mit dem OS (HR 1,66; 95% KI 1,04-2,65; $P = ,035$). In multivariater Analyse konnte ein signifikanter Zusammenhang allerdings nur für das PFS gefunden werden (HR 1,95; 95% KI 1,22-3,12; $P = .005$). Entsprechend der Klassifikation nach dem Hans-Algorithmus ergab sich im Hinblick auf das Outcome kein Unterschied zwischen der GCB- und nicht-GCB-Subgruppe. Patientencharakteristika und das Ansprechen auf die Therapie unterschieden sich nicht zwischen den BCL6-positiven und BCL6-negativen Patienten mit Ausnahme der Anzahl der Läsionen: Es zeigte sich eine Assoziation der BCL6-Expression mit multifokalem zerebralem Lymphombefall (BCL6 positiv: 33% versus BCL6 negativ: 16%).

Bei der Überprüfung bereits bekannter klinischer Risikofaktoren bestätigte sich in univariater Analyse eine signifikante Assoziation von Alter (HR 1,027; 95% KI 1,003-1,05; $P = ,026$) und

KPS (HR 0,99; 95% KI 0,97-1,00; P = ,044) mit dem OS. Der MSKCC-Score, welcher auf Alter und KPS basiert, zeigte in multivariater Analyse einen prognostischen Zusammenhang sowohl mit dem PFS (HR 1,87; 95% KI 1,15-3,04; P = ,011) als auch mit dem OS (HR 2,95; 95% KI 1,22-7,13; P = ,016). Das Vorliegen multifokaler Gehirnläsionen war signifikant mit kürzerem PFS (HR 1,79; 95% KI 1,14-2,80; P = ,011) in univariater und kürzerem OS (HR 2,72; 95% KI 1,18-6,28; P = ,019) in multivariater Analyse assoziiert⁵⁶.

1.5. Diskussion

Diese Dissertation fasst drei Projekte und die dazugehörenden Publikationen 1-3 zu diagnostischen und prognostischen Markern für ZNSL zusammen. Die Publikation 1 konnte erstmalig OPN im Liquor als einen potentiellen, leicht messbaren und kosteneffektiven diagnostischen und prognostischen Marker für ZNSL identifizieren. Des Weiteren konnte in der Publikation 2 erstmalig ein negativer prognostischer Einfluss des okulären Befalls bei PZNSL gezeigt werden. Immunhistochemische Analysen in der Publikation 3 identifizierten die Expression von BCL6 bei PZNSL als einen negativen prognostischen Biomarker.

OPN im Liquor wurde in der Publikation 1 auf seine diagnostische Bedeutung hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass OPN im Liquor von Patienten mit ZNSL signifikant höher ist als bei den Kontrollen. OPN erlaubte eine Unterscheidung von ZNSL und den Kontrollgruppen mit hoher Sensitivität und Spezifität und könnte daher als diagnostisches Molekül dienen.

Aufgrund der Seltenheit der ZNSL ist wenig über den Mechanismus der Entwicklung der Erkrankung im ZNS, welches bisher als frei von lymphatischem Gewebe betrachtet wurde, bekannt. Hohe Werte von proinflammatorischen Proteinen wie Neopterin und – wie in der Publikation 1 beschrieben – OPN lassen eine pathogenetische Mitbeteiligung eines neuroinflammatorischen Prozesses vermuten^{15,54}. Diese These unterstützend ergab die Untersuchung von Incesoy-Özdemir et al. bei Kindern mit akuter Leukämie mit ZNS-Befall höhere OPN-Werte im Liquor als bei Patienten ohne ZNS-Befall¹⁹.

Eine Bestätigung unserer Ergebnisse in größeren Studien wäre wünschenswert. Möglicherweise könnte OPN insbesondere in Kombination mit anderen Molekülen wie Interleukin-10, CXCL13 oder Neopterin das diagnostische Feld verbessern¹⁴⁻¹⁷.

Interessant erscheint eine potentielle Rolle von OPN als ein Frühmarker eines sekundären ZNS-Befalls bei systemischen Lymphomen. Diese sind bisher kaum etabliert und basieren überwiegend auf klinischen Merkmalen⁵⁷. Insbesondere mit dem Ziel einer möglichen ZNS-Prophylaxe

bei Patienten mit hohem Risiko für einen ZNS-Befall ist es wichtig, valide diagnostische Biomarker zu finden.

Die erhöhten OPN-Werte bei Patienten mit MS bestätigen Studien anderer Gruppen, die über erhöhte OPN-Werte im Liquor bei Patienten mit MS und anderen neuroinflammatorischen sowie neurodegenerativen Erkrankungen berichten^{58,59}. Die niedrige OPN-Konzentration im Liquor von GBM-Patienten in unserer Analyse steht im Gegensatz zum Ergebnis der Studie von Yamaguchi et al., in der eine hohe Expression von OPN mittels Immunhistochemie sowie relativ hohe OPN-Werte im Liquor gefunden wurden⁶⁰. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz besteht in methodologischen Unterschieden sowie Unterschieden von Patientencharakteristika und Vorbehandlung. OPN-Werte im Liquor bei den gesunden Kontrollpersonen waren in der vorliegenden Analyse höher als in anderen Studien^{61,62}. Auch wenn bei den Kontrollpersonen keine ZNS-Erkrankung diagnostiziert wurde, können nicht alle Umstände wie bspw. eine periphere Neuropathie mit möglichem Einfluss auf OPN-Werte im Liquor ausgeschlossen werden.

