

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie,
Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Konzentration von CXCL13 und CXCL12 im Liquor zur
Diagnosestellung eines ZNS-Lymphoms

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hüsniye Cakiroglu

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstrakt	5
Abstract	6
1. Einleitung	7
1.1. Definition primäre und sekundäre ZNS-Lymphome	7
1.2 Epidemiologie	7
1.3 Risikofaktoren	8
1.4 Diagnosestellung	9
1.4.1 Rolle der Liquordiagnostik	9
1.5 Therapie und Prognose	10
1.6 Pathogenese	11
1.6.1 Rolle der Chemokine	12
1.11 Fragestellung und Ziele der Arbeit	13
2. Materialien und Methoden	15
2.1 Reagenzien	15
2.1.1 Kits	15
2.1.2 Vorbereitung der Reagenzien	16
2.2 Weitere Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Geräte	18
2.4 Computer-Software	18
2.5 Patienten	18
2.6 Probengewinnung	19
2.7 Probenanalysen mittels <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	20
2.7.1 Prinzip	20
2.7.2 Durchführung	20
2.7.3 Statistik	22
3. Ergebnisse	23
3.1 Patientenkollektiv	23
3.2 Chemokinkonzentrationen bei ZNSL-Patienten und in den Kontrollgruppen	25
3.3 Bluthirnschrankenfunktion und Chemokinkonzentrationen bei ZNSL-Patienten ..	27
3.4 Vorbehandlung mit Glukokortikoiden	32

3.5 Chemokinkonzentrationen im Serum bei Patienten mit systemischem Lymphom	33
3.6 Chemokinkonzentrationen im Verlauf der Therapie.....	35
4. Diskussion	37
5. Zusammenfassung	41
6.Literaturverzeichnis	42
Eidesstattliche Versicherung	47
Lebenslauf.....	48
Publikationsliste	51
Danksagung	52

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CD	Cluster of differentiation
dl	Deziliter
DLBCL	diffuses grosszelliges B-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent-assay
°C	Grad Celsius
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
l	Liter
LWK	Lumbalwirbelkörper
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pg	Pikogramm
PZNSL	primäres ZNS Lymphom
Q _{alb}	Albuminquotient
r	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
2 M H ₂ SO ₄	Schwefelsäure-Maßlösung
SD	Standardabweichung
SZNSL	sekundäres ZNS-Lymphom
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZNSL	ZNS-Lymphom

Abstrakt

Einleitung: Die Mechanismen, die zur Entstehung von Lymphomen im zentralen Nervensystem (ZNS) führen - einem Organ, das unter physiologischen Bedingungen kein eigenes lymphatisches System besitzt - sind bislang unklar. Das *Homing* von Lymphozyten ins ZNS reguliert durch Chemokine könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit gingen wir dieser Hypothese nach, indem wir die Konzentration der Chemokine CXCL12 und CXCL13 im Liquor und Serum von Patienten mit ZNS-Lymphomen (ZNSL) untersuchten und mit Kontrollpersonen verglichen.

Methodik: Material von insgesamt 30 Patienten mit einem ZNSL (23 mit primärem und 7 mit sekundärem ZNSL) wurde untersucht und mit einer Kontrollgruppe bestehend aus 40 Patienten (10 mit anderen ZNS-Malignomen und 30 ohne eine maligne ZNS-Erkrankung) verglichen. Die Messungen der CXCL12- und CXCL13-Konzentrationen wurden mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)-Methode durchgeführt. Um den Schweregrad der Störung der Blut-Hirnschranke einzuschätzen, wurde der Liquoralbumin-/Serumalbumin-Quotient (Q_{alb}) bestimmt.

Ergebnisse: Hinsichtlich der Konzentrationen von CXCL12 im Serum und im Liquor bestand kein Unterschied zwischen den ZNSL-Patienten und der Kontrollgruppe. Die CXCL13-Konzentrationen im Liquor waren bei den ZNSL-Patienten mit einem medianen Wert von 468 pg/ml (range 41-1384) signifikant höher als bei den Patienten mit einem anderen ZNS-Malignom mit median 6 pg/ml (range 0-601), $p=0,0005$; und bei Patienten ohne ein ZNS-Malignom mit median 8 pg/ml (range 0-187), $p<0,0001$. Die CXCL13-Serumkonzentrationen waren in allen Patientengruppen niedrig. Es bestand keine Korrelation zwischen den Chemokinkonzentrationen im Liquor und Serum. Bei den ZNSL-Patienten korrelierte die CXCL13-Konzentration im Liquor mit dem Ausmaß der Bluthirnschrankenstörung ($r=0,66$; $p=0,003$). Bei 7 ZNSL-Patienten wurde die CXCL12- und CXCL13-Konzentration im Liquor im Verlauf ihrer Krankheit gemessen: Bei 5 Patienten, die auf die Therapie angesprochen haben, fielen die Konzentrationen und bei 2 Patienten mit Progress unter Therapie kam es zu einem Anstieg.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass CXCL13 an der Pathogenese der ZNSL beteiligt sein kann und die Tumormast widerzuspiegeln

scheint. Sollten diese Ergebnisse bestätigt werden, könnte CXCL13 als diagnostischer und prognostischer Marker bei ZNSL dienen.

Abstract

Purpose: Homing of malignant lymphocytes to the central nervous system (CNS) may play a role in the pathogenesis of CNS lymphoma. In this study, we evaluated the chemokines CXCL12 and CXCL13 in the cerebrospinal fluid (CSF) and serum of patients with CNS lymphoma.

Methods: We examined samples from 30 patients with CNS lymphoma (23 with primary and 7 with secondary CNS lymphoma) and 40 controls (10 patients with other CNS malignancies and 30 without a malignant CNS disease). CXCL12 and CXCL13 concentrations were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. The grade of blood-brain barrier disruption was estimated by the CSF/serum albumin ratio.

Results: CNS lymphoma patients and controls did not differ in CXCL12 serum and CSF levels. Serum levels of CXCL13 were generally low. CXCL13 CSF levels, however, were significantly higher in CNS lymphoma patients with median 468 pg/ml (range 41-1384) as compared to patients with other CNS malignancies (median 6 pg/ml, range 0-601), $p=0.0005$; and patients without malignant CNS disease (median 8 pg/ml, range 0-187), $p<0.0001$. Chemokine levels in CSF and serum did not correlate. In CNS lymphoma, CXCL13 concentration in CSF correlated with the degree of blood-brain barrier disruption ($r=0.66$; $p=0.003$). In seven patients CXCL12 and CXCL13 were measured in CSF before and during therapy. The levels decreased in five patients who responded to chemotherapy and increased in two with lymphoma progression.

Conclusions: Our results suggest a production of CXCL13 within the CNS of CNS lymphoma patients, which decreases with response to therapy. Thus, CXCL13 may represent a marker for further diagnostic and prognostic studies.

1. Einleitung

1.1. Definition primäre und sekundäre ZNS-Lymphome

Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems (primäre ZNS-Lymphome, PZNSL) sind extranodale Non-Hodgkin-Lymphome, die bei Diagnosestellung auf das Gehirnparenchym, die Leptomeninge und/oder das Rückenmark beschränkt sind. Die Augen können in ca. 15-25 % der Fälle initial befallen sein in Form einer Retina-, Glaskörper- oder Uveainfiltration.¹ Eine Beteiligung des Liquors wird bei bis zu 15% der Patienten mit PZNSL beobachtet.^{2, 3} Pathologisch handelt es sich fast ausschließlich um diffuse großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL).¹

Im Gegensatz zu den primären ZNS-Lymphomen stellen sekundäre Lymphome des zentralen Nervensystems (SZNSL) eine - sehr seltene - ZNS-Beteiligung systemischer (außerhalb des ZNS lokalisierter) Lymphome dar.⁴ Beim DLBCL, einem der häufigsten malignen Lymphome, wird eine sekundäre ZNS-Beteiligung in ca. 3-5% der Fälle diagnostiziert. Ein SZNSL kann zum Zeitpunkt der Primärdiagnose des Lymphoms oder im Rezidiv auftreten und im meningealen Kompartiment und/oder Hirnparenchym (sehr selten im Rückenmark) lokalisiert sein.

1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der PZNSL zeigte bis Mitte der 90er Jahre eine steigende Tendenz.⁵ Die höchste Inzidenz wurde 1995 erreicht mit 10,2 Neuerkrankungen pro 1 Million. Seit 1998 zeigte sich ein Rückgang in der Erkrankungshäufigkeit.⁶ Dies wird auf die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) und den konsekutiven drastischen Rückgang der Häufigkeit bei HIV-positiven Patienten zurückgeführt. In der älteren Population wird dagegen über eine bis zuletzt zunehmende Inzidenz berichtet.^{6,7}

Die Inzidenz der ZNS-Beteiligung bei neu diagnostizierten systemischen aggressiven Lymphomen ist nicht bekannt, da die diagnostischen Maßnahmen zur Feststellung einer ZNS-Beteiligung nicht routinemäßig bei allen Patienten durchgeführt werden. Meist ist diese Diagnostik begrenzt auf Patienten mit neurologischen Symptomen oder besonderem Risiko für eine ZNS-Beteiligung (siehe unten). Des Weiteren sind die

routinemäßig verwendeten diagnostischen Methoden zur Evaluation einer potentiellen ZNS-Beteiligung wie die zytomorphologische Liquoruntersuchung und CT- oder MRT-Untersuchung des Gehirns nicht sehr sensitiv. In neueren Analysen wurde die Durchflußzytometrie des Liquors als eine potentiell sensitivere diagnostische Methode verwendet. In einer Analyse von 246 Patienten mit neudiagnostiziertem systemischen DLBCL und 80 Patienten mit Burkitt-Lymphom, alle mit klinisch definiertem erhöhten Risiko für eine ZNS-Beteiligung, fand sich mit Hilfe der Durchflußzytometrie eine Liquorbeteiligung bei 33 (13%) der DLBCL-Patienten und bei 9 (11%) der Burkitt-Lymphom-Patienten; durch die zytomorphologische Liquoruntersuchung wurde entsprechend bei 11 (4,5%) und 5 (6%) Patienten der Liquorbefall diagnostiziert.⁸

PZNSL können in allen Altersstufen auftreten. Der Häufigkeitsgipfel bei immunkompetenten Patienten liegt zwischen der 5. und 7. Lebensdekade. Das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung von PZNSL liegt zwischen 53 und 57, wobei das Verhältnis von Männern zu Frauen 1,2 bis 1,7:1 beträgt.⁹ Bei immunsupprimierten Patienten liegt das Manifestationsalter niedriger. Bei den HIV-positiven PZNSL-Patienten wird das mediane Alter von 31 Jahren berichtet; betroffen sind hier überwiegend Männer.¹

1.3 Risikofaktoren

Ein kongenitaler oder erworbener Immundefekt ist neben dem Alter der einzige bekannte Risikofaktor für das PZNSL. HIV-positive Patienten, die keine HAART erhalten, haben gegenüber der Normalbevölkerung ein 3.600fach erhöhtes Risiko an einem PZNSL zu erkranken.¹⁰ In der HAART-Ära ist das PZNSL bei HIV-positiven Patienten selten geworden; die größte Gruppe der immunsupprimierten Patienten mit PZNSL sind aktuell Patienten mit Langzeitimmunsuppression bei Autoimmunerkrankungen oder nach Organtransplantation.

Risikofaktoren für das SZNSL sind bislang nur unzureichend analysiert worden. Zu den bisher am häufigsten berichteten Risikofaktoren gehören: aggressive Lymphomhistologie, extranodale Lymphomlokalisierung, insbesondere im Hoden, und Laktatdehydrogenase (LDH)-Erhöhung im Blut.¹¹ Von der Deutschen Studiengruppe für Hochmaligne Lymphome (DSHNHL) wurde ein Risiko-Modell für über 60-jährige

Patienten mit DLBCL unter R-CHOP-Behandlung (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) etabliert, das auf der Anzahl extranodaler Befälle, Allgemeinzustand nach Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) und Erhöhung des Serum-LDH-Spiegels basiert. Für Patienten mit >1 extranodalen Befall, ECOG-Zustand>2 und erhöhter Serum-LDH betrug die Wahrscheinlichkeit für eine ZNS-Manifestation in 2 Jahren 33,5% im Vergleich zu 2,8% für Patienten ohne diese Risikofaktoren.¹²

1.4 Diagnosestellung

Bei der Mehrheit der Patienten kommt es zu Wesensveränderungen, Desorientierung, kognitiven Einbußen sowie zu psychomotorischen Verlangsamung. Etwas seltener sind akute Hirndruckzeichen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie fokale Defizite. Bei einer okulären Mitbeteiligung kann es zu verschwommenem Sehen, dem „*mouches volantes*“ Phänomen und Visusverlust kommen.¹

Bei klinischem Verdacht wird eine Bildgebung des Gehirns durchgeführt, die vorzugsweise aus einem zerebralen MRT besteht. Typischerweise finden sich hier eher solitäre als multiple Läsionen, häufig in Ventrikelnähe und mit starker und homogener Kontrastmittelanreicherung. Die Diagnosesicherung erfolgt in der Regel über eine Biopsie, vorzugsweise stereotaktisch. Die Gabe von Kortikosteroiden sollte wegen ihres lymphotoxischen Effektes, der die Diagnosestellung erschweren kann, vor der Biopsie nach Möglichkeit vermieden werden.¹ Zur Ausbreitungsdiagnostik gehören auch eine Liquoruntersuchung sowie eine ophthalmologische Evaluation. Zwecks Unterscheidung zwischen einem PZNSL und einem SZNSL wird eine umfassende klinische Untersuchung inklusive Palpation peripherer Lymphknoten sowie der Hoden und eine Computertomographie des Thorax, Abdomens und Beckens und eine Knochenmarksuntersuchung durchgeführt.¹

1.4.1 Rolle der Liquordiagnostik

Eine im Vergleich zur Hirnbiopsie weniger invasive Diagnostik, z.B. über eine Liquoruntersuchung, wäre sowohl grundsätzlich bei allen Patienten, aber insbesondere bei denjenigen Patienten wünschenswert, deren Läsionen aufgrund ihrer Lokalisation

einer Biopsie schwer zugänglich sind. Bisher ist die Diagnosestellung aus dem Liquor nur bei AIDS-Patienten möglich, bei denen der Nachweis von hoher Epstein-Barr-Virus (EBV)-Last im Liquor verglichen mit Serum zur Sicherung der Diagnose eines PZNSL als ausreichend gilt.

