Aus dem Institut für Neuropathologie (Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler) der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Histologische Veränderungen von primären ZNS-Lymphomen nach Steroidtherapie im Vergleich zu chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Aylin Sophie Handan Engel (geb. Haskiris)

aus

Hamburg

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referentin:	Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. B. Chapuy
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 03.05.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Histologische Veränderungen von primären ZNS-Lymphomen nach Steroidtherapie im Vergleich zu chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 30.03.2021

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Barrantes-Freer A, **Engel AS**, Rodríguez-Villagra OA, Winkler A, Bergmann M, Mawrin C, Kuempfel T, Pellkofer H, Metz I, Bleckmann A et al. (2018): Diagnostic red flags: steroid-treated malignant CNS lymphoma mimicking autoimmune inflammatory demyelination. Brain Pathol <u>28</u>, 225–233

Barrantes-Freer: Pathological features of steroid-mitigated CNS lymphoma mimicking inflammatory demyelination, Vortrag im Rahmen des 60. jährlichen Treffen der Deutschen Gesellschaft für Neuropathology und Neuroanatomy, Berlin, 26.08. – 28.08.2015

Inhaltsverzeichnis

A	bbildungs	sverzeichnis	VII
T	abellenve	rzeichnis	VIII
A	bkürzung	sverzeichnis	IX
1	Einlei	tung	1
	1.1 Mul	tiple Sklerose (MS)	1
	1.1.1	Klinik	1
	1.1.2	Diagnostik	2
	1.1.3	Histopathologie	5
	1.1.4	Therapie	7
	1.1.5	Differentialdiagnosen	8
	1.2 Prin	näre ZNS-Lymphome (PZNSL)	10
	1.2.1	Klinik	10
	1.2.2	Diagnostik	11
	1.2.3	Therapie und Prognose	
	1.3 Ster	oidmitigierte Lymphome (SML)	13
	1.3.1	Einfluss von Steroiden auf Lymphomzellen	13
	1.3.2	Fallberichte über durch Steroide histologisch veränderte Primäre ZNS-Lymphom	e 14
	1.4 Fraş	gestellung	14
2	Mater	ial und Methoden	16
	2.1 Ver	wendete Chemikalien	16
	2.2 Prin	närantikörper	18
	2.3 Sek	undärsysteme	19
	2.4 Vor	behandlung der histologischen Schnitte	20
	2.5 His	tologische Färbungen	20
	2.5.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	20
	2.5.2	Luxol-Fast-Blue-Perjodsäure-Schiff-Reaktion (LFB-PAS)	20
	2.5.3	Bielschowsky-Versilberung	21
	2.6 Imr	nunhistochemische Färbungen	22
	2.6.1	Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode	22
	2.6.2	Immunhistochemische Einfachmarkierung	23
	2.6.3	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase(APAAP)-Methode	25
	2.6.4	Immunhistochemische Doppelmarkierung für die Ki67-CD3-Doppelfärbung	
	2.7 Imr	nunhistochemische Marker	27
	2.7.1	Cluster of differentiation 3 (CD3)	27
	2.7.2	Cluster of differentiation 4 (CD4)	27
	2.7.3	Cluster of differentiation 8 (CD8)	
	2.7.4	Cluster of differentiation 20 (CD20)	
	2.7.5	Cluster of differentiation 138 (CD138)	
	2.7.0	Wyeloid-related Protein 14 (MKP14)	29 20
	∠././ 278	Ki07	29 30
	4.1.0	1 21 1/11 1	

	2	.7.9	Neurofilament 200 (NF200)	30	
	2	.7.10	Basisches Myelinprotein (MBP)	30	
	2	.7.11	Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)	30	
	2.8	Patie	ntenauswahl	31	
	2.9	Bilda	ufnahmen und -bearbeitung	32	
	2.10) Statis	stische Auswertung	33	
3	E	Ergebr	nisse	34	
	3.1	Klini	sche Angaben	34	
	3	.1.1	Patientenkohorte steroidmitigierte Lymphome	34	
	3	.1.2	Patientenkohorte steroidunbeeinflusste Lymphome (SUL)	36	
	3	.1.3	Patientenkohorte Multiple Sklerose	37	
	3	.1.4	Patientenkohorte Primäre ZNS-Lymphome	38	
	3.2	Histo	pathologie	39	
	3	.2.1	Übersichtsdarstellung der Zellstrukturen und der Zellverteilung	39	
	3	.2.2	Zellverteilung von Makrophagen und Mikroglia	41	
	3	.2.3	Zellverteilung der B-Zellen	41	
	3	.2.4	Verteilung der T-Zellen	44	
	3	.2.5	Zellproliferation	46	
3.2.6 Vergleich der Myelinschädigung					
3.2.7 Vergleich der axonalen Schädigung					
	3	.2.8	Histomorphologischer Vergleich der SML- und SUL-Fälle	51	
	3	.2.9	Histomorphologischer Vergleich der SML- und PZNSL-Fälle	52	
4	Ľ	Diskus	sion	53	
	4.1	Unte	rschiedliche Demyelinisierungsmuster	55	
	4.2	Hoh	e T-Zelldichte als Indikator für steroidmitigierte Lymphome	55	
	4.3	Fehle	ende inflammatorische Demyelinisierung bei Primären ZNS-Lymphomen	55	
	4.4	Zusa	mmenhänge zwischen Multipler Sklerose und Primären ZNS-Lymphomen	56	
	4.5	Ents	tehungstheorien zu den histologischen Veränderungen bei steroidmitigierten Lymp	homen 56	
	4.6	Spor	atane Remission von Primären ZNS-Lymphomen	57	
	4.7	Diag Lym	nostische Unterschiede zwischen Spätformen der Multiplen Sklerose und Primären	ZNS- 57	
	4.8	Diag	nostische Treffsicherheit bei Primären ZNS-Lymphomen unter Steroidtherapie	58	
5	7		menfaseung	60	
5	L	Jusaill	IIICIIIa55ulig	00	
6	A	nhan	g	62	
7	L	iterati	urverzeichnis	66	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	: Diagnosealgorithmus PZNSL	11
Abbildung 2	2: Schematische Darstellung der ABC-Methode	23
Abbildung 3	B: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Einfachmarkierung mittels	
	ABC-Methode und DAB	24
Abbildung 4	E Schematische Darstellung der immunhistochemischen Einfachmarkierung mittels	
	ABC-Methode und AEC	25
Abbildung 5	5: Schematische Darstellung der APAAP-Methode	25
Abbildung 6	5: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Doppelmarkierung mit Ki67	und
	CD3	27
Abbildung 7	7: Ausschnitt einer repräsentativen Aufnahme für die Zellzählung mit dem Programm	Fiji
		32
Abbildung 8	8: Übersicht zum Ersterkrankungsalter in den vier Kohorten SML, SUL, MS und PZS	NL
		39
Abbildung 9	2: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien zur Darstellung der	
	Zellstrukturen	40
Abbildung 1	0: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien zu Makrophagen so	wie
	deren statistische Auswertung	42
Abbildung 1	1: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für B-Zellen und	
	Plasmazellen sowie deren statistische Analyse	43
Abbildung 1	2: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für T-Zellen,	
	T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen sowie die dazugehörigen statistischen	
	Auswertungen	45
Abbildung 1	3: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für proliferierende	
	T-Zellen sowie die entsprechenden graphischen Darstellungen der Quantifizierung.	47
Abbildung 1	4: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien zum Myelin	49
Abbildung 1	5: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für Axone	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnosekriterien der schubförmigen Multiplen Sklerose	4
Tabelle 2:	Diagnosekriterien der primär-progredienten Multiplen Sklerose	4
Tabelle 3:	Übersicht zu verwendeten Chemikalien	. 16
Tabelle 4:	Übersicht zu verwendeten Primärantikörpern	. 18
Tabelle 5:	Übersicht zu verwendeten Sekundärsystemen	. 19
Tabelle 6:	Herstellerdetails der Tabellen 3-5	. 19
Tabelle 7:	Übersicht zur Patientenkohorte mit steroidmitigiertem Lymphom	. 35
Tabelle 8:	Übersicht zur Patientenkohorte mit steroidunbeeinflusstem Lymphom	. 37
Tabelle 9:	Übersicht zur MS-Patientenkohorte	. 38
Tabelle 10:	Übersicht zur PZNSL-Patientenkohorte	. 39
Tabelle 11:	Zusammenfassung der histologischen Unterschiede zwischen SML- und frühaktiven MS	-
	Läsionen	. 53

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP-Methode	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Methode
BAFF	B-Zell-Aktivierungsfakor (B cell activating factor of the TNF family)
BDNF	vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (brain-derived neurotrophic factor)
Biel	Bielschowsky-Versilberung
Bx	Biopsie
CD	Cluster of differentiation
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
CNPase	2 ', 3'-zyklische Nucleotid-3'-Phosphodiesterase
СТ	Computertomographie
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDSS	Skala zur Schweregradeinteilung der Behinderungen bei Multipler Sklerose
	(Expanded Disability Status Scale)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
LFB	Luxol-Fast-Blue
MAG	Myelin-assoziertes Glykoprotein (myelin-associated glycoprotein)
MBP	Basisches Myelinprotein (myelin basic protein)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRP14	Myeloid-related protein 14
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
NA	Numerische Apertur eines Objektives

NF200	Neurofilament 200
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMO	Neuromyelitis optica, Devic-Krankheit
OKB	oligoklonale Banden (im Liquor cerebrospinalis)
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (Periodic acid-Schiff reaction)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PNS	Peripheres Nervensystem
PPMS	Primär-progressive Multiple Sklerose
PZNSL	Primäres Zentrales Nervensystem-Lymphom
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom
RRMS	schubförmig remittierende MS (relapsing remitting MS)
SML	steroidmitigiertes Lymphom
SUL	steroidunbeeinflusstes Lymphom
TBS	Tris-Puffer (tris-buffered saline)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zelle	T-Helferzelle
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose (MS)

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische entzündlich-entmarkende Erkrankung des Zentralen Nervensystems. Die Erstbeschreibung erfolgte im Jahre 1868 durch den französischen Arzt Jean-Martin Charcot (Charcot 1868). Weltweit wird heutzutage von etwa zweieinhalb Millionen Betroffenen ausgegangen, wobei in Europa und Nordamerika die höchsten Prävalenzen zu finden sind (Koch-Henriksen und Sørensen 2010; Browne et al. 2014). Die Erkrankung tritt gehäuft bei jungen Erwachsenen auf und ist die häufigste nicht traumatische Ursache neurologischer Behinderung bei jungen Erwachsenen (Sadovnick und Ebers 1993; Niedziela et al. 2014). Dabei sind Frauen zwei- bis dreifach häufiger betroffen (Orton et al. 2006). Die Ätiologie ist komplex und trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden verschiedene Hypothesen diskutiert, wobei aktuell von einer autoimmunen Genese ausgegangen wird. Für einige Faktoren konnte ein Zusammenhang zu der Krankheitsentstehung der MS nachgewiesen werden. Hierzu gehören einerseits genetische Komponenten, wie Polymorphismen der T-Zellregulation, und andererseits Umweltfaktoren wie Vitamin D-Mangel, Ebstein-Barr-Virus-Infektion, Autoantigenbildung gegen das Enzym GDP-L-Fucose-Synthase sowie Rauchen (Sawcer et al. 2011; Ascherio et al. 2012; Planas et al. 2018).

Die klinischen Symptome bei der MS sind sehr unterschiedlich ausgeprägt. Obwohl zur Diagnosestellung mit den McDonald Kritierien aus 2017 (siehe Abschnitt 1.1.2) eindeutige klinische und radiologische Kriterien vorliegen, ist es wichtig, einige Differentialdiagnosen auszuschließen, die eines anderen Behandlungsregimes bedürfen. Hierzu gehört beispielsweise das Primäre ZNS-Lymphom. Diese Erkrankung ist zusammen mit einigen anderen Differenzialdiagnosen oft schwierig abzugrenzen. In solchen unklaren Fällen spielt die Biopsie auch heute noch eine bedeutende Rolle.

Im Folgenden wird zunächst auf die Hauptmerkmale der MS und ihrer Differentialdiagnosen mit Schwerpunkt auf die histomorphologischen Unterschiede eingegangen und anschließend auf die Charakteristika der Primären ZNS-Lymphome.

1.1.1 Klinik

Die Klinik der MS ist variabel ausgeprägt und abhängig von den jeweiligen Läsionsorten. Häufig werden als klinische Symptome motorische und sensorische Funktionsverluste, Schwindel und Gleichgewichtsstörungen sowie Sehstörungen und Blasenfunktionsstörungen genannt (Compston und Coles 2002). Neben körperlichen Einschränkungen leiden MS-Patienten¹ häufig auch unter kognitiven und psychischen Beeinträchtigungen (Smestad et al. 2010). Eine Unterstützung mittels Gehhilfen, entsprechend EDSS 6,0 (Kurtzke 1983), wird bei schubförmigem Verlauf bereits nach acht Jahren und bei progressivem Verlauf nach etwa 13 Jahren beobachtet (Weinshenker et al. 1989; Kremenchutzky et al. 2006; Scalfari et al. 2010).

Es können zwei Gruppen von klinischen Verlaufsformen unterschieden werden: die rezidivierend-schubförmige und die progressive Form. Die progressive Verlaufsform kann je nach Auftreten in primär progressiv, d. h. von Beginn an, oder sekundär progressiv, d. h. erst im Verlauf auftretend, eingeteilt werden. Alle Verlaufsformen können weiter in aktive und nicht aktive Unterformen unterteilt werden. Aktiv bedeutet in diesem Zusammenhang ein Schub bzw. eine Episode mit neurologischen Ausfällen, die sich mindestens teilweise zurückbilden oder radiologisch als T1 Gadolinium-anreichernde Läsion bzw. als T2 neu auftretende oder vergrößerte Läsion in der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) sichtbar werden. Als Progression ist hier eine kontinuierliche neurologische Beeinträchtigung definiert (Lublin 2014).

Am häufigsten verläuft die MS rezidivierend-schubförmig (ca. 85 %), wobei sie mehrheitlich nach einem Zeitraum von etwa zehn bis 20 Jahren in eine sekundär-progressive Verlaufsform übergeht. Deutlich weniger Fälle verlaufen primär-progressiv (ca. 15 %) (Weinshenker et al. 1989; Gelfand 2014). Bei der primär-progressiven Verlaufsform ist das Erkrankungsalter mit durchschnittlichen 40 Jahren etwa zehn Jahre höher als das typische Alter bei Erstmanifestation und es betrifft überdurchschnittlich häufig Männer (Miller und Leary 2007). Zusätzlich gibt es noch das klinisch isolierte Syndrom (CIS), dies stellt die Erstpräsentation eines Patienten mit klinischen Symptomen, die an ein demyelinisierendes Ereignis denken lassen, ohne die zeitlichen und räumlichen Disseminationskriterien zu erfüllen, dar. Das Radiologisch isolierte Syndrom (RIS) hingegen repräsentiert einen Zufallsbefund im MRT in T2-Wichtung mit angereicherten Herden ohne klinische Symptome (Karussis 2014).

1.1.2 Diagnostik

Um die Diagnose Multiple Sklerose stellen zu können, müssen sowohl klinische als auch radiologische Kriterien erfüllt sein. Derzeitig gültig sind die revidierten McDonald-Kriterien von 2017 (Thompson et al. 2018). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine schubförmig-remittierende MS zu diagnostizieren. Als Schub ist eine neurologische Verschlechterung über mindestens 24 Stunden ohne Fieber oder Infektion zu werten. Räumliche Dissemination ist festgelegt

¹ In der vorliegenden Arbeit wird zum Zweck der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Dieses bezieht sich immer zugleich auch auf weibliche und diverse Personen.

durch mindestens zwei T2-Läsionen im MRT folgender Areale: periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder im Rückenmark. Die zeitliche Dissemination kann auf zwei Arten erfüllt werden, entweder durch eine neue T2- oder gadoliniumanreichernde Läsion im Kontroll-MRT oder durch das simultane Vorliegen einer gadoliniumanreichernden und einer nicht kontrastmittelaufnehmenden Läsion.

Bei gleichzeitigem Vorliegen mindestens zweier Schübe und zweier radiologisch nachgewiesenen Läsionen kann man die Diagnose einer MS stellen. Andere Möglichkeiten ergeben sich durch das Vorliegen mindestens zwei klinischer Schübe sowie einer Läsion, wobei hierbei entweder eine räumliche Dissemination oder ein Schub mit einer weiteren Läsion vorliegen können. Ein Sonderfall ergibt sich durch Hinweise auf einen früheren, bisher undokumentierten Schub durch eindeutige anamnestische Aussagen und eine weitere radiologisch nachgewiesene Läsion in Kombination mit zwei Schüben und einer Läsion.

Bei der Kombination von einem Schub und mindestens zwei Läsionen sollte zusätzlich eine zeitliche Dissemination nachweisbar sein, ein weiterer klinisch nachgewiesener Schub oder oligoklonale Banden im Liquor ohne Bestätigung im Serum. Wenn ein Schub und eine Läsion existieren, müssen sowohl die räumliche wie auch zeitliche Dissemination zur Diagnosestellung erfüllt sein, vgl. Thompson et al. (2018).

Zur Diagnosestellung der primär-progressiven Multiplen Sklerose wird eine klinische Befundverschlechterung über mindestens ein Jahr sowie zwei von drei der folgenden Kriterien benötigt: mindestens eine T2-Läsion an typischen Lokalisationen im Gehirn, mindestens zwei T2-Läsionen im Rückenmark und das Vorhandensein oligoklonaler Banden im Liquor, vgl. Tabelle 2 (Thompson et al. 2018).

Der Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor ist für die Diagnosestellung der rezidivierend-schubförmigen MS nicht essenziell, aber seit den revidierten McDonald Kriterien von 2017 ein Zusatzkriterium. Nachweislich weisen 95 % der MS-Patienten oligoklonale Banden aus IgG im Liquor cerebrospinalis auf (Link und Huang 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass Bandenzahl und Bandenintensität mit der Höhe des intrathekalem IgG korrelieren (Kaiser et al. 1995).

Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose								
Anzahl der Schübe	Anzahl der Anzahl der Zusätzlich notwendige Diagnosekriterien							
≥ 2	≥ 2	keine						
≥ 2	1	 räumliche Dissemination im MRT erfüllt oder klinisch nachgewiesener Schub mit einer weiteren Läsion oder historische Hinweise für zurückliegenden Schub aufgrund einer alten Läsion 						
1	≥ 2	 zeitliche Dissemination im MRT erfüllt <u>oder</u> ein weiterer klinisch nachgewiesener Schub <u>oder</u> oligoklonale Banden isoliert im Liquor (nicht im Serum) 						

Tabelle 1: Diagnosekriterien der schubförmigen Multiplen Sklerose

Die Diagnosekritieren entsprechen den überarbeiteten McDonald-Kriterien von 2017 basierend auf Thompson et al. (2018).

Tabelle 2: Diagnosekriterien der primär-progredienten Multiplen Sklerose

Primär-progrediente Multiple Sklerose					
Klinische Symptome Zusätzlich notwendige Diagnosekriterien					
≥ 1 Jahr klinische nicht schub- hafte Behinderungsprogression	 Mindestens 2 der folgenden 3 Kriterien: ≥ 1 T2-Läsion periventrikulär, kortikal/ juxtakortikal oder intratentoriell ≥ 2 T2-Läsionen im spinalen MRT oligoklonale Banden isoliert im Liquor (nicht im Serum) 				

Die Diagnosekritieren entsprechen den überarbeiteten McDonald-Kriterien von 2017 basierend auf Thompson et al. (2018).

1.1.2.1 Rolle der Biopsie für die Diagnostik

Zum Nachweis der MS wird heutzutage nur selten eine ZNS-Biopsie benötigt, diese sollte nur bei fulminanten oder atypischen Verläufen entnommen werden (Gelfand 2014). So sicher die Diagnose einer MS bei Manifestation im typischen jüngeren Erkrankungsalter gestellt werden kann, so schwierig kann es bei der Spätform sein, die im hohen Lebensalter erstmalig auftritt und oftmals ohne eindeutig klinische und radiologische Ergebnisse bleibt. Hier ist eine stereotaktische Biopsie mit anschließender histologischer Befundung zum Ausschluss eines Primären ZNS-Lymphomes (PZNSL) besonders wichtig, da aus der korrekten Diagnose unterschiedliche therapeutischen Konsequenzen folgen (Barrantes-Freer et al. 2018).

1.1.3 Histopathologie

Typische Charakteristika der MS sind entzündlich-entmarkende Läsionen im ZNS, die sowohl weiße als auch graue Substanz betreffen können und mit ausgeprägter Entmarkung, d.h. Myelinverlust bei relativem Axonenerhalt, sowie reaktiver Astrogliose einhergehen (Gold et al. 2005).

1.1.3.1 Inflammation

MS-Plaques können aufgrund bestimmter histologischer Eigenschaften in aktive oder inaktive Läsionen unterteilt werden.

Das entzündliche Infiltrat besteht zum größtem Teil aus Makrophagen und Mikroglia, gefolgt von T-Zellen (Esiri und Reading 1987). Typischerweise übertrifft die Anzahl der T-Zellen die der B-Zellen um etwa ein Zehnfaches, während Plasmazellen in akuten Läsionen nur spärlich anzutreffen sind (Frischer et al. 2009). Dagegen weisen chronische Läsionen eine erhöhte Plasmazelldichte auf (Ozawa et al. 1994). Sowohl CD4- als auch CD8-positive T-Zellen können identifiziert werden. Weiterhin lassen sich, ausgehend von beiden T-Zell-Subtypen, Antwortkaskaden gegen verschiedene Myelinbestandteile, wie das basische Myelinprotein (MBP) nachweisen (Crawford et al. 2004). T-Zellen sind einerseits in der Lage neurotoxisch zu wirken, andererseits sezernieren sie das neuroprotektive Protein BDNF *(brain-derived neurotrophic factor)* (Kerschensteiner et al. 1999; Nitsch et al. 2004). Dieser neurotrophe Faktor konnte ebenfalls in Läsionen von Patienten mit MS nachgewiesen werden (Stadelmann et al. 2002).

Bei entzündlichen ZNS-Ekrankungen dominieren die zytotoxischen T-Zellen erheblich gegenüber den T-Helfer-Zellen, etwa im Verhältnis 3 : 1 (Booss et al. 1983; Hayashi et al. 1988; Babbe et al. 2000). Analog korreliert das Ausmaß der axonalen Schädigung mit der Anzahl der CD8positiven zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen (Lassmann et al. 2001). Durch den Nachweis klonal expandierter CD8-Zellen wird eine Reaktion auf eine lokale Antigenstimulation vermutet (Babbe et al. 2000). Neuere Erkenntnisse weisen auf eine B-Zell-vermittelte Autoproliferation von TH₁-Zellen hin. Die autoreaktiven T-Zellen attackieren wiederum Antigenfragmente auf B-Zellen und in den Hirnläsionen. Dies könnte die Wirkung von anti-CD20-Antikörpern bei MS erklären (Jelcic et al. 2018). Daneben gibt es auch Hinweise für eine immunmodulatorische oder suppressive Funktion von CD8-positiven T-Zellen (Saxena et al. 2011). Allerdings gehen die meisten experimentellen Versuche an Nagetieren von einer CD4-abhängigen Pathogenese der MS aus (Flügel et al. 2001; Simmons et al. 2013). In humanen MS-Läsionen liegen CD4-positive T-Zellen vor allem perivaskulär vor. Bei MS-Fällen wird das Verhältnis von CD4und CD8-positiven Zellen in etwa ausgeglichen (Booss et al. 1983; Gay et al. 1997) oder mit überwiegenden CD8-positiven T-Zellen beschrieben (Sinha et al. 2014). Einleitung

Interessanterweise zeigen sich bei der rezidivierend-schubförmigen Form der MS weitaus mehr Läsionen in der weißen Substanz des Zentralen Nervensystems als bei progressiven Verlaufsformen (Kutzelnigg und Lassmann 2014).