Patienten mit höheren OPN-Werten hatten in unserer Analyse ein kürzeres medianes PFS und OS. OPN könnte daher auch einen leicht messbaren prognostischen Biomarker bei ZNSL darstellen. Weiterhin korrelierten höhere OPN-Werte signifikant mit einer multifokalen Gehirnmanifestation, was darauf hindeutet, dass die OPN-Konzentration im Liquor die Tumormass bei ZNSL widerspiegeln könnte. Auch bei anderen Tumorentitäten ist eine Korrelation zwischen erhöhter OPN-Konzentration im Blut und erhöhter OPN-Expression auf Tumorzellen mit einer schlechteren Prognose gefunden worden^{20,21}. Dies könnte die Möglichkeit der Nutzung von OPN und des zugehörigen Rezeptors CD44 als potentielle therapeutische Ansatzpunkte öffnen^{63,64}.

Die relativ kleinen Fallzahlen, insbesondere der Kontrollgruppen, stellen eine Einschränkung der Analyse dar. Daher sind weitere Studien mit größeren Kontrollgruppen zur Validierung der Ergebnisse notwendig.

Die Publikation 2 berichtet über die erste Analyse okulärer Beteiligung bei PZNSL und deren prognostischen Bedeutung in einer großen prospektiven Kohorte, die im Rahmen der G-PCNSL-SG1-Studie mit einer HDMTX-basierten Chemotherapie behandelt wurde. Die Frequenz des IOL-Befalls lag hier bei 6%⁵⁵. Dies ist in Übereinstimmung mit der in der Literatur berichteten Frequenz von 1-19%³⁶⁻³⁸. Die Streubreite der Frequenz lässt sich mit der hohen Rate asymptomatischer Patienten und der Schwierigkeit, den intraokulären Lymphombefall zu diagnostizieren, erklären.

Erstmalig wurde gezeigt, dass IOL zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines PZNSL einen unabhängigen negativen prognostischen Indikator sowohl für das PFS als auch das OS darstellt. Für die schlechtere Prognose der IOL⁺-Patienten sind zwei Erklärungsansätze denkbar. Zum einen könnte IOL einer erhöhten Tumorlast oder einem aggressiveren Tumorverhalten entsprechen. Zum anderen ist es schwierig, therapeutische Dosen von HDMTX in der Glaskörper-Flüssigkeit zu erreichen^{65,66}. Die Vermutung liegt nahe, dass somit Tumorzellen in diesem schwer zugänglichen Kompartiment überleben und zu einem Rezidiv führen können.

Eine Einschränkung der Analyse besteht darin, dass es sich dabei um eine ungeplante retrospektive Sekundäranalyse einer Subgruppe handelte, da nicht alle Studienpatienten im Hinblick auf eine okuläre Mitbeteiligung untersucht wurden. Von einem Bias ist allerdings nicht auszugehen, da der Gruppenvergleich der wichtigsten klinischen Charakteristika und des Outcomes keine signifikanten Unterschiede zeigte⁵⁵. Da im Follow-up keine routinemäßige augenärztliche Untersuchung durchgeführt wurde (diese war im Protokoll der G-PCNSL-SG1-Studie nicht vorgesehen), kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass einige der okulären Rezidive verkannt geblieben sind.

Die Resultate der Publikation 2 unterstreichen die Wichtigkeit einer sorgfältigen ophthalmologischen Beurteilung auch bei asymptomatischen PZNSL-Patienten – so wie es in den Richtlinien der „International Primary CNS Lymphoma Collaborative Group“ empfohlen wird. Das schlechte Outcome dieser Patienten suggeriert, dass sie als Hochrisiko-Patienten betrachtet werden können und ggf. aggressiver zu behandeln sind. Ob eine zusätzliche Behandlung des okulären Befalls wie eine lokale Radiotherapie oder intravitreale Injektion von Chemo- bzw. Immuntherapie (Rituximab) die Prognose von IOL⁺-PZNSL-Patienten verbessern kann, bleibt noch unklar^{39,67,68}.

In der Publikation 3 wurde die Expression und prognostische Signifikanz der B-Zell-Differenzierungsmarker bei PZNSL untersucht. Der hohe Prozentsatz der Tumore mit Ko-Expression von BCL6 und MUM1/IRF4 steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hans et al. und Chang et al., welche ebenfalls eine hohe Ko-Expressionsrate von BCL6 und MUM1/IRF4 als charakteristisches Merkmal der PZNSL im Vergleich zu systemischen DLBCL fanden^{48,49,69}. Die Koexpression von MUM1/IRF4 weist auf die Abstammung der PZNSL aus dem aktivierten Keimzentrum hin^{49,70}. Des Weiteren ließen sich die meisten PZNSL dieser Analyse entsprechend dem Hans-Algorithmus dem nicht-GCB-Subtyp zuordnen. Dies stimmt mit anderen immunhistochemischen und Genexpressions-Analysen überein^{49,71,72}.