Bei den Immunkompetenten ist leider die Diagnosestellung eines ZNSL aus dem Liquor unter Verwendung von Routineverfahren, wie die klassische Liquorzytomorphologie nur bei einer Minderheit der Patienten möglich. In der bisher größten prospektiven Serie von 361 PZNSL-Patienten wurden Lymphomzellen mit Hilfe der Zytomorphologie bei nur 44 (12,2%) nachgewiesen. Interessanterweise war in diesem Kollektiv die vermeintlich sensitivere Methode, die Immunglobulinschwerkettengen (IgH)-PCR zum Nachweis monoklonaler B-Zellen bei nur 16 von 152 (10,5%) der untersuchten Patienten positiv.¹³ Inwieweit die Durchflußzytometrie des Liquors das diagnostische Spektrum beim PZNSL erweitert, ist gegenwärtig noch nicht klar.

Die anderen für die Routinediagnostik zur Verfügung stehenden Liquorparameter, die bei ZNSL auffällig sind, wie die Erhöhung von Gesamteiweiß, Laktat, verminderte Glukosekonzentration und oligoklonale Banden sind sehr unspezifisch.

1.5 Therapie und Prognose

Nach alleiniger Kortikosteroidgabe wurde eine Rückbildung eines ZNSL bei ca. 40 bis 85% der Fälle beschrieben. In der Regel sind diese Remissionen nur partiell und dauern nur wenige Wochen an.¹⁴

Die Chirurgie spielt in der Behandlung des ZNSL bisher keine Rolle.

Die Therapie der ZNSL basiert auf systemischer Chemotherapie, die imstande ist, die intakte Blut-Hirnschranke zu überwinden, insbesondere auf hochdosiertem Methotrexat (HDMTX). Das optimale Chemotherapieprotokoll wurde bisher aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankungen nicht etabliert. Am häufigsten werden Kombinationsprotokolle mit HDMTX und Ifosfamid oder hochdosiertem Cytarabin (HDARA-C) benutzt.¹ Eine konsolidierende Ganzhirnbestrahlung führte in der bisher einzigen publizierten Phase III Studie bei PZNSL nicht zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens¹⁵ und sollte

daher nicht routinemäßig verwendet werden, zumal damit das Risiko der späten Neurotoxizität steigt.

Bei jüngeren PZNSL-Patienten ist eine konsolidierende Hochdosischemotherapie gefolgt von autologer Stammzelltransplantation (HD-ASCT) möglicherweise von Vorteil. Dieses Konzept wird in aktuell laufenden randomisierten Studien geprüft und führt möglicherweise auch bei Patienten mit SZNSL zu einer guten Langzeitkontrolle und möglicherweise Heilung. In der bisher einzigen Phase II Studie mit kurativer Zielsetzung resultierte eine HDMTX- und HDARA-C-basierte Induktionschemotherapie gefolgt von Hochdosischemotherapie mit Carmustin (BCNU), Thiotepa und Etoposid gefolgt von ASCT in einem 2-Jahres progressionsfreiem Überleben von 49%.¹⁶

Die Prognose der ZNSL gilt als ungünstig. Beim PZNSL lag in den meisten größeren Studien das mediane Überleben nach HDMTX-basierter Chemotherapie mit oder ohne Radiotherapie bei etwas mehr als 3 Jahre.¹ Die wichtigsten Prognosefaktoren sind hier Alter und Allgemeinzustand des Patienten. Als noch ungünstiger gilt die Prognose der SZNSL mit einem medianen Überleben von nur wenigen Monaten. Allerdings beziehen sich diese Daten auf Patienten, die in rein palliativer Intention mit nur intrathekaler Chemotherapie, Radiotherapie oder konventionell dosierter Chemotherapie behandelt wurden.¹¹ Möglicherweise lässt sich die Prognose dieser Patienten durch eine intensive Chemotherapie einschließlich HD-ASCT verbessern¹⁶, was allerdings noch in größeren Studien demonstriert werden muss.

1.6 Pathogenese

Die Entstehung von malignen Lymphomen in einem Organ wie das ZNS, das unter physiologischen Bedingungen kein eigenes Immunsystem besitzt und von Lymphozyten - ganz überwiegend T-Lymphozyten - nur passiert wird, ist heutzutage unklar.

Die am weitesten verbreitete Hypothese basiert auf der Annahme, dass die maligne Entartung von Lymphozyten außerhalb des ZNS stattfindet und dass die entarteten Zellen im ZNS, das immunologisch gesehen ein privilegiertes Organ darstellt, günstige Entwicklungsbedingungen finden, während sie systemisch durch ein intaktes Immunsystem eliminiert werden. Dafür spricht auch, dass sogar in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung kaum eine systemische Beteiligung des PZNSL beobachtet wird.

Die Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der ZNSL wird durch die Assoziation der PZNSL mit angeborener und erworbener Immunsuppression unterstrichen. Immunsupprimierte PZNSL-Patienten weisen einige Charakteristika auf, die sie von immunkompetenten PZNSL-Patienten unterscheiden. Die Oligo- oder Polyklonalität der Lymphomzellen und die Korrelation mit dem Ausmaß der Immunsuppression sind typisch für diese Patientengruppe. Der Nachweis von Epstein-Barr-Virus (EBV) -DNA in fast 100% der PZNSL-Zellen bei immunsupprimierten Patienten stellt das wichtigste Unterscheidungsmerkmal dar. Das EBV infiziert B-Lymphozyten und induziert ihre polyklonale Proliferation. Während dieser Vorgang normalerweise durch die Regulationsmechanismen eines intakten Immunsystems limitiert wird, ist das bei Immunsupprimierten nicht der Fall. Bei der Proliferation von B-Lymphozyten können genetische Alterationen einiger Klone auftreten, die in einem Wachstumsvorteil und Entstehung oligo- oder monoklonaler Tumoren resultieren kann.

1.6.1 Rolle der Chemokine

Es ist möglich, dass bei der Migration und Ansiedlung maligner Lymphozyten im ZNS Chemokine eine wichtige Rolle spielen. Bei den Chemokinen handelt es sich um kleine Signalproteine, die bei Zellen eine Wanderungsbewegung auslösen und die Migration über die Blut-Hirn-Schranke vermitteln.¹⁷ Chemokinen und Chemokinrezeptoren wird eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese und Disseminierung maligner Lymphome zugeschrieben.¹⁸ In den letzten Jahren wird auch die Bedeutung von Chemokinen, insbesondere von *chemokine stroma cell-derived factor 1* (SDF-1), auch als chemokin ligand 12 (CXCL12) bekannt und *B-cell attracting chemokine-1* (BACA-1; auch bekannt als CXCL13) für die Pathogenese der PZNSL diskutiert.

CXCL12 wird von einer Vielzahl an Geweben exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Hämatopoese¹⁹, in dem es auf Lymphozyten und Monozyten chemotaktisch anziehend wirkt und die B-Zell-Proliferation fördert.²⁰ Es wurde gezeigt, dass Bindegewebszellen in Lymphknoten über CXCL12-Produktion auf B-Zell-Lymphome anziehend wirken.²¹ CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4), der Rezeptor für CXCL12, wird physiologisch auf B- und T-Zellen, Stromazellen des Knochenmarks und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die Expression von

CXCR4 auf malignen Zellen ist bei einer Vielfalt von Tumoren nachgewiesen worden, wie Glioblastom, Mammakarzinom, sowie B- und T-Zell-Lymphome.

CXCL13 wird von hochendothelialen Venolen (HEV) in Lymphknoten und Peyer-Plaques exprimiert, wobei CXCL13 die Adhäsion von B-Zellen an die HEV bewirkt.²² Die CXCL13-Expression wird mit durch *Helicobacter pylori*-Infektion induziertem lymphatischem Gewebe, gastrischem Lymphom²³ und rheumatoider Arthritis²⁴ assoziiert. CXCR5 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5) ist der primäre Rezeptor für CXCL13. Dieser Rezeptor wirkt auf T-Helfer-Zellen chemotaktisch anziehend. Follikuläre dendritische Zellen, die in den Keimzentren der lymphatischen Follikel lokalisiert sind, werden als Hauptquelle für CXCL13 betrachtet.²⁵ Die Expression von CXCL13 wurde bei mehreren B-Zell-Lymphomen, u.a. mit extranodaler Lokalisation wie gastrische oder adnexale Lymphome, gefunden.²⁶⁻²⁹

Beim PZNSL wurde die Expression von Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7 (C-C chemokine receptor type 7) sowie der Chemokinliganden CXCL12 und CXCL13 auf den Tumorzellen gefunden. Die Expression von CXCL12 und CXCL13 wurde zusätzlich auf zerebralen Endothelzellen gefunden und die Expression von CXCL12, CCR5 und CCR6 auf reaktiven Astrozyten und aktivierten Mikrogliazellen.³⁰⁻³⁴ Es konnte gezeigt werden, dass intrazellulär exprimierte Chemokinrezeptoren funktionell inaktiv waren. Die bei PZNSL festgestellte zytoplasmatische Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 bei gleichzeitigem Fehlen einer membranösen Expression könnte die mögliche Erklärung für die nahezu fehlende Disseminierung außerhalb des ZNS sein.³²

1.11 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Für die Diagnosestellung eines ZNSL ist nahezu immer noch eine Biopsie der im CT oder MRT sichtbaren Tumoraläsion notwendig. Diese geschieht heutzutage ganz überwiegend über eine stereotaktische Biopsie, die an erfahrenen Zentren mit einer minimalen (<1%) Rate an schwerer wiegenden Komplikationen einhergeht, dennoch aber eine invasive Maßnahme ist. Insbesondere bei stark reduziertem Allgemeinzustand des Patienten kann die Entscheidung zu einer invasiven diagnostischen Maßnahme schwer zu treffen sein. In einigen Fällen sind die Läsionen

aufgrund ihrer Lokalisation einer Biopsie nur schwer oder gar nicht zugänglich. Auch kommt es immer wieder vor, dass das bioptisch gewonnene Material keine Diagnose erlaubt. Dies ist insbesondere immer wieder der Fall, wenn die Patienten vorher zu einer Symptomkontrolle Kortikosteroide bekommen haben. Die Möglichkeit der Diagnosestellung aus einem anderen Material, das leichter zugänglich ist als das Hirngewebe, wäre daher grundsätzlich wünschenswert.

Darüber hinaus wäre es wünschenswert, einen Marker in einem leicht zugänglichem Kompartiment zu haben, der mit dem Verlauf der Erkrankung korreliert und daher zur Abschätzung der Prognose oder frühzeitiger Erkennung eines Progresses/Rezidivs genutzt werden könnte.

Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob die Konzentration der Chemokine CXCL12 und CXCL13 im Liquor ein solcher diagnostischer und prognostischer Marker für ZNSL ist. Dazu wurden Konzentrationen beider Chemokine im Serum und im Liquor von Patienten mit ZNSL gemessen und mit Patienten mit anderen Erkrankungen verglichen. Zusätzlich wurden die Konzentrationen von CXCL12 und CXCL13 im Liquor bei einigen Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung bestimmt und mit denen vor der Therapie verglichen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Reagenzien

2.1.1 Kits

Human CXCL12 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA

CXCL12-Mikroplatte:	96-Well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol beschichtet mit monoklonalem Mäuse-Antikörper gegen CXCL12
CXCL12-Konjugat:	polyklonaler Antikörper gegen CXCL12 konjugiert an Meerrettich-Peroxidase
CXCL12-Standard:	100 ng rekombinant hergestelltes humanes CXCL12 in gepufferter Proteinlösung
Assay-Verdünnung:	gepufferte Proteinlösung mit blauem Färbemittel
Kalibrator-Verdünnung:	tierisches Serum
Waschpufferkonzentrat:	25fach konzentrierte Lösung an gepuffertem Tensid
Farb-Reagenz A:	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)
Farb-Reagenz B:	Tetramethylbenzidin (TMB)
Stopplösung:	Schwefelsäure-Maßlösung (2M H ₂ SO ₄)
Plattenabdeckung:	Klebestreifen

Human CXCL13 Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA

CXCL13-Mikroplatte:	96-Well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol beschichtet mit monoklonalem Mäuse-Antikörper gegen CXCL13
CXCL13-Konjugat:	monoklonaler Mäuse-Antikörper gegen CXCL13 konjugiert an Meerrettich-Peroxidase
CXCL13-Standard:	5 ng rekombinant hergestelltes humanes CXCL13 in gepufferter Proteinlösung
Assay-Verdünnung:	gepufferte Proteinlösung mit blauem Färbemittel
Kalibrator-Verdünnung:	gepufferte Proteinlösung
Waschpufferkonzentrat:	25fach konzentrierte Lösung an gepuffertem Tensid
Farb-Reagenz A:	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)
Farb-Reagenz B:	Tetramethylbenzidin (TMB)
Stopplösung:	Schwefelsäure-Maßlösung (2M H ₂ SO ₄)
Plattenabdeckung:	Klebestreifen

2.1.2 Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer

Zur Herstellung von 500 ml Waschpuffer wird 20 ml des Waschpufferkonzentrats in destilliertem Wasser verdünnt.