1.1.3.2 Axonale Schädigung und Remyeliniserung

Es gibt verschiedene Marker, die eine axonale Schädigung, wie es bei der MS typisch ist, anzeigen. Die akute axonale Schädigung korreliert am ehesten mit der Anzahl von Makrophagen und Mikroglia (Frischer et al. 2009). Weiterhin zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem axonalen Schaden und der Krankheitsprogression. Histopathologisch lassen sich geschwollene Axone mit perlschnurartigen Verdichtungen und aufgetriebenen Enden nachweisen (Popescu und Lucchinetti 2012). Zartere Axone sind dabei häufiger von einer Zerstörung betroffen als kräftigere Axone (Evangelou et al. 2001). Es gilt zu bedenken, dass das Ausmaß des axonalen Verlusts sowohl interindividuell heterogen als auch in verschiedenen Läsionen eines Patienten stark variieren kann (Prineas et al. 2001).

Neben der axonalen Schädigung kommt es bereits in noch aktiven Läsionen zur Remyelinisierung (Prineas et al. 1993). Auch das Ausmaß der Remyelinisierung stellt sich von Patient zu Patient sehr unterschiedlich dar (Patrikios et al. 2006). Bei chronischen Läsionen findet die Remyeliniserung in Gegensatz zu akuten Herden nur selten und dann v. a. im Randbereich statt. Unklar bleibt, warum die Remyeliniserung nicht suffizient erfolgt (Goldschmidt et al. 2009). Es wird diskutiert, dass dies an einer fehlerhaften Differenzierung der Oligodendrozyten liegen könnte (Kuhlmann et al. 2008b). Zusätzlich konnte eine neuronale Schädigung mit einer Synapsenreduktion nachgewiesen werden (Wegner et al. 2006; Vercellino et al. 2007).

Die graue Substanz des Zentralen Nervensystems unterliegt ebenfalls einigen krankheitstypischen Veränderungen. Auch sie ist von einer Entmarkung betroffen, wobei der Groß- und Kleinhirnkortex am stärksten betroffen sind (Kutzelnigg et al. 2007). Progressive klinische Subtypen zeigen dabei einen höheren Anteil an kortikaler Demyeliniserung als schubförmige Verlaufsformen (Kutzelnigg et al. 2005; Lucchinetti et al. 2011). Zusätzlich weist der Kortex eine globale Atrophie von etwa zehn Prozent gegenüber Gesunden auf (Wegner et al. 2006). Die Veränderungen in der grauen Substanz sind besonders bedeutsam, da gerade die Schädigung in diesem Bereich die meisten Behinderungen von MS-Patienten bedingt (Geurts 2008). Kürzlich wurde ein neuer Subtyp entdeckt, bei dem eine myelokortikale Pathologie ohne Demyelinisierung der weißen Substanz vorliegt; hier herrscht ein größerer neuronaler Verlust im Vergleich zu typischen MS-Fällen (Trapp et al. 2018).

1.1.3.3 Typisierung nach Läsionsalter

Je nach Aktivität und Verlauf können die Läsionen weiter unterteilt werden in aktive und inaktive Läsionen, wobei die aktiven noch genauer beschrieben werden in früh- und spätaktive sowie chronische Läsionen.

Akute aktive Läsionen sind hyperzellulär, es zeigen sich Makrophagen mit zytoplasmatischen Myelingranula, perivenöse entzündliche Infiltrate und eine Demyelinisierung bei relativem Axonerhalt mit reaktiver Astrogliose. Während bei frühaktiven Plaques vor allem das Myelinassozierte Glykoprotein (MAG), das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) und die 2', 3'-zyklische Nucleotid-3'-Phosphodiesterase (CNPase) detektierbar sind, weisen spätaktive Plaques vermehrt das basische Myelinprotein (MBP) sowie das Proteolipidprotein (PLP) auf (Popescu und Lucchinetti 2012). Eine Sonderform bilden die chronisch aktiven Läsionen, die mit einem hyperzellulären Randsaum imponieren, der vorwiegend aus phagozytische Zellen besteht. Sie werden als Korrelat der klinischen Progression angesehen (Prineas et al. 2001).

Bei inaktiven Läsionen dienen leere Vakuolen in Makrophagen als Hinweis für phagozytiertes Myelin (Brück et al. 1995). Weiterhin erscheinen inaktive Läsionen hypozellulär, komplett demyelinisert mit starkem Axonverlust und vorherrschender Astrogliose und weisen eine prominente Läsionsgrenze auf (Popescu und Lucchinetti 2012).

1.1.4 Therapie

Das Ziel aller gegenwärtig zugelassenen Medikamente ist die Entzündungshemmung bzw. deren Modulation. Andere Ansatzpunkte zum Verzögern der progredienten Neurodegeneration, wie beispielsweise eine Verhinderung der axonalen Schädigung oder Förderung der Remyeliniserung werden damit aktuell nicht erfasst. Therapeutisch wird eine Schub- von einer Dauertherapie unterschieden. In der Schubtherapie ist eine hochdosierte intravenöse Methylprednisolonpulstherapie über drei bis fünf Tage die Therapie der ersten Wahl und die Plasmapherese die Therapie der zweiten Wahl. In der verlaufsmodifizierenden Dauertherapie werden in der 2014 ergänzten Leitlinie die medikamentösen Empfehlungen nach klinischer Verlaufsform und Schweregrad unterteilt. Bei der rezidivierend-schubförmigen Form stehen bei der milderen Ausprägung sieben Medikamente der ersten Wahl zur Verfügung (Diemethylfumarat, Glatirameracetat, Interferon-β 1a intramuskulär oder subkutan, PEGyliertes Interferon-β 1a subkutan, Interferon-β 1b subkutan und Teriflunomid) und bei der hochaktiven Form vier verschiedene Wirkstoffe (Alemtuzumab, Daclizumab, Fingolimod, Natalizumab). Bei der sekundär progressiven Verlaufsform ohne Schübe sollte mit Mitoxantron therapiert werden, treten hingegen aufgesetzte Schüben auf, stehen zusätzlich noch zwei Interferonpräparate zur Auswahl (Interferon- β 1a oder 1b subkutan) (DGN 2012). Gemäß der europäischen Leitlinie aus 2018 werden bei Patienten mit sekundär progressiver MS Ocrelizumab und Cladribine sowie bei Patienten mit primär progressiver Form auch Ocrelizumab empfohlen (Montalban et al. 2018).

1.1.5 Differentialdiagnosen

1.1.5.1 Andere demyelinisierende ZNS-Erkrankungen

Zu den Erkrankungen des Formenkreises der MS gehören die Marburg-Krankheit, Balos konzentrische Sklerose, Schilders diffuse Sklerose, die Neuromyelitis optica (NMO) und die Akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) sowie die Tumorsimulierende Multiple Sklerose (sog. tumefactive MS).

Die Marburg-Krankheit ist eine fulminante Verlaufsform der MS, die von Otto Marburg 1906 erstmals beschrieben wurde. Sie weist einen besonders rapiden Krankheitsverlauf auf und führt innerhalb eines Jahres zum Tode (Marburg 1906). Histopathologisch zeigen sich hier vermehrt neutrophile Granulozyten und eine massive Makrophageninfiltration sowie stärkere axonale Destruktion und Nekrose (Bitsch et al. 1999).

Balos konzentrische Sklerose ist eine seltene Variante der MS, die Joseph Balo 1928 als Erster beschrieb (Balo 1928). Die Erkrankung tritt vorwiegend bei Asiaten auf (Tabira 1994). Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen 20 und 50 Jahren und der Krankheitsverlauf ist mehrheitlich monophasisch (Karaarslan et al. 2001). Charakteristisch sind hierbei die konzentrisch angeordneten demyelinisierten Ringe mit aktivierten Makrophagen, die sich mit erhaltenem Myelin abwechseln und so zwiebelschalenartig erscheinen. Das Zentrum ist hierbei der älteste Teil und die Ausbreitung erfolgt zentrifugal (Moore et al. 1985). Neuropathologisch können in frühen Läsionen eine Oligodendrozytenapoptose und ein MAG-Verlust nachgewiesen werden (Stadelmann et al. 2005).

Schilders diffuse Sklerose ist eine durch Paul Schilder 1912 erstmalig beschriebene seltene demylinisierende ZNS-Erkrankung (Schilder 1912). Später wurde die Erkrankung genauer definiert, um Überschneidungen zu anderen Erkrankungsbildern, insbesondere zur Adrenoleukodystrophie, und damit Fehldiagnosen zu vermeiden. Dazu zählen nunmehr symmetrische, demyelinisierte Läsionen bestimmter Mindestgröße, die histologisch den typischen MS-Fällen gleichen. Weiterhin unauffällig erweisen sich das periphere Nervensystem und die Nebennierenrindenfunktion sowie der Lipidstatus (Poser 1985). Vorwiegend scheinen Kinder von der diffusen Sklerose betroffen zu sein (Miyamoto et al. 2006).

Die Neuromyelitis optica (NMO) wurde als erstes durch Thomas Clifford Allbutt im Jahre 1870 beschrieben (Allbutt 1870). Aufgrund der systematischen Beschreibung durch Eugene Devic

als Kombination aus einer Optikusneuritis und transversen Myelitis wird sie auch als Devic-Syndrom bezeichnet (Devic 1894). Man geht heute davon aus, dass die MS und die NMO unterschiedliche Entitäten sind. Bei der NMO konnte eine antikörper-assoziierte Pathogenese nachgewiesen werden (Lennon et al. 2004). Diese Antikörper binden selektiv an Aquaporin-4-Kanäle, die sich an den Endfortsätzen von Astrozyten befinden und sich hochspezifisch für den Nachweis einer Neuromyelitis optica eignen (Lennon et al. 2005). Histologisch ist die NMO durch demyelinisierte Läsionen gekennzeichnet, die nicht nur aus Makrophagen und T-Zellen, sondern auch aus eosinophilen und neutrophilen Granulozyten bestehen (Lucchinetti et al. 2002). Kennzeichnend sind auch eine ausgeprägte axonale Schädigung und ein erheblicher Astrozytenverlust (Lucchinetti et al. 2014). Radiologisch zeigen sich bei der NMO kaum Läsionen im Großhirn, sondern vielmehr im Sehnerv, Rückenmark oder Hirnstamm (Pittock et al. 2006). Des Weiteren ist hier das mehrsegmentale Auftreten im Rückenmark typisch (Wingerchuk et al. 1999).

Die Akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) ist eine monophasisch verlaufende Erkrankung, von der vorwiegend Kinder und junge Erwachsene betroffen sind und die zu einer multifokalen neurologischen Symptomatik mit Ataxie, Enzephalopathie und ggf. Bewusstlosigkeit führt (Hynson et al. 2001). Dem Erkrankungsbeginn geht meist eine Infektion oder Impfung in einem zeitlichen Zusammenhang von Tagen bis Wochen voraus (Jorens et al. 2000; Murthy et al. 2002). Histopathologisch zeigt sich eine perivaskuläre Demyelinisierung mit einem entzündlichen Infiltrat, das sich vornehmlich aus Makrophagen zusammensetzt. Außerdem können in diesen Fällen in Abgrenzung zur klassischen MS keine scharfen Läsionsgrenzen und seltener konfluierende demyelinisierte Areale befundet werden (Hart und Earle 1975; Young et al. 2010).

Die Tumorsimulierende Multiple Sklerose (sog. tumefactive MS) besteht aus verhältnismäßig großen MS-Läsionen, die klinisch und radiologisch Hirntumore imitieren. Sie werden a. e. als Teil des MS-Spektrums angesehen. Histopathologisch gleichen sie klassischen MS-Plaques, können aber teilweise klassische Tumormerkmale wie Hyperzellularität, Kernatypien und Mitosefiguren aufweisen (Lucchinetti et al. 2008).

1.1.5.2 Weitere Differentialdiagnosen

Es gibt einige Konstellationen, bei denen die Diagnosestellung einer Multiple Sklerose überdacht werden sollte, beispielsweise bei allgemeinen Beschwerden wie Müdigkeit und Normalbefunden in neurologischen und neurophysiologischen Untersuchungen, wie z. B. evozierten Potentialen oder Liquoranalysen. Bei für MS untypischen Konstellationen wie dem Vorliegen von schlaffen Paresen in Kombination mit abgeschwächten Muskeleigenreflexen sowie bei einem primär progredienten Krankheitsverlauf bei Patienten unter 35 Jahren ist weitere Diagnostik unerlässlich (Faiss und Wiethölter 2011). Dies gilt ebenfalls bei Patienten, deren Erstmanifestation der MS jenseits des 60. Lebensjahres auftritt (Kis et al. 2008).

Aus histologischer Sicht kommen weitere Erkrankungen als Differentialdiagnose entmarkender Läsionen in Betracht. Dies gilt insbesondere für Infektions-, Autoimmun- und Tumorerkrankungen. Hierzu zählen beispielsweise die Progressive multifokale Leukenzephalopathie, Vaskulitiden, diverse systemische Autoimmunerkrankungen und ZNS-Lymphome.

Die Progressive multifokale Leukenzephalopathie weist riesige, bizarr veränderte Astrozyten und Oligodendrozyten mit hyperchromatischen Nuklei durch Infektion mit dem JC-Virus auf. In demyelinisierten Arealen wird ein vermehrtes Auftreten schaumzelliger Makrophagen beobachtet, teilweise auch mit perivaskulären Infiltraten. Die Erkrankung tritt bei Patienten mit reduzierter Immunabwehr auf. Eine Vaskulitis weist im Gegensatz zur MS histologisch keine Demyelinisierung, dafür nekrotische und thrombotische Gefäßveränderungen auf. Auch systemische Autoimmunerkrankungen, wie der systemischen Lupus erythematodes, zeigen zwar MSähnliche entzündliche Infiltrate, jedoch keine Demyelinisierung (Kuhlmann et al. 2008a).

1.2 Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL)

Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL) sind eine seltene Untergruppe der Non-Hodgkin-Lymphome und kommen im Gehirn, Rückenmark, den Meningen sowie Augen vor (Batchelor et al. 2012). Sie wurden erstmalig von Percival Bailey im Jahre 1929 noch als Untergruppe der Sarkome beschrieben (Bailey 1929). James Henry fand schließlich heraus, dass es sich hierbei um eine im Zentralen Nervensystem lokalisierte Lymphomvariante handelt (Henry et al. 1974). Die PZNSL stellen nur einen Anteil von ca. 2 % aller Hirntumore bzw. 6 % aller malignen Hirntumore dar, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (Ostrom et al. 2015). Die höchsten Inzidenzwerte liegen zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (Batchelor und Loeffler 2006). Weiterhin findet sich ein gehäuftes Vorkommen bei immungeschwächten Patienten. So kann beispielsweise ein erhöhtes Risiko bei Patienten beobachtet werden, die mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind (Coté et al. 1996). Während PZNSL bei immunsupprimierten Patienten mit dem Auftreten des Epstein-Barr-Virus assoziiert sind, kann bei Immunkompetenten ein solcher Zusammenhang nicht nachgewiesen werden (Chang et al. 1993).

1.2.1 Klinik

Im Gegensatz zur MS können auf PZSNL sog. B-Symptome (Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß), eine nicht-MS-typische klinische Symptomatik sowie eine über Monate hinweg

bestehende kontrastmittelaufnehmende Läsion im MRT hinweisend sein (Gelfand 2014). Die klinischen Symptome sind überwiegend unspezifisch und rasch progredient. Am häufigsten treten neuropsychiatrische Symptome, wie Wesensänderungen sowie kognitive Einschränkungen (in 70 % der Fälle), gefolgt von fokal-neurologischen Defiziten (in 50 % der Fälle) auf. Selten zeigen sich bereits bei Diagnosestellung Hirndruckzeichen oder Visusstörungen (von Baumgarten et al. 2018).

1.2.2 Diagnostik

Primäre ZNS-Lymphome sollten von Metastasen bei systemischer Lymphommanifestation abgegrenzt werden; hier erfolgt die zerebrale Metastasierung erst nach einigen Jahren (Lossos et al. 2004). Zum Ausschluss einer systemischen Manifestation werden von einer internationalen Expertengruppe folgende Untersuchungen empfohlen: Palpation aller Lymphknotengebiete, Knochenmarkspunktion, Computertomographie von Hals bis Becken, Sonographie des Hodens, ophthalmologische Spaltlampenuntersuchung, Liquorpunktion inklusive Liquorzytologie und Durchflusszytometrie sowie serologische Testung auf Hepatitis B und C, Epstein-Barr-Virus sowie dem Humanen Immundefizienz-Virus (vgl. Abbildung 1) (Abrey et al. 2005).



Abbildung 1: Diagnosealgorithmus PZNSL nach Abrey et al. (2005)

Die kraniale Kernspintomographie erweist sich als aussagekräftigste Methode der Bildgebung. Morphologisch können sich Lymphome und MS in der MRT-Bildgebung ähneln (Ormsby et al. 1999; Liew et al. 2006). Bildmorphologisch sichtbar sind einzelne (in 65 % der Fälle) oder multiple Läsionen (in 35 % der Fälle) in der kranialen Magnetresonanztomographie, die sich in der T1-Wichtung hypointens und in der T2-Wichtung hyperintens darstellen und nach Gadoliniumgabe homogen kontrastmittelaufnehmend erscheinen. Die Läsionen sind am häufigsten in den Großhirnhemisphären lokalisiert, hier meist periventrikulär, gefolgt von der Thalamus-/Basalganglienregion sowie dem Corpus callosum. Oftmals zeigt sich zudem eine meningeale Beteiligung (Küker et al. 2005a; Küker et al. 2005b).

Laboranalysen aus dem Liquor cerebrospinalis reichen zur definitiven Diagnosestellung nicht aus; hierzu ist eine stereotaktische Biopsie mit histologischer Diagnosesicherung obligat (Scott et al. 2013). Die pathologische Beurteilung erfolgt dann entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation (Harris 2017).

Die PZNSL entstammen fast ausschließlich der B-Zell-Reihe. Die häufigste histologische Entität stellt mit 85 % die diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome dar (Miller et al. 1994). Histopathologisch weisen sie eine hohe Zelldichte mit perivaskulärer Betonung sowie eine hohe Proliferationsrate auf (Ki67 von 70-90 %). Zusätzlich erscheinen je nach Subtyp die B- oder T-Oberflächenmerkmale immunhistochemisch positiv. Die am häufigsten vorliegenden B-Zell-Lymphome exprimieren Pan-B-Zell-Marker, wie CD20, jedoch keine Plasmazellmarker, wie CD138. Bei primären T-Zell-Lymphomen kommen histologisch zusätzlich nekrotische Veränderungen zum Vorschein (Harder et al. 2003; von Baumgarten et al. 2018).

Unter Glukokortikoidtherapie ist in etwa 40 % der Fälle von einer Tumorregression über Wochen bis Monate sowie einer Verbesserung der neurologischen Symptome auszugehen (Pirotte et al. 1997; Mathew et al. 2005). Vor Biopsieentnahme sollte möglichst keine Steroidtherapie erfolgt sein. Wenn eine Steroidtherapie bereits begonnen wurde, sollte diese schnellstmöglich in ausschleichender Dosierung beendet und die Biopsie ein bis zwei Wochen nach erneuter Tumorvergrößerung geplant werden, da eine Steroidtherapie die Diagnose eines Lymphoms verfälschen oder unmöglich machen kann (Porter et al. 2008; Brück et al. 2013). Eine geringe Verzögerung des Therapiebeginns mit Glukokortikoiden ist bei den meisten Patienten im Hinblick auf ihren klinischen Verlauf tolerierbar (Deckert et al. 2014).

1.2.3 Therapie und Prognose

Primäre ZNS-Lymphome sind hochmaligne Tumore mit aggressivem Wachstum. Unter rein symptomatischer Therapie beträgt die Überlebenszeit nur einige Wochen bis wenige Monate, unter adequater Therapie ergibt sich eine Fünfjahresüberlebensrate von etwa 30 % (Shiels et al. 2016). Es konnten einige Prognosefaktoren ermittelt werden, von denen ein hohes Lebensalter und ein schlechter Allgemeinzustand mit einer ungünstigsten Prognose einhergehen (Ferreri et

al. 2003). Gerade aufgrund der schlechten Prognose kann eine zügige Diagnose und Therapie prognoseentscheidend sein.

Die derzeitigen Therapieempfehlungen für Primäre ZNS-Lymphome beruhen auf wenigen prospektiven Studien, da aufgrund der niedrigen Inzidenz keine großen Fall-Kontroll-Studien vorliegen. Onkologische Therapieprinzipien beruhen im Allgemeinen auf den drei Säulen Operation, Chemo- und Strahlentherapie. Die operative Resektion erfolgt bei dieser Tumorentität jedoch nur selten, was möglichweise dem infiltrativen Tumorwachstum und dem guten Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie geschuldet ist. Zwar führt eine perkutane fraktionierte Ganzhirnbestrahlung zur kompletten Remission, jedoch geht dies mit einer hohen Rezidivrate und ohne eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit einher. In Anbetracht der schwerwiegenden Nebenwirkungen, insbesondere der Neurotoxizität, die zu einer Leukenzephalopathie und kortikalen bzw. subkortikalen Atrophie führt, ist die Radiotherapie nur bei Kontraindikation für eine systemische Chemotherapie zugelassen. In den chemotherapeutischen Konzepten ist hochdosiertes Methotrexat der wichtigste Bestandteil, z. T. kombiniert mit anderen Zytostatika und/ oder dem anti-CD20-Antikörper Rituximab. Bei Rezidiven von Patienten, die jünger als 65 Jahre sind, kommt eine myeloablative Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation als potenziell kurative Therapieoption in Frage. Bei älteren Patienten sind die Therapieoptionen oftmals limitiert durch Komorbiditäten und therapieassoziierte Nebenwirkungen (Hoang-Xuan et al. 2015).

1.3 Steroidmitigierte Lymphome (SML)

1.3.1 Einfluss von Steroiden auf Lymphomzellen

Die Wirkung von Glukokortikoiden beruht auf einem starken immunsuppressiven und antiinflammatorischen Effekt (McKay und Cidlowski 1999). Hierbei kommt es zur Apoptose der Lymphomzellen, d.h. einer geordneten Form des Zelltodes (Gametchu 1987). Die therapeutische Verabreichung von Glukokortikoiden führt zu einer raschen Apoptose und damit einhergehendem Verschwinden der malignen Lymphomzellen. Aktivierte T-Zellen scheinen dagegen nicht zugrunde zu gehen (Bashir et al. 1996; Greenstein et al. 2002). Übrig bleiben kaum B-Zellen, sondern unspezifische Veränderungen mit vielen schaumzelligen Makrophagen und T-Zellen, einer reaktiven Gliose sowie einer mittelhohen Proliferationsrate (Ki67 von 20-50 %) (Deckert et al. 2014). Bei begleitender variabler Demyelinisierung bisher ungeklärter Ursache liegt als Differentialdiagnose eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung wie die MS nahe.

1.3.2 Fallberichte über durch Steroide histologisch veränderte Primäre ZNS-Lymphome

Im Jahr 1984 wurde erstmalig ein Fallbericht über einen Patienten veröffentlicht, bei dem nach Steroidgabe nur entzündliches Gewebe in der Biopsie sichtbar wurde und parallel radiologisch die Läsion verschwand. Die Diagnose eines zerebralen Lymphoms konnte hier erst in der Autopsie gestellt werden (Vaquero et al. 1984). Im Jahre 1990 folgten zwei weitere Fallbeschreibungen, bei denen die definitive Diagnose erst in einer zweiten Biopsie festgestellt werden konnte. Bei beiden Beispielen schrumpfte die Tumorgröße CT-morphologisch nach Steroidgabe merklich. Die erste Biopsie ergab jeweils ein uncharakteristisches histologisches Bild: von lysierten Blasten blieben nur mikrozytäre Kavitationen übrig, weiterhin zeigten sich perivaskuläre T-Lymphozyten sowie eine reaktive Gliose. Nach Absetzten der Steroidtherapie vergrö-Berte sich der Tumor jedoch rasch, sodass in einer zweiten Biopsie ein Primäres ZNS-Lymphom nachgewiesen werden konnte (Geppert et al. 1990). Im Laufe der Zeit folgten weitere Kasuistiken von Patienten, bei denen aufgrund von Klinik und Bildgebung eine MS vermutet wurde und sie auf eine Steroiddauertherapie eingestellt wurden, unter der sich ihre Symptome mittelbis längerfristig verschlimmerten. Bei wiederholter Bildgebung in den Folgemonaten konnten dann erneute Kontrastmittelaufnahmen der gleichen Läsion beobachtet werden, was untypisch für die MS ist. Durch Analyse von Hirngewebe und Liquor gelang schließlich der Nachweis maligner Lymphomzellen. Charakteristisch in beiden Fällen war ein höheres Lebensalter sowie eine Steroidabhängigkeit zur Symptomkontrolle (DeAngelis 1990). In einer weiteren Fallbeschreibung von drei Patienten mit vorangegangener Steroidtherapie ergab die initiale Biopsie inflammatorische und/oder demyelinisierende Veränderungen, hier als "sentinel lesions" bezeichnet, die zweite nach Beschwerdeexazerbation und ohne Steroideinfluss dann die Diagnose eines Primären ZNS-Lymphoms (Alderson et al. 1996).