Die prognostische Wertigkeit des B-Zell-Differenzierungsstatus⁷ und verschiedener B-Zell-Differenzierungsmarker zur Vorhersage des Outcomes bei PZNSL ist derzeit ungewiss. Die verfügbaren Daten zu dieser Fragestellung basieren zumeist auf retrospektiven Studien mit kleinen Fallzahlen und heterogener Behandlung und sind zum Teil widersprüchlich^{49-52,70-74}. Im Datensatz der Publikation 3 wurde keine Korrelation zwischen der Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL2 und dem PFS oder OS festgestellt. BCL2-negative Tumore waren allerdings so selten, dass die Expression von BCL2 eher ein Charakteristikum als ein prognostischer Faktor beim PZNSL zu sein scheint. Bei systemischen DLBCL hingegen wurde BCL2 von Mounier et al. und Gascoyne et al. als unabhängiger ungünstiger Prognosefaktor beschrieben^{75,76}. Auch die alleinige Expression des B-Zell-Markers CD10 oder MUM1/IRF4 korrelierte nicht mit der Prognose, was in Übereinstimmung mit anderen Publikationen steht^{49,74}. In unserer Analyse wies BCL6-Expression eine Korrelation mit schlechterem Outcome auf und kann daher als potentieller negativer prognostischer Biomarker gesehen werden. Die bisherigen Untersuchungen der prognostischen Signifikanz von BCL6 bei PZNSL-Patienten im Rahmen von retrospektiven Studien mit kleinen Fallzahlen ergaben kontroverse Ergebnisse^{50,52,74}. In einer prospektiven multizentrischen Studie konnte allerdings ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der BCL6-Expression und schlechterem Überleben gefunden werden⁷⁷. Ein Zusammenhang zwischen der BCL6-Expression und ungünstigen klinischen Prognosefaktoren wie höherem Alter oder schlechterem KPS wurde von anderen Gruppen beschrieben⁴⁹. In der aktuellen Auswertung wurde eine Korrelation zwischen der Expression von BCL6 und multifokalem zerebralem Lymphombefall gefunden. Dieser wurde bereits in früheren Analysen der gesamten Kohorte der G-PCNSL-SG1-Studie als negativer Prognosefaktor beschrieben⁷⁸. Einen signifikanten Unterschied im Outcome zwischen der GCB und der nicht-GCB-Gruppe konnten wir in der vorliegenden Analyse nicht feststellen. Dies passt zu den Ergebnissen verschiedener anderer kleinerer Studien^{49,50,71,73}.

Eine relevante Einschränkung der immunhistochemischen Post-hoc-Analyse ist, dass nur 23% aller Studienpatienten der G-PCNSL-SG1-Studie in die Untersuchung der B-Zell-Differenzierungsmarker eingeschlossen wurden. Der Bias der positiven Selektion ist auf die Notwendigkeit der Verfügbarkeit großer Tumormassen für die Immunhistochemie zurückzuführen. Folglich handelt es sich bei den eingeschlossenen Fällen zum großen Anteil um Patienten mit weniger als zwei zerebralen Tumoreläsionen und einer subtotalen oder totalen Tumoresektion bei Erstdiagnose. In der gesamten G-PCNSL-SG1-Studienpopulation waren diese beiden Faktoren mit einem besseren Outcome assoziiert. Dies könnte den nicht-signifikanten aber po-

tentiell wichtigen Trend einer besseren Prognose in der in Publikation 3 analysierten Patientengruppe mit immunhistochemischer Analyse erklären.

Insgesamt ist die vorliegende Arbeit ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur besseren diagnostischen und prognostischen Charakterisierung von ZNSL.