Substratlösung

Jeweils 12,5 ml des Farb-Reagenzes A und B werden miteinander vermischt und innerhalb von 15 min verbraucht, wobei die Einwirkung von Licht vermieden wird.

CXCL12-Standard

Der Standard wird mit 1 ml destilliertem Wasser wiederhergestellt, sodass man eine Stammlösung von 100.000 pg/ml erhält. Der Standard wird behutsam gemischt und für mindestens 30 min ruhen gelassen.

CXCL12-Standard-Verdünnungsreihe (Abbildung 1)

In das 10.000 pg/ml Polypropylen-Röhrchen wird 900 μ l Kalibrator-Verdünnung pipettiert. In die restlichen Röhrchen werden jeweils 500 μ l Kalibrator-Verdünnung pipettiert. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wird die Stammlösung verwendet (siehe Abbildung unten). Vor der nächsten Übertragung wird jedes Röhrchen gründlich vermischt. Der 10.000 pg/ml Standard dient als höchster Standard und die Kalibrator-Verdünnung als Null-Standard (0 pg/ml).

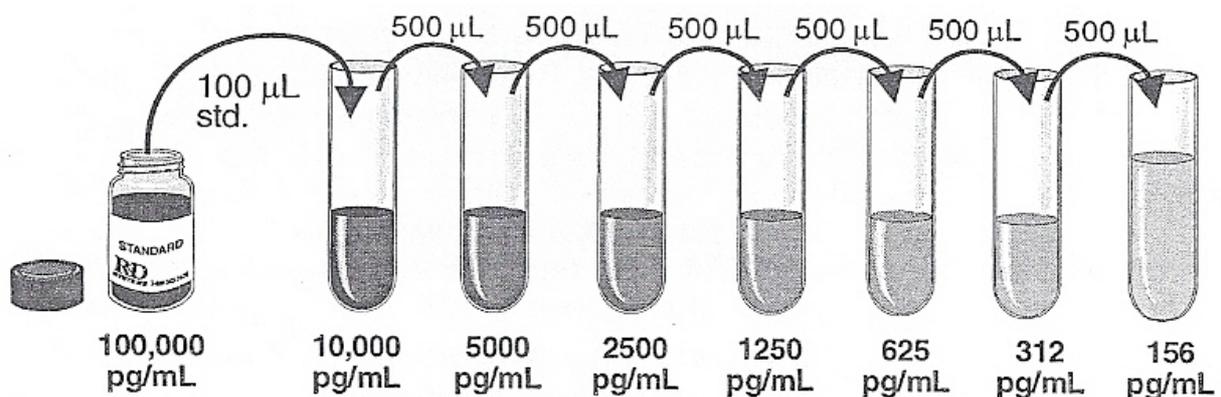


Abbildung 1: CXCL12-Standardverdünnungsreihe

CXCL13-Standard

Der Standard wird mit 1 ml destilliertem Wasser wiederhergestellt, sodass man eine Stammlösung von 5.000 pg/ml erhält. Der Standard wird behutsam gemischt und für mindestens 15 min ruhen lassen.

CXCL13-Standard-Verdünnungsreihe (Abbildung 2)

In das 5.000 pg/ml Röhrchen wird 450 µl Kalibrator-Verdünnung pipettiert. In die restlichen Röhrchen werden jeweils 250 µl Kalibrator-Verdünnung pipettiert. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wird die Stammlösung verwendet (siehe Abbildung unten). Vor der nächsten Übertragung wird jedes Röhrchen gründlich vermischt. Der 500 pg/ml Standard dient als höchster Standard und die Kalibrator-Verdünnung als Null-Standard (0 pg/ml).

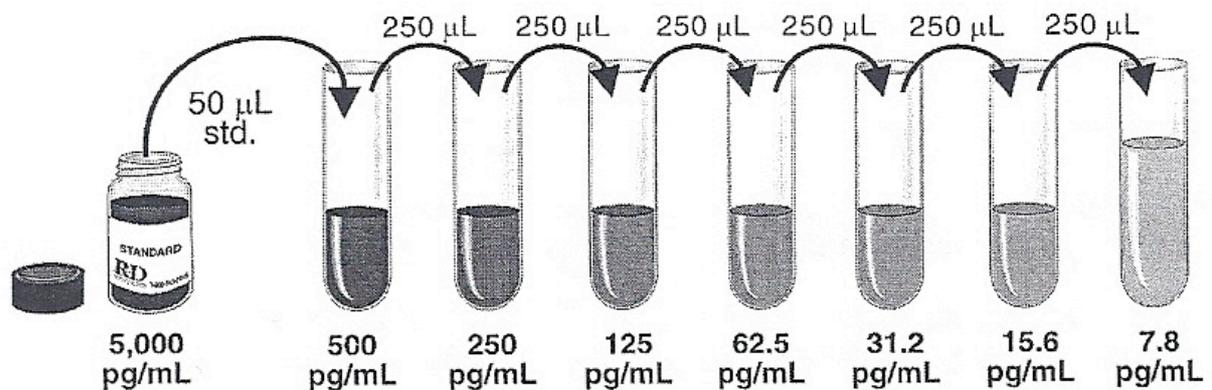


Abbildung 2: CXCL13-Standardverdünnungsreihe

2.2 Weitere Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller bzw. Lieferant
9 ml Serum-Monovetten, Einmalkanülen	Sarstedt, Nümbrecht
Destilliertes Wasser	Fresenius GmbH, Bad Homburg
Einwegpipetten	Greiner, Frickenhausen
Einmalpipetten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
8-Kanal Pipette	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Röhrchen (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

2.3 Geräte

Name	Hersteller bzw. Lieferant
SANYO Ultra low, Gefrierschrank (-80 °C)	SANYO, Japan
Mikrotiterplatten-Photometer VERSAmax	Molecular Devices, München
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Schüttler, Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA

2.4 Computer-Software

Name	Hersteller bzw. Lieferant
MS Word für Mac 2011	Microsoft, Unterschleißheim
MS Excel für Mac 2011	Microsoft, Unterschleißheim
SPSS Win 18.0	SPSS Inc., Chicago, USA
SoftMax Pro v5	Molecular Devices, München

2.5 Patienten

Es wurden Proben von immunkompetenten erwachsenen Patienten mit histologisch (über eine Tumorbiopsie) oder zytologisch (aus dem Liquor) gesichertem PZNSL oder SZNSL benutzt. Das ZNSL war entweder neu diagnostiziert oder befand sich im Rezidiv, in beiden Fällen wurde das Material vor dem Beginn einer ursächlichen Therapie gewonnen. Eine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden stellte kein Ausschlusskriterium dar. Die Patienten wurden wegen ihres ZNSL in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin (Direktor: Prof. Dr. Eckhard Thiel) des Campus Benjamin Franklin, Charité Universitätsmedizin Berlin, oder in der Klinik für Innere Medizin I - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie (Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh), Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg behandelt.

In die Kontrollgruppen wurden Patienten der Charité eingeschlossen, die sich wegen einer anderen Erkrankung als ein ZNSL einer diagnostischen Lumbalpunktion in unseren hämato-onkologischen und neurologischen Einrichtungen unterzogen.

Für die Analysen lag ein Votum der Ethikkommission der Charité vor und alle Patienten unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung.

2.6 Probengewinnung

Nachdem ein erhöhter intrakranialer Druck ausgeschlossen wurde, wurde den Patienten über eine Lumbalpunktion zwischen dem 3. und 4. oder 4. und 5. Lumbalwirbelkörper 1 bis 2 ml Liquor entnommen. Unmittelbar danach wurde über eine periphere venöse Punktion 3 ml Blut entnommen.

Die Liquorprobe wurde unverzüglich bei Raumtemperatur weiter verarbeitet. In einer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Die Protein- und Albuminkonzentration wurden mithilfe der Nephelometrie gemessen.

Um das Vorhandensein einer Bluthirnschrankenstörung zu überprüfen, wurde jeweils aus der Albuminkonzentration im Liquor und Serum der dazugehörige Albuminquotient berechnet (Q_{alb}).³⁵ Anhand der ermittelten Q_{alb} -Werte war eine Einteilung der Bluthirnschrankenstörung in vier verschiedene Grade möglich, die sich an den folgenden Grenzwerten orientierte:

I	keine Bluthirnschrankenstörung:	$Q_{alb} \leq 7,4 \times 10^{-3}$
II	geringgradige Bluthirnschrankenstörung:	$7,4 \times 10^{-3} < Q_{alb} \leq 10 \times 10^{-3}$
III	mittelschwere Bluthirnschrankenstörung:	$10 \times 10^{-3} < Q_{alb} \leq 20 \times 10^{-3}$
IV	hochgradige Bluthirnschrankenstörung:	$Q_{alb} > 20 \times 10^{-3}$

Für die Bestimmung der Chemokinkonzentrationen wurden die Zellen im Liquor durch Zentrifugation (4 Minuten; 4000 rpm) pelletiert. Die erhaltenen Überstände wurden gemeinsam mit den dazugehörigen Serumproben bis zu ihrer Verwendung bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

2.7 Probenanalysen mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

2.7.1 Prinzip

Bei diesem Assay wird die Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik verwendet. Dabei wird ein Enzym als Marker benutzt, sodass anhand des Substratumsatzes die quantitative Bestimmung der Zytokine ermöglicht wird. Es kam eine ELISA-Mikroplatte zum Einsatz, deren Matrix bereits vom Hersteller mit einem für das zu bestimmende Zytokin spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet worden war. Diesen Antikörper bezeichnet man als Fängerantikörper. Als erstes wird in jede Kavität Assay-Verdünnungsmittel, das proteinhaltiges Blockierungspuffer enthält, pipettiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wird das quantitativ zu untersuchende Zytokin in die Kavitäten hinzupipettiert. Es erfolgt eine Bindung der Zytokine an die immobilisierten Fängerantikörper. Zur Entfernung ungebundener Substanzen erfolgt ein Waschschrift. Im Folgenden werden Enzym-gebundene monoklonale Antikörper, die sich spezifisch an das zu bestimmende Zytokin binden, in die Kavitäten hinzugegeben. Diese Antikörper nennt man Detektionsantikörper. Um ungebundene Detektionsantikörper zu entfernen, erfolgt ein weiterer Waschschrift. Als nächstes wird zum Starten der Enzymreaktion eine Substrat-Lösung in die Kavitäten hinzugegeben. Es enthält ein colorimetrisch detektierbares Substrat und einen Puffer, der einen pH-Wert gewährleistet, bei dem das Enzym optimal arbeitet. So kommt es zur Farbentwicklung in Abhängigkeit von der Menge an gebundenen Zytokinen. Durch Zugabe der entsprechenden Stopplösung wird die Enzymreaktion gestoppt. Dann wird die Intensität der Farbe, welche durch das bis zu diesem Zeitpunkt gebildete Produkt hervorgerufen wird, bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen.

2.7.2 Durchführung

Die Messungen erfolgten in der Abteilung für Medizinische Immunologie (Leiter: Prof. Dr. Hans-Dieter Volk), Charité Universitätsmedizin Berlin. Hierfür wurden jeweils Quantikine Human CXCL13/BLC/BCA-1 und Quantikine Human CXCL12/SDF-1 α Immunoassay kits von R&D Systems® (Minneapolis, USA) für CXCL12 und CXCL13 verwendet.

Die jeweiligen Konzentrationen der Chemokine CXCL12 und CXCL13 wurden in Doppel- oder Einzelbestimmungen gemessen, wobei nach den Herstelleranweisungen vorgegangen wurde (R&D Systems; Minneapolis, USA). Die untere Nachweisgrenze wurde für CXCL12 mit 1,0 pg/ml und für CXCL13 mit 0,4 pg/ml angegeben.

Als Reagenzien wurden 96-Well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol verwendet, die schon mit monoklonalen Mäuse-Antikörpern als Fängerantikörper gegen jeweils CXCL12 oder CXCL13 beschichtet waren.