Mehrheitlich handeln die Kasuistiken von älteren Patienten, bei denen erst in der zweiten Biopsie nach Steroidpause ein Lymphom diagnostiziert werden konnte (DeAngelis 1990; Geppert et al. 1990; Alderson et al. 1996; Kuhlmann et al. 2001; Donaghy 2002; Günaydin et al. 2007; Kvarta et al. 2016; Lukas et al. 2018). Daneben gibt es einige ungewöhnliche Fallbeispiele von jüngeren Patienten (Alarcia et al. 2000; Ng et al. 2007; Yang und Wu 2007).

1.4 Fragestellung

Die Diagnose eines Primären ZNS-Lymphoms ist oftmals verzögert, da die Patienten unspezifische klinische und radiologische Befunde aufweisen, so dass wichtige Differenzialdiagnosen nicht ausgeschlossen werden können. Zur definitiven Diagnosestellung eines Primären ZNS- Lymphoms ist die stereotaktische Biopsie mit histopathologischer Begutachtung daher unumgänglich und stellt somit den Goldstandard dar. Bei Patienten, die unmittelbar vor Biopsieentnahme eine Steroidtherapie erhalten, zeigt sich histopathologisch oft eine Kombination aus Demyelinisierung und Inflammation ohne neoplastische B-Zellen, was zur Fehldiagnose einer MS führen kann (Alderson et al. 1996; Giannini et al. 2014; Kvarta et al. 2016). Zusätzlich besteht das Dilemma, dass sowohl demyelinisierende Erkrankungen wie auch Lymphome gleichermaßen klinisch und radiologisch gut auf eine Steroidtherapie ansprechen (Weingarten et al. 1983; Alderson et al. 1996). Eine zeitnahe und korrekte neuropathologische Diagnosestellung ist essenziell, da beide Entitäten unterschiedlicher Therapien bedürfen. Formale Kriterien zur histopathologischen Unterscheidung sind bisher nicht publiziert worden. Neuere Studien zeigen bei steroidanbehandelten Lymphomen eine hohe T-Zell-Infiltration und eine bestimmte Demyeliniserungsart (Brück et al. 2013; Giannini et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde eine direkte Gegenüberstellung von klassischen früh-aktiven MS-Läsionen mit steroidanbehandelten Primären ZNS-Läsionen durchgeführt, um diagnostische Unterscheidungskriterien aufzuzeigen. Einen Schwerpunkt der Arbeit bilden dabei die histopathologischen Unterscheidungsmerkmale.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3: Übersicht zu verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller	Art. Nr.	Zusammensetzung
Acetatpuffer (0,1M)			Essigsäure (99,9 mM) und Natrium-Trihydrat (100 mM) im Verhältnis 3:7 in Aqua bidest, pH 5,2
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma	D15754-10G	
AEC-Entwicklungschromogen			AEC-Stammlösung in Ace- tatpuffer 0,1 M (Verdün- nung 1:15), pH 5,2
AEC-Stammlösung			3-Amino-9 Ethylcarbazol (AEC) (19 mM) in Dime- thylformamid
Ammoniak 32 %	Merck	1.05426.1000	
Aquatex	Merck	1.08562.0050	
Citratpuffer (10mM)			Zitronensäure (5,2 mM) in Aqua bidest., pH 6,0
Citronensäure-Monohydrat	Merck	1.00244.1000	
DAB-Entwicklerlösung			DAB (1.4 mM) und H ₂ O ₂ (13 µM) in PBS
DePeX mounting medium	Serva	18243.01	
Dimethylformamid	Sigma	D158550-1L	
3-3'-Diaminobenzidin-Tetra-hydro- chlorid (DAB)	Sigma	D5637-25G	
Ethylendiamintretaacetat (EDTA)	Fluka	03609-250G	
Entwicklerlösung (Bielschowsky-Versilberung)			Formalin (36 mM), Citro- nensäure (23,8 mM) in Aqua bidest., 2 Tropfen Salpeter- säure (65 %)
Eosin G	Merck	1.15935.0100	
Eosin Färbelösung			Essigsäure (87,5 mM) in Eo- sin-Stammlösung
Eosin Stammlösung			Eosin G (14,5 mM) in Isop- ropylalkohol (70 %)
Essigsäure 100 %	Merck	1.00063.1000	10 % in Aqua dest.
Fast Blue	Sigma	FBS25	
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom	S0115	
Formaldehyd (Formalin) (37 %)	Merck	1.03999.1000	
Isopropanol	Chem So- lute	1182.5000	100 %, 96 %, 70 %, 50 %
Isoxylol			Isopropanol und Xylol im Verhältnis 1:1
Lithiumcarbonat	Merck	1.05680.0250	

Substanz	Hersteller	Art. Nr.	Zusammensetzung
Luxol-Fast-Blue (LFB)-Lösung			LFB (1,4 mM) und Essig- säure (83,8 mM) in Ethanol (96 %)
Luxol-Fast-Blue (Solvent Blue 38)	Clin Tech	80140	
Mayers Hämalaunlösung	Merck	1.09249.0500	1 g Hämalaun in 1000 ml Aqua dest., 0,2 g Nartriumiodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Citronensäure
Natrium-Thiosulfat-Pentahydrat	Merck	1.06516.0500	2 % in Aqua dest.
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	1.06406	
Natrium-Trihydrat	Merck	1.06267.1000	
Perjodsäure	Merck	1.00524.0100	1 % in Aqua dest.
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Appli Chem	A0965,9050	di-Natriumhydrogen-phos- phat wasserfrei (81 mM), Natriumchlorid (136,9 mM), Kaliumchlorid (26,8 mM), Kaliumdihydrogenphosphat (14.7 mM), pH 7.5 ± 0.2
Protease	Sigma	P8038-1G	25 mg Protease in 100 ml Aqua bidest.
Salpetersäure 65 %	Merck	1.00456.1000	<u> </u>
Salzsäure (HCl) 37 %	Merck	1.00317.1000	
Salzsäure (HCl)-Alkohol			1 % in Ethanol
Schiff's Reagenz	Sigma	3952016- 500 ml	
Silbernitrat (AgNO ₃)-Lösung	Carl Roth	9370.2	
Tris-buffered saline (TBS)			Tris-Pufferan (50,1 mM), NaCl (145,4 mM) in Aqua bidest., mit Salzsäure auf pH 7,5 einstellen
Tris-Pufferan	Carl Roth	4855.2	
Tris-EDTA			Tris-Pufferan (110,2 mM) und EDTA (7,6 mM) in Aqua bidest., pH 8,0
Triton 0,1 %	MP	1.800.854.0530	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck	1.08597.1000	
Xylol	Chem So- lute	371.5000	

2.2 Primärantikörper

Tabelle 4: Übersicht zu verwendeten Primärantikörpern

Antikör-	Klon	Markierung	Hersteller	Art. Nr.	Spezies	Verdün-	Vorbe-
per						mang	inununung
CD3	-	T-Zellen	Dako	A0452	Kanin- chen	1:150	Mw Citrat
CD4	-	T-Helferzellen	Zytomed	503- 3350	Kanin- chen	1:50	Mw mit HCl, Blo- ckierung statt H ₂ O ₂ mit 10 % FCS und 0,1 % Tri- ton
CD8	C8/ 144B	zytotoxische T-Zellen	Dako	M7103	Maus	1:50	Mw Citrat
CD20	L26	B-Zellen	Dako	M0755	Maus	1:100	-
CD138	MI15	Plasmazellen	Dako	M7228	Maus	1:50	Mw Tris- EDTA
Ki-67	MIB 1	proliferierende Zellen	Dako	M7240	Maus	1:100	Mw Citrat
Ki-M1P	-	Makrophagen, Mikroglia	Prof. M. R. Parwaresch, Kiel	-	Maus	1:5000	Mw Citrat
MAG (II 35)	-	Myelin-assozi- iertes Gly- koprotein	C. Richter- Landsberg, Oldenburg	-	Kanin- chen	1:500	Mw Citrat
MBP	-	Myelin basic protein	Dako	A0623	Kanin- chen	1:2000	-
MRP14 (AEC)	S36. 48	Migration in- hibitory factor- related protein 14	Acris	BM4026 B	Maus	1:500	Protease
NF200	N 52	Neurofilament 200	Sigma	N0142	Maus	1:400	Mw Citrat

Mw: Mikrowolle

2.3 Sekundärsysteme

Tabelle 5: Übersicht zu verwendeten Sekundärsystemen

Bezeichnung	Konjugiert mit (Klon)	Hersteller	Art. Nr.	Verdünnung
Intestinale Käl- ber Alkalische Phosphatase und monoklonale Maus anti-Alkali- sche Phospha- tase (APAAP)	(monoklonal: Klon AP7/6/7)	Dako	D0651	1:50 in 10 % FCS/TBS
Esel-anti- Kaninchen IgG	Biotin	GE Healthcare	RPN1004	1:200 in 10 % FCS/PBS
Extr. Avidin	Peroxidase	Sigma	E2886-1 ml	1:1000 in 10 % FCS/PBS
Kaninchen-anti- Maus IgG	(polyklonal)	Dako	Z0259	1:50 in 10 % FCS/TBS
Maus-anti- Kaninchen IgG	(monoklonal: Klon MR12/53)	Dako	M0737	1:50 in 10 % FCS/TBS
Schaf-anti- Maus IgG	Biotin	GE Healthcare	RPN1001	1:200 in 10 % FCS/PBS

Tabelle 6: Herstellerdetails der Tabellen 3-5

Hersteller	Ort	
Acris Antibodies GmbH	Herford, Deutschland	
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland	
Biochrom AG	Berlin, Deutschland	
Carl Roth GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland	
Chem Solute - Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen, Deutschland	
Clin Tech Limited	Guildford, Vereinigtes Königreich	
Dako	Glostrup, Dänemark	
Fluka Analytical gehört zu Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland	
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	
MP Biomedicals	Illkirch Cedex, Frankreich	
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland	
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim, Deutschland	
Zytomed Systems GmbH	Berlin, Deutschland	

2.4 Vorbehandlung der histologischen Schnitte

Zunächst werden die bioptisch aus dem Gehirn entnommenen Gewebestücke mindestens 24 Stunden in 3,7%igem Formalin fixiert, über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und schließlich in Paraffin eingebettet. Hierfür wird das Gerät "Excelsior AS Tissue Processor" der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Aus den Paraffinblöcken werden mit dem Mikrotom ca. 1 µm dünne Schnitte hergestellt, die auf einen Objektträger aufgezogen werden. Bevor man mit den histologischen und immunhistochemischen Färbungen beginnen kann, müssen die Schnitte in den wässrigen Zustand zurückgeführt werden. Dies erfolgt durch das Einbringen in eine absteigende Alkoholreihe. Hierzu werden die Paraffinschnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol entparaffiniert. Danach erfolgt das Rehydrieren über die absteigende Isopropanolreihe jeweils drei Minuten in Isoxylol, zweimal in Isopropanol 100 %, danach einmal in Isopropanol 90 %, 70 % und 50 % mit anschließendem Spülen in destilliertem Wasser. Anschließend können die einzelnen Färbungen appliziert werden.

2.5 Histologische Färbungen

2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist eine der am häufigsten verwendete Übersichtsfärbung. Während der saure Hämalaun-Farbstoff basische Strukturen wie den Zellkern, Knorpel, Kalk und grampositive Bakterien blauviolett anfärbt, bildet das basische Eosin alle sauren Bestandteile wie Zytoplasma, Kollagen und Erythrozyten rot ab (Lang 2013).

Nach der in Abschnitt 2.4 beschriebenen Vorbereitung werden die Schnitte für fünf Minuten in Mayers Hämalaun inkubiert und danach mit destilliertem Wasser gespült. Es folgt eine Differenzierung in 1% igem HCl-Alkohol mit anschließendem zehnminütigen Bläuen in fließendem Leitungswasser. Nun werden die Schnitte für fünf Minuten in die Eosin-Färbelösung ibnkubiert und danach erneut mit destilliertem Wasser gespült. Abschließend folgt das Dehydrieren der Schnitte in aufsteigender Isopropanolreihe. Dazu werden die Schnitte kurz in 50 %, 70 % und anschließend 90 % getaucht und dann zweimal für drei Minuten in 100 % Isopropanol. Danach erfolgt die Inkubation für drei Minuten in Isoxylol und schließlich dreimal für drei Minuten in Xylol. Am Ende werden die Schnitte mit DePeX® eingedeckt.

2.5.2 Luxol-Fast-Blue-Perjodsäure-Schiff-Reaktion (LFB-PAS)

Der saure Farbstoff Luxol-Fast-Blue (LFB) färbt die basischen Phospholipide der Myelinscheiden durch eine Säure-Basen-Reaktion leuchtend blau an (Selle 2019). Die graue Substanz wird blaugrünlich angefärbt und die Zellkerne werden blau-violett abgebildet (Lang 2013; Mulisch und Welsch 2015).

Die anschließende Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) stellt einen allgemeinen histochemischen Test auf Kohlenhydrate dar, wobei die Perjodsäure als Oxidationsmittel Hydroxygruppen zu Aldehyden reduziert. PAS-positive Substanzen sind u. a. Polysaccharide, neutrale Glykokonjugate, Glykogen, Kollagen, retikuläre Fasern sowie Basalmembranen und Pilze, die in magentarot leuchten. Die Zellkerne werden blau dargestellt (Mulisch und Welsch 2015).

Die Herstellung erfolgt in zwei Teilschritten. Bei der Luxol-Fast-Blue-Färbung werden die Paraffinschnitte entparaffiniert, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben und bis zum 90%igen Isopropanol rehydriert. In der Luxol-Fast-Blue-Lösung erfolgt die Inkubation in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 60 °C über zwölf Stunden. Am folgenden Tag werden die Schnitte in 90 % Isopropanol getaucht. Nun folgt die Differenzierung durch kurzes Eintauchen und Schwenken in 0,05 % Lithiumcarbonat und 70 % Isopropanol. Nach dem Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser folgt die PAS-Färbung. Dafür werden die Schnitte für fünf Minuten in 1 % Perjodsäure inkubiert, danach werden die Schnitte erst fünf Minuten in Leitungswasser und anschließend gründlich in destilliertem Wasser gespült. Als nächstes werden die Schnitte für 20 Minuten in Schiff'schem Reagenz inkubiert, um danach wieder fünf Minuten mit Leitungswasser gespült zu werden. Dann verbleiben sie zwei Minuten in Mayers Hämalaun und werden anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Es folgt eine Differenzierung der Färbung in 1%igem HCl-Alkohol und Spülen in Leitungswasser. Letztendlich wird die aufsteigende Isopropanolreihe bis einschließlich Xylol durchgeführt, die Schnitte mit DePeX® eingedeckt.

2.5.3 Bielschowsky-Versilberung

Die Bielschowsky-Versilberung stellt eine histologische Färbung dar, bei der durch Silberimprägnierung Neurofibrillen, Axone und Dendriten in schwarz und amyloide Plaques in braun dargestellt werden (Mulisch und Welsch 2015). Das in der Entwicklerlösung enthaltene Formalin, insbesondere seine Gelatine, wirkt der Präzipitation der Silberionen entgegen (Lang 2013). Das umgebende Bindegewebe wird bräunlich-violett angefärbt (Mulisch und Welsch 2015). Durch das Auswaschen mit ammoniakhaltigem Wasser wird die Hintergrundfärbung minimiert (Lang 2013).

Die Herstellung erfolgt nach folgendem Protokoll: Nach der Vorbehandlung, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, folgt eine zwanzigminütige Inkubation in 20% iger Silbernitrat-Lösung. Die Schnitte werden in eine Küvette mit destilliertem Wasser überführt. Zur 20% igen Silbernitrat-Lösung wird tropfenweise 32% iges Ammoniak hinzugegeben und es wird solange gerührt, bis die braune Lösung klar wird. Drei weitere Tropfen werden zugefügt und die Objektträger für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von drei Tropfen Ammoniak in eine Küvette mit zweifach destilliertem Wasser werden die Schnitte darin geschwenkt. Nun werden von der Entwicklerlösung zehn Tropfen in die Silbernitrat-Ammoniak-Lösung hinzugeführt, die Lösung wird umgerührt und zügig über die Schnitte verteilt. Die Reaktion wird mit destilliertem Wasser gestoppt. Es folgte eine zweiminütige Inkubation in 2%igem Natrium-Thiosulfat zur Kontrasterhöhung. Danach werden die Schnitte kurz mit Leitungswasser gespült. Zum Schluss folgt die aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol und das Eindecken mit DePeX®.

2.6 Immunhistochemische Färbungen

In der Immunhistochemie kann man mit spezifischen Antikörpern bestimmte Epitope von Antigenen durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen. So werden je nach gewünschtem Epitop unterschiedliche Antikörper benötigt. Ziel ist es dabei, den Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar zu machen.

2.6.1 Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode

Als Vorbereitung zu dieser Färbung werden die endogenen Peroxidasen und unspezifischen Proteine mit Serum der Spezies geblockt, aus dem der Sekundärantikörper stammt, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Ein Primärantikörper bindet spezifisch an das Antigen auf der Zelloberfläche. Der zugefügte Sekundärantikörper erfüllt zwei Eigenschaften: er bindet am spezifischen Fab-Fragment des Primärantikörpers und ist mit Biotin gekoppelt, um eine Brücke zum Avidin zu gewährleisten. Avidin und Biotin gehen durch eine hohe gegenseitige Affinität sehr leicht eine Bindung ein. Ursächlich für die stärkste bekannte nicht kovalente Bindung zwischen Avidin und Biotin sind elektrostatische Wechselwirkungen (Heitzmann und Richards 1974). Avidin wird als Avidin-Peroxidase-Komplex eingesetzt. Das Avidin hat vier Bindungsstellen, von denen drei mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt sind und eine freie Stelle als mögliche Bindungsstelle zum biotinylierten Sekundärantikörper vorhanden ist. Eine solche Bindung zwischen Biotin und Avidin führt zu einer Amplifikation des Farbsignals um ein Vielfaches, vgl. Abbildung 2.

Das nachfolgend hinzugegebene chromogene Substrat DAB (3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) wird von der Peroxidase oxidiert, während Wasserstoffperoxid reduziert wird. Hieraus resultiert eine Braunfärbung. In einigen Fällen wird als Chromogen abweichend AEC (3-Amino-9- Ethylcarbazol) verwendet, welches nach Oxidation eine Rotfärbung zeigt. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun zur Darstellung der Kernmorphologie (Mulisch und Welsch 2015).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der ABC-Methode: (a) An das ungebunde Antigen (dunkelblau) (b) bindet zunächst der Primärantikörper (grün) und dann (c) der mit Biotin (hellblau) gekoppelte Sekundärantikörper (gelb). (d) An das Biotin bindet schließlich der Avidin-Peroxidase-Komplex (rot, violett). Eigene Darstellung basierend auf Mulisch und Welsch (2015).

2.6.2 Immunhistochemische Einfachmarkierung

Für diese Anfärbung werden gemäß Abschnitt 2.4 vorbereitete Schnitte weiter vorbehandelt. Viele Antigene werden durch die Formalinfixierung strukturell so verändert, dass sie nicht mehr vom Antikörper erkannt werden können. Die Vorbehandlung zur Demaskierung des Antigens gelingt mittels proteolytischer Enzyme bzw. Wärmeapplikation. Diese ist je nach Primärantikörper unterschiedlich, vgl. Tabelle 4.

Bei der Vorbehandlung mit Citrat werden die Schnitte fünfmal drei Minuten in einer Mikrowelle (800 Watt) mit Citratpuffer erhitzt und nach dem Abkühlen der Schnitte folgt der nächste Schritt. Bei CD4 erfolgt die Vorbehandlung in der Mikrowelle mittels Tris-EDTA-Puffer. Bei der Vorbehandlung mit der Protease für die MRP-14-Färbung löst man 25 mg Protease in 100 ml warmem zweifach destillierten Wasser und lässt die Schnitte für fünf Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank (der Firma Memmert) inkubieren. Anschließend werden die Schnitte in zweifach destillierten Wasser gespült und in PBS-Puffer überführt. Zum Blockieren der endogenen Peroxidase werden die Schnitte in 3% iger Wasserstoffperoxid-PBS-Lösung (5 ml H₂O₂ (30 %) und 45 ml PBS) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abweichend wird für CD4 anstelle von reinem FCS hier 10% iges FCS mit 0,1 % Triton zum Blockieren verwendet.

Anschließend werden die Schnitte dreimal in PBS gespült. Um unspezifische Bindungsstellen zu Blockieren erfolgt eine Inkubation mit 10%igem FCS in PBS (1 ml FCS und 9 ml PBS), bzw. in 10%igem FCS mit 0,1 % Triton für CD4, für zehn Minuten. Diese Lösung muss danach lediglich abgeklopft, nicht aber abgespült werden. Anschließend folgt das Auftragen des Pri-

24

märantikörpers in der jeweiligen Verdünnung in 10%iger FCS/PBS-Lösung und seine Inkubation über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Am nächsten Tag folgt nach dreimaligem Spülen in PBS die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper in 10%iger FCS/PBS-Lösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit PBS gibt man Peroxidase-konjugiertes Streptavidin 1:1000 verdünnt in 10%iger FCS/PBS-Lösung dazu und lässt die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Vor dem nächsten Arbeitsschritt wird wieder dreimal mit PBS gespült. Nun folgt das Entwickeln der Schnitte mit dem Entwicklungschromogen DAB (25 mg/ 50 ml PBS) und 20 µl Wasserstoffperoxid (30 %), wobei eine Braunfärbung entsteht, vgl. Abbildung 6. Nur bei der MRP-14-Färbung wird zur Kolorierung AEC-Entwicklungschromogen (4 ml AEC-Stammlösung, 56 ml des Acetatpuffers, 20 µl Wasserstoffperoxid) verwendet, welches eine Rotfärbung hervorruft, vgl. Abbildung 7. Die Gegenfärbung findet in Mayers Hämalaun für 30 Sekunden zur besseren Darstellung der Zellkerne statt. Nach dem Bläuen der Schnitte für zehn Minuten in fließendem Leitungswasser folgt schließlich das Dehydrieren mit der aufsteigenden Isopropanolreihe bis Xylol und letztendlich das Eindecken mit DePeX®.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Einfachmarkierung mittels ABC-Methode und DAB. Dabei kommt es durch Umsetzung des Chromogens DAB durch die Peroxidase zu einer Braunfärbung.



Abbildung 4: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Einfachmarkierung mittels ABC-Methode und AEC. Hier kommt es durch Umsetzung des Chromogens AEC durch die Peroxidase zu einer Rotfärbung.

2.6.3 Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase(APAAP)-Methode

Mit dieser Methode kann man durch eine Signalverstärkung die Sensitivität des Nachweises der Antigen-Antikörper-Reaktion erhöhen und die Hintergrundfärbung minimieren. Dabei wird über Primär- und Sekundärantikörper der Alkalische-Phosphatase-anti-Maus-Alkalische-Phosphatase-(APAAP)-Komplex gebunden, vgl. Abbildung 5. Bedeutsam ist, dass die Antikörper des Enzymkomplexes aus der gleichen Spezies wie der Primärantikörper stammen. Da in einem Komplex drei aktive Enzym-Moleküle vorhanden sind, die folglich mehrere Substrate umsetzen können, wird eine Signalverstärkung erreicht (Lang 2013; Mulisch und Welsch 2015).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der APAAP-Methode. An das Antigen (dunkelblau) bindet über den Primärantikörper (grün) der Sekundärantikörper (gelb). Letzterer bildet die Brücke zum Alkalische-Phosphatase-Amplex (braun). Eigene Darstellung basierend auf Mulisch und Welsch (2015).