1.6. Literaturverzeichnis

1. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014 Oct;16 Suppl 4:iv1-63.
2. Boehme V, Zeynalova S, Kloess M, Loeffler M, Kaiser U, Pfreundschuh M, Schmitz N, German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). Incidence and risk factors of central nervous system recurrence in aggressive lymphoma--a survey of 1693 patients treated in protocols of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Ann Oncol.* 2007 Jan;18(1):149-57.
3. Thiel E, Korfel A, Martus P, Kanz L, Griesinger F, Rauch M, Röth A, Hertenstein B, von Toll T, Hundsberger T, Mergenthaler HG, Leithäuser M, Birnbaum T, Fischer L, Jahnke K, Herrlinger U, Plasswilm L, Nägele T, Pietsch T, Bamberg M, Weller M. High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1036-47.
4. Korfel A, Elter T, Thiel E, Hänel M, Möhle R, Schroers R, Reiser M, Dreyling M, Eucker J, Scholz C, Metzner B, Röth A, Birkmann J, Schlegel U, Martus P, Illerhaus G, Fischer L. Phase II study of central nervous system (CNS)-directed chemotherapy including high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation for CNS relapse of aggressive lymphomas. *Haematologica.* 2013 Mar;98(3):364-70.
5. Deckert M, Engert A, Brück W, Ferreri AJ, Finke J, Illerhaus G, Klapper W, Korfel A, Küppers R, Maarouf M, Montesinos-Rongen M, Paulus W, Schlegel U, Lassmann H, Wiestler OD, Siebert R, DeAngelis LM. Modern concepts in the biology, diagnosis, differential diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma. *Leukemia.* 2011 Dec;25(12):1797-807.
6. Strehlow F, Schroers R, Schmidt-Hieber M, Schlegel U, Reimer P, Griesinger F, Höffkes HG, Jordan K, Meyer zum Büschenfelde C, Mezger J, Kreher S, Hirsch A, Menßen A, Fischer L, Korfel A. Sekundärer ZNS-Befall maligner Lymphome: Erste Daten aus einem prospektiven Register. Jahrestagung der DGHO 10.-14.10.2014, Vortrag, Hamburg.
7. Hirsch A, Strehlow F, Kreher S, Schulz C, Schroers R, Schlegel U, Schmidt-Hieber M, Reimer P, Höffkes HG, Steur C, Griesinger F, Stuhlmann R, Weissinger F, Fischer L, Korfel A. Secondary CNS involvement in malignant lymphoma in the rituximab-era: Data of the first 100 patients from a prospective registry. 13th International Conference On Malignant Lymphoma 17.-20.06.2015, Poster, Lugano.
8. Baraniskina A, Deckert M, Schulte-Altendorfer G, Schlegel U, Schroers R. Current strategies in the diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Br J Haematol.* 2012 Feb;156(4):421-32.
9. Schroers R, Baraniskina A, Heute C, Vorgerd M, Brunn A, Kuhnhen J, Kowoll A, Alekseyev A, Schmiegel W, Schlegel U, Deckert M, Pels H. Diagnosis of leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system by flow cytometry and cytopathology. *Eur J Haematol.* 2010 Dec;85(6):520-8.
10. Gleissner B, Siehl J, Korfel A, Reinhardt R, Thiel E. CSF evaluation in primary CNS lymphoma patients by PCR of the CDR III IgH genes. *Neurology.* 2002 Feb;58(3):390-6.
11. Korfel A, Weller M, Martus P, Roth P, Klasen HA, Roeth A, Rauch M, Hertenstein B, Fischer T, Hundsberger T, Leithäuser M, Birnbaum T, Kirchen H, Mergenthaler HG, Schubert J, Berdel W, Birkmann J, Hummel M, Thiel E, Fischer L. Prognostic impact of meningeal dissemination in primary CNS lymphoma (PCNSL): experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Oncol.* 2012 Sep;23(9):2374-80.

12. Bromberg JE, Doorduijn JK, Illerhaus G, Jahnke K, Korfel A, Fischer L, Fritsch K, Kuitinen O, Issa S, van Montfort C, van den Bent MJ. Central nervous system recurrence of systemic lymphoma in the era of stem cell transplantation--an International Primary Central Nervous System Lymphoma Study Group project. *Haematologica*. 2013 May;98(5):808-13.
13. Roth P, Keller A, Hoheisel JD, Codo P, Bauer AS, Backes C, Leidinger P, Meese E, Thiel E, Korfel A, Weller M. Differentially regulated miRNAs as prognostic biomarkers in the blood of primary CNS lymphoma patients. *Eur J Cancer*. 2015 Feb;51(3):382-90.
14. Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M, Kawamura A, Tanaka H, Mizukawa K, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E. Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Neuro Oncol*. 2012 Mar;14(3):368-80.
15. Viacozz A, Ducray F, Tholance Y, Barcelos GK, Thomas-Maisonneuve L, Ghesquières H, Meyronet D, Quadrio I, Cartalat-Carel S, Louis-Tisserand G, Jouanneau E, Guyotat J, Honnorat J, Perret-Liaudet A. CSF neopterin level as a diagnostic marker in primary central nervous system lymphoma. *Neuro Oncol*. 2015 Nov;17(11):1497-503.
16. Fischer L, Korfel A, Pfeiffer S, Kiewe P, Volk HD, Cakiroglu H, Widmann T, Thiel E. CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct;15(19):5968-73.
17. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao HX, Barajas R, Chen L, Josephson SA, Scott B, Douglas V, Maiti M, Kaplan LD, Treseler PA, Cha S, Hwang JH, Cinque P, Cyster JG, Lowell C. CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4740-8.
18. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol*. 2014 Jul;37:131-41.
19. Incesoy-Özdemir S, Sahin G, Bozkurt C, Oren AC, Balkaya E, Ertem U. The relationship between cerebrospinal fluid osteopontin level and central nervous system involvement in childhood acute leukemia. *Turk J Pediatr*. 2013 Jan-Feb;55(1):42-9.
20. Rud AK, Boye K, Oijordsbakken M, Lund-Iversen M, Halvorsen AR, Solberg SK, Berge G, Helland A, Brustugun OT, Mælandsmo GM. Osteopontin is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2013 Nov 11;13:540.
21. Li Y, Li L, Wang JT, Kan X, Lu JG. Elevated content of osteopontin in plasma and tumor tissues of patients with laryngeal and hypopharyngeal carcinoma associated with metastasis and prognosis. *Med Oncol*. 2012 Sep;29(3):1429-34.
22. Yuan J, Gu K, He J, Sharma S. Preferential up-regulation of osteopontin in primary central nervous system lymphoma does not correlate with putative receptor CD44v6 or CD44H expression. *Hum Pathol*. 2013 Apr;44(4):606-11.
23. Rubenstein JL, Shen A, Batchelor TT, Kadoch C, Treseler P, Shuman MA. Differential gene expression in central nervous system lymphoma. *Blood*. 2009 Jan 1;113(1):266-7.
24. Tun HW, Personett D, Baskerville KA, Menke DM, Jaeckle KA, Kreinest P, Edenfield B, Zubair AC, O'Neill BP, Lai WR, Park PJ, McKinney M. Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3200-10.
25. Jiang L, Marlow LA, Cooper SJ, Roemeling CV, Menke DM, Copland JA, Tun HW. Selective central nervous system tropism of primary central nervous system lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010 Oct 8;3(8):763-7.
26. Abrey LE, Yahalom J, DeAngelis LM. Treatment for primary CNS lymphoma: the next step. *J Clin Oncol*. 2000 Sep;18(17):3144-50.
27. Doolittle ND, Abrey LE, Shenkier TN, Tali S, Bromberg JE, Neuwelt EA, Soussain C, Jahnke K, Johnston P, Illerhaus G, Schiff D, Batchelor T, Montoto S, Kraemer DF, Zucca E. Brain parenchyma involvement as isolated central nervous system relapse of