Zunächst wurden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur gebracht. Nach Entfernen der Abdeckungen der Mikrotiterplatten wurde jeweils 100 µl Assay-Verdünnungsmittel in jede Kavität pipettiert. Das Assay-Verdünnungsmittel bestand aus proteinhaltigem Puffer. Im nächsten Schritt wurden die Proben und die Verdünnungsreihe des jeweiligen Standards in Duplikaten mit 50 µl bei CXCL13-Immunoassay bzw. 100 µl beim CXCL12-Immunoassay pro Kavität pipettiert. Als Standard wurde humanes rekombinant hergestelltes CXCL12 oder CXCL13 verwendet. Die Mikrotiterplattenoberflächen wurden mit Klebefolien bedeckt und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Dazu wurden die CXCL12-Mikrotiterplatten auf einen Shaker, der auf 500±50 rpm eingestellt wurde, platziert. Nach Entfernung der Klebefolien folgten insgesamt 4 Waschvorgängen. Dabei wurden die Mikrotiterplatten mit 400 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschvorgängen wurden sie auf Zellstoff ausgeklopft, um flüssige Überreste möglichst vollständig zu entfernen. Dann wurde in jede Kavität 200 µl CXCL12- bzw. CXCL13-Konjugat pipettiert. Das Konjugat enthielt mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Detektionsantikörper. Die Platten wurden mit neuen Klebefolien bedeckt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die CXCL12-Platten wurden dabei auf einen Shaker platziert. Es folgten nach Entfernen der Folien wieder 4 Waschvorgänge. Danach wurde in jede Kavität jeweils 200 µl Substratlösung hinzugegeben. Die Substratlösung enthielt Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin (H_2O_2/TMB). Anschließend wurden die Mikrotiterplatten für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine direkte Lichteinwirkung vermieden wurde. Im Folgenden wurde 50 µl pro Kavität Stopplösung, die 2 M H_2SO_4 enthielt, pipettiert. Das Reaktionsprodukt zeigte eine Farbänderung von blau zu gelb. Falls die Farbe grün blieb oder nicht einheitlich erschien, wurden die Mikrotiterplatten vorsichtig zum Durchmischen angetippt. Innerhalb der nächsten 30 min wurde die optische Dichte jeder Kavität mithilfe eines Mikroplatten-Lesers bestimmt.

Dies erfolgte bei einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm.

Zur Berechnung der Zytokinkonzentrationen wurden aus den Extinktionswerten der Standardverdünnungsreihen Eichgeraden ermittelt. Diese dienten als Grundlage zur Berechnung der unbekanntenen Zytokinkonzentrationen.

2.7.3 Statistik

Es wurde eine deskriptive und explorative Analyse aller erhobener Variablen durchgeführt. Die Deskription kategorialer Variablen erfolgte durch die Angabe von absoluten und relativen Häufigkeiten. Quantitative Variablen wurden beschrieben durch die Angabe von Mittelwerten, Standardabweichungen, Medianwerten und Range. Da keine Normalverteilung der quantitativen Parameter bekannt war, kamen die im Folgenden genannten Tests zum Einsatz. Bei quantitativen Variablen wurde zum Vergleich zweier Stichproben der U-Test von Mann und Whitney und bei mehr als zwei Stichproben der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Der exakte Test nach Fisher kam zum Einsatz, wenn Stichproben bezüglich nicht quantitativer Parameter verglichen werden sollten und die Voraussetzungen für den χ^2 -Test nicht erfüllt waren, d.h. wenn die erwarteten Häufigkeiten zu klein waren. Zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

Mittels dieser statistischen Tests wurde überprüft, ob die Unterschiede, die beim Vergleich der Stichproben beobachtet wurden, zufällig oder ob sie signifikant waren. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgesetzt, d.h. ein Ergebnis war signifikant wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war, wobei stets zwei-seitige Tests durchgeführt worden sind.

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde das Statistikprogramm SPSS Statistics 18.0 ® verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die Patienten wurden entsprechend ihrer Diagnose in drei Gruppen unterteilt.

Die Gruppe der Patienten mit einem ZNSL umfasste insgesamt 30 Patienten:

- 23 Patienten mit PZNSL
- 7 Patienten mit SZNSL.

Die histologische Aufarbeitung der Proben zeigte bei 28 Patienten ein DLBCL, wobei bei drei dieser Patienten eine sekundäre aggressive Transformation eines indolenten systemischen B-Zelllymphoms vorlag. Bei zwei Patienten, einem mit PZNSL und einem mit SZNSL, lag ein indolentes B-Zelllymphom vor. Alle Patienten hatten Läsionen im Hirnparenchym und 4 hatten zusätzlich einen zytomorphologisch nachgewiesenen leptomeningealen Befall. Keiner der Patienten hatte eine intraokuläre Beteiligung, welche mit Spaltlampenuntersuchungen ausgeschlossen wurde. Alle Lymphom-Patienten waren HIV-negativ.

Die Kontrollgruppe 1 bestand aus 10 Patienten, die eine ZNS-Beteiligung eines malignen Tumors aufwiesen:

- 7 Patienten mit meningealer Aussaat oder Hirnmetastasen eines soliden Tumors
- 3 Patienten mit einem Glioblastom.

Die Kontrollgruppe 2 bestand aus 30 Patienten ohne eine maligne ZNS-Erkrankung:

- 7 Patienten mit einem systemischen Lymphom ohne ZNS-Beteiligung,
- 3 Patienten mit einem anderen malignen Tumor ohne ZNS-Beteiligung,
- 12 Patienten mit einem Normaldruckhydrozephalus,
- 4 Patienten mit einer Demenzerkrankung
- 4 Patienten, die zum Ausschluss einer inflammatorischen ZNS-Erkrankung eine Liquorpunktion erhielten.

Die Charakteristika der drei Gruppen sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Der Vergleich der Gruppen ergab folgende Ergebnisse: Unter den ZNSL-Patienten befanden sich signifikant mehr männliche Individuen als in den Kontrollgruppen. Die ZNSL-Patienten wiesen die höchste Zellzahl im Liquor und den höchsten Q_{alb} auf; diese Werte waren in

der Kontrollgruppe ohne ZNS-Tumor am niedrigsten. Die Gesamtproteinkonzentration im Liquor war bei den ZNSL- und den Tumor-Patienten höher im Vergleich zu den Patienten ohne ZNS-Tumor. Eine mittelschwere oder schwere Bluthirnschrankenstörung war signifikant häufiger in der Gruppe der ZNSL-Patienten als in der Kontrollgruppe ohne ZNS-Tumor.

	ZNS-Lymphom	Kontrollgruppe 1 (ZNS-Tumor)	Kontrollgruppe 2 (kein ZNS-Tumor)	p
Anzahl der Patienten	30	10	30	
Anzahl der Liquorproben	29	9	25	
Alter [Lebensjahre] <i>median</i> <i>(range)</i>	67 (52-86)	63 (54-76)	62 (25-83)	0,39
Geschlecht [männlich/weiblich]	19 / 11	4 / 6	9 / 21	0,032
Zellzahl im Liquor [/ μ l] <i>median</i> <i>(range)</i>	9 (0-81)	6 (1-40)	1 (0-26)	0,0003
Proteinkonzentration im Liquor [mg/dl] <i>median</i> <i>(range)</i>	98 (16-376)	100 (44-136)	52 (24-129)	0,014
Q_{alb} (Liquor/Serum) [$\times 10^{-3}$] <i>median</i> <i>(range)</i>	19.2 (3,4-62,7)	13.7 (7,3-24,4)	6.7 (2,8-25)	0,001
Bluthirnschrankenstörung:	n = 21	n = 7	n = 19	
Keine	3	1	13	
Leichte	2	2	1	
Mittelgradige	6	3	4	
Schwere	10	1	1	0,0007

Tabelle 1: Charakteristika der ZNSL-Patienten und der Kontrollen

3.2 Chemokinkonzentrationen bei ZNSL-Patienten und in den Kontrollgruppen

Die CXCL12-Konzentrationen im Serum waren sowohl bei den ZNSL-Patienten als auch in den beiden Kontrollgruppen hoch, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte (Tabelle 2). Tendenziell waren die Konzentrationen bei den ZNSL-Patienten mit einem medianen Wert von 2088 pg/ml höher verglichen mit allen Kontrollprobanden mit einem medianen Wert von 1500 pg/ml ($p=0,059$). Die CXCL12-Konzentrationen im Liquor waren niedriger als die Serum-Konzentrationen in allen Gruppen und unterschieden sich nicht signifikant zwischen ZNSL-Patienten und den Kontrollen (Abbildung 3).

Die CXCL13-Serum-Konzentrationen waren im Gegensatz zu CXCL12 in allen Gruppen niedrig (median <100 pg/ml). In den beiden Kontrollgruppen war auch die CXCL13-Konzentration im Liquor sehr niedrig. Die ZNSL-Patienten hatten dagegen hohe CXCL13-Konzentrationen im Liquor; dieser Unterschied war im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen hoch signifikant (Abbildung 4).

	<u>CXCL13</u>		<u>CXCL12</u>	
	Liquor	Serum	Liquor	Serum
ZNS-Lymphom				
<i>median [pg/ml]</i>	468	77	880	2088
<i>(range) [pg/ml]</i>	(41-1384)	(36-657)	(144-3537)	(692-2944)
Kontrollgruppe 1 (ZNS-Tumor)				
<i>median [pg/ml]</i>	6	94	934	1987
<i>(range) [pg/ml]</i>	(0-601)	(21-363)	(111-2040)	(1643-2345)
Kontrollgruppe 2 (kein ZNS-Tumor)				
<i>median [pg/ml]</i>	8	65	785	1352
<i>(range) [pg/ml]</i>	(0-187)	(28-170)	(139-2442)	(851-2566)
p	0,000000047	0,57	0,48	0,091

Tabelle 2: Chemokinkonzentrationen im Liquor und Serum

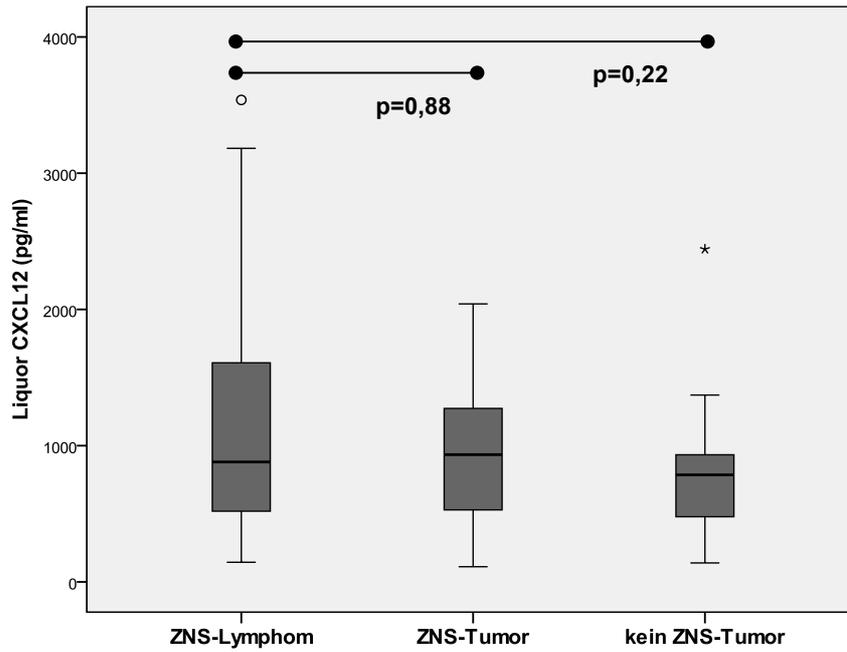


Abbildung 3: CXCL12-Konzentration im Liquor bei Patienten mit einem ZNSL (n = 29), einer malignen ZNS-Erkrankung (n = 9) und ohne eine maligne ZNS-Erkrankung (n = 25)

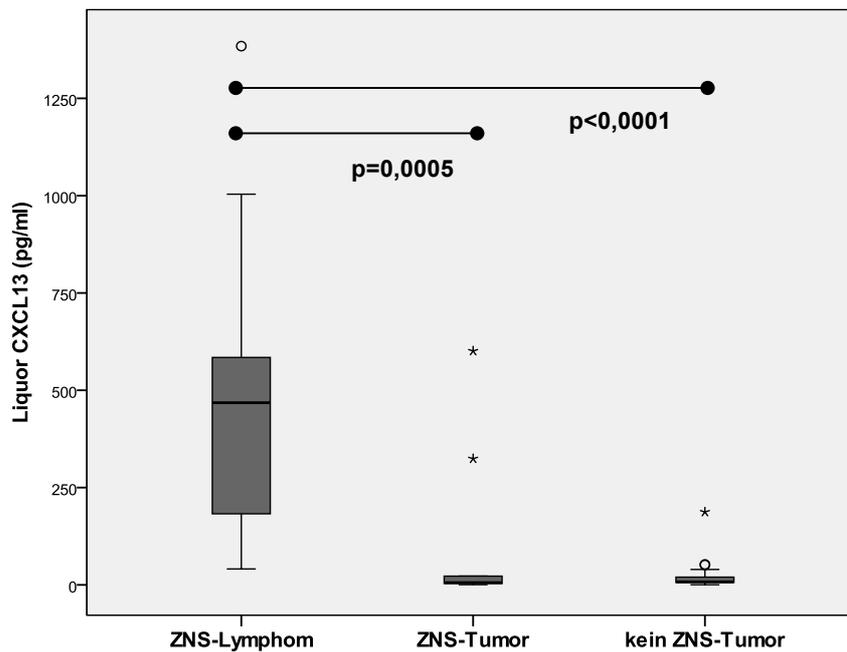


Abbildung 4: CXCL13-Konzentration im Liquor bei Patienten mit einem ZNSL (n = 29), einer malignen ZNS-Erkrankung (n = 9) und ohne eine maligne ZNS-Erkrankung (n = 25)

3.3 Bluthirnschrankenfunktion und Chemokinkonzentrationen bei ZNSL-Patienten

Es wurde die Korrelation zwischen Serum- und Liquorchemokinkonzentrationen untersucht, um einen möglichen Einfluss hoher systemischer Chemokinkonzentrationen auf die Liquorkonzentrationen bedingt durch eine gestörte Bluthirnschranke auszuschließen. Es fand sich keine Korrelation von CXCL12- und CXCL13-Konzentrationen im Liquor und Serum mit einem r-Korrelationswert nach Spearman von 0,13 ($p=0,67$) für CXCL12 (Abbildung 5) und 0,14 ($p=0,62$) für CXCL13 (Abbildung 6).