2.6.4 Immunhistochemische Doppelmarkierung für die Ki67-CD3-Doppelfärbung

Die praktische Durchführung der immunhistochemischen Doppelmarkierung gliedert sich in zwei Teile. Während die Färbung mit Ki67 auf Grundlage der ABC-Methode erfolgt, wird die CD3-Färbung mittels APAAP-Methode durchgeführt.

Nach Vorbereitung der Schnitte gemäß Abschnitt 2.6.2 wird der Primärantikörper Ki67 in einer Verdünnung von 1:100 in FCS/PBS aufgetragen und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach Spülen mit PBS wird der biotinylierte Schaf-anti-Maus-Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 10%iger FCS/PBS aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird der Schnitt kurz in PBS gespült. Dann wird mit Peroxidase konjugiertes Streptavidin in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 1 ml DAB-Lösung in 49 ml PBS und 25 µl 30%iges Wasserstoffperoxid aufgetragen. Die DAB-Reaktion kann nun für ca. fünf bis zehn Minuten unter visueller Kontrolle ablaufen. Schließlich werden die Schnitte in destilliertem Wasser und dann in TBS-Puffer gespült, vgl. Abbildung 6.

Die CD3-Markierung startet mit dem Auftragen des Antikörpers in der Konzentration 1:150 in 10% iger FCS/TBS-Lösung, der über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird mit TBS gespült und das Maus-anti-Kaninchen IgG mit 1:50 Verdünnung in 10% iger FCS-TBS-Lösung für eine Stunde inkubiert, kurz mit TBS gespült und weiter mit dem Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper in der Konzentration 1:50 in 10% iger TBS-FCS-Lösung ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren TBS-Spülvorgang wird nun der Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase(APAAP)-Komplex in einer Verdünnung von 1:50 in eine 10% iger FCS/TBS-Lösung hinzugefügt, der wiederum über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von erneutem Spülen mit TBS. Überschüssige APAAP-Komplexe werden mit TBS abgespült und die Farbentwicklung mit Fast Blue erfolgt unter mikroskopischer Kontrolle. Schließlich werden die Schnitte kurz in Hämalaun-Lösung getaucht und dann für zehn Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut und aus der wässrigen Phase mit dem Eindeckmittel Aquatex® eingedeckt, vgl. Abbildung 6.


Abbildung 6: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Doppelmarkierung mit Ki67 und CD3. Die CD3-Färbung erfolgt mittels der APAAP-Methode (**links**). Über einen Primärantikörper aus der Maus erfolgt eine Bindung an das CD3-Antigen aus dem Kaninchen. Der erste Sekundärantikörper stammt aus dem Kaninchen und ist gegen den murinen Primärantikörper gerichtet. Der zweite Sekundärantikörper stammt aus der Maus und ist gegen den ersten Sekundärantikörper aus dem Kaninchen gerichtet. An ihm bindet schließlich der murine APAAP-Komplex. Der Antikörper Ki67 wird nach der ABC-Methode eingebracht (**rechts**). Über die Verbindung zwischen Streptavidin und der biotinylierten Peroxidase enstehen Komplexe, bei denen das Chromogen DAB durch die Peroxidase umgesetzt eine Braunfärbung hervorruft.

2.7 Immunhistochemische Marker

2.7.1 Cluster of differentiation 3 (CD3)

Der CD3-Antikörper markiert sowohl physiologische als auch pathologische T-Zellen. CD3 ist der Teil des T-Zell-Rezeptorkomplexes, der für den Ablauf der biochemischen Signalwege wichtig ist, während das α:β-Heterodimer des T-Zell-Rezeptors für die Antigenerkennung und -bindung des MHC-Liganden verantwortlich ist. T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei Entzündungsreaktionen.

2.7.2 Cluster of differentiation 4 (CD4)

Bei CD4 handelt es sich um ein Glykoprotein aus vier immunglobulinähnlichen Domänen, die über eine Transmembrandomäne verankert sind. Die CD4-Markierung befindet sich auf der Oberfläche von T-Helferzellen sowie auf einigen Monozyten und Makrophagen (Kenneth 2012). Die T-Helferzellen kann man weiter untergliedern in TH₁ und TH₂, wobei TH₁ über Interleukin-2 und Interferon-γ die zelluläre Immunabwehr stimuliert, während TH₂über Interleukin-4 und -5 die humorale Immunantwort anregt (Coffman et al. 1988). Bei MS-Patienten zeigt sich eine TH₁-dominierende Reaktion (Crawford et al. 2004). Neben der Funktion als KoRezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle dient CD4 auch als Rezeptor für das HI-Virus (Kenneth 2012).

In der Immunhistochemie wird CD4 zum Nachweis von T-Zell-Lymphomen verwendet, da die meisten T-Zell-Lymphome von T-Helferzellen ausgehen (Leong et al. 2003). Die T-Helferzellen sind beim PZNL signifikant erhöht (Bashir et al. 1996). Auch im Kontext entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise der MS, liegt CD4 erhöht vor (Christensen et al. 2013). Der Anteil der CD4-positiven T-Zellen ist bei MS-Patienten deutlich erhöht und lässt sich in folgende Subpopulationen untergliedern: INF-γ-produzierende T-Helferzellen-Klasse-1 und IL-17 produzierende T-Helferzellen-Klasse-17 (Dardalhon et al. 2008).

2.7.3 Cluster of differentiation 8 (CD8)

Der CD8-Antikörper ist ein Marker für zytotoxische und suppressorische T-Zellen. Es handelt sich hierbei vom Aufbau her um ein mit Disulfidbrücken vernetztes transmembranes Glykoprotein, das als Ko-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle dient. Stereochemisch ist CD8 ein Heterodimer, bestehen aus einer α - und einer β -Kette, die kovalent über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Kenneth 2012).

CD4- und CD8-positive T-Zellen lassen sich in MS-Plaques nachweisen (Traugott et al. 1983). Das Verhältnis wird dabei als ähnlich bzw. zugunsten der CD8-positiven T-Zellen beschrieben, vgl. Abschnitt 1.1.3.1.

Die CD8-positiven T-Zellen bei PZNSL-Patienten lassen sich im ZNS in wesentlich geringerer Anzahl nachweisen als bei systemischer Lymphommanifestation (Bashir et al. 1996). Histopathologisch zeigen sich im Hirngewebe der PZNSL-Patienten mehrheitlich CD3- und CD8-positive, seltener jedoch CD4-positive T-Zellen (Menon et al. 2015).

2.7.4 Cluster of differentiation 20 (CD20)

Der CD20-Antikörper hilft zur B-Zell-Identifizierung. Das CD20-Antigen ist ein transmembranöses, nicht glykosyliertes Protein, wobei der Antikörper an ein zytoplasmatisches Epitop bindet. Das CD20-Antigen wird auf reifen B-Zellen und ihren Vorläuferzellen exprimiert, allerdings nicht auf den ausdifferenzierten Plasmazellen. Es wird vermutet, dass das CD20-Antigen den transmembranösen Kalziumfluss reguliert; daher wird ihm eine Rolle bei der B-Zell-Proliferation zugeschrieben (Tedder und Engel 1994). In Skelettmuskelzellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass CD20 als Transmembranprotein als speichergesteuerter Kalziumkanal vor allem bei der Aufnahme von Kalziumionen beteiligt ist (Parolini et al. 2012). Mithilfe des Anti-CD20-Antikörpers Rituximab konnte das Therapieergebnis von Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen wesentlich verbessert werden (Kubuschok et al. 2015). Eine AntiCD20-Therapie bei MS offenbarte einen Rückgang an aktivierten Mikroglia und eine Verkleinerung der Läsion, woraus man schlussfolgern kann, dass B-Zellen – auch ohne Auto-Antikörperproduktion – eine wichtige Rolle bei der Läsionsentstehung der MS zuzuschreiben ist (Anthony et al. 2014; Hauser 2015).

2.7.5 Cluster of differentiation 138 (CD138)

Der CD138-Antikörper, auch Syndecan-1 genannt, ist ein Transmembranmolekül, das in der Membran von Plasmazellen und in anderen späten Stadien der B-Zelldifferenzierung exprimiert wird. Es besteht aus Heparansulfaten und bindet an Kollagen Typ I (Kenneth 2012). Bei malignen Veränderungen der Epithelien liegt CD138 verringert vor (Inki und Jalkanen 1996). Es wird u. a. zur Diagnostik des multiplen Myeloms (Jourdan et al. 1998) und von HIV-assoziierten Lymphomen verwendet (Carbone et al. 2001). Diffus-großzellige B-Zell-Lymphome können auch positiv für CD138 sein (Alapat et al. 2015).

2.7.6 Myeloid-related Protein 14 (MRP14)

Das "Myeloid-related protein 14" (S100A9) ist als proinflammatorisches Protein im Zytosol von myeloiden Zellen zu finden, v. a. in neutrophilen Granulozyten (Wache et al. 2015). Ebenso können durch MRP14 frühaktive, also gerade erst stimulierte Makrophagen und Monozyten nachgewiesen werden (Bitsch et al. 1998). Daher kann man MRP14 in akuten, nicht aber in chronischen entzündlichen Läsionen nachweisen (Bhardwaj et al. 1992). Nicht nur bei Entzündungsreaktionen, sondern auch bei Neoplasien wird MRP14 vermehrt exprimiert, was eine entscheidende Rolle bei entzündungsbedingten Karzinomen vermuten lässt (Gebhardt et al. 2006). Während MRP14 als valider histopathologischer Marker gilt, korreliert der MRP14-Level im Serum nicht mit der Läsionsaktivität bei der schubförmig-remittierenden MS (Floris et al. 2004).

2.7.7 Ki-67

Das Ki-67-Antigen ist ein nukleäres Protein, das als Proliferationsmarker genutzt werden kann, da es in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, d.h. in G1-, S-, G2- und M-Phase, nicht jedoch in ruhenden Zellen (Gerdes et al. 1984). Ebenso fehlt Ki67 bei Zellen, die sich im Reparationsstadium und in der G0-Phase befinden (Key et al. 1994). Der Ki67-Antikörper färbt die Zellkerne, außer bei mitotischen Zellen, bei denen die Chromosomen und das Zytoplasma koloriert werden (Scholzen und Gerdes 2000). Normales Gehirngewebe zeigt bei Zugabe des Antikörpers eine negative Reaktion. Bei proliferativer Zellaktivität kann somit im Gehirn auf eine Neoplasie geschlossen werden (Cattoretti et al. 1992). Ki67 eignet sich gut zur Diagnose von Tumoren des Gehirns wie Astrozytomen (Thotakura et al. 2014) und Lymphomen (Hashmi

2.7.8 Ki-M1P

Ki-M1P ist ein monoklonaler Antikörper für Mikroglia und zerebrale Makrophagen. Mithilfe dieses Antikörpers ist es möglich, physiologische von pathologischen Reaktionsformen und neoplastischen Varianten des Makrophagen- und Mikrogliasystems abzugrenzen (Radzun et al. 1991). Bei Meningeomen, Schwannomen oder Glioblastomen können Kreuzreaktionen auftreten, daher sind die Ergebnisse bei neoplastischen Präparaten kritisch zu hinterfragen (Paulus et al. 1992). Die Mehrheit der Mikrogliazellen und Makrophagen in MS-Läsionen ist Ki-M1P-positiv.

2.7.9 Neurofilament 200 (NF200)

Neurofilamente sind als Intermediärfilamente im neuronalen Gewebe definiert und bestehen aus fünf Subtypen: den leichten, mittleren und schweren Neurofilamentproteinen, α -Internexin und Peripherin. Neurofilamente lassen sich in ihrer phosphorylierten Form vorzugsweise in den Axonen antreffen, während sie in der dephosphorylieten Variante im Zellkörper und den Dendriten lokalisiert sind (Laser-Azogui et al. 2015). Mit NF200 kann man eindeutig demyelinisierte Axone, wie bei typischen MS-Läsionen detektieren, da in solchen Regionen eine deutliche Hyperphosphorylierung des Neurofilaments feststellbar ist (Gray et al. 2013).

2.7.10 Basisches Myelinprotein (MBP)

Das basische Myelinprotein ist ein Hauptbestandteil des kompakten Myelins im ZNS (Harauz et al. 2004). Es komprimiert durch seine Adhäsionskräfte die Myelinschichten und ist möglicherweise an der Integration extrazellulärer Signale beteiligt (Boggs 2006). Durch anti-MBP-Antikörper können myelinreiche von demyelinisierten Arealen, wie beispielsweise bei der MS, unterschieden werden (Rozenblum et al. 2014). Bei MS ist vermehrt morphologisch verändertes Myelin zu beobachten (Bando et al. 2015). Das basische Myelinprotein ist hierbei ein dynamischer Bestandteil des Myelins, das den Myelinaufbau und -umbau beeinflusst und somit bei Fehlstrukturierung in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen könnte (Vassall et al. 2015).

2.7.11 Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG)

Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) ist ein Bestandteil der Plasmamembran in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen (Salzer et al. 1987). Das MAG reguliert den Myelindurchmesser durch Phosphorylierung verschiedener Proteine (Nguyen et al. 2009) und sorgt für den Zusammenhalt der Myelinschichten (Schnaar und Lopez 2009). In MS-Läsionen ist der Anteil an MAG um mehr als die Hälfte reduziert (Möller et al. 1987). Der Einfluss von MAG auf die Myelinisierung wird kontrovers diskutiert: so gibt es Anhaltspunkte, dass MAG die axonale Degeneration inhibieren (Nguyen et al. 2009), aber auch Hinweise, dass es die axonale Regeneration nach einer Myelinreduktion behindern könnte (Schnaar und Lopez 2009).

2.8 Patientenauswahl

Die histologischen Schnitte stammen aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen und sind im Zeitraum von Januar 2006 bis Dezember 2014 akquiriert worden. Es wurden vier separate Patientenkohorten mit folgenden Bezeichnungen gebildet: steroidmitigierte Lymphome (SML), steroidunbeeinflusste Lymphome (SUL), Multiple Sklerose (MS) und Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL) vom diffus-großzelligen Typ der B-Zell-Reihe.

In die Gruppe der steroidmitigierten Lymphome (SML) wurden nur solche Patientien eingeschlossen, bei denen mindestens zwei aufeinanderfolgende ZNS-Biopsien entnommen wurden. In allen Fällen erfolgte vor der ersten Biopsie eine Therapie mit Kortikosteroiden und es wurde neuropathologisch ein entzündlicher oder entzündlich-demyelinisierender ZNS-Prozess beschrieben. Die zweite und zeitlich spätere Biopsie wurde ohne vorherige Steroidtherapie akquiriert; hier zeigte sich nun ein Primäres ZNS-Lymphom, regelhaft vom diffus-großzelligen Typ. In diese Gruppe wurden acht Patienten inkludiert, wovon drei männlich und fünf weiblich waren.

In die Kohorte der SUL-Gruppe wurden nur solche Patienten eingeschlossen, die ebenso wie die SML-Gruppe vor Biopsie-Entnahme eine therapeutische Intervention mit Kortikosteroiden erhalten hatten. Hier zeigte sich aber in der ersten und einzigen Biopsie histologisch direkt ein primäres ZNS-Lymphom - trotz vorangegangener Steroidtherapie. In diese Gruppe konnten fünf Patienten eingeteilt werden, wovon vier männlich und eine weiblich waren.

Die Kohorte der MS-Patienten bestand aus neun Fällen mit histologisch eindeutigen und charakteristischen frühaktiven MS-Läsionen. Das Geschlechterverhältnis betrug hier vier Männer zu fünf Frauen.

In die vierte Gruppe, die der Primären ZNS-Lymphompatienten, wurden Patienten mit eindeutigen zerebralen Lymphommanifestationen mit histologisch angrenzbarem Läsions- und Randbereich ohne unmittelbar vorausgegangene Steroidtherapie inkludiert. In diese Gruppe konnten sechs Patienten, darunter ein Mann und fünf Frauen, eingeteilt werden.

Das Vorhaben wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Göttingen mit der Antragsnummer 19/9/10 genehmigt.

Weitere Details zu den klinischen Ergebnissen der einzelnen Gruppen finden sich in Abschnitt 3.1.

2.9 Bildaufnahmen und -bearbeitung

Die kolorierten mikroskopischen Übersichtsaufnahmen wurden am invertierten Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop der Firma Keyence vom Typ "BZ-9000E" mit 10-facher und 20facher Vergrößerung im "*Brightfield-Channel*"-Modus des "BZ-II-Viewers", Version 2.2, von Keyence aufgenommen. Anschließend wurden die Einzelbilder mithilfe des "BZ-II-Analyzers", Version 2.2, von Keyence zu einem Mosaikbild zusammengefügt. Auf diesen Übersichtsaufnahmen wurde die Zelldichte in Zellen/mm² bestimmt. Dabei wurde die absolute Zellzahl innerhalb der Läsion per Hand mithilfe des "Cell Counter Plugins" des Open-Source-Programms Fiji (Schindelin et al. 2012) in der Version 1.49g gezählt, vgl. Abbildung 7 und durch die Gesamtläsionsfläche geteilt.

Die mikroskopischen Detailaufnahmen stammen vom Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Olympus vom Typ "BX51" mit der Kamera "DP71" in 100-facher bis 1000-facher Vergrößerung. Die korrespondierende Computersoftware hierzu stellte "Cell Sens Dimension", Version 1.7.1, dar. Zur Erstellung von Bildtafeln wurde das Grafik-Programm "CorelDRAW X3", Version 13.0.0.739, verwendet.



Abbildung 7: Ausschnitt einer repräsentativen Aufnahme für die Zellzählung mit dem Programm Fiji. Es zeigt CD3-positive T-Zellen, die mit türkisfarbenen Punkten markiert wurden.

Zur Messung der axonalen Dichte wurde in der Bielschowsky-Versilberung exemplarisch an acht Punkten des histologischen Präparates mithilfe eines 25-Felder-Gitternetzes bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt. Hier wurde die Anzahl der Axone ermittelt, die durch das Gitternetz verliefen - sowohl innerhalb als auch außerhalb der Läsion. Der Mittelwert der Axone außerhalb der Läsion wurde als 100 % festgesetzt. Davon ausgehend wurde die axonale Reduktion in Prozent berechnet, indem die axonale Dichte innerhalb der Läsion durch die außerhalb der Läsion dividiert wurde.

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm "GraphPad Prism 6" der Firma Graph Software in der Version 6.01. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt. Zum Zelldichtevergleich zwischen zwei Gruppen wurden t-tests für unverbundene Stichproben verwendet. Bei Vergleichen zwischen drei Gruppen, z. B. im Hinblick auf Altersunterschiede, wurde eine "One-Way-ANOVA" verwendet. Im Vergleich mehrerer Gruppen untereinander wurde die post-hoc-Analyse nach Tukey angewandt. Die Zahlenwerte entsprechen, sofern nicht anders deklariert, dem Mittelwert ± der Standardabweichung (SD).

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Angaben

Die speziell untersuchten klinischen Angaben umfassten bei den Patienten mit steroidmitigiertem Lymphom und der Patientenkohorte mit steroidunbeeinflusstem Lymphom insbesondere das Patientenalter bei Diagnosestellung, die Art und Dauer der Steroidtherapie, die klinischen Erstsymptome und Lokalisation der Läsion, die Verdachtsdiagnose sowie die neuropathologischen Befunde. Bei den klassischen MS-Patienten wurde außerdem das Vorhandensein von oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor, vgl. Abschnitt 1.1.2, untersucht. Bei den PZNSL-Patienten waren insbesondere das Alter bei Diagnosestellung und die Verdachtsdiagnose für die Gegenüberstellung entscheidend.

3.1.1 Patientenkohorte steroidmitigierte Lymphome

Die untersuchte Kohorte der steroidmitigierten Lymphompatienten bestand aus insgesamt acht Patienten, wobei das Verhältnis von Männern zu Frauen drei zu fünf und das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 59,5 Jahre (SD \pm 4,8) betrug.

Ihre klinischen Erstsymptome reichten von unspezifischen Anzeichen wie Kopfschmerzen, Schwindel oder Schmerzen bis hin zu schweren neurologischen Ausfällen, wie Schwäche einzelner Extremitäten (n = 3), Hemiparese (n = 2), Sehstörungen, Aphasie und Vigilanzminderung. Alle bis auf einen Patienten dieser Kohorte erhielten vor der ersten Hirnbiopsie eine Steroidtherapie in unterschiedlicher Dosis und Dauer. Ein Patient erhielt vor der zweiten Biopsie eine Steroidtherapie, hier erfolgte jedoch noch eine dritte Biopsie ohne Steroideinfluss, so dass bei diesem Patienten der Zeitraum zwischen zweiter und dritter Biopsie zur Analyse herangezogen wurde.

Die Läsionsorte stellten sich als variabel dar, wobei die frontale Hemisphäre am häufigsten betroffen war (n = 4). Läsionen konnten aber auch in den Stammganglien, dem Cerebellum oder thorakalen Rückenmark (mit je n = 1) lokalisiert sein. Bei zwei Patienten waren multiple Läösionen vorhanden (vgl. Tabelle 7).

Im überwiegenden Teil der Fälle (n = 5) wurde als klinische Verdachtsdiagnose bereits ein Lymphom vermutet. Daneben wurden entzündlich-demyelinisierende ZNS-Prozesse wie MS und ADEM (n = 2) sowie rein inflammatorische ZNS-Erkrankungen wie Vaskulitis und Enzephalitis (n = 1), aber auch neoplastische Veränderungen wie Gliome und Metastasen differentialdiagnostisch in Betracht gezogen (n = 2).

Monate zwischen Biopsien	1	2	8	1	Ŋ	1	unbekannt	0
Neuropathologische Diagnose	 Bx: Destruktiver entzündlich entmarkender ZNS- Prozess, Bx: Sentinel levion, hochmalignes B-Zell-Lymphom 	 Bx: T-und B-zellreicher ZNS-Prozess. A. e. steroid- mitigiertes Lymphom DD Vaskulitis Bx: Lymphom 	1. Bx: entzündlich entmarkender ZNS-Prozess, 2. Bx: B-Zell-Lymphom, diffus-großzelliger Typ	 Bx: T'-zellreicher ZNS-Prozess, Bx T-zellreiche Meningoenzephalitis und akuter ent- zündlicher ZNS-Prozess, vereinbar mit Wundheilstö- rung DD steroidmitigiertes Lymphom 	 Bx: entzündlich entmarkender ZNS-Prozess, Bx: ZNS-Gewebe mit diskreten reaktiven Verände- rungen, Bx: diffüs großzelliges B-Zell-Lymphom 	 Bx: entzündlich entmarkender ZNS-Prozess wie MS, Bx: intrazerebrales malignes Non-Hodkin-Lymphom der B-Zell-Reihe 	 B.x: entzündlich destruktiv entmarkender ZNS-Pro- zess DD steroidmitigiertes Lymphom, B.x: Lymphom 	 Bx: Weiße Substanz mit Demyelinisierung und aus- geprägter T-Zellinfiltration, wie steroidanbehandeltes Lymphom FACS: Lymphom
Steroidtherapie (Medikament in Tagesdosis //Dauer)	Prednisolon (40 mg/4 Tage), Dexamethason (12 mg/3 Tage)	Methylprednisolon (2 g/7 Tage)	Ja (n.b.)	Prednisolon (40 mg/4 Tage), Dexamethason (4 mg/3 Tage)	Ja, vor 2. Bx	Ja (n.b.)	Ja (n.b.)	Dexamethason (12 mg) bis 7 Tage vor Bx
Verdachtsdiagnose	Lymphom	ADEM	MS	Lymphom DD Gliom	Lymphom	Metastase DD Lym- phom	Nekrotisierende En- zephalitits DD lym- phozytäre Vaskulitis	Lymphom
Läsionsort	Stammganglien links	frontotemporal links, thorakales Myelon	hypodense Marklagerverän- derung links	okzipito- parietal links	frontal rechts (Bx)	multipel, Biopsie rechts frontal	frontales Mark- lager	multiple supra- u. infratentori- elle, wenig peri- ventrikulär
Klinische Erstsymptome	Hemiparese rechts, Teilaphasie	Schmerzen thorako- lumbal, Schwäche des linken Beins,	epileptischer Anfall	Kopfschmerzen, Schwindel, Sehstörungen; im Verlauf Hemiparese, Vigilanzminderung	unbekannt	unbekannt	unbekannt	Gangunsicherheit, Armparese links
Alter (Jahre)	63	46	61	56	74	52	42	82
Pat. Nr.	7	2	3	4	2	9	L	8

Tabelle 7: Übersicht zur Patientenkohorte mit steroidmi	tigiertem	Lymphom
---	-----------	---------

Bx = Biopsie, n.b. = nicht bekannt

In allen Fällen wurde in der initialen Biopsie histologisch ein entzündlicher oder entzündlichdemyelinisierender ZNS-Prozess beschrieben, z. T. mit destruktiven Anteilen, vgl. Tabelle 7.