- systemic non-Hodgkin lymphoma: an International Primary CNS Lymphoma Collaborative Group report. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1085-93.
28. Ferreri AJ, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, Torri V, Fox CP, Rosée PL, Schorb E, Ambrosetti A, Roth A, Hemmaway C, Ferrari A, Linton KM, Rudà R, Binder M, Pukrop T, Balzarotti M, Fabbri A, Johnson P, Gørløv JS, Hess G, Panse J, Pisani F, Tucci A, Stilgenbauer S, Hertenstein B, Keller U, Krause SW, Levis A, Schmoll HJ, Cavalli F, Finke J, Reni M, Zucca E, Illerhaus G; International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG). Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2016 May;3(5):e217-27.
 29. Pels H, Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A, Schulz H, Engert A, Diehl V, Zellner A, Schackert G, Reichmann H, Kroschinsky F, Vogt-Schaden M, Egerer G, Bode U, Schaller C, Deckert M, Fimmers R, Helmstaedter C, Atasoy A, Klockgether T, Schlegel U. Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2003 Dec 15;21(24):4489-95.
 30. Korfel A, Schlegel U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nat Rev Neurol*. 2013 Jun;9(6):317-27.
 31. Pfreundschuh M. Current therapeutic strategies for diffuse large B-cell lymphoma. *Internist (Berl)*. 2016 Mar;57(3):214-21.
 32. Kühnl A, Cunningham D, Counsell N, Hawkes EA, Qian W, Smith P, Chadwick N, Lawrie A, Mouncey P, Jack A, Pocock C, Ardesna KM, Radford J, McMillan A, Davies J, Turner D, Kruger A, Johnson P, Gambell J, Rosenwald A, Ott G, Horn H, Ziepert M, Pfreundschuh M, Linch D. Outcome of Elderly Patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with R-CHOP: Results from the UK NCRI R-CHOP14v21 trial with combined analysis of molecular characteristics with the DSHNHL RICOVER-60 trial. *Ann Oncol*. 2017 Apr 7. doi: 10.1093/annonc/mdx128. [Epub ahead of print].
 33. Abrey LE, Ben-Porat L, Panageas KS, Yahalom J, Berkey B, Curran W, Schultz C, Leibel S, Nelson D, Mehta M, DeAngelis LM. Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5711-5.
 34. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, Calderoni A, Rossi A, Vavassori V, Conconi A, Devizzi L, Berger F, Ponzoni M, Borisch B, Tinguely M, Cerati M, Milani M, Orvieto E, Sanchez J, Chevreau C, Dell'Oro S, Zucca E, Cavalli F. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):266-72.
 35. Choi JY, Kafkala C, Foster CS. Primary intraocular lymphoma: A review. *Semin Ophthalmol*. 2006 Jul-Sep;21(3):125-33.
 36. DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold SC, Fisher B, Schultz CJ; Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. *J Clin Oncol*. 2002 Dec 15;20(24):4643-8.
 37. Shah GD, Yahalom J, Correa DD, Lai RK, Raizer JJ, Schiff D, LaRocca R, Grant B, DeAngelis LM, Abrey LE. Combined immunochemotherapy with reduced whole-brain radiotherapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 20;25(30):4730-5.
 38. Soussain C, Hoang-Xuan K, Taillandier L, Fourme E, Choquet S, Witz F, Casasnovas O, Dupriez B, Souleau B, Taksin AL, Gisselbrecht C, Jaccard A, Omuro A, Sanson M, Janvier M, Kolb B, Zini JM, Leblond V. Intensive chemotherapy followed by hemato-