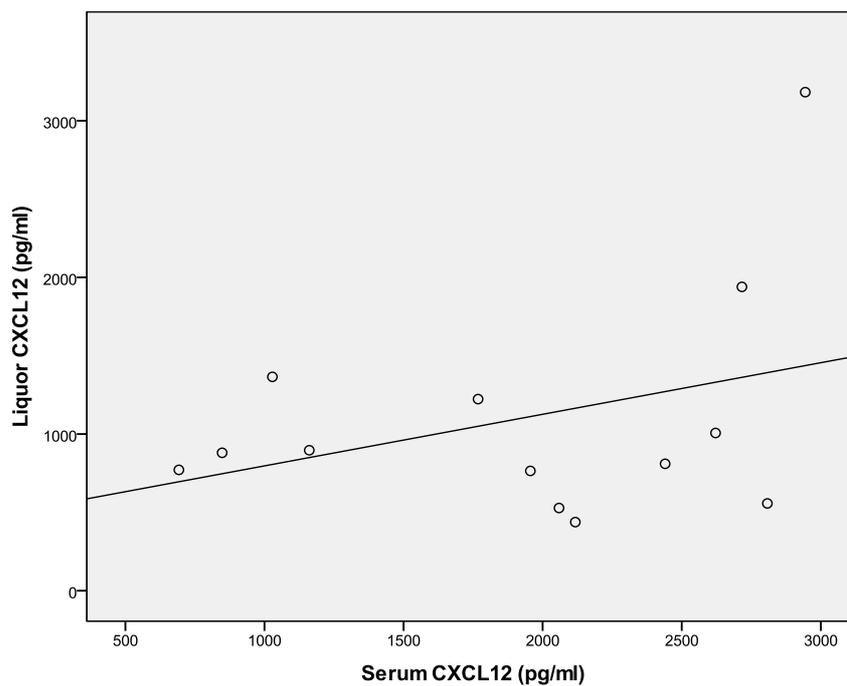


Abbildung 5: Korrelation zwischen CXCL12- Liquor- und Serumkonzentration bei ZNSL-Patienten (n =13)

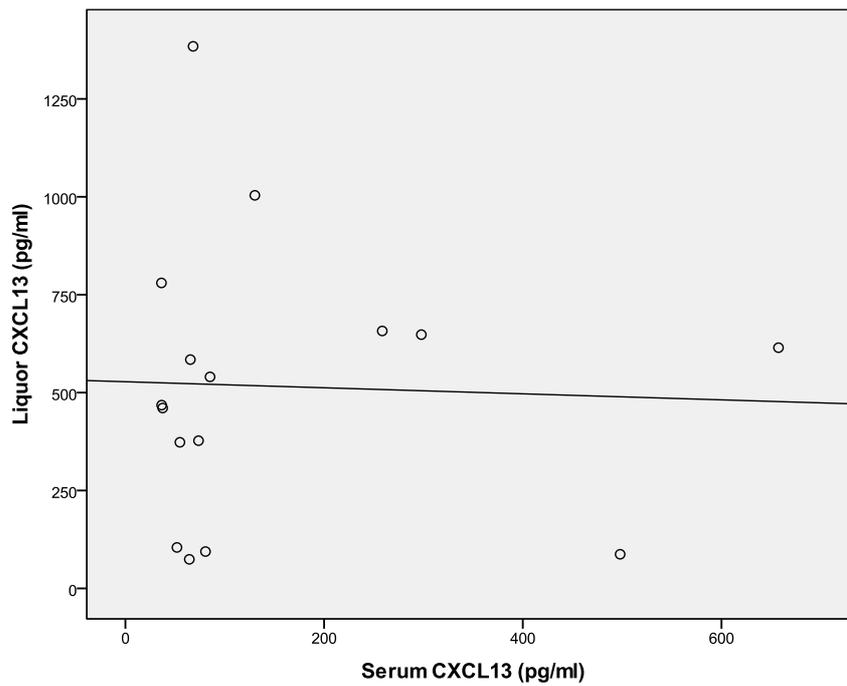


Abbildung 6: Korrelation zwischen CXCL13- Liquor- und Serumkonzentration bei ZNSL-Patienten (n = 16)

Die fehlende Korrelation blieb auch bestehen, wenn alle Kontrollpatienten in die Analyse miteinbezogen wurden (Abbildungen 7 und 8).

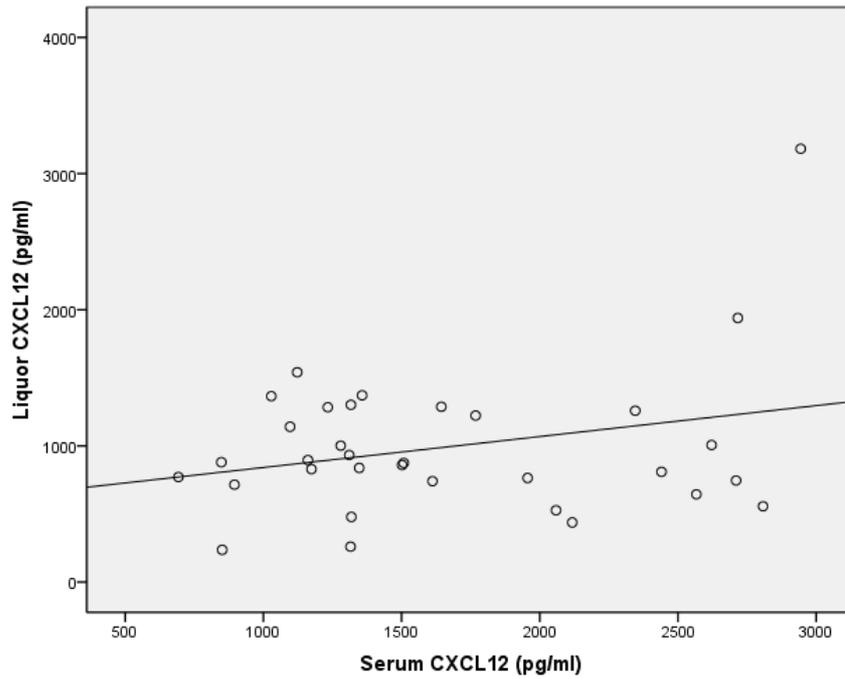


Abbildung 7: Korrelation zwischen CXCL12- Liquor- und Serumkonzentration bei Patienten mit einem ZNSL (n = 13), einer malignen ZNS-Erkrankung (n =5) und ohne eine maligne ZNS-Erkrankung (n = 15)

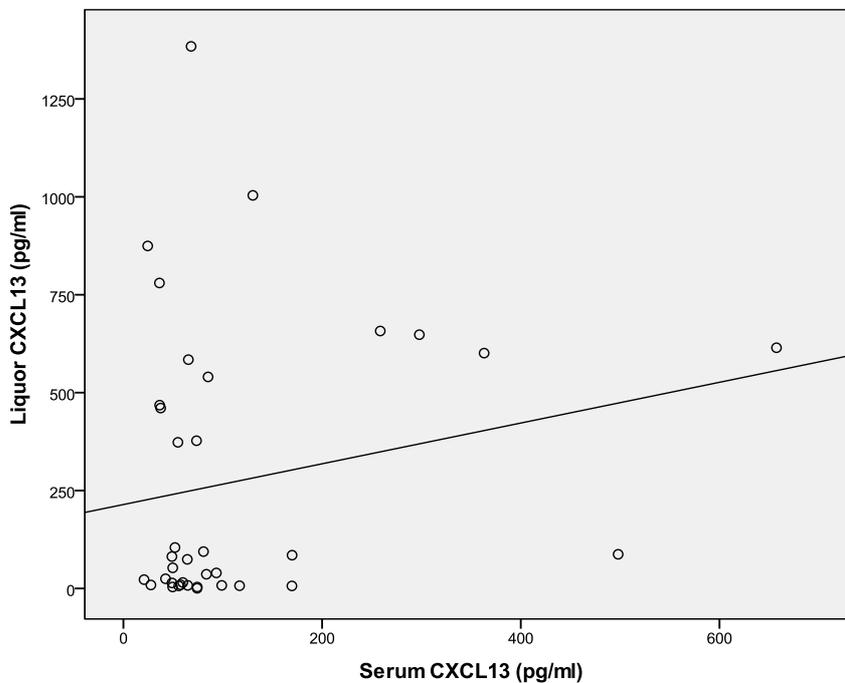


Abbildung 8: Korrelation zwischen CXCL13- Liquor- und Serumkonzentrationen bei Patienten mit einem ZNSL (n = 16), einer malignen ZNS-Erkrankung (n =5) und ohne eine maligne ZNS-Erkrankung (n = 16)

Es fand sich bei den ZNSL-Patienten keine Korrelation zwischen CXCL12-Konzentrationen im Liquor und dem Q_{alb} (Abbildung 9), wohingegen CXCL13-Konzentrationen im Liquor signifikant mit dem Q_{alb} assoziiert waren (Spearman $r=0,66$, $p=0,003$) (Abbildung 10).

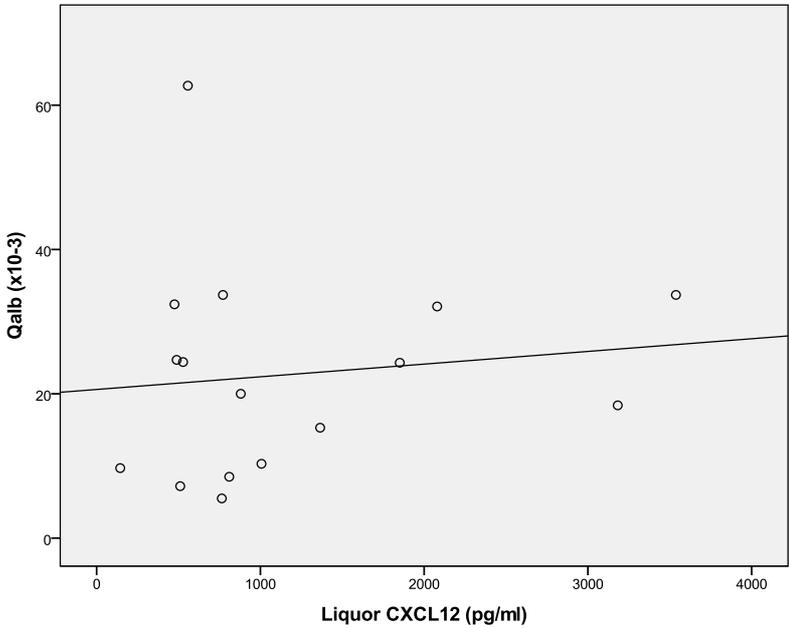


Abbildung 9: Korrelation von CXCL12- Liquorkonzentrationen mit dem Q_{alb} bei ZNSL-Patienten (n = 16)

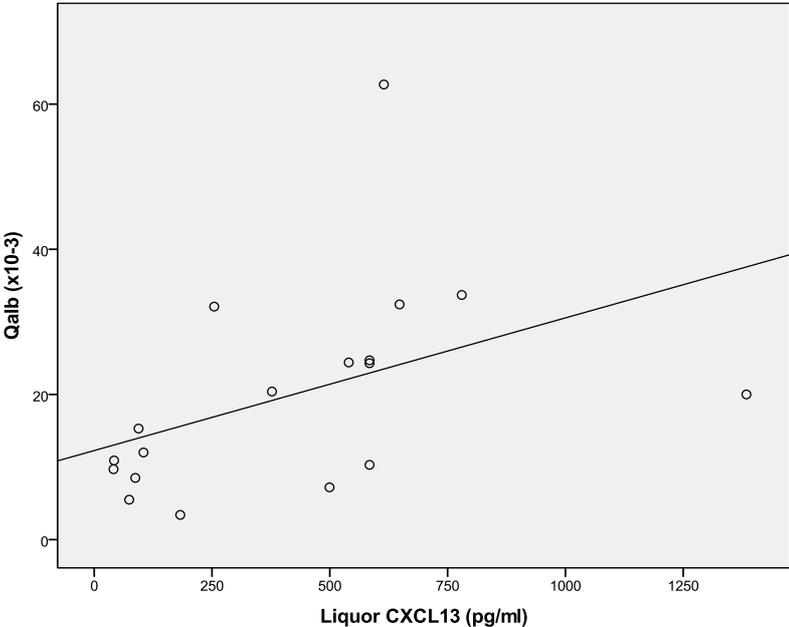


Abbildung 10: Korrelation von CXCL13- Liquorkonzentrationen mit dem Q_{alb} bei ZNSL-Patienten (n = 18)

Es fand sich weder eine Korrelation beider Chemokine mit der Zellzahl im Liquor (Abbildungen 11 und 12) noch mit dem Nachweis von Lymphomzellen im Liquor (zytomorphologisch oder immunzytologisch detektiert).