Unter klinischer Verschlechterung wurde bei sieben von acht Patienten im Mittel nach einem Zeitraum von 2,6 \pm 1,1 Monaten eine zweite stereotaktische Biopsie veranlasst, diesmal ohne vorherige Steroidgabe. In der folgenden Biopsie wurde dann bei allen Patienten ein intrazerebrales malignes B-Zell-Lymphom festgestellt, vom diffus-großzelligen Typ, vgl. Tabelle 7. In einem Fall konnte die Diagnose des Lymphoms zusätzlich durchflusszytometrisch gesichert werden, so dass bei allen acht Patienten ein Lymphom diagnostiziert werden konnte.

3.1.2 Patientenkohorte steroidunbeeinflusste Lymphome (SUL)

Mit der SUL-Gruppe wurde eine weitere Kohorte von fünf Patienten untersucht, bei denen in der ersten Hirnbiopsie im Gegensatz zur SML-Kohorte trotz Steroidtherapie ein Primäres ZNS-Lymphom eindeutig nachweisbar war.

Das Geschlechterverhältnis in dieser Kohorte betrug vier Männer zu einer Frau und das Durchschnittsalter 67,8 Jahre (SD \pm 5,3). Die temporale Region stellte die häufigste Lokalisation dar (n = 2). In allen Fällen wurde ein Lymphom diagnostiziert, siehe Tabelle 8.

Histopathologisch zeigten sich auch hier ein ausgeprägtes T-Zell-Infiltrat, vgl. Abbildung A. 1, und Anzeichen einer Demyelinisierung, vgl. Abbildung A. 2.

Pat. Nr.	Alter (Jah- re)	Klinische Erstsymptome	Läsionsort	Klinische Verdachts- diagnosen	Steroid- therapie (Medi- kament/ Dauer)	Neuropathologische Diagnose
9	76	unspezifisch: Kopfschmerzen, Schwindel, Zittern in den Armen	periventrikulär links (balken- nah)	Lymphom	ja	steroidanbehandeltes malignes Non-Ho- dgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe, diffus großzelliger Typ
10	53	Schwindel	multifokal	Lymphom	ja (Predniso- lon)	Malignes Non-Ho- dgkin-Lymphom der B-Zellreihe, diffus großzelliger Subtyp
11	83	unbekannt	temporal rechts	Lymphom, Glioblastom, entzündliche Läsion	ja (hochdo- siert 3 Tage vor Biopsie)	steroidmitigiertes Lymphom
12	62	unbekannt	temporal links	Lymphom	ja	diffus großzelliges B- Zell-Lymphom
13	65	Hemiparese rechts	paratrigonal links	ZNS-Lym- phom	ja (mehrtä- gig)	T-Zellinfiltrat, apopto- tische B-Zellen, Re- sorption vereinbar mit steroidmitigiertem Lymphom

Tabelle 8: Übersicht zur Patientenkohorte mit steroidunbeeinflusstem Lymphom

3.1.3 Patientenkohorte Multiple Sklerose

Zum Vergleich mit der SML-Kohorte wurden MS-Patienten ausgewählt, deren Erstdiagnose vor dem 40. Lebensjahr gestellt wurde, um typische Fälle mit Erkankungsbeginn im jungen Erwachsenenalter zu untersuchen. In diese Kohorte wurden neun Patienten eingeschlossen, deren Geschlechterverhältnis vier Männer zu fünf Frauen betrug. Der Altersdurchschnitt lag bei 30 Jahren (SD \pm 2,2). Damit waren die MS-Patienten signifikant jünger im Vergleich zu allen anderen untersuchten Kohorten (SML-, SUL- und PZNSL-Patienten), vgl. Abbildung 8.

Die klinischen Erstsymptome präsentierten sich vielfältig; bemerkenswert häufig wurden eine Hemiparese (n = 3) und kognitive Defizite (n = 2) beobachtet. Bei zwei Patienten war die Erkrankung zum Zeitpunkt der Biopsie bereits bekannt. In vier Fällen konnten oligoklonale Banden im Liquor cerebrospinalis der MS-Patienten nachgewiesen werden, in drei Fällen fehlten diese und in zwei Fällen war kein Ergebnis ermittelbar.

Der häufigste Läsionsort war, genauso wie in der Kohorte der steroidmitigierten Patienten, die frontale Hemisphäre (n = 3). Weitere Lokalisationen waren eine zentrale (n = 2) sowie tempo-

rale und okzipitale Verteilung (je n = 1). In zwei Fällen ließen sich mehrere Läsionsorte nachweisen, vgl. Tabelle 9. Die neuropathologischen Befunde zeigten in allen neun Fällen einen entzündlich-entmarkenden ZNS-Prozess.

Pat.	Alter	Klinische Symptome	OKBs im	Läsionsort
Nr.	(Jahre)		Liquor	
1	32	Dysästhesien rechte Hand, Bewusstlosigkeit	unbekannt	okzipital
2	38	Hemiparese rechts, Hemihypästhesie rechts	unbekannt	zentral links
3	34	bekannte MS (RRMS)	ja	frontal rechts
4	36	Vergesslichkeit, zeitliche Desorientierung	ja	mesio-temporal beidseits
5	30	bekannte MS	ja	multiple Läsionen
6	16	Verhaltensänderung, Konzentrations- und	nein	frontal links
		Gedächtnisstörungen		
7	26	Hemiparese links, Sehnerventzündung	nein	zentral rechts
8	29	brachiofazial betonte Hemiparese links	nein	frontodorsal rechts
9	29	Hemihypästhesie rechts, Schwindel	ja	multiple intrazerebrale
				und intraspinale Herde

Tabelle 9: Übersicht zur MS-Patientenkohorte

3.1.4 Patientenkohorte Primäre ZNS-Lymphome

Die Gruppe der PZNSL-Patienten wurde zusammengestellt, um auszuschließen, dass es sich bei den SML-Biopsien histologisch um ein Phänomen im Randbereich eines Lymphoms handelt.

Die PZNSL-Patienten hatten mit 58,83 Jahren (SD \pm 6,5) ein ähnliches hohes Durchschnittsalter wie die steroidmitigierten Lymphompatienten, ein signifikanter Altersunterschied zeigt sich nur im Vergleich zur MS-Gruppe, vgl. Abbildung 8. Die Kohorte bestand aus sechs Patienten mit einer Distribution von Männern und Frauen im Verhältnis eins zu fünf. Keiner der Patienten erhielt vor der stereotaktischen Biopsie eine Steroidmedikation. In allen Fällen wurde ein zerebrales Lymphom vermutet, in einem Fall zusätzlich ein hirneigener Tumor als Differenzialdiagnose, vgl. Tabelle 10.

Pat. Nr.	Alter (Jahre)	Steroid- therapie	Neuropathologische Diagnose
1	50	nein	zerebrales Lymphom bei bekanntem B-Zell-Lymphom
2	64	nein	Lymphom DD hirneigener Tumor
3	29	nein	zerebrales Lymphom bei bekanntem Lymphom
4	56	nein	zerebrales Lymphom
5	72	nein	zerebrales Lymphom
6	70	nein	zerebrales Lymphom

Tabelle 10: Übersicht zur PZNSL-Patientenkohorte



Abbildung 8: Übersicht zum Ersterkrankungsalter in den vier Kohorten SML, SUL, MS und PZSNL. SML = steroidmitigierte Lymphome (MW = 59,5 Jahre), SUL = steroidunbeinflusste Gruppe (MW = 67,8 Jahre), MS = Multiple Sklerose (MW = 30,0 Jahre) und PZNSL = Primäres-Zentrales-Nervensystem-Lymphom (MW = 56,8 Jahre). Die post-hoc-Analyse nach Tukey zeigte einen signifikanten Unterschied im Alter zwischen folgenden Gruppen: SML und MS, SUL und MS sowie PZNSL und MS (ns = nicht signifikant).

3.2 Histopathologie

3.2.1 Übersichtsdarstellung der Zellstrukturen und der Zellverteilung

Zur Übersichtsdarstellung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet, um Zellstrukturen sichtbar zu machen. Hier fiel bei den steroidmitigierten Lymphomen ein hyperzelluläres sowohl perivaskulär als auch diffus verteiltes, mononukleäres Infiltrat auf, vgl. Abbildung 9a. Neben der hohen Zelldichte imponierten schaumzellige Makrophagen (Abbildung 9b). Die Gewebematrix war häufig ödematös oder mikrozystisch aufgelockert. Mitosen oder Nekrosen waren nicht sichtbar, dafür aber deutlich identifizierbare apoptotische Zellkerne (Abbildung 9c). Diese erschienen pyknotisch oder zerfallend.

Bei den MS-Patienten fiel in der HE-Färbung zunächst eine im Vergleich zu den SML-Patienten deutlich verminderte Zellzahl in der aufgelockerten Matrix auf. Es ließen sich ebenfalls vermehrt schaumzellige Makrophagen sowie ein perivaskuläres, mononukleäres Infiltrat nachweisen. Bei drei von neun MS-Patienten war eine klare Grenze zwischen einem hyperzellulären Läsionareal und einer normalen Zellverteilung peripher zu erkennen, vgl. Abbildung 9d-e. Bei den MS-Fällen waren seltener apoptotische Zellkerne erkennbar.



Abbildung 9: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien zur Darstellung der Zellstrukturen in HE. Die Fotographien in a und d wurden in 200facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 100 µm erstellt, die Fotographie in e in 400facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 200 µm Länge und die Fotographien in b und c in 1000facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 10 µm Länge. (a) Bei den SML-Fällen zeigten sich eine hohe Zelldichte mit zahlreichen Makrophagen (markiert in b) sowie reichlichen Apoptosen, beispielhaft umrandet in der Nahaufnahme in (c). (d) Bei den MS-Fällen zeigte sich eine höhere Zelldichte im Läsionsareal (unten) gut abgegrenzt zur Peripherie (oben). (e) Zudem waren perivaskuläre Infiltrate zu erkennen.

3.2.2 Zellverteilung von Makrophagen und Mikroglia

Immunhistochemien mit Antikörpern gegen KiM1P und MRP14 markieren Zellen des Makrophagensystems inklusive Mikroglia, wobei MRP14 Makrophagen im frühaktiven Stadium markiert.

In der Kohorte der SML-Patienten konnte man eine diffuse Verteilung der KiM1P-positiven Makrophagen beobachten (Abbildung 10a). In den MS-Biopsien zeigte sich im Läsionsbereich ebenfalls ein ausgeprägtes schaumzelliges Makrophageninfiltrat. Anhand der Makrophageninfiltrate ließen sich die Läsionsgrenzen bei vier von neun MS-Biopsien deutlich erkennen, vgl. (Abbildung 10b-d). Während die frühaktiven Makrophagen bei den SML-Patienten eher vereinzelt vorlagen (Abbildung 10f), gruppierten sie sich bei den MS-Patienten häufig entlang der Läsionsgrenze (Abbildung 10g-h).

Bei der Quantifizierung der MRP14-positiven Zellen ließ sich in beiden Kohorten eine hohe Zelldichte frühaktiver Makrophagen nachweisen. Die Anzahl der MRP14-positiven Zellen war in den MS-Biopsien tendenziell höher als in den SML-Biopsien, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war (SML: 132,2 \pm 43,0 Zellen/mm² (n = 7), MS: 381,5 \pm 136,3 Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,1416), vgl. Abbildung 10e.

3.2.3 Zellverteilung der B-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des Zellinfiltrates wurden B-Zellen mit einem anti-CD20 Antikörper detektiert und Plasmazellen mit einem anti-CD138 Antikörper sichtbar gemacht, um Rückschlüsse auf die humorale Immunantwort bzw. die eventuelle Präsenz von B-Zell-Blasten zu ziehen.

Die CD20-positiven B-Zellen traten in niedriger Zelldichte auf. Blasten waren nicht nachweisbar. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich beider Gruppen (Abbildung 11e). Die durchschnittlich erhöhte Zelldichte der SML-Kohorte resultierte im Wesentlichen aus einem SML-Fall mit besonders hoher B-Zell-Dichte (SML: 219,3 \pm 129,5 (n = 8), MS: 44,5 \pm 20,8 Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,1775). In beiden Gruppen zeigte sich zudem eine perivaskuläre Häufung der B-Zellen, vgl. Abbildung 11a-b. Dabei konnte in den SML-Fällen keine Granulierung der B-Zellen als Hinweis auf fragmentierte Lymphomzellen nachgewiesen werden.

Die Plasmazelldichte (CD138-positive Zellen) war, analog zu den B-Zellen, in beiden Kohorten etwa gleich niedrig (SML: 32,9 \pm 13,9 Zellen/mm² (n = 7), MS: 20,6 \pm 8,7 Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,4423). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand nicht (Abbildung 11f).

Auch auf den mikroskopischen Detailbildern waren dementsprechen in beiden Gruppen nur vereinzelt Plasmazellen sichtbar, vgl. Abbildung 11c-d.



Abbildung 10: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien zu Makrophagen in KiM1P (a, b und d) und Ki-M1P-LFB-Doppelfärbung (c) und MRP-14 (f bis h), sowie statistische Auswertung (e). Die Fotographien a, b, f und g wurden in 200facher Vergrößerung mit einem Messbalken in 100 µm Länge aufgenommen. Die Fotographien d und h wurden in 400facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 20 µm erstellt. Die Übersichtsaufnahme in c wurde in 100facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 500 µm Länge aufgenommen. (a) Die Makrophagenverteilung war bei den SML-Fällen diffus. (b) Bei den MS-Fällen lagen die schaumzelligen Makrophagen im Läsionsareal häufig in hoher Dichte vor, vergrößert in (d). (c) Bei den MS-Fällen mit erkennbarem Läsionsrand ließ sich eine erhöhte Makrophagendichte im entmarkten Areal (braun mit KiM1P markiert) mit klarer Grenze zur Periläsion und typischem Makrophagensaum nachweisen. (e) Die Dichtemessung an frühaktiven Makrophagen ergab eine etwa gleich hohe Zelldichte in beiden Kohorten. (f) Bei den SML-Fällen zeigten sich die frühaktiven Makrophagen (mit MRP14 angefärbt) in der Regel diffus über die Läsion verteilt. (g) In den MS-Biopsien zeigte sich deren Häufung entlang der Läsionsgrenze, in (h) beispielhaft vergrößert.



Abbildung 11: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für B-Zellen mit CD20 (a, b) sowie Plasmazellen mit CD138 (c, d) sowie deren statistische Analyse (e bzw. f). Die Fotographien wurden in 400facher Vergrößerung und mit einem Messbalken von 20 µm Länge abgebildet. Die CD20-positiven B-Zellen zeigten sich sowohl in der SML-Kohorte (a) als auch in der MS-Kohorte (b) in geringer Anzahl mit perivaskulärer Betonung. Plasmazellen waren ebenfalls sowohl in der SML- (c) als auch in der MS-Kohorte (d) rar. Die B-Zelldichte (e) und Plasmazelldichte (f) waren in beiden Kohorten gering ausgeprägt und vergleichbar.

3.2.4 Verteilung der T-Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des entzündlichen Infiltrats folgte die immunhistochemische Darstellung von T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD3 sowie die Subtypanalyse in T-Helferzellen mittels anti-CD4- und zytotoxische T-Zellen mittels anti-CD8-Antikörpern. Im Vergleich zur MS-Kohorte konnte bei den SML-Patienten eine etwa fünffach erhöhte Zelldichte von CD3-positiven Zellen nachgewiesen werden, wobei der Unterschied statistische Signifikanz zeigte (SML: 864,2 \pm 224,3 CD3-positive Zellen/mm² (n = 8), MS: 165,8 \pm 44,1 CD3-positive Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,0055), vgl. Abbildung 12g.

Während die T-Zellen bei den MS-Fällen perivaskulär akzentuiert vorkamen (Abbildung 12b), waren die T-Zellen der SML-Fälle zusätzlich und häufig bevorzugt intraparenchymal lokalisiert (Abbildung 12a).

Die Zelldichte der T-Helferzellen (CD4-positiv) zeigten im Vergleich beider Kohorten einen signifikanten Unterschied, wobei die Zellanzahl bei den SML-Patienten etwa dreifach über der T-Helferzell-Dichte der MS-Patienten lag (SML: 160,9 \pm 58,6 CD4-positive T-Zellen/mm² (n = 4), MS: 43,7 \pm 9,6 CD4-positive T-Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,0131), siehe Abbildung 12h. Die Verteilung der T-Helferzellen in den immunhistochemischen Schnitten entsprach der Präsentation der CD3-positiven T-Zellen (Abbildung 12c-d).

Als signifikant stellte sich auch der Dichteunterschied der CD8-positiven, also zytotoxischen-T-Zellen, im Vergleich der beiden Gruppen dar. Die Dichte CD8-positiver T-Zellen war bei den steroidmitigierten Lymphomen sechsmal höher als in den MS-Läsionen (SML: 210,8 ± 46,1 CD8-positive T-Zellen/mm² (n = 7), MS: 43,1 ± 14,8 CD8-positive Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,0018), vgl. Abbildung 12i. Die zytotoxischen T-Zellen lagen bei den steroidmitigierten Lymphomfällen einzeln oder gruppiert über das Präparat verteilt vor (Abbildung 12e), während sie bei den MS-Schnitten nur vereinzelt zu finden waren (Abbildung 12f).

In der Subgruppenanalyse der T-Zellen war das Verhältnis der T-Helferzellen (CD4-positiv) zu den zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) in beiden untersuchten Kohorten ähnlich und betrug bei den SML-Patienten 1:1,3 und bei den MS-Patienten 1:1, mit einer leichten Tendenz zu mehr T-Helferzellen in beiden Kohorten.



Abbildung 12: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für CD3-positive T-Zellen (a, b), CD4-positive T-Helferzellen (c, d) und CD8-positive zytotoxische T-Zellen (e, f) sowie die dazugehörigen statistischen Auswertungen. Die Fotographien a bis f wurden in 400facher Vergrößerung und mit einem Messbalken von 20 µm Länge abgebildet. (a) Die T-Zellen waren in der SML-Kohorte zahlreich perivaskulär und intraparenchymal erkennbar. (b) In der MS-Kohorte zeigten sich die T-Zellen vorwiegend perivaskulär. Das gleiche Verteilungsmuster wie bei den CD3-positiven T-Zellen ergab sich für die CD4-positiven T-Helferzellen in den SML- (c) sowie MS-Biopsien (d). Die CD8-positiven T-Zellen ließen sich bei den SML-Fällen (e) in höherer Anzahl als bei den MS-Fällen (f) nachweisen. (g) SML-Patienten verfügten über eine signifikant höhere T-Zelldichte im Vergleich zu MS-Patienten (** p < 0,01). (h) SML-Patienten wiesen auch eine signifikant höhere T-Helferzelldichte im Vergleich zu MS-Patienten auf (* p < 0,05). (i) Zudem ließ sich bei den SML-Patienten eine signifikant höhere Zelldichte an zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zu MS-Patienten nachweisen (** p < 0,01).

3.2.5 Zellproliferation

Um der Frage nach einer Zellaktivierung und deren Hauptakteuren nachzugehen, wurden mit dem Antikörper Ki67 proliferierende Zellen dargestellt und mit der Ki67-CD3-Doppelfärbung der Anteil der proliferierenden T-Zellen identifiziert.

In beiden Kohorten befanden sich die proliferierenden Zellen überwiegend in der Nähe von Blutgefäßen, aber auch diffus verteilt im Gewebe. Die CD3-Ki67-doppelt positiven Zellen von SML (Abbildung 13a-b) und MS (Abbildung 13c-d) verteilten sich entsprechend der Ki67-Einfachfärbung perivaskulär und diffus.

Ki67-positive Zellen waren bei den SML-Patienten in moderater Dichte zu finden (SML: 145,1 \pm 41,0 Zellen/mm² (n = 8)). Dagegen gab es bei den MS-Patienten signifikant weniger proliferierende Zellen (MS: 38,4 \pm 10,6 Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,0178), vgl. Abbildung 13e.

Eine Aussage über die Art der Ki-67-positiven proliferierenden Zellen ließ sich durch die Doppelanfärbung mit CD3 (für T-Zellen) machen. Demnach gab es keinen Unterschied zwischen den Zelldichten der proliferierenden T-Zellen der SML- und MS-Kohorte (SML: $8,3 \pm 4,0$ (n = 8); MS: 11,0 ± 6,1 Zellen/mm² (n = 9), t-test, p = 0,7233), vgl. Abbildung 13f.



Abbildung 13: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für proliferierende T-Zellen (Ki67-CD3-positiv) in a bis d mit 400facher Vergrößerung und einem Messbalken von 20 μ m Länge sowie die entsprechenden graphischen Darstellungen der Quantifizierung. Ki67-CD3-doppelt positive Zellen wurden beispielhaft umrandet. Die proliferierenden T-Zellen zeigten sich in den SML-Biopsien perivaskulär (a) sowie intraparenchymal (b). Bei den MS-Biopsien ergab sich das gleiche Verteilungsmuster mit in der Nähe der Blutgefäße (c) sowie diffus (d). (e) Die Zellproliferationsrate der SML-Kohorte zeigte sich statistisch signifikant erhöht gegenüber der MS-Kohorte (* p < 0,05). (f) Die Dichte an proliferierenden T-Zellen war in beiden Kohorten ähnlich ausgeprägt.

3.2.6 Vergleich der Myelinschädigung

Während sich bei den steroidmitigierten Lymphomfällen ein unterschiedlich starker Myelinverlust offenbarte, zeigte sich bei den MS-Fällen innerhalb der Läsion eine komplette Entmarkung, mit oftmals scharfer Grenze zum umgebenden Gewebe. Im Folgenden wird auf die einzelnen Färbungen beider Gruppen vergleichend genauer eingegangen.

In der LFB-PAS-Färbung erkannte man bei den SML-Fällen eine teils fokale (n = 2), meist eher flächige Entmarkung (n = 6) mit unscharfer Läsionsgrenze. Neben komplett fehlenden Myelinscheiden in einigen Arealen erschien der überwiegende Teil geschädigt und rarefiziert: ausgedünnt, aufgesplittert oder ödematös verdickt (Abbildung 14a). Weiterhin wirkten die Blutgefäßwände in SML-Läsionen im Vergleich häufig verdickt und deutlich PAS-positiv (Abbildung 14b). Die Kohorte der klassischen MS-Patienten hingegen zeigte einen nahezu vollständigen Myelinverlust mit scharfer Grenze, in der LFB-PAS Färbung erkennbar am Übergang vom noch myelinisierten blauen zum demyelinisierten rosa-violetten Gewebe (Abbildung 14c-d). Entlang der Läsionsgrenze traten gehäuft myelinbeladene Makrophagen auf (Abbildung 14e).