- poietic stem-cell rescue for refractory and recurrent primary CNS and intraocular lymphoma: Société Française de Greffe de Moëlle Osseuse-Thérapie Cellulaire. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15):2512-8.
39. Grimm SA, McCannel CA, Omuro AM, Ferreri AJ, Blay JY, Neuwelt EA, Siegal T, Batchelor T, Jahnke K, Shenkier TN, Hall AJ, Graus F, Herrlinger U, Schiff D, Raizer J, Rubenstein J, Laperriere N, Thiel E, Doolittle N, Iwamoto FM, Abrey LE. Primary CNS lymphoma with intraocular involvement: International PCNSL Collaborative Group Report. *Neurology*. 2008 Oct 21;71(17):1355-60.
 40. Cassoux N, Merle-Beral H, Leblond V, Bodaghi B, Miléa D, Gerber S, Fardeau C, Reux I, Xuan KH, Chan CC, LeHoang P. Ocular and central nervous system lymphoma: clinical features and diagnosis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2000 Dec;8(4):243-50.
 41. Küker W, Herrlinger U, Grönwäller E, Rohrbach JM, Weller M. Ocular manifestation of primary nervous system lymphoma: what can be expected from imaging? *J Neurol*. 2002 Dec;249(12):1713-6.
 42. Chan CC, Wallace DJ. Intraocular lymphoma: update on diagnosis and management. *Cancer Control*. 2004 Sep-Oct;11(5):285-95.
 43. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503-11.
 44. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
 45. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, Braziel RM, Geng H, Iqbal J, Lenz G, Vose JM, Hans CP, Fu K, Smith LM, Li M, Liu Z, Gascoyne RD, Rosenwald A, Ott G, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Jaye DL, Staudt LM, Chan WC. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5494-502.
 46. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*. 2006 Apr;208(5):714-23.
 47. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Campo E, Vose JM, Lenz G, Staudt LM, Chan WC, Weisenburger DD. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29(2):200-7.
 48. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275-82.

49. Camilleri-Broët S, Crinière E, Broët P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, Kujas M, Raphaël M, Iraqi W, Sautès-Fridman C, Colombat P, Hoang-Xuan K, Martin A. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):190-6.
50. Momota H, Narita Y, Maeshima AM, Miyakita Y, Shinomiya A, Maruyama T, Muragaki Y, Shibui S. Prognostic value of immunohistochemical profile and response to high-dose methotrexate therapy in primary CNS lymphoma. *J Neurooncol*. 2010 Jul;98(3):341-8.
51. Song MK, Chung JS, Joo YD, Lee SM, Oh SY, Shin DH, Yun EY, Kim SG, Seol YM, Shin HJ, Choi YJ, Cho GJ. Clinical importance of Bcl-6-positive non-deep-site involvement in non-HIV-related primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *J Neurooncol*. 2011 Sep;104(3):825-31.
52. Lossos C, Bayraktar S, Weinzierl E, Younes SF, Hosein PJ, Tibshirani RJ, Sutton Posthumus J, DeAngelis LM, Raizer J, Schiff D, Abrey L, Natkunam Y, Lossos IS. LMO2 and BCL6 are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*. 2014 Jun;165(5):640-8.
53. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann ML, Schmelter C, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Siebert R, Loeffler M, Rosenwald A, Ott G; German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2253-63.
54. Strehlow F, Bauer S, Martus P, Weller M, Roth P, Schlegel U, Seidel S, Scheibenbogen C, Korfel A, Kreher S. Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma. *J Neurooncol*. 2016 Aug;129(1):165-71.
55. Kreher S, Strehlow F, Martus P, Roth P, Hertenstein B, Röth A, Birnbaum T, Griesinger F, Rauch M, Kanz L, Thiel E, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of intraocular involvement in primary CNS lymphoma: experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Hematol*. 2015 Mar;94(3):409-14.
56. Kreher S, Jöhrens K, Strehlow F, Martus P, Borowiec K, Radke J, Heppner F, Roth P, Thiel E, Pietsch T, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol*. 2015 Jul;17(7):1016-21.
57. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, Kansara R, Villa D, Sehn LH, Glass B, Scott DW, Gascoyne RD, Connors JM, Ziepert M, Pfreundschuh M, Loeffler M, Savage KJ. CNS International Prognostic Index: A Risk Model for CNS Relapse in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2016 Sep;34(26):3150-6.
58. Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S. Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2012 Mar;244(1-2):94-6.
59. Börnsen L, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS, Sellebjerg F. Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2011 Jan;17(1):32-42.
60. Yamaguchi Y, Shao Z, Sharif S, Du XY, Myles T, Merchant M, Harsh G, Glantz M, Recht L, Morser J, Leung LL. Thrombin-cleaved fragments of osteopontin are overexpressed in malignant glial tumors and provide a molecular niche with survival advantage. *J Biol Chem*. 2013 Feb 1;288(5):3097-111.
61. Edwards LJ, Sharrack B, Ismail A, Tench CR, Gran B, Dhungana S, Brettschneider J, Tumani H, Constantinescu CS. Increased levels of interleukins 2 and 17 in the cerebro-