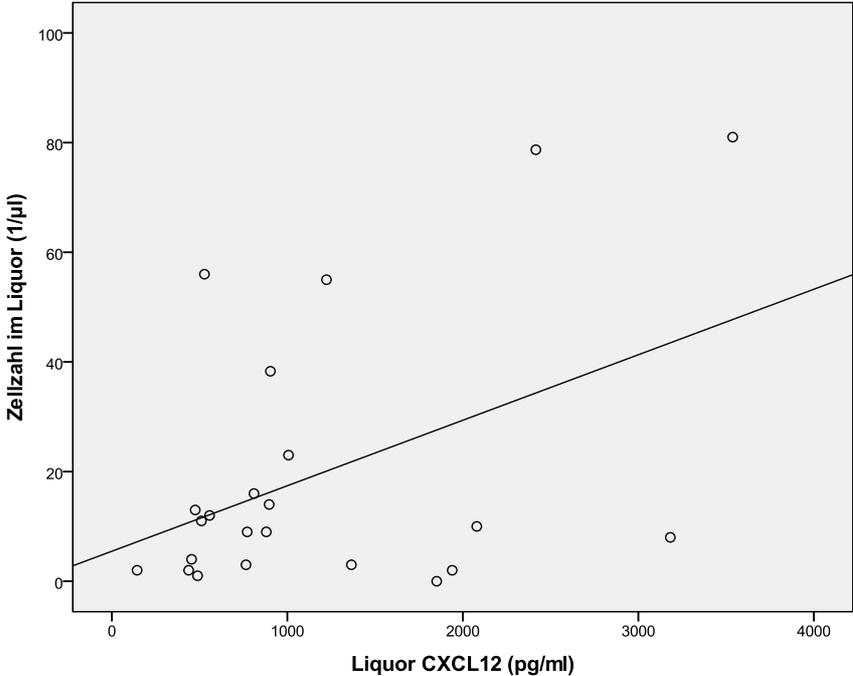


Abbildung 11: Korrelation der CXCL12- Liquorkonzentration mit der Liquorzellzahl bei ZNSL-Patienten (n = 23)

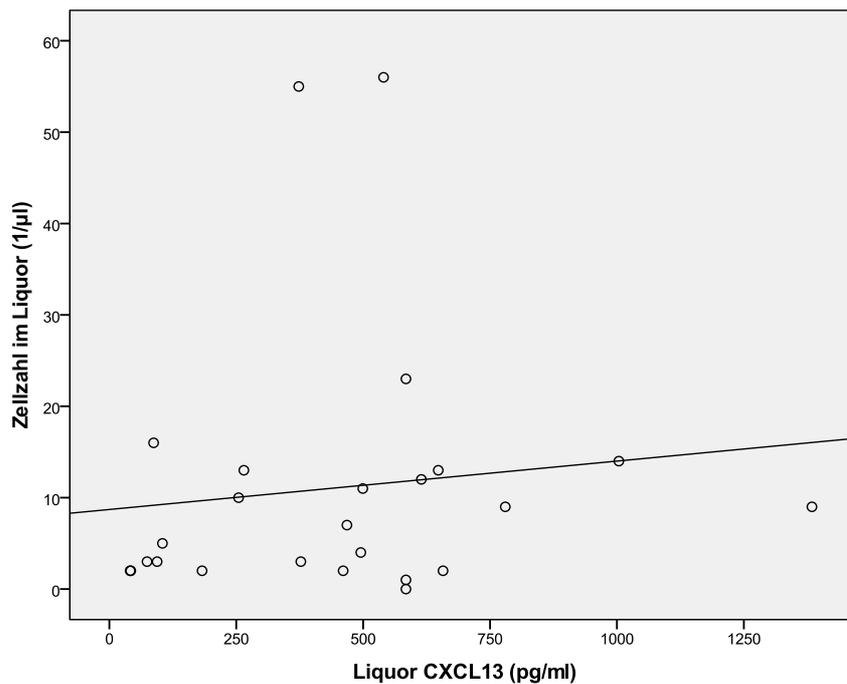


Abbildung 12: Korrelation der CXCL13- Liquorkonzentration mit der Liquorzellzahl bei ZNSL-Patienten (n = 25)

3.4 Vorbehandlung mit Glukokortikoiden

Daten über die Vorbehandlung mit Glukokortikoiden waren bei 26 von 30 ZNSL-Patienten vorhanden: 20 Patienten erhielten Dexamethason in einer Dosis von 3 bis 24 mg systemisch täglich, und 6 Patienten waren nicht mit Glukokortikoiden vorbehandelt gewesen.

Die Serum- und Liquorkonzentrationen der Chemokine waren nicht signifikant unterschiedlich bei Patienten mit und ohne Glukokortikoidvorbehandlung. Es fand sich lediglich eine Tendenz zu niedrigeren CXCL12-Serum-Konzentrationen bei Patienten, die mit Glukokortikoiden vorbehandelt waren (Tabelle 3).

	<u>Liquor</u>		<u>Serum</u>	
	CXCL12	CXCL13	CXCL12	CXCL13
Kortikosteroid-Vorbehandlung, n=20				
<i>median [pg/ml]</i>	888	457	1860	55
Keine Kortikosteroid-Vorbehandlung, n=6				
<i>median [pg/ml]</i>	556	584	2620	65
p	0,24	0,27	0,06	1,0

Tabelle 3: Chemokinkonzentrationen in Abhängigkeit der prätherapeutischen Glukokortikoidtherapie bei ZNSL-Patienten

3.5 Chemokinkonzentrationen im Serum bei Patienten mit systemischem Lymphom

Neun Patienten mit einem systemischen Lymphom, 5 davon mit ZNS-Beteiligung (5 mit DLBCL und 4 mit einem indolenten B-Zell-Lymphom) wurden bezüglich der Chemokinkonzentrationen im Serum mit den insgesamt 19 Patienten ohne eine Lymphomerkrankung verglichen. Die mediane CXCL12-Serumkonzentration betrug bei Patienten mit einem systemischen Lymphom 2059 pg/ml und bei Patienten ohne eine Lymphomerkrankung 1357 pg/ml, dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,069$) (Abbildung 13). Die mediane CXCL13-Konzentration betrug bei Patienten mit einem systemischen Lymphom 105 und war damit signifikant höher als bei Patienten ohne eine Lymphomerkrankung mit 65 pg/ml ($p=0,039$) (Abbildung 14).

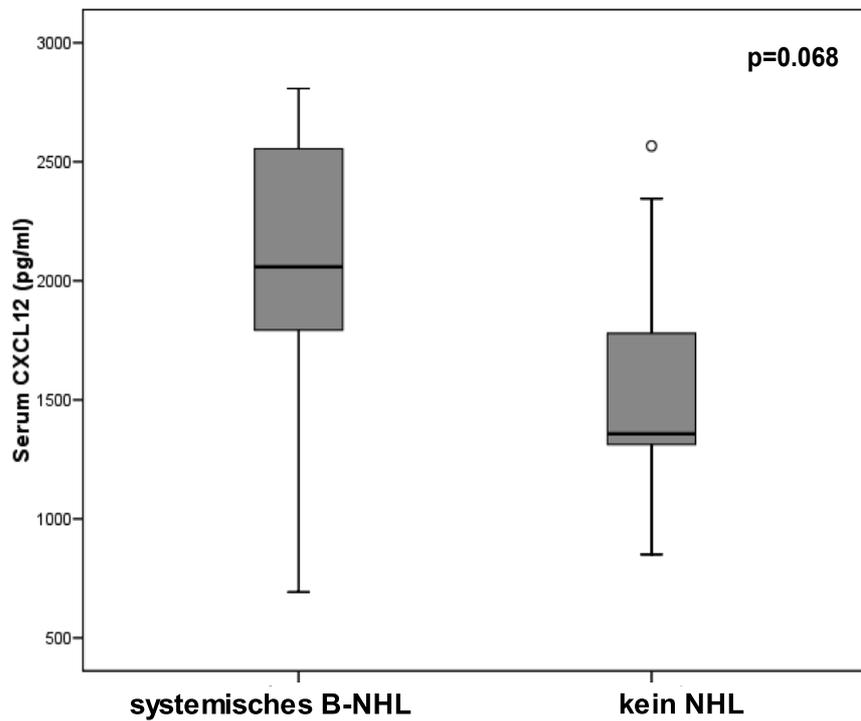


Abbildung 13: CXCL12-Serumkonzentration bei Patienten mit einem systemischen Lymphom (n = 9) versus ohne eine Lymphomerkrankung (n =19)

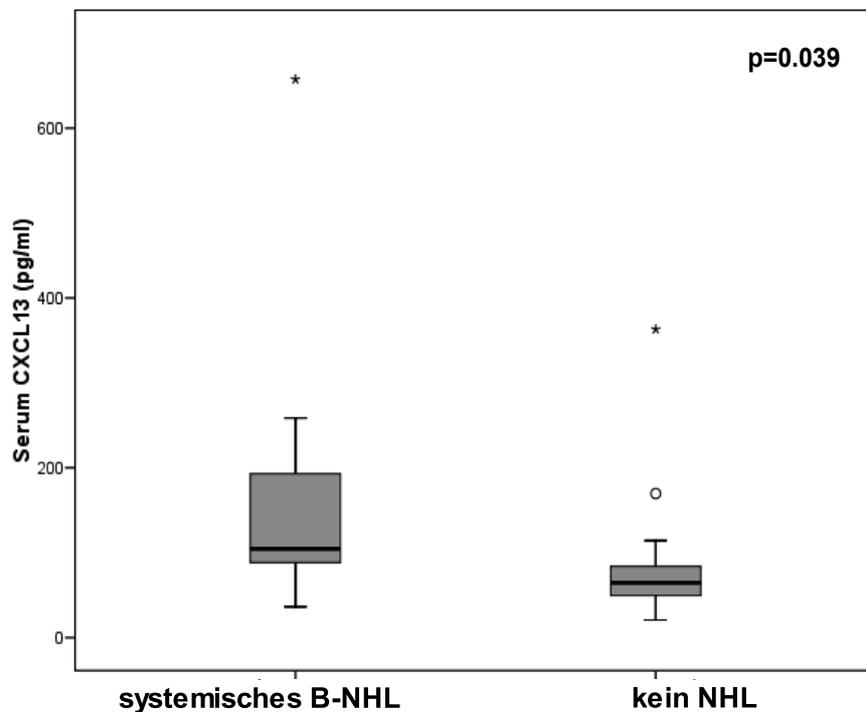


Abbildung 14: CXCL13-Serumkonzentration bei Patienten mit einem systemischen Lymphom (n = 9) versus ohne eine Lymphomerkrankung (n = 19)

3.6 Chemokinkonzentrationen im Verlauf der Therapie

Bei 5 Patienten wurden serielle Messungen von CXCL12-Konzentrationen im Liquor vor, während oder nach Chemotherapie durchgeführt; bei 6 Patienten wurde CXCL13 seriell gemessen. In beiden Gruppen befand sich jeweils ein Patient mit einem Progress unter der Therapie, während bei allen anderen die Erkrankung angesprochen hatte (partielle oder komplette Remission). Die Therapie bestand bei allen Patienten aus HDMTX (4 g/m² intravenös über 4 Stunden am Tag 1) und Ifosfamid (1,5 g/m² intravenös über 1 Stunde 1x pro Tag; Tag 3-5).

Während der Chemotherapie sanken die Chemokinkonzentrationen im Liquor 1,1 bis 10,1-fach (durchschnittlich 3,8-fach) bei allen Patienten mit Ansprechen und stiegen bei beiden Patienten mit Progress (Abbildung 15 A und B). Bei einem Patienten, der eine komplette Remission erreicht hatte, fanden sich nach der Therapie sehr niedrige CXCL12- und CXCL13-Konzentrationen im Liquor; Konzentrationen vor der Therapie lagen bei diesem Patienten nicht vor, da zu diesem Zeitpunkt bei ihm keine Liquorprobe für die Messung asserviert wurde.

Bei allen Patienten, die auf die Therapie ansprachen, fielen die CXCL13-Konzentrationen auf Werte ab, die vergleichbar niedrig waren mit den Kontrollpatienten (<100 pg/ml). Die einzige Ausnahme war ein Patient mit einer kompletten Remission seiner intrazerebralen Läsion, jedoch Persistenz der vorbestehenden meningealen Beteiligung. Bei einem Patienten, der eine komplette chirurgische Entfernung seines PZNSL hatte, wurde eine niedrige CXCL13-Konzentration vor der Chemotherapie gefunden.