Auch die immunhistochemischen Färbungen ließen bei SML-Patienten einen geringeren Myelinverlust als bei MS-Patienten erkennen. Das basische Myelinprotein (MBP) brachte als Myelinmarker bei den steroidmitigierten Erkrankungsfällen unregelmäßig angeordnete Myelinscheiden in reduzierter Anzahl hervor, wobei der Myelinverlust ein teils streifenartiges, teils flächiges Muster aufwies (Abbildung 14g). Bei den MS-Patienten stellte sich ein markanter flächiger Myelinfaserverlust, in drei von neun Fällen auch mit klarer Läsionsgrenze, dar (Abbildung 14h). Unter Anfärbung mit MBP ließen sich zahlreiche Myelinabbauprodukte in Makrophagen darstellen (Abbildung 14f).

Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) bestätigten als weiterer Myelinmarker bei den SML-Patienten einen unterschiedlich starken Myelinverlust (Abbildung 14i). Bei den typischen MS-Patienten entdeckte man nur noch punktförmige Myelinreste bei sonst kompletter Entmarkung, wobei aber auch hier in drei von neun MS-Fällen ein klarer Läsionsrand erkennbar war (Abbildung 14j).



Abbildung 14: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien zum Myelin in der LFB-PAS Färbung (a bis e) sowie MBP (g bis i) und MAG Immunhistochemie (i und j). Die Fotographien in a bis c sowie g bis j wurden in 400facher Vergrößerung mit einem Messbalken in 20 µm Länge abgebildet. Abweichend davon wurden die Aufnahme in d in 100facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 500 µm und die Fotographien in e und f in 1000facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 10 µm erstellt. (a) Bei den SML-Fällen zeigte sich ein fokaler bis flächiger Myelinverlust, erkennbar am Fehlen des türkisblau angefärbten Myelins in LFB-PAS. (b) Hier fielen verdickte, PAS-positive Gefäßwände auf. (c) In den MS-Biopsien konnte ein kompletter intraläsionaler Myelinverlust mit deutlicher Entmarkungsgrenze nachgewiesen werden, gut erkennbar in der Übersichtaufnahme in (d). (e und f) Detailbilder von Makrophagen aus MS-Fällen zeigten inkorporierte Myelindegradationsprodukte, bläulich in LFB-PAS (e) bzw. bräunlich in MBP (f). Das Myelin in den SML-Biopsien war sowohl in MBP (g) als auch MAG (i) als vereinzelt, unregelmäßig, teils verdickt und teils aufgespalten zu erkennen. Hingegen zeigte sich in den MS-Fällen ein annährend kompletter Myelinverlust mit klarer Entmarkungsgrenze in MBP (h) und MAG (j).

3.2.7 Vergleich der axonalen Schädigung

Nach den Erkenntnissen der eindeutigen Myelinschädigung stellte sich die Frage, inwieweit die Axone betroffen waren und ob sich ein Unterschied zwischen beiden Gruppen finden lasse. Hierzu wurden die Versilberungsreaktion nach Bielschowsky und die Immunhistochemie für NF200 ausgewertet. Es erfolgten beide Färbungen, um durch die Kombination der Ergebnisse eine höhere Aussagekraft zu erhalten.

In der Bielschowsky-Versilberung zeigte sich bei den steroidmitigierten Lymphomfällen eine Axonreduktion (Abbildung 15a). Auch bei der MS-Kohorte war eine deutliche intraläsionale Axonrarefizierung sichtbar. Zusätzlich war bei drei von neun MS-Patienten eine klare Läsionsgrenze zu erkennen (Abbildung 15b).

Mit dem Neurofilamentmarker NF200 wurde bei den MS-Fällen ein rarefiziertes axonales Gerüst festgestellt, wobei bei zwei von neun Patienten die Läsionsgrenze sehr gut erkennbar war (Abbildung 15d). Bei den SML-Patienten zeigte sich ebenfalls das Bild einer axonalen Reduktion bei Erhalt distendierter Axone (Abbildung 15c).

Der rechnerische axonale Verlust in der Läsion zu periläsionalem Gewebe stellte sich mit etwa 40-50 % in beiden Kohorten als vergleichbar heraus (SML: $43,53 \pm 3,83$ % (n = 6), MS: 52,48 \pm 4,36 % (n = 9) t-test, p = 0,09).



Abbildung 15: Repräsentative Mikrofotographien von SML- und MS-Biopsien für Axone in Bielschowsky (a, b) und NF200 (c, d) mit 400facher Vergrößerung und einem Messbalkon von 20 µm Länge. Die SML-Fälle zeigten sowohl in Bielschwosky (a) als auch NF200 (c) einen ähnlichen axonalen Verlust wie die MS-Kohorte. Bei den MS-Fällen ließ sich in Bielschowsky (b) und NF200 (d) eine deutliche intraläsionale Distension (rechts unten) mit markantem Läsionsrand zur Peripherie (links oben) nachweisen.

3.2.8 Histomorphologischer Vergleich der SML- und SUL-Fälle

Ein histomorphologischer Vergleich der beiden an einem Primären ZNS-Lymphom erkrankten Gruppen mit vorangegangener Steroidapplikation, der steroidmitigierten- und der steroidunveränderten Gruppe, zeigte einige bedeutsame Unterschiede.

Bei den SUL-Fällen zeigte sich eine deutliche Hyperzellularität mit markanten blastären B-Zellinfiltraten (CD20-positiv), die v. a. parenchymal vorlagen (SUL Abbildung A. 1, vgl. dazu SML Abbildung 11a). Zudem zeigte sich eine hohe Anzahl proliferierender Zellen (Ki67-positiv), die ebenfalls intraparenchymal auftraten (SUL Abbildung A. 1, vgl. dazu SML Abbildung 13a,b). Daher fiel in diesen Fällen die Diagnosestellung eines Lymphoms, in unserer Kohorte alle als malignes B-Zell-Lymphom, leicht. Des Weiteren zeigte sich eine erhöhte Makrophagendichte (SUL Abbildung A. 2 bzw. SML Abbildung 10a,e-f). Als Gemeinsamkeit mit der SML-Gruppe war eine hohe T-Zelldichte (CD3-positiv) zu verzeichnen (SUL Abbildung A. 1 bzw. SML Abbildung 12a,g) und eine fleckig-streifige Myelinreduktion in LFB-PAS und MBP (SML Abbildung 14a,g bzw. SUL Abbildung A. 2) sowie axonale Distension beispielhaft in Bielschowsky (SUL Abbildung A. 2 bzw. SML Abbildung 15a).

3.2.9 Histomorphologischer Vergleich der SML- und PZNSL-Fälle

Dieser Vergleich erfolgte, um auszuschließen, dass es sich bei den Veränderungen der SML-Fälle um ein Phänomen der PZNSL-Läsionsränder handelt.

Die histologische Begutachtung der Primären ZNS-Lymphome ergab, dass sowohl im Tumorareal als auch an der Läsionsgrenze in der LFB-PAS-Färbung kein Myelinverlust festzustellen war. In der MBP-Färbung zeigte sich an der Tumorgrenzzone feines, aber noch intaktes Myelin mit etwas reduzierter axonaler Dichte in der Bielschowsky-Versilberung, vgl. Abbildung A. 3.

Weiterhin zeigte sich bei den PZNSL-Fällen eine ausgeprägte läsionale Hyperzellularität sowie ein hervorstechendes blastäres B-Zell-Infiltrat (Abbildung A. 4), das bei den SML-Schnitten fehlte (Abbildung 11a). Die T-Zelldichte der beiden Gruppen war ähnlich ausgeprägt (PZNSL Abbildung A. 4 bzw. SML Abbildung 12a,g).

4 Diskussion

In Biopsien von Primären ZNS-Lymphomen können die typischen Lymphomzellen fehlen. Zudem können die Biopsien eine primär inflammatorisch-demyelinisierende Erkrankung wie beispielsweise eine Multiple Sklerose vortäuschen. Oftmals lässt sich in solchen Fällen anhand der klinischen Angaben bestätigen, dass prä- und perioperativ Glukokortikoide verabreicht wurden. Da sich die Therapieansätze grundlegend unterscheiden, ist eine frühzeitige Diagnose entscheidend. Die korrekte Befundung ist bei fehlenden Lymphomzellen oft schwierig und bedarf eindeutiger Kriterien zur Unterscheidung von PZNSL und primär demyelinisierenden Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurde die bisher größte uns bekannte Kohorte mit Steroiden vorbehandelter Lymphome ohne histologischen Nachweis von Lymphomzellen untersucht, bei denen zunächst in der ersten Biopsie unter Steroideinfluss eine inflammatorischdemyelinisierende Erkrankung diagnostiziert wurde und bei klinischer Verschlechterung und Steroidkarenz in einer weiteren Biopsie die Diagnose eines Primären ZNS-Lymphoms gestellt werden konnte. Diesen acht Fällen wurden neun typische frühaktive Multiple Sklerose-Fälle gegenübergestellt, um mögliche histologische Unterschiede zu identifizieren, vgl. Tabelle 11.

Tabelle 11: Zusammenfassung der histologischen Unterschiede zwischen SML- und frühaktiven MS-Läsionen

Histologische Merkmale	SML	MS
(Färbung)		
Makrophagen (KiM1P)	hoch, diffus	hoch, diffus und
		am Läsionsrand
Frühaktive Makrophagen (MRP14)	hoch	hoch
B-Zellen (CD20)	niedrig	niedrig
Plasmazellen (CD138)	niedrig	niedrig
T-Zellen (CD3)	sehr hoch*	hoch
T-Helferzellen (CD4)	hoch*	moderat
zytotoxische T-Zellen (CD8)	hoch*	moderat
Verhältnis von CD4+ zu CD8+	CD4 > CD8	CD4 > CD8
Zellen		
proliferierende Zellen (Ki67)	moderat*	niedrig
Demyelinisierung (LFB-PAS)	ungleichmäßig,	flächig,
	moderat bis fast komplett,	komplett,
	unscharfer Läsionsrand	meist scharfer Läsionsrand
Demyelinisierung (MBP)	viele Restfasern	wenige Restfasern
Axonale Reduktion (Biel)	moderat	moderat

* = t-Test mit p-Wert < 0.05

54

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zur Differentialdiagnose vorrangig die Dichte an T-Lymphozyten und das Demyelinisierungsmuster herangezogen werden können. So überwiegen in den SML-Fällen die T-Zellen, und zwar sowohl die T-Helferzellen als auch die zytotoxischen T-Zellen sowie auch die proliferierenden Zellen gegenüber den frühaktiven MS-Läsionen. Das Demyelinisierungsmuster präsentiert sich in den SML-Fällen unregelmäßig, inkomplett und mit unscharfem Läsionsrand, während die klassischen MS-Fälle in der Regel eine flächige, komplette Entmarkung mit scharfem Läsionsrand aufweisen. Ergänzend zeigt sich in den SML-Fällen der Myelinverlust in der LFB-PAS-Färbung ausgeprägter als in der MBP-Färbung, bei der meist noch bemarkte Restfasern erhalten sind. Passend zum Myelinverlust ist die Verteilung der myelin-phagozytierenden KiM1P-positiven Makrophagen, die in den SML-Fällen diffus verteilt und in den MS-Fällen zusätzlich deutlich vermehrt am Läsionsrand zu finden sind. Andere untersuchte Parameter wie MRP14-positive frühaktive Makrophagen, CD20-positive B-Zellen, CD138-positive Plasmazellen genauso wie die axonale Reduktionsrate ergaben zwischen beiden Kohorten keine signifikanten Unterschiede.

Genauso wie in vorangegangenen Publikationen (Vaquero et al. 1984; DeAngelis 1990; Geppert et al. 1990; Alderson et al. 1996; Alarcia et al. 2000; Kuhlmann et al. 2001; Donaghy 2002; Günaydin et al. 2007; Ng et al. 2007; Porter et al. 2008; Liu und Lin 2009; Mokhtari et al. 2012; Giannini et al. 2014; Manoj et al. 2014; Önder et al. 2015; Kvarta et al. 2016; Lukas et al. 2018) handelt es sich bei den hier beschriebenen SML-Fällen um histologisch bestätigte Primäre B-Zell-Lymphome des ZNS, die sich zunächst unter Steroidgabe als entzündlich-demyelinisierende Läsion ohne Nachweis von Lymphomzellen, oft als "sentinel lesion" (Alderson et al. 1996) beschrieben, präsentieren. Dies legt einen Zusammenhang zwischen der Steroidtherapie und der Entwicklung einer inflammatorisch-demyelinisierenden Läsion bei einem bestehenden B-Zell-Lymphom nahe. Dass Glukokortikoide zur Apoptose der Lymphomzellen führen, passt zum Ergebnis einer nur geringen bis nicht nachweisbaren B-Zelldichte in den SML-Fällen. Untergegangene B-Zellen und Myelinprodukte werden vom Makrophagen-/Mikroglia-System phagozytiert, was deren hohe Präsenz und schaumzellige Morphologie erklärt. Neben der geringen B-Zelldichte fehlte auch eine B-Zell-Granulierung, die auf fragmentierte Lymphomzellen hätte hindeuten und die Diagnose erleichtern können (Giannini et al. 2014). Ebenfalls irreführend kann die vergleichsweise niedrig geschätzte Proliferationsrate von 20-50 % bei den SML-Fällen im Vergleich zu neoplastischen Prozessen und typischen PZNSL-Fällen von 70-90 % sein (Harder et al. 2003; Günaydin et al. 2007; Deckert et al. 2014; von Baumgarten et al. 2018).

4.1 Unterschiedliche Demyelinisierungsmuster

Ausgehend vom charakteristischen Merkmal der Demyelinisierung kommen verschiedene Erkrankungen infektiöser, toxischer und autoimmuner Genese in Frage, vgl. Differentialdiagnosen im Abschnitt 1.1.5. Hier zeigte sich in der MS-Kohorte eine flächige, komplette Demyelinisierung mit scharfer Läsionsgrenze, an der eine ausgeprägte Makrophagenansammlung als Zeichen einer noch laufenden Demyelinisierung erkennbar war. Die durch Steroidtherapie veränderten PZNSL zeigten dagegen eine fleckig-inkomplette Demyelinisierung ohne klar abgrenzbaren Läsionsrand und folglich eine diffuse Makrophageninfiltration. Das Demyelinisierungsmuster und die axonale Reduktion von etwa 40-50 % in der Bielschowsky-Versilberung entsprechen dem Ergebnis einer vorangegangenen Studie (Giannini et al. 2014).

4.2 Hohe T-Zelldichte als Indikator für steroidmitigierte Lymphome

Der auffälligste Unterschied zwischen MS- und SML-Fällen war die hohe T-Zelldichte bei steroidmitigierten Lymphomen. Daher sollte bei entzündlich-demyelinisierten Plaques eine außergewöhnlich hohe T-Zelldichte als Warnhinweis für ein steroidmitigiertes Lymphom angesehen werden, insbesondere bei älteren Patienten. Die große Anzahl an T-Zellen lässt zunächst einen entzündlichen Prozess anstelle eines neoplastischen Geschehens vermuten.

4.3 Fehlende inflammatorische Demyelinisierung bei Primären ZNS-Lymphomen

In jedem Fall sollte man eine Fehlpunktion im Randbereichs des Lymphoms ausschließen. Eine T-Zell-Infiltration ist für PZNSL nicht ungewöhnlich (Bashir et al. 1996). Eine T-Zell-Häufung am Rande eines Lymphoms ist allerdings bisher noch nicht beschrieben worden (Kvarta et al. 2016). Die PZNL-Fälle zeigten ebenfalls eine höhere T-Zelldichte innerhalb des Tumors verglichen mit ihrem Randbereich.

Die histomorphologische Begutachtung der Primären ZNS-Lymphome ergab, dass in der LFB-PAS-Färbung weder im Tumorbereich noch an der Grenze zum gesunden Gewebe ein Myelinscheidenverlust erkennbar war. Allerdings konnte im Tumorrandbereich in der MBP-Immunhistochemie und Bielschowsky-Versilberung zarteres, aber noch intaktes Myelin bei geringgradiger axonaler Distension nachgewiesen werden, vgl. Abbildung A. 3. Dies zeigt, dass eine Demyelinisierung kein generelles Phänomen bei PZNSL und nicht abhängig von der B-Zelldichte ist, sondern vielmehr speziell bei steroidbehandelten Lymphomen vorliegt.

4.4 Zusammenhänge zwischen Multipler Sklerose und Primären ZNS-Lymphomen

Ein genereller Zusammenhang zwischen Multipler Sklerose und der Inzidenz von Malignomen konnte nicht festgestellt werden. Einige Autoren konstatieren, dass bei MS-Patienten in den ersten zehn Jahren unter immunsuppressiver Therapie sogar ein niedrigeres Malignomrisiko als in der Kontrollgruppe vorliegt (Confavreux und Vukusic 2004; Achiron et al. 2005; Lebrun et al. 2008).

Einige Autoren nehmen ein gleichzeitiges Vorkommen von Multipler Sklerose und Primären ZNS-Lymphomen an. Es konnte ein epidemiologischer Zusammenhang und ein familiär gehäuftes Auftreten beobachtet werden, wobei daraus mögliche genetische Überschneidungen geschlussfolgert wurden (Newell 1970; Bernard et al. 1987; Bender und Schapiro 1989; Brecher et al. 1998; Hjalgrim et al. 2004; Landgren et al. 2005; Kalus et al. 2016; Khankhanian et al. 2016). Für manche Autoimmunerkrankungen, nicht aber die Multiple Sklerose, konnte zudem eine Korrelation zwischen der Schwere der Entzündungsreaktion und dem Lymphomrisiko nachgewiesen werden (Smedby et al. 2006).

4.5 Entstehungstheorien zu den histologischen Veränderungen bei steroidmitigierten Lymphomen

Der Erstbeschreiber der sog. "sentinel lesions" nahm zunächst eine intrathekale klonale B-Zell-Proliferation an (Alderson et al. 1996). Das T-Zell-Infiltrat wurde dabei als eine Immunreaktion gegen das sich entwickelnde Lymphom interpretiert (Alderson et al. 1996; Bashir et al. 1996; Husseini et al. 2012).

In Anbetracht der geringen B- und Plasmazelldichte sowie der überragender T-Zell-Dichte der SML-Kohorte erscheint ein antigen-unabhängiger Entstehungsmechanismus plausibler. Es ergaben sich erhöhte T-Helfer- und zytotoxische T-Zell-Zahlen, wobei die T-Helferzellzahl überwog. Die große Anzahl an zytotoxischen T-Zellen in den SML-Fällen deutet auf einen Apoptose-assoziierten Immunabwehrmechanismus hin, möglicherweise eine durch Glukokortikoide ausgelöste T-Zell-assoziierte Apoptose von Lymphomzellen. Um die genauen Mechanismen von steroidmitigierten Lymphomen verstehen zu können, sind daher weitere molekulare Studien notwendig. Auch in der MS-Kohorte zeigten sich etwas mehr CD4-positive als CD8positive T-Zellen, vgl. Abschnitt 3.2.4, obwohl in der Literatur ein vergleichbares bis umgekehrtes T-Zell-Subtypenverhältnis beschrieben wird, vgl. Abschnitt 1.1.3.1. Dies könnte an unterschiedlichen Auswahlkritieren im Gegensatz zu anderen Studien, der Konzentrierung auf frühaktive MS-Stadien und der geringen Fallzahl der Kohorte liegen.

Andere Autoren vermuten auf Grundlage von Fallberichten eine Umwandlung von inflammatorischen B-Zellen in maligne Lymphomzellen (Brecher et al. 1998; Kuhlmann et al. 2001). Bei MS-Patienten ließen sich klonal expandierte B-Zellen im Liquor cerebrospinalis nachweisen, dies wurde als möglicher Hinweis für die Transition gesehen (Young et al. 1996; Qin et al. 1998). Möglicherweise könnten von monoklonalen B-Zellen Antikörper gegen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) produziert werden (Storch et al. 1998; Kuhlmann et al. 2001). Außerdem konnte ein von Astrozyten sezernierter Botenstoff namens BAFF (B-Zell-Aktivierungsfakor), der das B-Zell-Überleben fördert, sowohl bei Multipler Sklerose als auch bei Primären ZNS-Lymphomen in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Krumbholz et al. 2005).

Durch den vergleichsweise kurzen Diagnosezeitraum von durchschnittlich 2,6 Monaten zwischen beiden Biopsien in der Gruppe der steroidmitigierten Lymphome (vgl. Abschnitt 3.1.1), lässt sich keine sequentielle Transformation aus einer MS-Läsion sondern eher eine Verzerrung des histologischen Bildes eines ZNS-Lymphoms durch die Steroidtherapie vermuten.

4.6 Spontane Remission von Primären ZNS-Lymphomen

In der Literatur sind darüber hinaus einige PZNSL-Fälle mit spontaner Remission beschrieben (Weingarten et al. 1983; Alderson et al. 1996; Al-Yamany et al. 1999; Kon et al. 2003; Partap und Spence 2006; Takekawa et al. 2008; Suzuki et al. 2009). Bei etwa der Hälfte aller Läsionen, die sich spontan zurückbildeten, handelte es sich um Primäre-ZNS-Lymphome (Bromberg et al. 2002). In diesen Fällen konnte während der Remission eine erhöhte Anzahl von Natürlichen Killerzellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist eine Immunreaktion, die zur Expansion von Natürlichen Killerzellen führte, die dann wiederum Lymphomzellen angreifen könnten (Al-Yamany et al. 1999).

4.7 Diagnostische Unterschiede zwischen Spätformen der Multiplen Sklerose und Primären ZNS-Lymphomen

Genauso wie in den meisten Fallberichten (DeAngelis 1990; Geppert et al. 1990; Alderson et al. 1996; Kuhlmann et al. 2001; Donaghy 2002; Günaydin et al. 2007; Kvarta et al. 2016; Lukas et al. 2018) handelt es sich bei den vorliegenden SML- Fällen um ältere Patienten mit einem Durchschnittsalter von 59,5 Jahren (vgl. Abschnitt 3.1.1). Betrachtet man das mittlere Erkrankungsalter von ca. 50 Jahren bei typischen Primären ZNS-Lymphomen, sollte man diese vor allem von den Spätformen der Multiplen Sklerose abgrenzen, die sich erst nach dem 50. Lebensjahr manifestieren und eine Prävalenz von etwa 7,5 % aufweisen (Noseworthy et al. 1983; Confavreux et al. 2000; Polliack et al. 2001). Während diese Spätformen der MS meist primär-progressiv verlaufen, funktionale sowie motorische Störungen aufweisen und spinale Läsionen häufig nachweisbar sind, präsentiert sich eine Multiple Sklerose bei jüngeren Patienten meist als schubförmig-remittierende Form. Im Vergleich von PZNSL zu SML beschreibt die Literatur für PZNSL überdurchschnittlich häufig Sehstörungen und radiologisch KM-aufnehmende Läsionen in den Großhirnhemisphären (Kis et al. 2008; Husseini et al. 2012). Demgegenüber zeigen sich bei der SML-Kohorte vorwiegend neurologische Ausfälle einzelner oder mehrerer Extremitäten, seltener auch Sehstörungen, vgl. Tabelle 7.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Magnet-Resonanz-Spektroskopie bei Hirntumoren, darunter auch Lymphomen, eine hohe Konzentration an freien Lipiden detektiert, die bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen untypisch sind und somit zur Unterscheidung genutzt werden können (Kuhlmann et al. 2001). Sofern maligne B-Zellen vorliegen, können auch molekulargenetische Analysen zur Diagnosestellung eines B-Zell-Lymphoms herangezogen werden (Choi et al. 2006; Barrantes-Freer et al. 2018).

Ein Primäres ZNS-Lymphom sollte vor allem dann vermutet werden, wenn ein für die Multiple Sklerose untypisches, hohes Ersterkrankungsalter und eine rapide klinische Verschlechterung nach Beendigung der Steroidtherapie vorliegen. Radiologisch ist zudem eine monofokal auftretende Läsion, die im Verlauf diffus kontrastmittelanreichernd bleibt und sich vergrößert, suspekt (Kuhlmann et al. 2008a; Kvarta et al. 2016).