- spinal fluid of patients with idiopathic intracranial hypertension. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013 Oct 16;2(3):234-44.
62. Szalardy L, Zadori D, Simu M, Bencsik K, Vecsei L, Klivenyi P. Evaluating biomarkers of neuronal degeneration and neuroinflammation in CSF of patients with multiple sclerosis-osteopontin as a potential marker of clinical severity. *J Neurol Sci.* 2013 Aug 15;331(1-2):38-42.
 63. Dai J, Li B, Shi J, Peng L, Zhang D, Qian W, Hou S, Zhao L, Gao J, Cao Z, Zhao J, Wang H, Guo Y. A humanized anti-osteopontin antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Mar;59(3):355-66.
 64. Megaptche AP, Erb U, Büchler MW, Zöller M. CD44v10, osteopontin and lymphoma growth retardation by a CD44v10-specific antibody. *Immunol Cell Biol.* 2014 Sep;92(8):709-20.
 65. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, Pasini F, Gubkin A, Tirelli U, Calderoni A, Zucca E, Cortelazzo S, Chassagne C, Tinguely M, Borisch B, Berger F, Ponzoni M, Cavalli F; International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG). Relevance of intraocular involvement in the management of primary central nervous system lymphomas. *Ann Oncol.* 2002 Apr;13(4):531-8.
 66. Hormigo A, Abrey L, Heinemann MH, DeAngelis LM. Ocular presentation of primary central nervous system lymphoma: diagnosis and treatment. *Br J Haematol.* 2004 Jul;126(2):202-8.
 67. de Smet MD, Vancs VS, Kohler D, Solomon D, Chan CC. Intravitreal chemotherapy for the treatment of recurrent intraocular lymphoma. *Br J Ophthalmol.* 1999 Apr;83(4):448-51.
 68. Fishburne BC, Wilson DJ, Rosenbaum JT, Neuwelt EA. Intravitreal methotrexate as an adjunctive treatment of intraocular lymphoma. *Arch Ophthalmol.* 1997 Sep;115(9):1152-6.
 69. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuć T, Vesole DH, Logan B, Kajdacsy-Balla A, Perkins SL. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2004 Apr;28(4):464-70.
 70. Kinoshita M, Hashimoto N, Izumoto S, Okita Y, Kagawa N, Maruno M, Ohnishi T, Arita N, Yoshimine T. Immunohistological profiling by B-cell differentiation status of primary central nervous system lymphoma treated by high-dose methotrexate chemotherapy. *J Neurooncol.* 2010 Aug;99(1):95-101.
 71. Lin CH, Kuo KT, Chuang SS, Kuo SH, Chang JH, Chang KC, Hsu HC, Tien HF, Cheng AL. Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 15;12(4):1152-6.
 72. Levy O, Deangelis LM, Filippa DA, Panageas KS, Abrey LE. Bcl-6 predicts improved prognosis in primary central nervous system lymphoma. *Cancer.* 2008 Jan 1;112(1):151-6.
 73. Raoux D, Duband S, Forest F, Trombert B, Chambonnière ML, Dumollard JM, Khadage A, Gentil-Perret A, Péoc'h M. Primary central nervous system lymphoma: immunohistochemical profile and prognostic significance. *Neuropathology.* 2010 Jun;30(3):232-40.
 74. Braaten KM, Betensky RA, de Leval L, Okada Y, Hochberg FH, Louis DN, Harris NL, Batchelor TT. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2003 Mar;9(3):1063-9.
 75. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, Berger F, Bosly A, Morel P, Tilly H, Bouabdallah R, Reyes F, Gaulard P, Coiffier B. Rituximab plus CHOP

- (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2003 Jun 1;101(11):4279-84.
76. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):244-51.
77. Rubenstein JL, Hsi ED, Johnson JL, Jung SH, Nakashima MO, Grant B, Cheson BD, Kaplan LD. Intensive chemotherapy and immunotherapy in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202). *J Clin Oncol*. 2013 Sep 1;31(25):3061-8.
78. Weller M, Martus P, Roth P, Thiel E, Korfel A; German PCNSL Study Group. Surgery for primary CNS lymphoma? Challenging a paradigm. *Neuro Oncol*. 2012 Dec;14(12):1481-4.

2. Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung

„Ich, Felicitas Strehlow, geb. Lammer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Diagnostische und prognostische Marker bei Lymphomen des zentralen Nervensystems“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Felicitas Strehlow hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Strehlow F, Bauer S, Martus P, Weller M, Roth P, Schlegel U, Seidel S, Scheibenbogen C, Korfel A, Kreher S. Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma. J Neurooncol. 2016 Aug;129(1):165-71. Erstautorenschaft. Impact Faktor: 2,754.

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Konzeption des Projektes. Erfassung eines entscheidenden Anteils der klinischen Daten. Weitgehend eigenständige Konzeption und Durchführung der Datenanalyse sowie der statistischen Auswertung. Entscheidender Anteil bei der Dateninterpretation. Verfassung des Manuskriptentwurfs. Mitbearbeitung der Revisionsvorschläge.

Publikation 2: Kreher S, Strehlow F, Martus P, Roth P, Hertenstein B, Röth A, Birnbaum T, Griesinger F, Rauch M, Kanz L, Thiel E, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of intraocular involvement in primary CNS lymphoma: experience from the G-PCNSL-SG1 trial. Ann Hematol. 2015 Mar;94(3):409-14. Koautorenschaft. Impact Faktor: 3,022.

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Erfassung der Daten. Mitarbeit bei der Konzeption der Datenanalyse. Mithilfe bei der Dateninterpretation. Mithilfe bei der Erstellung der Publikation.