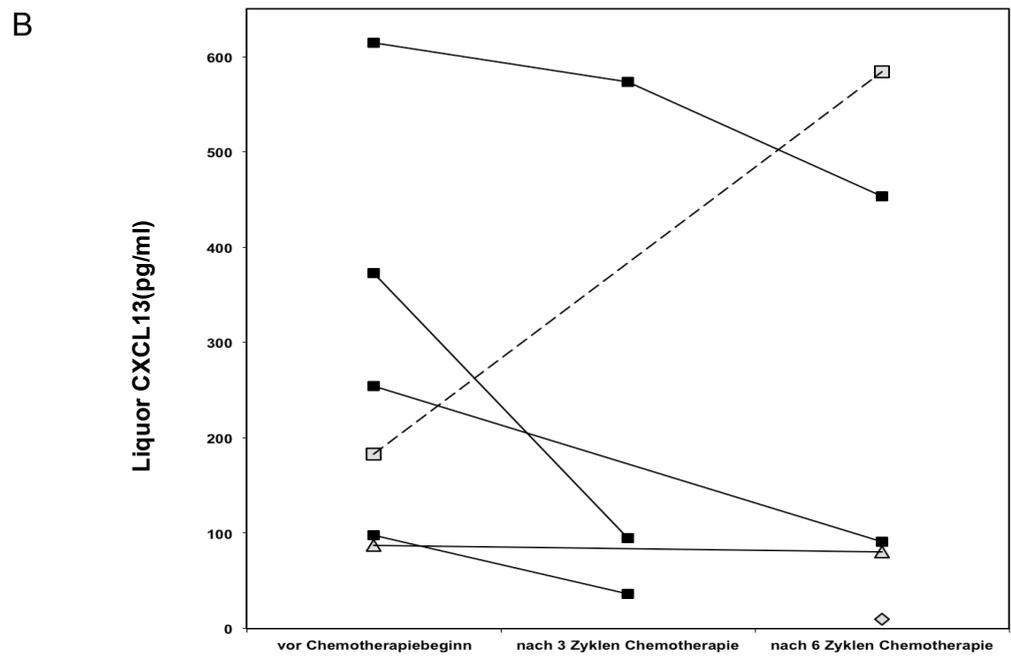
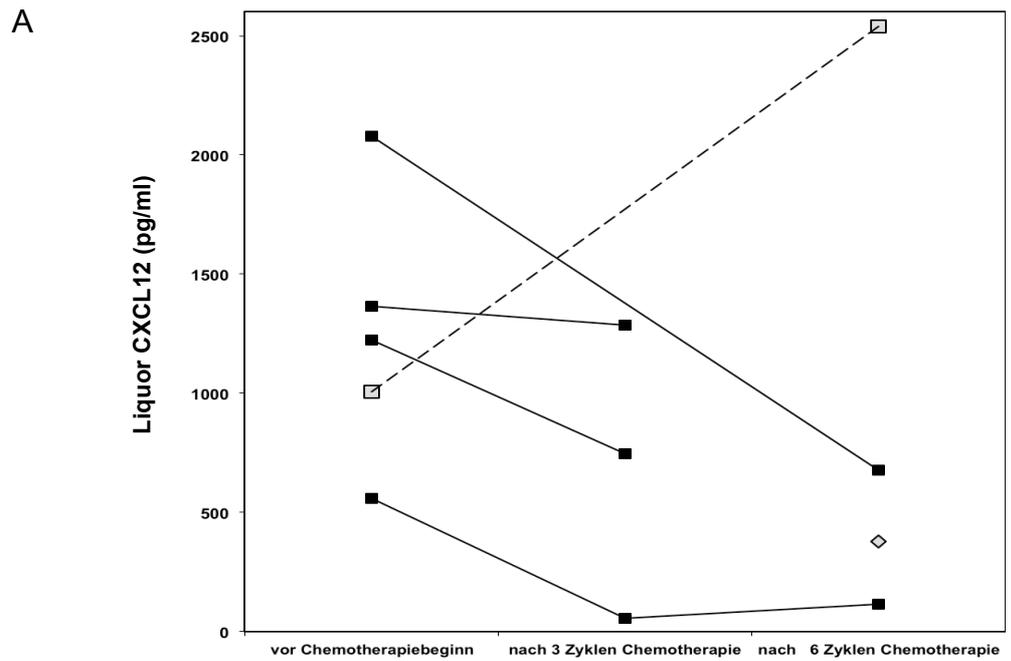


Abbildung 15: Liquorkonzentration von CXCL12 (A) und CXCL13 (B) bei ZNSL-Patienten ((A) n = 6; (B) n = 7) vor, während und nach der Chemotherapie

Legende

- Patienten, die auf Chemotherapie ansprechen
- Patient mit progressiver Erkrankung
- ◇ Patient in vollständiger Remission nach Therapie, keine prätherapeutischen Messungen vorhanden
- △ Patient mit vollständiger Tumorresektion

4. Diskussion

Im Liquor der 30 ZNSL-Patienten fanden wir hohe CXCL12- und CXCL13-Konzentrationen, wobei der Unterschied zu den Kontrollen für CXCL13 signifikant war, für CXCL12 dagegen nicht. Es erscheint wahrscheinlich, dass diese Ergebnisse die Rolle der Chemokine in der Entstehung, im *Homing* und für das Überleben der Lymphomzellen im ZNS widerspiegeln. Beide Chemokine sind bekannt als *Homing*-Faktoren für B-Lymphozyten, allerdings bleibt es unklar, ob die maligne Transformation bei ZNSL vor oder nach dem Eintritt der B-Zellen ins ZNS vollzogen wird. Im gesunden ZNS wird CXCL13 nicht exprimiert. Auf den Tumorzellen des PZNSL wurde die CXCL13-Expression über in situ Hybridisierung des CXCL13-mRNA nachgewiesen.³³ Follikuläre dendritische Zellen sind die einzige eindeutig nachgewiesene Quelle von CXCL13, das normale ZNS beinhaltet jedoch keine Lymphfollikel mit Keimzentren. Die Entstehung von ektopen Keimzentren in den Meningen und die Produktion von CXCL13 im ZNS wurde bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen wie der Neuroborreliose oder der Multiple Sklerosen nachgewiesen.^{17, 36-40} Eine entzündliche Läsion, die ein *Homing* von B-Lymphozyten im ZNS initiiert, könnte den ersten Schritt in der Pathogenese des ZNSL darstellen. Die CXCL12-Expression auf den Endothelzellen der Hirnkapillaren, die die Lymphozytenpassage durch die Bluthirnschranke begünstigt^{30, 34}, sowie die Apoptose verhindert (wie bei der chronischen lymphatischen Leukämie und malignen Gliomen gezeigt), könnte zu der ZNSL-Entstehung beitragen.^{41, 42}

Da die Tumorzellen des PZNSL sowohl die beiden Chemokine, als auch ihren jeweiligen Rezeptor exprimieren³⁰⁻³⁴, erscheint die Rolle der Chemokine in der Pathogenese des PZNSL wahrscheinlich. Da das Tumorgewebe des PZNSL keine follikulären dendritischen Zellen enthält, wird CXCL13, das im Liquor nachgewiesen werden kann, wahrscheinlich von den Lymphomzellen selbst produziert. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass die CXCL13-Serumkonzentrationen bei Patienten mit einem systemischen Lymphom höher waren als bei denen ohne eine systemische Lymphomerkkrankung.

Unsere Ergebnisse wurden inzwischen von einer amerikanischen Gruppe bestätigt. Rubenstein et al. verglichen 123 ZNSL-Patienten (100 PZNSL-Patienten und 23

SZNSL-Patienten, 6 Patienten HIV-positiv) mit Patienten mit anderen Tumoren außerhalb des ZNS, mit neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen und mit anderen ZNS-Tumoren. Bei Patienten mit einem ZNSL wurde eine >50fach höhere mittlere CXCL13-Konzentration im Liquor gefunden verglichen mit Patienten ohne ZNSL. ⁴³ Durch Genexpressionsanalysen und Immunhistochemie konnte die Produktion von CXCL13 in den Tumorzellen des PZNSL bestätigt werden. Interessanterweise wurde auch in Migrationsversuchen gezeigt, dass die Migration von Zellen, die aus den Tumorproben oder Liquor der ZNSL-Patienten isoliert wurden, von CXCL13 signifikant beschleunigt wurde.

Die Erkenntnis, dass CXCL13 auch im Liquor von SZNSL-Patienten erhöht ist, könnte wichtige Implikationen haben. Insbesondere wäre es interessant zu prüfen, inwiefern sich das Chemokin als ein früher diagnostischer Marker für die ZNS-Beteiligung bei systemischen Lymphomen eignet, d.h. bereits zu einem Zeitpunkt erhöht ist, zu dem nur der mikroskopische ZNS-Befall vorliegt. Solche frühen Marker eines subklinischen ZNS-Befalls bei Lymphomen wurden bisher nicht identifiziert und werden dringend benötigt, um Patienten für die ZNS-Prophylaxe adäquat selektieren zu können. ¹¹

Abgesehen von CXCL13 wurde bei den ZNSL inzwischen eine Reihe von diagnostischen Biomarkern in Liquor beschrieben: lösliches CD27 (sCD27) ⁴⁴, β 2-Mikroglobulin ⁴⁵, Antithrombin III ⁴⁶, freie Leichtketten ⁴⁷, bestimmte microRNA ⁴⁸, sowie Interleukin (IL)-10, IL-6 und löslicher IL-2-Rezeptor (sIL2-R) ⁴⁹. Die Studien wurden mit 10 bis 49 ZNSL-Patienten durchgeführt, die Sensitivität der Marker lag zwischen 57% (sIL2-R) und 100% (sCD27), die Spezifität zwischen 63% (IL-6) und 100% (IL-10). Mit einer Sensitivität von 71% und Spezifität von 91% ⁴³ gehört CXCL13 zu den mäßig sensitiven aber relativ spezifischen Markern. Allerdings konnte nur für IL-10, IL-6, sCD27 und β 2-Mikroglobulin der Vergleich zu anderen Hirntumoren gezogen werden, da es in den anderen Studien keine Tumorpatienten zum Vergleich gab oder die Patientenkollektive zu klein waren für robuste Schlussfolgerungen.

Die diagnostische Wertigkeit von CXCL13 könnte erhöht werden durch die Kombination mit anderen diagnostischen Methoden. Rubenstein et al. konnten zeigen, dass der prädiktive Wert der Erhöhung von sowohl CXCL13 als auch Interleukin 10 (IL-10) im Liquor 95% betrug bei einem negativen prädiktiven Wert von 88%. ⁴³ Eine andere

Möglichkeit, den diagnostischen Wert von CXCL13 zu erhöhen, wäre die Kombination mit bestimmten MRT-Techniken, wie das Perfusions-MRT oder die MRT-Spektroskopie. Der Rückgang der Chemokinkonzentration im Liquor parallel zum Ansprechen des Tumors auf die Therapie in unserer Studie suggerierte eine Korrelation der Liquorkonzentration mit dem Tumolvolumen. Für diese Annahme sprach auch die signifikante Korrelation zwischen CXCL13-Konzentration im Liquor und dem Ausmaß der Bluthirnschrankenstörung. Bei größeren Tumoren ist das Ausmaß der Bluthirnschrankenstörung größer; sie baut sich wieder auf, wenn sich der Tumor unter einer erfolgreichen Therapie zurückbildet. Daher kann geschlussfolgert werden, dass CXCL13 einen prognostischen Wert beim PZNSL haben könnte, ähnlich wie Liquoreiweiß, das ebenfalls mit dem Ausmaß dem Schweregrad der Bluthirnschrankenstörung korreliert und als prognostischer Faktor beim PZNSL beschrieben wurde.⁵⁰ Der prognostische Wert von CXCL13 bei ZNSL konnte inzwischen tatsächlich demonstriert werden: In der bereits erwähnten amerikanischen Studie mit insgesamt 123 ZNSL-Patienten waren Liquorkonzentrationen von CXCL-13 <200 pg/ml mit einem signifikant längerem progressionsfreien Überleben assoziiert verglichen mit Patienten mit höheren Konzentrationen. Bezeichnenderweise zeigte keiner der Patienten ohne nachweisbares CXCL13 im Liquor zum Zeitpunkt der Erstdiagnose einen Progress der Erkrankung nach der Therapie bei einer medianen Beobachtungszeit von 46 Monaten.⁴³

Aus dem Nachweis einer prognostischen Rolle von CXCL13 beim PZNSL könnten sich wichtige Konsequenzen für die Therapie dieser Erkrankung ergeben. Bei Patienten mit einem sehr hohen CXCL13-Wert und damit einer ungünstigen Prognose wäre eine Intensivierung der Therapie zu diskutieren, z.B. durch eine primäre Hochdosischemotherapie gefolgt von ASCT oder eine Konsolidierung der HDMTX-haltigen Primärtherapie durch eine nicht-kreuzresistente andere konventionelle Chemotherapie. Bei Patienten mit niedrigen CXCL13-Werten und günstiger Prognose dagegen wäre eine weniger intensive Therapie vorstellbar und dadurch die Einsparung der unnötigen Toxizität. Es erscheint auch sinnvoll, die Interaktion CXCL13-CXCR5 als Therapieziel zu nutzen. Die Evaluation von CXCL13-Inhibitoren wäre vorzugsweise zunächst in der Rezidiv-Situation denkbar, in der es derzeit keine etablierte Therapie gibt. Ein therapeutischer CXCL13-Antikörper wurde bereits erfolgreich in einem Mausmodell der rheumatoiden Arthritis eingesetzt.⁵¹

CXCL12 im Liquor stammt wahrscheinlich aus verschiedenen Quellen. Das CXCL12-Molekül ist mit 89 Aminosäuren deutlich kleiner als Albumin, das aus 584 Aminosäuren besteht. Da CXCL12-Konzentrationen im Serum höher waren als die im Liquor, erscheint es möglich, dass Liquor-CXCL12 aus dem Serum stammte, insbesondere in Anwesenheit einer durchbrochenen Blut-Hirn-Schranke, wie dies bei ZNS-Tumoren oder entzündlichen ZNS-Prozessen der Fall ist. Andererseits haben wir keine Korrelation zwischen Serum- und Liquorkonzentrationen von CXCL12 und dem Ausmaß der Bluthirnschrankenstörung gefunden, was für die Produktion von CXCL12 im ZNS spricht. Abgesehen von Lymphomzellen sind Endothelzellen der Tumorgefäße und reaktive Gliazellen potentielle Quellen des Chemokins im ZNS.⁵²

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit ist der potentielle Einfluss der Kortikosteroide auf die gemessenen Chemokinkonzentrationen. Dies ist ein häufiges Problem bei Diagnostikstudien bei ZNSL, die aufgrund ihres schnellen und aggressiven Wachstums eine bedrohlich rasch voranschreitende klinische Symptomatik verursachen können, die wiederum die behandelnden Ärzte zu Kortikosteroidgabe veranlasst, häufig noch bevor der diagnostische Prozess abgeschlossen ist. Eine Herunterregulierung der Chemokin-Expression durch Kortikosteroide wurde beschrieben.^{53, 54} Gegen die Verfälschung unserer Ergebnisse durch Kortikosteroide spricht allerdings, dass wir keine Korrelation zwischen der Vorbehandlung mit Kortikosteroiden und der Chemokinkonzentrationen im Liquor fanden. Lediglich CXCL12-Konzentrationen im Serum waren bei Patienten, die mit Kortikosteroiden vorbehandelt waren, etwas niedriger, was möglicherweise den anti-inflammatorischen Effekt der Kortikosteroide widerspiegelt.