4.8 Diagnostische Treffsicherheit bei Primären ZNS-Lymphomen unter Steroidtherapie

Den Goldstandard zur Diagnose eines Primären ZNS-Lymphoms stellt die stereotaktische Biopsie dar (Baraniskin et al. 2012; Deckert et al. 2014). Einige Autoren gaben an, dass trotz Steroidtherapie mehrheitlich eine eindeutige histologische Diagnose ohne erhöhten Re-Biopsie-Rate möglich ist (Haldorsen et al. 2005; Porter et al. 2008; Binnahil et al. 2016). Gleiches gilt für Fallberichte, bei denen sich das Lymphom unter Steroidgabe histologisch verändert, aber dennoch diagnostizierbar bleibt (Porter et al. 2008; Mokhtari et al. 2012; Naeem et al. 2018).

Andere größere Studien zeigen jedoch, dass durch Steroideinfluss unter der Biopsie die korrekte Lymphomdiagnose in etwa 50 % der Fälle verhindert wird (Brück et al. 2013; Önder et al. 2015).

Die retrospektive Analyse von 25 Fällen, in denen die Patienten unter der Biopsie Glukokortikoide erhielten, ergab, dass 48 % bereits bei der ersten Biopsie korrekt diagnostiziert werden konnten. Die anderen 52 % erhielten von verschiedenen Pathologen gänzlich unterschiedliche Beurteilungen, was für eine hohe Subjektivität bei fehlenden Unterscheidungskritieren spricht. Histopathologisch ergab sich am häufigsten eine spärliche Lymphozytenverteilung über das ganze Präparat, z. T. mit perivaskulärer Betonung. In etwa zwei Drittel der Fälle waren Blasten der lymphatischen Zellreihe nachweisbar, in etwa der Hälfte der Fälle dominierte die B-Lymphozytenanzahl über die T-Lymphozytenanzahl (Önder et al. 2015). Eine weitere Studie an indischen Patienten konnte zudem zeigen, dass die Fehldiagnoserate von Lymphomen mit längerer Steroidtherapie zunimmt (Manoj et al. 2014). Die Analyse meiner SML-Fälle lässt vermuten, dass bei gänzlich fehlenden Lymphomzellen eine korrekte Diagnosestellung oft schwierig sein kann.

Sogar ohne vorangegangene Steroidgabe sind Fälle von histologisch stark veränderten Lymphomfällen beschrieben (Brecher et al. 1998; Kuroda et al. 1999; Yang und Wu 2007; Suzuki et al. 2009; Utsuki et al. 2010; Lyons et al. 2011; Husseini et al. 2012; Ohe et al. 2013; Yamamoto et al. 2014; Kalus et al. 2016), daher sollte ein PZSNL bei klinisch und histopathologisch suspekten Befunden immer als Differentialdiagnose erwogen werden.

5 Zusammenfassung

Primäre Zentrale Nervensystem-Lymphome (PZNSL) können Multiple Sklerose(MS)- Läsionen nicht nur klinisch und radiologisch, sondern wenn sie durch Glukokortikoide vorbehandelt worden sind, auch histologisch ähneln. Dann erscheinen sie als inflammatorisch-demyelinisierende Läsion. Dabei können Lymphomzellen gänzlich fehlen. Da sich die Therapieansätze beider Entitäten grundlegend unterscheiden und eine zeitnahe Therapie entscheidend ist, kommt der histologisch korrekt gestellten Diagnose eine wichtige Bedeutung zu. Die stereotaktische Biopsie und histologische Auswertung stellen den Goldstandard zur PZNSL-Diagnose dar. In der vorliegenden Arbeit habe ich histopathologische Unterscheidungskriterien zwischen steroidmitigierten Lymphomen und frühaktiven MS-Läsionen untersucht.

Dazu wurden neben klinischen Daten vor allem traditionelle histologische sowie immunhistochemische Techniken genutzt, um im Nervengewebe sowohl Aussagen über die Myelinschicht zu ermitteln als auch Angaben über Zellarten und Zelldichten zu treffen.

Das deutlichste Unterscheidungsmerkmal bildet die T-Zellzahl-Erhöhung in den steroidmitigierten Lymphomfällen, daher sollte bei höherem Patientenalter und reichlichem Vorhandensein von T-Zellen differentialdiagnostisch immer auch ein Primäres ZNS-Lymphom in Betracht gezogen werden. Dabei lagen sowohl die T-Helferzellen als auch die zytotoxischen T-Zellen massiv erhöht und weit über klassischen demyelinisierenden Erkrankungen vor. Weiterhin fiel eine signifikant erhöhte Proliferationsrate bei den steroidmitigierten Lymphomen auf, auch wenn sie weit unter den Werten typischer PZNSL ohne vorangegangene Steroidgabe lag. Weiterhin spricht eine fokale Entmarkung ohne scharfe Läsionsgrenze mit im Wesentlichen erhaltenen Axonen und diffuser Makrophageninfiltration für ein steroidmitigiertes Lymphom. Demgegenüber weisen MS-Läsionen meist eine klare Demyelinisierungsgrenze auf, entlang derer sich Makrophagen anhäufen. Im Randbereich typischer Primärer ZNS-Lymphome konnten weder eine erhöhte T-Zelldichte noch ein Myelinverlust nachgewiesen werden, so dass davon auszugehen ist, dass dies keine typischen Kennzeichen von Lymphomen sind.

Von klinischen Gesichtspunkten aus sprach vor allem ein deutlich höheres Ersterkrankungungsalter für das Vorliegen eines Primären ZNS-Lymphoms. Dennoch sollte man die Spätformen der Multiplen Sklerose nicht aus den Augen verlieren. Allerdings weisen diese häufig einen primär-progredienten Krankheitsverlauf und fallen durch motorische Funktionsstörungen und spinale Läsionen auf. Bei PZNSL dominieren Sehstörungen und Läsionen in den Großhirnhemisphären. Bei rapider klinischer Verschlechterung oder radiologisch zunehmenden Läsionen, die konstrastmittelanreichernd bleiben, sollte immer ein PZNSL differentialdiagnostisch erwogen und ausgeschlossen werden.

Die genauen molekularen Mechanismen der Läsionsbildung bei steroidmitigierten Lymphomen (SML) sind derzeit unbekannt. Aktuell werden Glukokortikoide als Apoptoseauslöser angenommen, die eine zytotoxische T-Zell-Aktivierung und Makrophageninfiltration nach sich ziehen. Die Makrophagen phagozytieren Lymphomzellen und Myelin, woraus sich eine niedrige B-Zelldichte und diffuse Entmarkung in den SML-Fällen erklären ließe. Allerdings weisen eine hohe T-Zelldichte und das Überwiegen der T-Helferzellen eher auf einen inflammatorischen statt apoptotischen Entstehungsmechanismus hin. Zur Klärung der genauen Signalwege werden weitere molekulare Studien in Zukunft notwendig sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die bisher größte uns bekannte Kohorte von acht histologisch bestätigten steroidmitigierten Lymphomfällen ohne Nachweis maligner Lymphomzellen, aber mit eindeutigen Merkmalen einer entzündlichen Entmarkung untersucht und erstmalig im direkten Vergleich zu frühaktiven Multiple Sklerose-Fällen analysiert. Mithilfe der hier gefunden Unterscheidungskriterien können anhand der höheren T-Zelldichte bei Patienten mit Steroid-anbehandeltem Lymphom und der ausgeprägteren Demyelinisierung mit Makrophagensaum am Rand bei MS-Läsionen beide Entitäten besser unterschieden werden.

6 Anhang



Abbildung A. 1: Vergleichende Mikrofotographien von SUL (linke Spalte) sowie SML verschiedener Färbungen (rechte Spalte). Die Fotographien wurden in 200facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 100 µm Länge erstellt. In den SUL-Fällen erkannte man im Vergleich zu den SML-Fällen eine erhöhte Zellzahl (HE), mit markanter B-Zelldichte (CD20) und höherem Anteil an proliferierenden Zellen (Ki67). Die zu beurteilenden Zellen in den immunhistochemischen Färbungen für CD3, CD20 und Ki67 stellen sich jeweils in braun dar.


Abbildung A. 2: Vergleichende Mikrofotographien von SUL (linke Spalte) sowie SML mehrerer Färbungen (rechte Spalte). Die Fotographien wurden in 200facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 100 µm Länge erstellt. Die SUL-Gruppe wies eine höhere Makrophagendichte (braun in KiM1P) und ebenfalls eine Demyelinisierung (Fehlen von türkisblau in LFB-PAS, weniger Braunfärbung in MBP) und axonale Reduktion (weniger schwarz in Bielschowsky) im Vergleich zu entsprechendem gesundem Gewebe auf.



Abbildung A. 3: Repräsentative Mikrofotographien von PZNSL-Patienten zum Vergleich der Markscheiden und Axone, wobei jeweils der Läsionsrand (gestrichelte Linie) dem Tumorinneren (T) gegenübergestellt wurde. Die Fotographien wurden in 200facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 100 µm Länge erstellt. Das Myelin und die Axone stellten sich sowohl im Tumorbereich als auch im Randbereich leicht reduziert dar (türkisblau in LFB-PAS und braun MBP bzw. schwarz in Bielschowsky).



Abbildung A. 4: Repräsentative Mikrofotographien von PZNSL-Patienten zum Zellvergleich, wobei jeweils der Läsionsrand (gestrichelte Linie) dem Tumorinneren (T) gegenübergestellt wurde. Die Fotographien wurden in 200facher Vergrößerung mit einem Messbalken von 100 µm Länge erstellt. Am Läsionsrand erschien deutlich, dass in der Tumorläsion eine hohe Zellularität (HE) mit markantem B-Zellinfiltrat (braun in CD20) und reichlichen T-Zellen (braun in CD3) vorlag.

7 Literaturverzeichnis

- Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJM, Gospodarowicz M, Pulczynski EJ, Zucca E, Smith JR, Korfel A, Soussain C, DeAngelis LM et al. (2005): Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma. J Clin Oncol <u>23</u>, 5034–5043
- Achiron A, Barak Y, Gail M, Mandel M, Pee D, Ayyagari R, Rotstein Z (2005): Cancer incidence in multiple sclerosis and effects of immunomodulatory treatments. Breast Cancer Res Treat <u>89</u>, 265–270
- Alapat D, Ramos J, Anderson J, Post G (2015): The utility of B-cell receptor gene rearrangement studies in diagnosing diffuse large B-cell lymphoma with plasmacytic differentiation. Ann Clin Lab Sci <u>45</u>, 79–82
- Alarcia R, Ara JR, Marta E, Barrena MR, Giménez-Más JA, Capablo JL, Serrano M (2000): Demyelinating pseudotumoral lesion prior to a primary cerebral lymphoma. Rev Neurol <u>31</u>, 955–958
- Alderson L, Fetell M, Sisti M, Hochberg F, Cohen M, Louis D (1996): Sentinel lesions of primary CNS lymphoma. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>60</u>, 102–105
- Allbutt T (1870): On the ophthalmoscopic signs of spinal disease. Lancet 1, 76-78
- Al-Yamany M, Lozano A, Nag S, Laperriere N, Bernstein M (1999): Spontaneous remission of primary central nervous system lymphoma: report of 3 cases and discussion of pathophysiology. J Neurooncol <u>42</u>, 151–159
- Anthony D, Dickens A, Seneca N, Couch Y, Campbell S, Checa B, Kersemans V, Warren E, Tredwell M, Sibson N et al. (2014): Anti-CD20 inhibits T cell-mediated pathology and microgliosis in the rat brain. Ann Clin Transl Neurol <u>1</u>, 659–669
- Ascherio A, Munger KL, Lünemann JD (2012): The initiation and prevention of multiple sclerosis. Nat Rev Neurol <u>8</u>, 602
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S et al. (2000): Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. J Exp Med <u>192</u>, 393–404
- Bailey P (1929): Intracranial sarcomatous tumours of leptomeningeal origin. Arch Surg <u>18</u>, 1359–1402
- Balo J (1928): Encephalitis periaxialis concentrica. Arch NeurPsych 19, 242-264
- Bando Y, Nomura T, Murakami K, Tanaka T, Watanabe T, Yoshida S (2015): Abnormal morphology of myelin and axon pathology in murine models of multiple sclerosis. Neurochem Int <u>81</u>, 16–27
- Baraniskin A, Deckert M, Schulte-Altedorneburg G, Schlegel U, Schroers R (2012): Current strategies in the diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. Br J Haematol <u>156</u>, 421–432

- Barrantes-Freer A, Engel AS, Rodríguez-Villagra OA, Winkler A, Bergmann M, Mawrin C, Kuempfel T, Pellkofer H, Metz I, Bleckmann A et al. (2018): Diagnostic red flags: steroid-treated malignant CNS lymphoma mimicking autoimmune inflammatory demyelination. Brain Pathol <u>28</u>, 225–233
- Bashir R, Chamberlain M, Ruby E, Hochberg F (1996): T-cell infiltration of primary CNS lymphoma. Neurology <u>46</u>, 440–444
- Batchelor T, Loeffler JS (2006): Primary CNS lymphoma. J Clin Oncol 24, 1281-1288
- Batchelor T, Neuwelt E, Wang D, Gonzalez R: Clinical and diagnostic considerations in primary central nervous system lymphoma. In: Batchelor T, DeAngelis LM (Hrsg.): Lymphoma an leukemia of the nervous system. 2. Auflage; Springer, New York 2012, 113– 128
- Bender GP, Schapiro RT (1989): Primary CNS lymphoma presenting as multiple sclerosis. A case study. Minn Med <u>72</u>, 157–160
- Bernard SM, Cartwright RA, Darwin CM, Richards ID, Roberts B, O'Brien C, Bird CC (1987): A possible epidemiological association between multiple sclerosis and lymphoma/leukaemia. Br J Haematol <u>65</u>, 122–123
- Bhardwaj R, Zotz C, Zwadlo-Klarwasser G, Roth J, Geobleler M, Mahnke K, Falk M, Meinardus-Hager G, Sorg C (1992): The calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 form a membrane-associated heterodimer in a subset of monocytes/macrophages present in acute but absent in chronic inflammatory lesions. Eur J Immunol <u>22</u>, 1891– 1897
- Binnahil M, Au K, Lu JQ, Wheatley BM, Sankar T (2016): The influence of corticosteroids on diagnostic accuracy of biopsy for primary central nervous system lymphoma. Can J Neurol Sci <u>43</u>, 721–725
- Bitsch A, da Costa C, Bunkowski S, Weber F, Rieckmann P, Brück W (1998): Identification of macrophage populations expressing tumor necrosis factor-alpha mRNA in acute multiple sclerosis. Acta Neuropathol <u>95</u>, 373–377
- Bitsch A, Wegener C, da Costa C, Bunkowski S, Reimers CD, Prange HW, Brück W (1999): Lesion development in Marburg's type of acute multiple sclerosis: from inflammation to demyelination. Mult Scler J <u>5</u>, 138–146
- Boggs J (2006): Myelin basic protein: a multifunctional protein. Cell Mol Life Sci <u>63</u>, 1945– 1961
- Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY (1983): Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. J Neurol Sci <u>62</u>, 219–232
- Brecher K, Hochberg F, Louis DN, de la Monte S, Riskind P (1998): Case report of unusual leukoencephalopathy preceding primary CNS lymphoma. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>65</u>, 917–920
- Bromberg JEC, Siemers MD, Taphoorn MJB (2002): Is a "vanishing tumor" always a lymphoma? Neurology <u>59</u>, 762–764

- Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ (2014): Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. Neurology <u>83</u>, 1022–1024
- Brück W, Porada P, Poser S, Rieckmann P, Hanefeld F, Kretzschmarch H, Lassmann H (1995): Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. Ann Neurol <u>38</u>, 788–796
- Brück W, Brunn A, Klapper W, Kuhlmann T, Metz I, Paulus W, Deckert M (2013): Differenzialdiagnose lymphoider Infiltrate im Zentralnervensystem: Erfahrungen des Netzwerks Lymphome und lymphomatoide Läsionen des Nervensystems. Pathol <u>34</u>, 186– 197
- Carbone A, Gloghini A, Larocca L, Capello D, Pierconti F, Canzonieri V, Tirelli U, Dalla-Favera R, Gaidano G (2001): Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. Blood <u>97</u>, 744–751
- Cattoretti G, Becker M, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol <u>168</u>, 357–363
- Chang KL, Flaris N, Hickey WF, Johnson RM, Meyer JS, Weiss LM (1993): Brain lymphomas of immunocompetent and immunocompromised patients: study of the association with Epstein-Barr virus. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc <u>6</u>, 427–432
- Charcot J (1868): Histologie de la sclérose en plaques. Gaz Hop Civ Mil 41, 554-555
- Choi YL, Suh YL, Kim D, Ko YH, Sung CO, Lee JI (2006): Malignant lymphoma of the central nervous system: difficult histologic diagnosis after glucocorticoid therapy prior to biopsy. Clin Neuropathol <u>25</u>, 29–36
- Christensen JR, Börnsen L, Ratzer R, Piehl F, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS, Sellebjerg F (2013): Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular Thelper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. PLoS One <u>8</u>, e57820
- Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW (1988): The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. Immunol Rev <u>102</u>, 5–28
- Compston A, Coles A (2002): Multiple sclerosis. Lancet 359, 1221-1231
- Confavreux C, Vukusic S (2004): Non-specific immunosuppressants in the treatment of multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg <u>106</u>, 263–269
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000): Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. N Engl J Med <u>343</u>, 1430–1438
- Coté TR, Manns A, Hardy CR, Yellin FJ, Hartge P (1996): Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. J Natl Cancer Inst <u>88</u>, 675–679

- Crawford M, Yan S, Ortega S, Mehta R, Hewitt R, Price D, Stastny P, Douek D, Koup R, Racke M et al. (2004): High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. Blood <u>103</u>, 4222– 4231
- Dardalhon V, Korn T, Kuchroo V, Anderson A (2008): Role of Th1 and Th17 cells in organspecific autoimmunity. J Autoimmun <u>31</u>, 252–256
- DeAngelis L (1990): Primary central nervous system lymphoma imitates multiple sclerosis. J Neurooncol <u>9</u>, 177–181
- Deckert M, Brunn A, Montesinos-Rongen M, Terreni MR, Ponzoni M (2014): Primary lymphoma of the central nervous system-a diagnostic challenge: Primary CNS lymphoma. Hematol Oncol <u>32</u>, 57–67
- Devic C (1894): Myelite subaigue compliquée de nevrite optique. Bull Med 35, 18-30
- DGN (2012): Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie). S2e-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. https://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplensklerose; abgerufen am 19.07.2018
- Donaghy M (2002): Shrinking cerebral lymphomas with steroids can cause diagnostic confusion. Pract Neurol <u>2</u>, 218–220
- Esiri MM, Reading MC (1987): Macrophage populations associated with multiple sclerosis plaques. Neuropathol Appl Neurobiol <u>13</u>, 451–465
- Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, Matthews PM (2001): Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. Brain <u>124</u>, 1813–1820
- Faiss J, Wiethölter H: Multiple Sklerose. In: Berlit P (Hrsg.): Klinische Neurologie. 3. Auflage; Springer, Heidelberg 2011, 1219–1257
- Ferreri AJM, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, Calderoni A, Rossi A, Vavassori V, Conconi A et al. (2003): Prognostic Scoring System for Primary CNS Lymphomas: The International Extranodal Lymphoma Study Group Experience. J Clin Oncol <u>21</u>, 266–272
- Floris S, van der Goes A, Killestein J, Knol D, Barkhof F, Polman C, Dijkstra C, de Vries H, Meilhof J (2004): Monocyte activation and disease activity in multiple sclerosis. A longitudinal analysis of serum MRP8/14 levels. J Neuroimmunol <u>148</u>, 172–177
- Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H (2001): Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunity <u>14</u>, 547–560
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain <u>132</u>, 1175–1189
- Gametchu B (1987): Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. Science <u>236</u>, 456–461

- Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM (1997): The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. Brain <u>120</u>, 1461–1483
- Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J (2006): S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. Biochem Pharmacol <u>72</u>, 1622–1631
- Gelfand J (2014): Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. Handb Clin Neurol <u>122</u>, 269–290
- Geppert M, Ostertag, CB, Seitz, G, Kiessling, M (1990): Glucocorticoid therapy obscures the diagnosis of cerebral lymphoma. Acta Neuropathol <u>80</u>, 629–634
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol <u>133</u>, 1710–1715
- Geurts JJG (2008): Is progressive multiple sclerosis a gray matter disease? Ann Neurol <u>64</u>, 230–232
- Giannini C, Dogan A, Salamao DR (2014): CNS Lymphoma: A practical diagnostic approach. J Neuropath Exp Neurol <u>73</u>, 478–495
- Gold R, Stadelmann C, Linker R, Diem R, Bähr M, Brück W (2005): Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der multiplen Sklerose. Dtsch Arztebl <u>102</u>, 1204–1210
- Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T (2009): Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. Neurology <u>72</u>, 1914
- Gray E, Rice C, Nightingale H, Ginty M, Hares K, Kemp K, Cohen N, Love S, Scolding N, Wilkins A (2013): Accumulation of cortical hyperphosphorylated neurofilaments as a marker of neurodegeneration in multiple sclerosis. Mult Scler <u>19</u>, 153–161
- Greenstein S, Ghias K, Krett N, Rosen S (2002): Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Clin Cancer Res <u>8</u>, 1681–1694
- Günaydin A, Er U, Acuduman A, Sabuncuoğlu H, Oztürk E (2007): Diagnostic and surgical pitfalls of an unusual primary central nervous system lymphoma. Turk Neurosurg <u>17</u>, 129–133
- Haldorsen IS, Espeland A, Larsen JL, Mella O (2005): Diagnostic delay in primary central nervous system lymphoma. Acta Oncol <u>44</u>, 728–734
- Harauz G, Ishiyama N, Hill C, Bates I, Libich D, Farès C (2004): Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. Micron <u>35</u>, 503–542
- Harder A, Dudel C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Brück W (2003): Molecular genetic diagnosis of a primary central nervous system T cell lymphoma. Acta Neuropathol <u>105</u>, 65–68
- Harris NL: Mature B-cell neoplasms. In: Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J (Hrsg.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Band 2; 4. Auflage; IARC, Lyon 2017, 215–344

- Hart MN, Earle KM (1975): Haemorrhagic and perivenous encephalitis: a clinical-pathological review of 38 cases. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>38</u>, 585–591
- Hashmi A, Hussain Z, Faridi N, Khurshid A (2014): Distribution of Ki67 proliferative indices among WHO subtypes of non-Hodgkin's lymphoma: association with other clinical parameters. Asian Pac J Cancer Prev <u>15</u>, 8759–8763
- Hauser S (2015): The Charcot Lecture | Beating MS: A story of B cells, with twists and turns. Mult Scler <u>21</u>, 8–21
- Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL (1988): Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. Ann Neurol <u>24</u>, 523–531
- Heitzmann H, Richards F (1974): Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. Proc Natl Acad Sci USA <u>71</u>, 3537–3541
- Henry JM, Heffner RR, Dillard SH, Earle KM, Davis RL (1974): Primary malignant lymphomas of the central nervous system. Cancer <u>34</u>, 1293–1302
- Hjalgrim H, Rasmussen S, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Munksgaard L, Storm HH, Melbye M (2004): Familial clustering of Hodgkin lymphoma and multiple sclerosis. J Natl Cancer Inst <u>96</u>, 780–784
- Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, Hottinger AF, Preusser M, Rudà R, Schlegel U, Siegal T, Soussain C, Abacioglu U et al. (2015): Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. Lancet Oncol <u>16</u>, e322-332
- Husseini L, Saleh A, Reifenberger G, Hartung H, Kieseier B (2012): Inflammatory demyelinating brain lesions heralding primary CNS lymphoma. Can J Neurol Sci <u>39</u>, 6–10
- Hynson JL, Kornberg AJ, Coleman LT, Shield L, Harvey AS, Kean MJ (2001): Clinical and neuroradiologic features of acute disseminated encephalomyelitis in children. Neurology <u>56</u>, 1308–1312
- Inki P, Jalkanen M (1996): The role of syndecan-1 in malignancies. Ann Med 28, 63-67
- Jelcic I, Nimer FA, Wang J, Lentsch V, Planas R, Jelcic I, Madjovski A, Ruhrmann S, Faigle W, Frauenknecht K et al. (2018): Memory B cells activate brain-homing, autoreactive CD4+ T cells in multiple sclerosis. Cell <u>175</u>, 1–16, e1–e10
- Jorens PG, VanderBorght A, Ceulemans B, Van Bever HP, Bossaert LL, Ieven M, Goossens H, Parizel PM, Van Dijk H, Raus J et al. (2000): Encephalomyelitis-associated antimyelin autoreactivity induced by streptococcal exotoxins. Neurology <u>54</u>, 1433–1441
- Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Hrovathova M, Liautard J, Rossi J, Wijdenes J, Brochier J, Klein B (1998): The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. B J Haematol <u>100</u>, 637–646
- Kaiser R, Czygan M, Kaufmann R, Lücking CH (1995): Intrathecal IgG synthesis: when is determination of oligoclonal bands necessary? Nervenarzt <u>66</u>, 618–623
- Kalus S, Di Muzio B, Gaillard F (2016): Demyelination preceding a diagnosis of central nervous system lymphoma. J Clin Neurosci <u>24</u>, 146–148