Publikation 3: Kreher S, Jöhrens K, Strehlow F, Martus P, Borowiec K, Radke J, Heppner F, Roth P, Thiel E, Pietsch T, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. Neuro Oncol. 2015 Jul;17(7):1016-21. Koautorenschaft. Impact Faktor: 7,371.

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei der Erfassung der Daten. Mitarbeit bei der Konzeption der Datenanalyse. Mithilfe bei der Dateninterpretation. Mithilfe bei der Erstellung der Publikation.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1

Strehlow F, Bauer S, Martus P, Weller M, Roth P, Schlegel U, Seidel S, Scheibenbogen C, Korfel A, Kreher S. Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma. *J Neurooncol.* 2016 Aug;129(1):165-71.

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-016-2162-5>

Publikation 2

Kreher S, Strehlow F, Martus P, Roth P, Hertenstein B, Röth A, Birnbaum T, Griesinger F, Rauch M, Kanz L, Thiel E, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of intraocular involvement in primary CNS lymphoma: experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Hematol.* 2015 Mar;94(3):409-14.

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-014-2212-z>

Publikation 3

Kreher S, Jöhrens K, Strehlow F, Martus P, Borowiec K, Radke J, Heppner F, Roth P, Thiel E, Pietsch T, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol.* 2015 Jul;17(7):1016-21.

URL: <http://dx.doi.org/10.1093/neuonc/nov046>

4. **Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.**

5. **Komplette Publikationsliste**

Artikel in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

1. Strehlow F, Bauer S, Martus P, Weller M, Roth P, Schlegel U, Seidel S, Scheibenbogen C, Korfel A, Kreher S. Osteopontin in cerebrospinal fluid as diagnostic biomarker for central nervous system lymphoma. *J Neurooncol.* 2016 Aug;129(1):165-71.
2. Kreher S, Strehlow F, Martus P, Roth P, Hertenstein B, Röth A, Birnbaum T, Griesinger F, Rauch M, Kanz L, Thiel E, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of intraocular involvement in primary CNS lymphoma: experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Hematol.* 2015 Mar;94(3):409-14.
3. Kreher S, Jöhrens K, Strehlow F, Martus P, Borowiec K, Radke J, Heppner F, Roth P, Thiel E, Pietsch T, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of B-cell lymphoma 6 in primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol.* 2015 Jul;17(7):1016-21.
4. Kreher S, Lammer F, Augustin D, Pezzutto A, Baldus CD. R-split-CHOP chemotherapy for elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2014 Jul;93(1):70-6.

Vorträge und Poster (wissenschaftliche Kongresse)

1. Strehlow F, Schroers R, Schmidt-Hieber M, Schlegel U, Reimer P, Griesinger F, Höffkes HG, Jordan K, Meyer zum Büschenfelde C, Mezger J, Kreher S, Hirsch A, Menßen A, Fischer L, Korfel A. Sekundärer ZNS-Befall maligner Lymphome: Erste Daten aus einem prospektiven Register. Jahrestagung der DGHO 10.-14.10.2014, Vortrag, Hamburg.
2. Strehlow F, Kreher S, Martus P, Roth P, Hertenstein B, Röth A, Birnbaum T, Griesinger F, Rauch M, Kanz L, Thiel E, Weller M, Korfel A. Prognostic impact of intraocular involvement in primary CNS lymphoma: experience from the G-PCNSL-SG1 trial. Jahrestagung der DGHO 10.-14.10.2014, Poster, Hamburg.
3. Hirsch A, Strehlow F, Kreher S, Schulz C, Schroers R, Schlegel U, Schmidt-Hieber M, Reimer P, Höffkes HG, Steur C, Griesinger F, Stuhlmann R, Weissinger F, Fischer L, Korfel A. Secondary CNS involvement in malignant lymphoma in the rituximab-era: Data of the first 100 patients from a prospective registry. 13th International Conference On Malignant Lymphoma 17.-20.06.2015, Poster, Lugano.
4. Strehlow F. ZNS-Lymphome: Aktuelle Entwicklungen und klinische Studien. 13. AIO Herbst-Kongress 2016, Vortrag Berlin.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Agnieszka Korfel. Sie hat die Rahmenbedingungen für diese Arbeiten großzügig geschaffen, mich in die wissenschaftliche Arbeit eingeführt, meine Projekte stets motivierend unterstützt und mit mir ihre besondere Expertise für die Durchführung klinischer Studien geteilt hat.

Herrn Dr. Stephan Kreher danke ich außerordentlich für die jahrelange vorbildliche Unterstützung meiner Projekte, seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und unzählige fruchtbare Diskussionen. Besonders danke ich auch Frau PD Dr. Korinna Jöhrens für die fachliche Expertise bei den immunhistochemischen Auswertungen. Herrn Prof. Dr. Peter Martus danke ich für seinen Rat und seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen. Frau Brigitta Nie-mer danke ich sehr für die großartige Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner gesamten Familie und Freunden, von denen ich Mario Strehlow, Steve Martin, Angela Schülke-Lammer und Franz Lammer hervorheben möchte, die meine Arbeiten stets motivierend begleitet haben.

Diese Arbeit widme ich den vielen Patientinnen und Patienten, welche an den jeweiligen Studien teilgenommen haben. Ohne sie wäre klinische Forschung nicht möglich und daher medizinischer Fortschritt undenkbar.