Insgesamt erscheint unseren Ergebnissen und den nachfolgenden Erkenntnissen zufolge das Chemokin CXCL13 ein vielversprechender diagnostischer und prognostischer Marker bei ZNSL zu sein, dessen Wertigkeit durch weitere Studien untermauert werden sollte.

5. Zusammenfassung

Unter der Annahme, dass das durch Chemokine regulierte *Homing* von Lymphozyten ins ZNS eine wichtige pathogenetische Rolle bei ZNSL spielen könnte, untersuchten wir die Konzentration der Chemokine CXCL12 und CXCL13 im Liquor und Serum von Patienten mit ZNSL und verglichen diese mit Kontrollpersonen.

Analysiert wurden Proben von insgesamt 30 Patienten mit einem ZNSL: 23 mit primärem und 7 mit sekundärem ZNSL. Die Kontrollgruppe bestand aus 40 Patienten: 10 mit einem anderen ZNS-Malignomen und 30 ohne eine maligne ZNS-Erkrankung (7 mit systemischem Lymphom, 3 mit einem anderen systemischen Tumor, 12 mit Normaldruckhydrozephalus, 4 mit Demenz und 4 mit Ausschluss einer entzündlichen ZNS-Erkrankung). Die Messungen der CXCL12- und CXCL13-Konzentrationen wurden mittels ELISA durchgeführt. Um den Schweregrad der Bluthirnschrankenstörung einzuschätzen, wurde der Liquoralbumin/Serumalbumin-Quotient (Q_{alb}) bestimmt.

CXCL12-Konzentrationen im Serum und im Liquor unterschieden sich nicht zwischen den ZNSL-Patienten und der Kontrollgruppe. Für CXCL13 fanden sich niedrige Serumspiegelkonzentrationen in allen Patientengruppen, die Konzentrationen im Liquor waren dagegen bei den ZNSL-Patienten mit median 468 pg/ml (range 41-1384) signifikant höher als bei den Patienten mit einem anderen ZNS-Malignom mit median 6 pg/ml (range 0-601), $p=0,0005$; und bei Patienten ohne ein ZNS-Malignom mit median 8 pg/ml (range 0-187), $p<0,0001$. Es fand sich keine Korrelation zwischen den Chemokinkonzentrationen im Liquor und Serum. Die CXCL13-Konzentration im Liquor bei den ZNSL-Patienten korrelierte mit dem Ausmaß der Bluthirnschrankenstörung ($r=0,66$; $p=0,003$). Diese Ergebnisse sprechen für die Produktion von CXCL13 durch die ZNSL und unterstützen die Hypothese zu dem pathogenetischen Beitrag des Chemokins bei dieser Erkrankung.

Die Messung der CXCL12- und CXCL13-Konzentration im Liquor im Verlauf der Krankheit bei 7 ZNSL-Patienten ergab einen Abfall der Konzentration bei 5 Patienten, die auf die Therapie angesprochen haben, und einen Anstieg bei 2 Patienten mit Progress unter Therapie. CXCL13 könnte somit die Tumorlast widerspiegeln und möglicherweise als prognostischer Marker bei ZNSL dienen.

6.Literaturverzeichnis

1. Korfel A, Schlegel U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nat Rev Neurol*;9(6):317-27.
2. Balmaceda C, Gaynor JJ, Sun M, Gluck JT, DeAngelis LM. Leptomeningeal tumor in primary central nervous system lymphoma: recognition, significance, and implications. *Ann Neurol* 1995;38(2):202-9.
3. Fischer L, Martus P, Weller M, et al. Meningeal dissemination in primary CNS lymphoma: prospective evaluation of 282 patients. *Neurology* 2008;71(14):1102-8.
4. Morgello S. Pathogenesis and classification of primary central nervous system lymphoma: an update. *Brain Pathol* 1995;5(4):383-93.
5. Panageas KS, Elkin EB, DeAngelis LM, Ben-Porat L, Abrey LE. Trends in survival from primary central nervous system lymphoma, 1975-1999: a population-based analysis. *Cancer* 2005;104(11):2466-72.
6. Kadan-Lottick NS, Skluzacek MC, Gurney JG. Decreasing incidence rates of primary central nervous system lymphoma. *Cancer* 2002;95(1):193-202.
7. O'Neill BP, Decker PA, Tieu C, Cerhan JR. The changing incidence of primary central nervous system lymphoma is driven primarily by the changing incidence in young and middle-aged men and differs from time trends in systemic diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*;88(12):997-1000.
8. Wilson WH, Bromberg JE, Stetler-Stevenson M, et al. Detection and outcome of occult leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Haematologica*;99(7):1228-35.
9. Schabet M. Epidemiology of primary CNS lymphoma. *J Neurooncol* 1999;43(3):199-201.
10. Cote TR, Manns A, Hardy CR, Yellin FJ, Hartge P. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(10):675-9.
11. Korfel A. Prevention of central nervous system relapses in diffuse large B-cell lymphoma: which patients and how? *Curr Opin Oncol*;23(5):436-40.
12. Boehme V, Schmitz N, Zeynalova S, Loeffler M, Pfreundschuh M. CNS events in elderly patients with aggressive lymphoma treated with modern chemotherapy (CHOP-14) with or without rituximab: an analysis of patients treated in the

- RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood* 2009;113(17):3896-902.
13. Korfel A, Weller M, Martus P, et al. Prognostic impact of meningeal dissemination in primary CNS lymphoma (PCNSL): experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Oncol*;23(9):2374-80.
 14. Herrlinger U, Schabet M, Eichhorn M, et al. Prolonged corticosteroid-induced remission in primary central nervous system lymphoma: report of a case and review of the literature. *Eur Neurol* 1996;36(4):241-3.
 15. Thiel E, Korfel A, Martus P, et al. 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*;11(11):1036-47.
 16. Korfel A, Elter T, Thiel E, et al. 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*;98(3):364-70.
 17. Giunti D, Borsellino G, Benelli R, et al. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol* 2003;73(5):584-90.
 18. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol* 2004;76(2):462-71.
 19. Psenak O. [Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). Its structure and function]. *Cas Lek Cesk* 2001;140(12):355-63.
 20. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996;184(3):1101-9.
 21. Arai J, Yasukawa M, Yakushijin Y, Miyazaki T, Fujita S. Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1. *Eur J Haematol* 2000;64(5):323-32.
 22. Kanemitsu N, Ebisuno Y, Tanaka T, et al. CXCL13 is an arrest chemokine for B cells in high endothelial venules. *Blood* 2005;106(8):2613-8.

23. Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, et al. BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J Clin Invest* 1999;104(10):R49-54.
24. Takemura S, Braun A, Crowson C, et al. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 2001;167(2):1072-80.
25. Allen CD, Ansel KM, Low C, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 2004;5(9):943-52.
26. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;110(9):3316-25.
27. Falkenhagen KM, Braziel RM, Fraunfelder FW, Smith JR. B-Cells in ocular adnexal lymphoproliferative lesions express B-cell attracting chemokine 1 (CXCL13). *Am J Ophthalmol* 2005;140(2):335-7.
28. Husson H, Freedman AS, Cardoso AA, et al. CXCL13 (BCA-1) is produced by follicular lymphoma cells: role in the accumulation of malignant B cells. *Br J Haematol* 2002;119(2):492-5.
29. Mori M, Manuelli C, Pimpinelli N, et al. BCA-1, A B-cell chemoattractant signal, is constantly expressed in cutaneous lymphoproliferative B-cell disorders. *Eur J Cancer* 2003;39(11):1625-31.
30. Brunn A, Montesinos-Rongen M, Strack A, et al. Expression pattern and cellular sources of chemokines in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol* 2007;114(3):271-6.
31. Montesinos-Rongen M, Siebert R, Deckert M. Primary lymphoma of the central nervous system: just DLBCL or not? *Blood* 2009;113(1):7-10.
32. Jahnke K, Coupland SE, Na IK, et al. Expression of the chemokine receptors CXCR4, CXCR5, and CCR7 in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 2005;106(1):384-5.
33. Smith JR, Braziel RM, Paoletti S, Lipp M, Ugucioni M, Rosenbaum JT. Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 2003;101(3):815-21.
34. Smith JR, Falkenhagen KM, Coupland SE, Chipps TJ, Rosenbaum JT, Braziel RM. Malignant B cells from patients with primary central nervous system

- lymphoma express stromal cell-derived factor-1. *Am J Clin Pathol* 2007;127(4):633-41.
35. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, et al. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41(3):331-7.
 36. Corcione A, Casazza S, Ferretti E, et al. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(30):11064-9.
 37. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006;129(Pt 1):200-11.
 38. Narayan K, Dail D, Li L, et al. The nervous system as ectopic germinal center: CXCL13 and IgG in lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 2005;57(6):813-23.
 39. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004;14(2):164-74.
 40. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 2000;406(6793):309-14.
 41. Zhou Y, Larsen PH, Hao C, Yong VW. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* 2002;277(51):49481-7.
 42. Chunsong H, Yuling H, Li W, et al. CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+CD5+ B cells. *J Immunol* 2006;177(10):6713-22.
 43. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, et al. CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. *Blood*;121(23):4740-8.
 44. Kersten MJ, Evers LM, DelleMijn PL, et al. Elevation of cerebrospinal fluid soluble CD27 levels in patients with meningeal localization of lymphoid malignancies. *Blood* 1996;87(5):1985-9.
 45. Caudie C, Bancel J, Dupont M, Matanza D, Poitevin F, Honnorat J. [CSF levels and diagnostic utility of cerebrospinal fluid beta2-microglobulin]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005;63(6):631-7.
 46. Roy S, Josephson SA, Fridlyand J, et al. Protein biomarker identification in the CSF of patients with CNS lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26(1):96-105.

47. Schroers R, Baraniskin A, Heute C, et al. Detection of free immunoglobulin light chains in cerebrospinal fluids of patients with central nervous system lymphomas. *Eur J Haematol*;85(3):236-42.
48. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood*;117(11):3140-6.
49. Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M, et al. Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Neuro Oncol*;14(3):368-80.
50. Ferreri AJ, Blay JY, Reni M, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol* 2003;21(2):266-72.
51. Finch DK, Ettinger R, Karnell JL, Herbst R, Sleeman MA. Effects of CXCL13 inhibition on lymphoid follicles in models of autoimmune disease. *Eur J Clin Invest*;43(5):501-9.
52. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(1):84-96.
53. Kim YS, Bigliani LU, Fujisawa M, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, CXCL12) is increased in subacromial bursitis and downregulated by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory agents. *J Orthop Res* 2006;24(8):1756-64.
54. Meraouna A, Cizeron-Clairac G, Panse RL, et al. The chemokine CXCL13 is a key molecule in autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2006;108(2):432-40.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hüsniye Cakiroglu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Konzentration von CXCL13 und CXCL12 im Liquor zur Diagnosestellung eines ZNS-Lymphoms“ 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, 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

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Hüsniye Cakiroglu hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: 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. Clinical Cancer Research, 2009.

Beitrag im Einzelnen: Datensammlung, Datenauswertung, Beteiligung an der Verfassung des Abstrakts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

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

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

Publikationsliste

Fischer L, Korfel A, Pfeiffer S, Kiewe P, Volk H D, Cakiroglu H, Widmann T, Thiel E.
CXCL13 and CXCL12 in central nervous system lymphoma patients. Clin Cancer Res.
2009 Oct 1;15(19):5968-73

Danksagung

Bei Frau PD Dr. Agnieszka Korfel bedanke ich mich herzlichst für die Unterstützung während der Fertigstellung und fachliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Lars Fischer gilt mein besonderer Dank als antreibende Kraft dieser Arbeit und für die vielen wertvollen Anregungen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Sebastian Pfeiffer für die zahlreichen hilfreichen Ratschläge bei anfallenden praktischen Fragen und Ermöglichung der fachübergreifenden Kooperation.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die Unterstützung während der Phase der Fertigstellung der Arbeit.