- Karaarslan E, Altintas A, Senol U, Yeni N, Dincer A, Bayindir C, Karaagac N, Siva A (2001): Baló's concentric sclerosis: clinical and radiologic features of five cases. Am J Neuroradiol <u>22</u>, 1362–1367
- Karussis D (2014): The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. J Autoimmun <u>48–49</u>, 134–142
- Kenneth M (Hrsg.): Janeways's Immunobiology. 8. Auflage; Garland Publishing Inc., New York 2012
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WEF, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle R-L, Bartke I et al. (1999): Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? J Exp Med <u>189</u>, 865
- Key G, Kubbutat M, Gerdes J (1994): Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. J Immunol Methods <u>117</u>, 113–117
- Khankhanian P, Cozen W, Himmelstein DS, Madireddy L, Din L, van den Berg A, Matsushita T, Glaser SL, Moré JM, Smedby KE et al. (2016): Meta-analysis of genome-wide association studies reveals genetic overlap between Hodgkin lymphoma and multiple sclerosis. Int J Epidemiol <u>45</u>, 728–740
- Kis B, Rumberg B, Berlit P (2008): Clinical characteristics of patients with late-onset multiple sclerosis. J Neurol <u>255</u>, 697–702
- Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2010): The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. Lancet Neurol <u>9</u>, 520–532
- Kon T, Kakita A, Koide A, Mori H, Tanaka R, Takahashi H (2003): A primary CNS lymphoma in spontaneous remission for 3.5 years after initial detection of the lesions by MRI. Brain Tumor Pathol <u>20</u>, 27–31
- Kremenchutzky M, Rice GPA, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC (2006): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: Observations on the progressive phase of the disease. Brain <u>129</u>, 584–594
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader A, Monoranu C-M, Kalled S, Hess D, Serafini B, Aloisi F et al. (2005): BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. J Exp Med 201, 195–200
- Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M: Management of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). In: Evens A, Blum K (Hrsg.): Non-Hodgkin lymphoma. Cancer treatment and research. Band 165; Springer, Cham 2015, 271–288
- Kuhlmann T, Schroter A, Dechent P, Weber F, Rustenbeck H, Füsezi K, Brück W, Ehrenreich H, Frahm J (2001): Diagnosis of a multifocal B cell lymphoma with preceding demyelinating central nervous system lesions by single voxel proton MR spectroscopy. J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>70</u>, 259–262
- Kuhlmann T, Lassmann, H, Brück W (2008a): Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. Acta Neuropathol <u>115</u>, 275–287

- Kuhlmann T, Miron V, Cuo Q, Wegner C, Antel J, Brück W (2008b): Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. Brain <u>131</u>, 1749–1758
- Küker W, Nägele T, Korfel A, Heckl S, Thiel E, Bamberg M, Weller M, Herrlinger U (2005a): Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. J Neurooncol <u>72</u>, 169–177
- Küker W, Nägele T, Thiel E, Weller M, Herrlinger U (2005b): Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI response criteria revised. Neurology <u>65</u>, 1129–1131
- Kuroda Y, Kawasaki T, Haraoka S, Fujiyama F, Kakigi R, Abe M, Tabuchi K, Kuroiwa T, Kishikawa T, Sugihara H (1999): Autopsy report of primary CNS B-cell lymphoma indistinguishable from multiple sclerosis: diagnosis with the immunoglobulin gene rearrangements analysis. J Neurol Sci <u>111</u>, 173–179
- Kurtzke J (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology <u>33</u>, 1444–1452
- Kutzelnigg A, Lassmann H (2014): Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. Handb Clin Neurol <u>122</u>, 15–58
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. Brain <u>128</u>, 2705–2712
- Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Schmidbauer M et al. (2007): Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. Brain Pathol <u>17</u>, 38–44
- Kvarta M, Sharma D, Castellani R, Morales R, Reich S, Kimball A, Shin R (2016): Demyelination as a harbinger of lymphoma: a case report and review of primary central nervous system lymphoma preceded by multifocal sentinel demyelination. BMC Neurol <u>16</u>, 1–7
- Landgren O, Kerstann KF, Gridley G, Mellemkjaer L, Hemminki K, Linet MS, Goldin LR (2005): Re: Familial clustering of Hodgkin lymphoma and multiple sclerosis. J Natl Cancer Inst <u>97</u>, 543–544
- Lang G: Histotechnik Praxislehrbuch für Biomedizinische Analytik. 2.; Springer, Wien 2013
- Laser-Azogui A, Kornreich M, Malka-Gibor E, Beck R (2015): Neurofilament assembly and fucntion during neuronal development. Curr Opin Cell Biol <u>32</u>, 92–101
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. Trends Mol Med <u>7</u>, 115–121
- Lebrun C, Debouverie M, Vermersch P, Clavelou P, Rumbach L, de Seze J, Wiertlevski S, Defer G, Gout O, Berthier F et al. (2008): Cancer risk and impact of disease-modifying treatments in patients with multiple sclerosis. Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl <u>14</u>, 399–405
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG (2004): A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. Lancet <u>364</u>, 2106–2112

- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR (2005): IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. J Exp Med <u>202</u>, 473–477
- Leong AY, Cooper K, Joel F, Leong WM: Antibodies. In: Manual of diagnostic antibodies for immunohistology. 2. Auflage; Greenwich Medical Media Ltd., London 2003, 3–447
- Liew CL, Shyu WC, Tsao WL, Li H (2006): Intravascular lymphomatosis mimicks a cerebral demyelinating disorder. Acta Neurol Taiwan <u>15</u>, 264–268
- Link H, Huang Y (2006): Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. J Neuroimmunol <u>180</u>, 17–28
- Liu C, Lin C (2009): Diagnosis of primary CNS lymphoma. J Med Sci 29, 155–158
- Liu J, Wang Y, Liu Y, Liu Z, Cui Q, Ji N, Sun S, Wang B, Wang Y, Sun X et al. (2017): Immunohistochemical profile and prognostic significance in primary central nervous system lymphoma: Analysis of 89 cases. Oncol Lett <u>14</u>, 5505–5512
- Lossos A, Ashhab Y, Sverdlin E, Amir G, Ben-Yehuda D, Siegal T (2004): Late-delayed cerebral involvement in systemic non-Hodgkin lymphoma. Cancer <u>101</u>, 1843–1849
- Lublin FD (2014): New multiple sclerosis phenotypic classification. Eur Neurol 72, 1-5
- Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Brück W, Gleich G, Ransohoff RM, Trebst C, Weinshenker B, Wingerchuk D, Parisi JE et al. (2002): A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. Brain <u>125</u>, 1450–1461
- Lucchinetti CF, Gavrilova RH, Metz I, Parisi JE, Scheithauer BW, Weigand S, Thomsen K, Mandrekar J, Altintas A, Erickson BJ et al. (2008): Clinical and radiographic spectrum of pathologically confirmed tumefactive multiple sclerosis. Brain <u>131</u>, 1759–1775
- Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C et al. (2011): Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. New Engl J Med <u>365</u>, 2188
- Lucchinetti CF, Guo Y, Popescu BFGh, Fujihara K, Itoyama Y, Misu T (2014): The pathology of an autoimmune astrocytopathy: lessons learned from neuromyelitis optica. Brain Pathol <u>24</u>, 83–97
- Lukas R, Riedell P, Horowitz P, Pytel P, Kamson D (2018): Diagnostic evaluation in primary CNS lymphoma. Neurologist <u>23</u>, 53–54
- Lyons M, Boucher O, Birch B, Patel N (2011): The development of primary central nervous system B-cell lymphoma in multiple sclerosis. Neurohospitalist <u>1</u>, 133–136
- Manoj N, Arivazhagan A, Mahadevan A, Bhat DI, Arvinda HR, Devi BI, Sampath S, Chandramouli BA (2014): Central nervous system lymphoma: patterns of incidence in Indian population and effect of steroids on stereotactic biopsy yield. Neurol India <u>62</u>, 19–25
- Marburg O (1906): Die sogenannte acute Multiple Sklerose (Encephalomyelitis periaxialis scleroticans). Jahrb Psychiat Neurol <u>27</u>, 213–312
- Mathew BS, Carson KA, Grossman SA (2005): Initial response to glucocorticoids. Cancer <u>106</u>, 383–387

- McKay LI, Cidlowski JA (1999): Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-*κ*B and steroid receptor-signaling pathways. Endocr Rev <u>20</u>, 435–459
- Menon M, Nicolae A, Meeker H, Raffeld M, Xi L, Jegalian A, Miller D, Pittaluga S, Jaffe E (2015): Primary CNS T-cell lymphomas: A clinical, morphologic, immunophenotypic, and molecular analysis. Am J Surg Pathol <u>39</u>, 1719–1729
- Miller D, Leary S (2007): Primary-progressive multiple sclerosis. Lancet Neurol 6, 903-912
- Miller DC, Hochberg FH, Harris NL, Gruber ML, Louis DN, Cohen H (1994): Pathology with clinical correlations of primary central nervous system non-Hodgkin's lymphoma. The massachusetts general hospital experience 1958-1989. Cancer <u>74</u>, 1383–1397
- Miyamoto N, Kagohashi M, Nishioka K, Fujishima K, Kitada T, Tomita Y, Mori K, Maeda M, Wada R, Matsumoto M et al. (2006): An autopsy case of Schilder's variant of multiple sclerosis (Schilder's disease). Eur Neurol <u>55</u>, 103–107
- Mokhtari K, Houillier C, Hoang-Xuan K (2012): Brain Biopsy in a Patient Suffering from Primary CNS Lymphoma Treated with Steroids. Eur Assoc Neurooncol Mag <u>2</u>, 95–96
- Möller J, Yanagisawa K, Brady R, Tourtellotte W, Quarles R (1987): Myelin-associated glycoprotein in multiple sclerosis lesions: a quantitative and qualitative analysis. Ann Neurol <u>22</u>, 469–474
- Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, Clanet M, Comi G, Derfuss T, Fazekas F et al. (2018): ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. Eur J Neurol <u>25</u>, 215–237
- Moore GRW, Neumann PE, Suzuki K, Lijtmaer HN, Traugott U, Raine CS (1985): Balo's concentric sclerosis: New observations on lesion development. Ann Neurol <u>17</u>, 604–611
- Mulisch M, Welsch U (Hrsg.): Romeis Mikroskopische Technik. 19. Auflage; Springer Spektrum, Heidelberg 2015
- Murthy SNK, Faden HS, Cohen ME, Bakshi R (2002): Acute Disseminated Encephalomyelitis in Children. Pediatrics <u>110</u>, e21–e21
- Naeem S, Niazi F, Baig A, Sadig H, Sattar M (2018): Primary CNS lymphoma vs. tumefactive multiple sclerosis: A diagnostic challenge. J Coll Physicians Surg Pak <u>28</u>, 66–68
- Newell GR (1970): Etiology of multiple sclerosis and Hodgkin's disease. Am J Epidemiol <u>91</u>, 119–122
- Ng S, Butzkueven H, Kalnins R, Rowe C (2007): Prolonged interval between sentinel pseudotumoral demyelination and development of primary CNS lymphoma. J Clin Neurosci <u>14</u>, 1126–1129
- Nguyen T, Mehta N, Conant K, Kim K, Jones M, Calabresi P, Melli G, Hoke A, Schnaar R, Ming G et al. (2009): Axonal protective effects of the myelin associated glycoprotein. J Neurosci <u>29</u>, 630–637

- Niedziela N, Adamczyk-Sowa M, Pierzchała K (2014): Epidemiology and clinical record of multiple sclerosis in selected countries: a systematic review. Int J Neurosci <u>124</u>, 322–330
- Nitsch R, Pohl EE, Smorodchenko A, Infante-Duarte C, Aktas O, Zipp F (2004): Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. J Neurosci <u>24</u>, 2458–2464
- Noseworthy J, Paty D, Wonnacott T, Feasby T, Ebers G (1983): Multiple sclerosis after age 50. Neurology <u>33</u>, 1537–1544
- Ohe Y, Hayashi T, Mishima K, Nishikawa R, Sasaki A, Matsuda H, Uchino A, Tanashani N (2013): Central nervous system lymphoma initially diagnosed as tumefactive multiple sclerosis after brain biopsy. Intern Med <u>52</u>, 483–488
- Önder E, Arıkök AT, Önder S, Han Ü, Sorar M, Kertmen H, Yılmaz ED, Fesli R, Alper M (2015): Corticosteroid pre-treated primary CNS lymphoma: a detailed analysis of stereotactic biopsy findings and consideration of interobserver variability. Int J Clin Exp Pathol <u>8</u>, 7798–7808
- Ormsby A, Prayson R, Heard R (1999): Angiotrophic large cell lymphoma mimicking multiple sclerosis associated transverse myelitis. J Clin Neurosci <u>6</u>, 408–410
- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC (2006): Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. Lancet Neurol <u>5</u>, 932–936
- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2015): CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2008-2012. Neuro Oncol <u>17</u>, iv1– iv62
- Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Brück W, Budka H, Jellinger K, Lassmann H (1994): Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. Brain <u>117</u>, 1311–1322
- Parolini D, Cassinelli L, Razini P, Sitzia C, Tonna N, Erratico S, Colleoni F, Angeloni V, Maffioli E, Farini A et al. (2012): Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal muscle. Int J Biochem Cell Biol <u>44</u>, 2095–2105
- Partap S, Spence AM (2006): Spontaneously relapsing and remitting primary CNS lymphoma in an immunocompetent 45-year-old man. J Neurooncol <u>80</u>, 305–307
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006): Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. Brain <u>129</u>, 3165–3172
- Paulus W, Roggendorf W, Kirchner T (1992): Ki-M1P as a marker for microglia and brain macrophages in routinely processed human tissues. Acta Neuropathol <u>84</u>, 538–544
- Pirotte B, Levivier M, Goldman S, Brucher JM, Brotchi J, Hildebrand J (1997): Glucocorticoid-induced long-term remission in primary cerebral lymphoma: case report and review of the literature. J Neurooncol <u>32</u>, 63–69

- Pittock SJ, Weinshenker BG, Lucchinetti CF, Wingerchuk DM, Corboy JR, Lennon VA (2006): Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. Arch Neurol <u>63</u>, 964–968
- Polliack ML, Barak Y, Achiron A (2001): Late-onset multiple sclerosis. J Am Geriatr Soc <u>49</u>, 168–171
- Popescu B, Lucchinetti C (2012): Pathology of demyelinating diseases. Annu Rev Pathol <u>7</u>, 185–217
- Porter A, Giannini, C, Kaufmann T, Lucchinetti C, Wu W, Decker P, Atkinson J, O'Neill B (2008): Primary central nervous system lymphoma can be histologically diagnosed after previous corticosteroid use: A pilot study to determine whether corticosteroids prevent the diagnosis of primary central nervous system lymphoma. Ann Neurol <u>63</u>, 662– 667
- Poser C: Myelinoclastic diffuse sclerosis. In: Vinken P, Bruyn G, Klawans H (Hrsg.): Handbook of clinical neurology. Band 47; Elsevier, Amsterdam 1985, 419–428
- Prineas JW, Barnard RO, Revesz T, Kwon EE, Sharer L, Cho E-S (1993): Multiple sclerosis: Pathology of recurrent lesions. Brain <u>116</u>, 681–693
- Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP (2001): Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. Ann Neurol 50, 646–657
- Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J (1998): Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. J Clin Invest <u>102</u>, 1045–1050
- Radzun H, Hansmann M, Heidebrecht H, Bödewadt-Radzun S, Wacker H, Kreipe H, Lumbeck H, Hernandez C, Kuhn C, Parwaresch M (1991): Detection of a monocyte/macrophage differentiation antigen in routinely processed paraffin-embedded tissues by monoclonal antibody Ki-M1P. Lab Invest <u>65</u>, 306–315
- Rozenblum G, Kaufman T, Vitullo A (2014): Myelin basic protein and a multiple sclerosis-related MBP-peptide bind to oligonucleotides. Mol Ther Nucleic Acids <u>3</u>, 1–9
- Sadovnick AD, Ebers GC (1993): Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. Can J Neurol Sci <u>20</u>, 17–29
- Salzer J, Holmes W, Colman D (1987): The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. J Cell Biol <u>104</u>, 957–965
- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE et al. (2011): Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature <u>476</u>, 214
- Saxena A, Martin-Blondel G, Mars L, Liblau R (2011): Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. FEBS Lett <u>585</u>, 3758–3763
- Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, Ebers GC (2010): The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: relapses and long-term disability. Brain <u>133</u>, 1914–1929

- Schilder P (1912): Zur Kenntnis der sogenannten diffusen Sklerose. (Über Encephalitis periaxialis diffusa.). Z Ges Neurol Psychiatr <u>10</u>, 1–60
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods <u>9</u>, 676
- Schnaar R, Lopez P (2009): Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. J Neurosci Res <u>87</u>, 3267–3276
- Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol <u>182</u>, 311–322
- Scott BJ, Douglas VC, Tihan T, Rubenstein JL, Josephson SA (2013): A systematic approach to the diagnosis of suspected central nervous system lymphoma. JAMA Neurol <u>70</u>, 311–319
- Selle K: Histology and Histochemical Stains. In: Humphrey P, Dehner L, Pfeifer J, Dehner L (Hrsg.): The washington manual of surgical pathology. 3. Auflage; Lippincott Williams & Wilkens in Wolters Kluwer, Philadelphia 2019, 801–808
- Shiels MS, Pfeiffer RM, Besson C, Clarke CA, Morton LM, Nogueira L, Pawlish K, Yanik EL, Suneja G, Engels EA (2016): Trends in primary central nervous system lymphoma incidence and survival in the U.S. Br J Haematol <u>174</u>, 417–424
- Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM (2013): Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. Trends Immunol <u>34</u>, 410–422
- Sinha S, Itani F, Karandikar N (2014): Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. Immunol Res <u>59</u>, 254–265
- Smedby KE, Baecklund E, Askling J (2006): Malignant lymphomas in autoimmunity and inflammation: a review of risks, risk factors, and lymphoma characteristics. Cancer Epidemiol Biomark Prev <u>15</u>, 2069–2077
- Smestad C, Sandvik L, Landrø NI, Celius EG (2010): Cognitive impairment after three decades of multiple sclerosis. Eur J Neurol <u>17</u>, 499–505
- Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brück W, Hohlfeld R, Lassmann H (2002): BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? Brain <u>125</u>, 75–85
- Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T, Guseo A, Lucchinetti CF, Leel-Össy L, Ordinario AT, Brück W, Lassmann H (2005): Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Baló's type of multiple sclerosis. Brain <u>128</u>, 979–987
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallström E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H (1998): Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. Brain Pathol <u>8</u>, 681– 694
- Suzuki M, Uchiyama T, Takahashi H, Ito M, Shimizu T, Kobayashi H, Ohashi T (2009): A case report of primary central nervous system lymphoma preceded by cerebral and cerebellar lesion diminishing spontaneously: consideration of two brain biopsy at the onset and after two years. Rinsho Shinkeigaku <u>49</u>, 586–589

Tabira T (1994): Concentric sclerosis (Baló). Nihon Rinsho 52, 2971-2975

- Takekawa H, Hozumi A, Hirata K, Yamazaki K (2008): A spontaneously vanishing primary cerebral lymphoma "ghost tumour". J Neurol Neurosurg Psychiatry <u>79</u>, 1159–1159
- Tedder T, Engel P (1994): CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunol Today <u>15</u>, 450–454
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol <u>17</u>, 162–173
- Thotakura M, Tirumalasetti N, Krishna R (2014): Role of Ki-67 labeling index as an adjunct to the histopathological diagnosis and grading of astrocytomas. J Cancer Res Ther <u>10</u>, 641–645
- Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, Battapady H, Mork S, Ontaneda D, Jones SE et al. (2018): Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. Lancet Neurol <u>17</u>, 870–884
- Traugott U, Reinherz E, Raine C (1983): Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. J Neuroimmunol <u>4</u>, 201– 221
- Utsuki S, Oka H, Miyazaki T, Yamazaki T, Yasui Y, Fujii K, Kawano N, Tokuyama W, Iwabuchi K, Okayasu I et al. (2010): Primary central nervous system large B-cell lymphoma with prolific, mixed T-cell and macrophage infiltrates, mimicking multiple sclerosis. Brain Tumor Pathol <u>27</u>, 59–63
- Vaquero J, Martínez R, Rossi E, López R (1984): Primary cerebral lymphoma: the "ghost tumor". Case report. J Neurosurg <u>60</u>, 174–176
- Vassall K, Bamm W, Harauz G (2015): MyelStones: the executive roles of myelin basic protein in myelin assembly and destabilization in multiple sclerosis. Biochem J <u>472</u>, 17–32
- Vercellino M, Merola A, Piacentino C, Votta B, Capello E, Mancardi GL, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P (2007): Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage. J Neuropathol Exp Neurol <u>66</u>, 732–739
- von Baumgarten L, Illerhaus G, Korfel A, Schlegel U, Deckart M, Dreyling M (2018): Diagnostik und Therapie primärer ZNS-Lymphome. Dtsch Arztebl Int <u>115</u>, 419–426
- Wache C, Klein M, Ostergaard C, Angele B, Häcker H, Pfister H, Pruenster M, Sperandio M, Leanderson T, Roth J et al. (2015): Myeloid-related protein 14 promote inflammation and injury in meningitis. J Infect Dis <u>212</u>, 247–257
- Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM (2006): Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. Neurology <u>67</u>, 960–967
- Weingarten KL, Zimmerman RD, Leeds NE (1983): Spontaneous regression of intracerebral lymphoma. Radiology <u>149</u>, 721–724

- Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. Brain <u>112</u>, 133–146
- Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG (1999): The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). Neurology <u>53</u>, 1107–1114
- Yamamoto J, Shimajiri S, Nakano Y, Nishizawa S (2014): Primary central nervous system lymphoma with preceding spontaneous pseudotumoral demyelination in an immunocompetent adult patient: A case report and literature review. Oncol Lett <u>7</u>, 1835–1838
- Yang J, Wu S (2007): Multiple sclerosis preceding CNS lymphoma: a case report. Acta Neurol Taiwan <u>16</u>, 92–97
- Young C, Gordon N, Safran HP, Schatz S, Stopa E, King TC (1996): Monoclonal B-cell population mimicking lymphoma in a patient with multiple sclerosis. Arch Pathol Lab Med <u>120</u>, 275–278
- Young NP, Weinshenker BG, Parisi JE, Scheithauer B, Giannini C, Roemer SF, Thomsen KM, Mandrekar JN, Erickson BJ, Lucchinetti CF (2010): Perivenous demyelination: association with clinically defined acute disseminated encephalomyelitis and comparison with pathologically confirmed multiple sclerosis. Brain <u>133</u>, 333–348

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler, für ihre offene, fröhliche Art, stetige konstruktive Beratung und ansteckende Begeisterung.

Ich möchte Herrn Dr. med. Alonso Barrantes-Freer vielmals danken für seine freundliche, stets hilfsbereite Art, die Spontanität, den Enthusiasmus für die Neuropathologie und mein Dissertationsthema sowie die hervorragende Betreuung.

Außerdem möchte ich Melanie Lohrberg für ihre stets hilfsbereite und gründliche Art und den bereichernden Austausch danken.

Weiterhin möchte ich Frau Katja Schulz für die Einführung in die histologischen und immunhistochemischen Färbemethoden und wertvolle Unterstützung danken.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie an der UMG gilt mein Dank für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.